

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

Первый Московский государственный медицинский университет

им. И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(Сеченовский Университет)

**Институт психолого-социальной работы**

Кафедра медицины труда, авиационной, космической и водолазной  
медицины Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана

**Выпускная квалификационная работа**

**Изучение матриксных металлопротеиназ у больных с бронхолёгочной  
патологией**

Направление подготовки 31.02.03 Лабораторная диагностика

**Исполнитель:**

Бобовская Татьяна Андреевна  
(гр.24-01, очная форма подготовки)

Москва 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1. Патогенетические механизмы развития бронхолегочной патологии .....	6
1.2. Механизмы формирования профессиональной бронхиальной астмы ..	11
1.3. Характеристика внеклеточного матрикса ткани легких .....	13
1.4. Матриксные металлопротеиназы как биомаркеры бронхолегочных заболеваний.....	17
ГЛАВА 2 ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	28
2.1. Общая клиническая характеристика обследованных больных.....	28
2.2. Методы исследования.....	30
ГЛАВА 3.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ .....	48

## ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени заболевания органов дыхания представляют собой важную социально-медицинскую проблему во всем мире, поскольку по удельному весу в общей смертности населения они занимают одно из ведущих мест, а наносимый обществу вследствие высокой заболеваемости и инвалидизации больных экономический ущерб огромен. В течение последних десятилетий регистрируется неуклонный рост общей заболеваемости болезнями органов дыхания. По данным официальной статистики на долю органов дыхания приходится около 40 % всех случаев заболеваемости, что значительно превосходит уровни заболеваемости по другим классам болезней.

Бронхиальная астма (БА) – широко распространенное заболевание, которое сопровождается значительной морбидностью, что определяет ее как серьезную медицинскую и социально-экономическую проблему. Профессиональной бронхиальной астмой (ПБА) болеют лица трудоспособного возраста, что сопровождается значительными финансовыми затратами, снижением качества жизни, потерей трудоспособности, а при неадекватных подходах к ведению больных профессиональной бронхиальной астмы – увеличением летальности. В последние десятилетия в большинстве стран отмечается нарастание распространенности БА [1,2]. Бронхиальная астма в настоящее время рассматривается как экологически зависимое заболевание, так как многочисленные исследования свидетельствуют о весьма устойчивой связи между распространенностью и уровнем промышленного загрязнения атмосферы [1,2]. Данные Федеральной целевой программы «Бронхиальная астма» 2011-2015 г. в России, полученные с использованием программы ISAAC и по программе ECRHS (The European Community Respiratory Health Survey), свидетельствуют, что бронхиальной астмой страдают от 4 до 8% населения России [1,2]. Во взрослой популяции этот показатель находится в пределах 5%. Общее число больных

бронхиальной астмой в стране приближается к 7 млн. человек, из них около 1 млн. больных имеют тяжелую форму заболевания. Ежегодно количество случаев возрастает в среднем на 7% [3,4]. У россиян частота симптомов текущей бронхиальной астмы в 1,5-6 раз выше, чем в европейских странах. От 10 до 15% случаев бронхиальной астмы связаны с профессиональной деятельностью. В структуре профессиональной патологии профессиональная астма занимает от 12,5 до 15,7%. Каждый шестой случай астмы у взрослых трудоспособного возраста обусловлен действием профессиональных факторов.

На сегодняшний день роль в развитии заболеваний легких матриксных металлопротеиназ является актуальной проблемой в медицине. В 1963 году Laurell и Eriksson привели наблюдение, что у лиц с дефицитом  $\alpha$ -1-антитрипсина, который ингибирует ряд сывороточных протеиназ, таких как нейтрофильная эластаза, отмечается повышенный риск развития эмфиземы, так как нейтрофильная эластаза разрушает эластин, являющийся основным компонентом стенки альвеол [5,6].

Кроме того, оказывая воздействие на макрофаги и нейтрофилы, фрагменты эластина участвуют в поддержании процессов воспаления. Хотя на сегодняшний день дефицит  $\alpha$ -1-антитрипсина разграничен с понятием хронических обструктивных заболеваний легких, изменения экстрацеллюлярного матрикса при заболеваниях органов дыхания обусловлены нарушением баланса между факторами, которые вызывают его деградацию и факторами, оказывающими стимулирующее воздействие на фибрилlogenез. Факторами деградации являются сигаретный дым, оксиданты и матриксные металлопротеиназы (ММП).

Матриксные металлопротеиназы рассматриваются как ключевые эффекторы тканевого ремоделирования в силу ряда причин: эти белки экспрессируются на всех этапах онтогенеза во всех тканях, они секретируются в межклеточное пространство и функционируют в

физиологических условиях, в условиях интенсивной тканевой перестройки их экспрессия тонко регулируется и активируется.

Структурные нарушения при хронических заболеваниях легких и эмфиземе легких, такие как потеря легочной ткани и нарушение альвеолярной архитектоники, обусловлены качественными и количественными локальными изменениями экстрацеллюлярного матрикса. И поэтому является актуальной проблемой и требует дальнейшего изучения роль матриксных металлопротеиназ в процессе трансформации легочной ткани и возникновении заболеваний дыхательной системы.

**Целью** работы является изучение состояния системы матриксных металлопротеиназ у больных с бронхолегочной патологией для оценки выраженности воспалительных и деструктивных процессов больных профессиональной бронхиальной астмой.

В рамках поставленной цели решаются следующие задачи:

1. Определить количественное содержание матрикс-разрушающих металлопротеиназ (про-ММР-1 и ММР-8) в сыворотке крови методом твердофазного ИФА – «Сэндвич».
2. Проанализировать состояние системы матрикс-разрушающих металлопротеиназ у больных профессиональной бронхиальной астмой и лиц без бронхолегочной патологии.
3. Оценить выраженности воспалительных и деструктивных процессов у больных профессиональной бронхиальной астмой, с целью оценки тяжести клинического течения и проведения профилактических и лечебных мероприятий.

Работа выполнена в лаборатории медико-биологических исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Патогенетические механизмы развития бронхолегочной патологии**

В России последние 25 лет характеризуются стремительным распространением инфекционных, аллергических, злокачественных новообразований органов дыхания, экологически обусловленных заболеваний легких, профессиональной патологии.

По прогнозам специалистов XXI век станет веком легочной патологии из-за резкого изменения экологической обстановки, и указанная группа заболеваний будет делить первые места с патологией сердечно-сосудистой системы и новообразованиями. В середине 90-х годов Европейское Респираторное Общество стимулировало проведение мультицентрических эпидемиологических исследований по наиболее распространенным заболеваниям органов дыхания. Проведенные в России исследования свидетельствуют о том, что более 25% больных ежедневно обращаются к врачам общей практики, с заболеваниями органов дыхания преимущественно верхнего отдела [6].

Общее название «хронические респираторные заболевания» объединяет целый ряд серьезных заболеваний. К предупреждаемым хроническим заболеваниям бронхолегочной системы относятся хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма и респираторные аллергии, профессиональные заболевания легких и легочная гипертензия. Они представляют, особенно среди социально уязвимых групп, серьезную угрозу для общества. По свидетельству экспертов ВОЗ, хронические заболевания легких станут не только одной из самых распространенных форм патологии человека, но и займут место в числе лидирующих причин смертельных исходов.

Болезни органов дыхания обладают социально обусловленным характером. Возникновение многих из них связано с влиянием, которое

оказывают различные социально-гигиенические факторы, среди которых наибольшее значение принадлежит профессиональным, экологическим, социальным.

В настоящее время по данным различных авторов зарегистрировано и описано от 16 до 30 основных факторов риска, способствующих развитию хронических заболеваний респираторной системы. Эти факторы можно объединить в несколько групп, среди которых выделяются биологические, социальные, социально-экологические, психологические, социально-демографические и др. Среди этих факторов наиболее значимыми и общепризнанными являются: профессиональные агенты, запыленность и загазованность атмосферного воздуха, длительность и интенсивность табакокурения, злоупотребление алкоголем, повторные острые респираторные заболевания и острые пневмонии, сенсibilизация к аллергенам, неблагоприятные природно-климатические условия, физическое и нервно-психическое перенапряжение, низкий социально-экономический статус, этнические особенности, отягощенный преморбидный фон, болезни матери во время беременности, нездоровое питание, гиподинамия, снижение иммунологической реактивности [7].

Основными факторами риска развития бронхолегочной патологии являются курение, генетически детерминированные аномалии на молекулярном уровне, например, неполноценность «протеазно-ингибиторной» системы, экспозиция неблагоприятных внешних и производственных факторов. Кроме того, имеется множество возможных и вероятных факторов риска, которые включают в себя воздушные поллютанты, пассивное курение, частые респираторные инфекции, социально-экономические факторы, повышенную реактивность бронхов и другие.

Интенсификация современного- производства как, одно из проявлений научно-технического прогресса способствует росту профессиональной патологии.

В развитии хронических неспецифических заболеваний легких выделяются четыре основных этапа:

- ситуация угрозы с наличием факторов риска;
- предболезнь;
- развернутая клиническая картина заболевания;
- осложнения болезни.

В качестве основных факторов риска развития бронхолегочной патологии общепризнанными являются курение, генетически детерминированные аномалии на молекулярном уровне, например, неполноценность «протеазно-ингибиторной» системы, воздействие неблагоприятных внешних и производственных факторов [8].

Кроме того, отмечается наличие множества возможных и вероятных факторов риска, к которым можно отнести такие факторы, как пассивное курение, воздушные поллютанты, социально-экономические факторы, частые респираторные инфекции, повышенная реактивность бронхов и другие.

Интенсификация технологических процессов современного производства как одно из проявлений научно-технического прогресса является одной из причин увеличения количества случаев профессиональной патологии. Профессиональные заболевания, которые составляют одну из самых многочисленных групп заболеваний, могут рассматриваться как причина не только самой высокой инвалидизации пациентов, но и одной из частых причин, способствующих росту смертности работоспособного населения на земном шаре.

Профессиональные заболевания, которые обусловлены наличием различных профессиональных вредностей, не следует рассматривать как неизбежное явление. Во многом возникновение профессиональных заболеваний определяется несовершенством технологических процессов и оборудования. Проблема профессиональной патологии должна



рассматриваться и решаться не только как медицинская проблема, но также и проблема социальная, и экономическая.

Патогенетические механизмы формирования хронических заболеваний системы органов дыхания у работающих во вредных условиях труда являются достаточно сложными, в пользу чего свидетельствует многообразие различных форм этих заболеваний, при которых преобладают разные компоненты и имеются различные изменения легочной ткани. Воздействие техногенных стресс-факторов вызывает напряжение неспецифических компенсаторных механизмов организма человека, что приводит к развитию общего адаптационного синдрома и повышению резистентности организма соответственно качественной и количественной характеристике повреждающего агента.

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что характер развития патологии в бронхолегочном аппарате, клинические проявления и течение заболеваний легких у работающих определяется не только характером, составом и длительностью воздействия вредных факторов, но и индивидуальными особенностями организма

Изучение с точки зрения этиологии и патогенеза на молекулярном и генетическом уровне профессиональной патологии является востребованным с одной стороны в целях оказания грамотной патогенетически обоснованной терапии, с другой для осуществления соответствующих мероприятий, которые должны быть направлены на совершенствование научно-технических производственных процессов и совершенствование системы профилактических и реабилитационных мероприятий.

У работающих во вредных условиях труда патогенетические механизмы формирования хронических заболеваний бронхолегочной системы являются сложными, на что указывает многообразие встречающихся форм, характеризующихся преобладанием различных компонентов (токсико-аллергического, инфекционно- воспалительного,

воспалительно-деструктивного) и наличием различных регионарных изменений (пневмосклероза, бронхоэктазий, эмфиземы легких) [9, 10].

Воздействие техногенных стресс-факторов вызывает развитие напряжения неспецифических компенсаторных механизмов в организме человека, что является причиной развития общего адаптационного синдрома и повышения резистентности организма адекватно качественной и количественной характеристике воздействующих раздражителей.

Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о том, что у работающих во вредных условиях труда характер развития патологии в бронхолегочном аппарате, клинические проявления и течение заболеваний легких определяется не только характером, составом и длительностью воздействия патогенных факторов, но и индивидуальными особенностями организма [11].

Воспалительные изменения, которые обусловлены патологическим воздействием ингаляционных повреждающих агентов, являются причиной изменений в стенках верхних и нижних дыхательных путей, паренхиме легких, легочных сосудах.

Многие вопросы патогенеза пылевой профессиональной бронхолегочной патологии, развитие которой обусловлено воздействием промышленных аэрозолей сложного состава, остаются до настоящего времени нерешенными, что является фактором, определяющим необходимость использования современных подходов к изучению развития данной нозологии на клеточном, молекулярном и молекулярно-генетическом уровне.

В процессах воспаления и репарации принимают участие многие клетки: альвеолярные макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и другие. Считается, что центральной клеткой воспаления является альвеолярный макрофаг. Повреждение эпителиальных клеток оказывает модулирующий эффект на развитие подлежащей соединительной ткани и может также приводить к развитию фиброза [12, 13, 14]

## **1.2. Механизмы формирования профессиональной бронхиальной астмы**

Бронхиальная астма остается одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем. За последнее десятилетие наблюдается значительное увеличение количества случаев аллергических заболеваний, прежде всего бронхиальной астмы, которая рассматривается как проблема мирового уровня и находится в центре внимания клиницистов различных специальностей. По данным ВОЗ, около 300 млн людей в мире страдают бронхиальной астмой. Согласно имеющимся прогнозам, к 2025 г. этот показатель может составить 400 миллионов. Хронизация патологического процесса приводит к ухудшению качества жизни больных, снижению их активности, инвалидизации и смертности [15].

Бронхиальная астма представляет собой хроническое заболевание, в основе которого лежат воспалительные процессы в дыхательных путях с участием разнообразных клеточных элементов, в особенности тучных клеток и эозинофильных лейкоцитов, который вызывает у предрасположенных лиц симптомы бронхиальной обструкции, обычно спонтанно обратимой, либо устраняемой полностью или частично под воздействием лечения.

В соответствии с современными представлениями факторы риска развития бронхиальной астмы классифицируются на внутренние (врожденные, эндогенные) и наружные (экзогенные). Причинами возникновения патологических изменений при бронхиальной астме могут быть разнообразные триггеры, такие как вирусные инфекции, аллергены, физическая нагрузка, табачный дым, внешние химические поллютанты на фоне воздействия генетических факторов

В качестве профессиональных рассматриваются те случаи бронхиальной астмы, когда основным вызывающим ее фактором является какой-либо фактор окружающей производственной среды. Заболевание может проявлять себя либо ухудшением течения ранее существующей бронхиальной астмы, либо в качестве впервые возникшей патологии.

Причинные профессиональные факторы можно разделить на три группы: высокомолекулярные вещества, низкомолекулярные вещества и высокие концентрации раздражителей, газов и паров. Эти вещества могут вызывать выделение медиаторов неиммунологическим путем, быть аллергенами, или оказывать свое воздействие как раздражители [16, 17].

Проведенные в настоящее время эпидемиологические исследования свидетельствуют, что удельный вес профессиональной бронхиальной астмы среди всех случаев бронхиальной астмы колеблется в пределах от 2 до 15%.

Частота впервые возникших случаев профессиональной бронхиальной астмы в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства составляет 2,3 - 26,5% [18, 19].

Профессиональную бронхиальную астму классифицируют на аллергическую, неаллергическую и сочетанную с участием аллергических, неаллергических механизмов и инфекционного компонента. У значительной части больных бронхиальной астмой изменение реактивности бронхов обусловлено нарушениями иммунокомпетентной системы, которые развиваются по I, III и IV типам реакций гиперчувствительности по классификации Селла и Кумбса, т.е. сопровождаются процессами изменения гуморального и клеточного иммунитета.

Развитие иммунных реакций осуществляется в слизистой оболочке респираторного тракта. Изменение реактивности бронхов, которое приводит к возникновению приступов бронхиальной астмы, может быть связано с наличием врожденных и приобретенных биологических дефектов. Неиммунологические механизмы оказывают воздействие на первичные или вторичные клетки-эффекторы, либо на рецепторы гладкомышечных клеток бронхов, сосудов, клеток бронхиальных желез [20].

Изменение реактивности клеток-мишеней происходит под воздействием различных физических, механических и химических раздражителей и прежде всего тучных клеток.

Изменение реактивности тучных клеток сопровождается избыточной продукцией биологически активных веществ, в первую очередь лейкотриенов, гистамина и других. В ответ на их выделение происходит развитие спазма бронхов, отека слизистой оболочки, нарушения секреции (гипер- и дискриния) бронхиальных желез. Все это приводит к резкому изменению проходимости бронхов и вызывает приступы удушья.

Центральным звеном в патогенезе бронхиальной астмы является изменения реактивности бронхов, что является следствием воспалительного процесса бронхиальной стенки и определяется как повышенная чувствительность дыхательных путей к факторам, являющимся индифферентными для здоровых лиц.

Исследованиями отечественных авторов (Румянцева О.И.) были выявлены клинические особенности, которые являются характерными для различных форм профессиональной бронхиальной астмы от воздействия промышленных аэрозолей: тяжелое, быстро прогрессирующее течение болезни, которое сопровождается ранним развитием осложнений и неблагоприятным прогнозом при профессиональной бронхиальной астме, ассоциированной с инфекцией; при своевременной элиминации аллергена у больных аллергической формой профессиональной бронхиальной астмы более благоприятное течение с тенденцией к регрессу [21, 22].

### **1.3. Характеристика внеклеточного матрикса ткани легких**

Внеклеточный матрикс представляет собой многокомпонентную субстанцию, в которую погружаются все клетки организма человека. Интерес к внеклеточному матриксу в последнее десятилетие значительно возрос. Это обусловлено установлением его роли в клеточной дифференцировке, старении, успешной терапии рака и лечении некоторых наследственных болезней.

Внеклеточный или экстрацеллюлярный матрикс представляет собой не только структурную основу организации тканей, но и среду, в которой осуществляется регулирование дифференциации клеток и их миграции биохимическими и биомеханическими сигналами. В экстрацеллюлярном матриксе осуществляются процессы модулирования иммунных реакций, инициации ангиогенеза, осуществляется поддержание коагуляционного гомеостаза [23].

Экстрацеллюлярный (внеклеточный) матрикс представляет собой сложную сетчатую структуру, состоящую преимущественно из белков и углеводов, и в настоящее время экстрацеллюлярный матрикс рассматривается в качестве ключевого регулятора организации тканей и гомеостаза. В каждом органе состав экстрацеллюлярного матрикса отличается своими особенностями, включает разнообразные фибриллярные компоненты, такие как фибронектин и эластин, коллагены различных типов и нефибриллярные молекулы, такие как протеогликаны, гликопротеины, гиалуронан и матриксные белки.

Внеклеточный матрикс представляет собой активную структуру, в которой постоянно осуществляются процессы синтеза новых молекул структурных компонентов и параллельно процессы их деградации, которая осуществляется преимущественно при участии ферментов, в том числе таких, как матриксные металлопротеиназы [24].

На синтез и разрушение компонентов экстрацеллюлярного матрикса оказывают сложное регуляторное влияние различные вещества, являющиеся медиаторами, цитокины, метаболические, а также эпигенетические и средовые воздействия. В настоящее время получено большое количество доказательств, что при различных патологических состояниях изменения внеклеточного матрикса играют важную роль.

В организме происходит одновременное протекание двух процессов: непрерывной деградации экстрацеллюлярного матрикса под влиянием специальных ферментов и параллельное осуществление синтеза компонентов

матрикса с его перестройкой. Данные изменения внеклеточного матрикса оказывают влияние на клетки, регулируют их пролиферацию, миграцию и дифференцировку.

Необходимым условием в соединительной ткани для обеспечения миграции и пролиферации клеток является локальная деградация экстрацеллюлярного матрикса.

Перестройка внеклеточного матрикса, т.е. его структурно-геометрические изменения, получила название ремоделирование. В здоровом организме ремоделированию принадлежит важная физиологическая роль, а его аномалии рассматриваются как важное звено в патогенезе различных патологических процессов. В здоровом организме ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса наблюдается от рождения до состояния зрелости и является компонентом процессов роста. Аномальное ремоделирование внеклеточного матрикса может сопровождать многие патологические состояния.

Проявление такого ремоделирования характерно в том числе для развития хронических заболеваний легких, в частности бронхиальной астмы. По результатам многочисленных проведенных исследований с применением современных методов визуализации у значительной доли детей с atopической бронхиальной астмой были выявлены гипертрофические изменения глоточной миндалины, аномалии внутриносовых структур, дебютирующая гипертрофия слизистой оболочки полости носа. Это, с одной стороны, может рассматриваться как одно из проявлений мультиморбидности патологических изменений при респираторной аллергии у детей и являться косвенным свидетельством системного вовлечения в патологический процесс экстрацеллюлярного матрикса [25, 26].

С другой стороны, выявленные изменения могут быть свидетельством наличия патологического ремоделирования, которое заключается в том числе в потенцировании в верхних дыхательных путях гипертрофических изменений у детей с atopической бронхиальной астмой.

Среди биомаркеров нарушения метаболизма внеклеточного матрикса, обусловленного процессами деградации эластина, особое место отводится аминокислотам десмозину и изодесмозину, существование которых возможно только в матрице эластина. Содержание данных аминокислот может быть измерено с высоким уровнем точности в плазме, моче и мокроте. Количественные данные уровня этих аминокислот отражают изменения в системном балансе между активностью и ингибированием эластазы, которые вызываются системными воспалительными состояниями. В мокроте уровни этих биомаркеров являются отражением состояния деградации эластина в легких. Накопленные за несколько десятилетий клинические данные указывают на корреляцию уровней десмозина и изодесмозина и хронических заболеваний легких различной степени тяжести и характера ответа на терапию.

Матриксные металлопротеиназы осуществляют разрушение как коллагенов, так и протеогликанов. Важным является анализ баланса между протеазами экстрацеллюлярного матрикса и веществами, оказывающими на них ингибирующее воздействие. Так, например, при хронических процессах в легких между протеазами и антипротеазами описан дисбаланс, что подтверждается избытком матриксных металлопротеиназ и относительным дефицитом тканевого ингибитора металлопротеиназ (TIMP) [27, 28].

Некоторые из металлопротеиназ рассматриваются в качестве биомаркеров состояния внеклеточного матрикса для практического использования, например, для измерения отношения TIMP/MMP-9 в супернатантах мокроты или фиброцитах крови. По данным ряда авторов, уровень MMP-9, содержащейся в слюне, не коррелирует с функцией легких у пациентов с хроническими патологическими процессами в легких, тогда как у больных старшей возрастной группы возраст достоверно коррелировал с уровнями MMP-3 слюны.



Единичные работы посвящены определению уровня отдельных металлопротеиназ при бронхиальной астме, эозинофильном фасциите. Некоторые авторы отмечают, что у пациентов с бронхиальной астмой уровень MMP-1 дыхательных путей был в 5,4 раза выше, чем у лиц группы контроля, а число тучных клеток было связано с пролиферацией гладкомышечных клеток бронхов, тогда как белок MMP-1 ассоциируется с гиперреактивностью дыхательных путей. На этом основании был сделан вывод о том, что активация MMP-1 осуществляется посредством триптазы тучных клеток, что ведет к пролиферативной активности внеклеточного матрикса и что взаимодействия гладкомышечных клеток бронхов и тучных клеток могут способствовать утяжелению течения бронхиальной астмы путем кратковременно увеличивающейся активации MMP, роста гладкомышечных клеток и гиперреактивности дыхательных путей [29, 30].

#### **1.4. Матриксные металлопротеиназы как биомаркеры бронхолегочных заболеваний**

Матриксные металлопротеиназы (ММП) являются представителями семейства цинковых металлопротеиназ, выполняющих функцию, связанную с обменом белков межклеточного матрикса. В развитии таких физиологических процессов, как морфогенез, адгезия, резорбция и ремоделирование тканей, дифференцировка и пролиферация клеток, миграция, а также при патологических состояниях (гломерулонефрите, ревматоидном артрите, пародонтитах, изъязвлении роговой оболочки глаз и др.), этим ферментам принадлежит решающая роль. Особое место отводится матриксным металлопротеиназам в генерализации процессов инвазии и метастазирования злокачественных опухолей.

Целый ряд клеток осуществляют синтез и секрецию матриксных металлопротеиназ: эпителиальные клетки, фибробласты, фагоциты, лимфоциты и клетки, которые подверглись опухолевой трансформации.

В настоящее время описаны более двадцати ферментов, которые входят в состав семейства матриксных металлопротеиназ. На основании первичной

структуры, субстратной специфичности и клеточной локализации металлопротеиназы классифицируют, как правило, на пять основных подсемейств: семейство коллагеназ, желатиназ, стромелизинов, матрилизинов и мембраносвязанных матриксных металлопротеиназ (МС-ММП). Однако некоторые, недостаточно изученные недавно описанные металлопротеиназы, не отнесены до настоящего времени ни к одному из указанных подсемейств, а выделяются в отдельную группу «другие ферменты». Известны также четыре представителя семейства тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (ТИМП).

Все матриксные металлопротеиназы характеризуются наличием ионов цинка  $\text{Sn}^{2+}$  в активном центре и потребностью в ионах  $\text{Ca}^{2+}$  в целях стабилизации молекулы. В молекулах практически всех матриксных металлопротеиназ содержатся несколько различных доменов, каждый из которых отвечает за определенную функцию: секрецию, сохранение в латентной форме, субстратную специфичность и катализ. Кроме того, у всех металлопротеиназ имеется общая консервативная последовательность. Продомен, содержащий консервативную последовательность, обеспечивает сохранение матриксных металлопротеиназ в латентной форме и отщепляется в процессе активации профермента. Каталитический домен включает три консервативных остатка гистидина в комплексе с ионами  $\text{Sn}^{2+}$ . В С-концевую часть молекулы включается гемопексиноподобный домен, который отвечает за субстратную специфичность молекулы и взаимодействие с рецепторами клеточной поверхности.

Синтез всех матриксных металлопротеиназ осуществляется в виде профермента (про-ММП), и все металлопротеиназы могут быть секретированы в латентной форме. В активации профермента принимают участие ряд протеаз вне клетки или на ее поверхности [31].

В первый, наиболее изученный класс, включаются коллагеназы. Известными в настоящее время являются четыре представителя этого семейства: интерстициальная коллагеназа, или коллагеназа I типа (ММП-1),

коллагеназа-3 (ММП-13), коллагеназа нейтрофилов (ММП-8), коллагеназа 4 (ММП-18). ММП-1 является первым тканевым ферментом, который осуществляет гидролиз спиральной области коллагена. ММП-1 синтезируется следующими клетками: нормальными и трансформированными фибробластами, хондроцитами, эпителиальными клетками, макрофагами.

ММП-8 была впервые обнаружена в нейтрофильных лейкоцитах, за что получила название нейтрофильная коллагеназа. ММП-3 была выявлена в клетках рака молочной железы, а также в клетках костной ткани грызунов. Своим названием коллагеназы обязаны способности к гидролизу нативного коллагена в спиральной области. Все четыре матриксные металлопротеиназы осуществляют гидролиз интерстициальных коллагенов.

Второе подсемейство матриксинов представлено коллагеназами IV типа, – желатиназой А (ММП-2) и желатиназой В (ММП-9). ММП-2 синтезируется многими нормальными и опухолевыми клетками, она секретируется в виде предшественника. ММП-9 обнаруживается в таких клетках как нейтрофильные лейкоциты и макрофаги, а также фибробласты, хондроциты и Т-лимфоциты после стимуляции их цитокинами, карболовым эфиром, онкогенами, а также в инфицированных клетках. Оба фермента интенсивно осуществляют гидролиз желатинов, получаемых из различных типов коллагенов, а также ряд белков соединительнотканного матрикса, в том числе и эластина. Кроме того, желатиназами значительно лучше осуществляется гидролиз коллагена V типа, чем коллагена IV типа, а ММП-2 способна расщеплять коллаген I типа по той же связи, что и ММП-1. В отличие от ММП-9 ММП-2 осуществляет гидролиз фибронектина, ламинина и большого тенасцин-С-белка, а ММП-9 способна расщеплять энтактин и коллаген XIV типа.

Третье семейство матриксных металлопротеиназ представлено двумя ферментами – стромиелизином-1 (ММП-3) и стромиелизином-2 (ММП-10). К стромиелизинам относятся также такие ферменты как протеогликаназа,

транзины, активатор проколлагеназы. MMP-3 продуцируется многими клетками соединительной ткани, но в очень незначительных количествах. Однако действие на эти клетки таких факторов, как цитокины, факторы роста, карболовый эфир, онкогены, приводит к резкой стимуляции синтеза как MMP-3, так и MMP-10.

К группе неклассифицированных матриксных металлопротеиназ относят ферменты, которые существенно отличаются по своей структуре и функциям от представителей предыдущих трех подсемейств металлопротеиназ: стромелизин-3 (MMP-11), матрилизин (MMP-7), металлоэластаза макрофагов (MMP-12) и четыре матриксные металлопротеиназы мембранного типа MT-ММП (ММП-14, ММП-15, ММП-16, ММП-17).

В обычных условиях металлопротеиназы содержатся в незначительных количествах в тканях. Эти протеиназы относятся к «индуцируемым» ферментам, синтез которых контролируется рядом факторов на уровне транскрипции и посттранскеллюлярном уровне.

У пациентов с застойной сердечно-сосудистой недостаточностью обнаружена прямая корреляционная зависимость между активностью ММП-2 и уровнем катехоламинов. Положительная корреляционная связь обнаружена также между ММП-2 и кортизолом [32]

В межклеточном матриксе необходимым условием нормального протекания физиологических процессов является поддержание равновесия между активностью металлопротеиназ и их ингибиторов. Нарушение этого равновесия может оказывать глубокое воздействие на состав межклеточного матрикса и оказывать влияние на различные функции клеток, включая миграцию, адгезию и дифференциацию.

Подавляющее большинство исследований матриксных металлопротеиназ направлено на выяснение их роли в различных физиологических и патологических процессах. Наиболее ярко выраженными являются изменения экспрессии матриксных металлопротеиназ в тканях,

которые подвергаются интенсивной циклической перестройке, например, такие как эндометрий человека.

Установлено, что в эндометрии адекватные уровни экспрессии ММП-2 и ММП-9 необходимы для успешной имплантации и дальнейшего положительного развития беременности. При хроническом эндометрите снижается экспрессия тканевой металлопротеиназы. Активность металлопротеиназ может подвергаться изменениям и в рамках раневого процесса. Известно, что основными продуцентами ММП-2 являются мезенхимальные клетки в процессе их миграции. При формировании раневого процесса и сбалансированности процессов пролиферации и миграции фибробластов, ангиогенеза отмечается относительно низкая активность ММП-2.

Матриксные металлопротеиназы, расцениваемые в качестве ключевых ферментов метаболизма компонентов соединительной ткани, принимают участие в различных физиологических и патологических процессах, которые требуют пролиферации и миграции клеток и, следовательно, сопровождаются перестройкой внеклеточного матрикса.

Деградация внеклеточного матрикса может рассматриваться как результат сложного каскада реакций, в которых многие матриксные металлопротеиназы действуют в качестве синергистов [33].

Желатиназы в связи со способностью разрушать денатурированный коллаген, по-видимому, играют основную роль на последних этапах этого процесса. В межклеточном пространстве эти металлопротеиназы могут посредством своего фибронектиноподобного фрагмента осуществлять взаимодействие с различными белками матрикса. Это обстоятельство создает обратную связь между потенциальной активацией матриксных металлопротеиназ и состоянием матрикса, возможно, определяя в живом организме ее механизм.

Активность отдельных матриксных металлопротеиназ (в частности коллагеназ) может регулироваться взаимодействиями со специфическими ингибиторами тканевых металлопротеиназ.

Экспрессия ММП-9 /ТИММП-1 одновременно возрастает в сыворотке крови пациентов с карциномой легкого. Показано, что одновременное повышение экспрессии ТИММП-1 и ТИММП-2 у больных с карциномой легкого коррелирует с плохими прогностическими факторами и прогрессированием заболевания.

В патогенезе ряда патологических процессов таких как метастазирование, ангиогенез, опухолевая инвазия, а также воспаление, ремоделирование матрикса при заживлении ран большое внимание уделяется плазминогеновой системе [34, 35, 36]. Различают тканевой активатор плазминогена (tPA) и урокиназоподобный плазминоген (uPA). Предполагают, что tPA играет ключевую роль в процессах лизиса тромбов, а uPA принимает активное участие в ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, инвазии и метастазировании. Показано, что связывание про-uPA и плазминогена с рецептором uPA на клеточной поверхности приводит к активации стимуляции протеолитической активности в отношении фибронектина, витронектина и фибрина. Для многих новообразований человека доказано усиление протеолиза с участием системы активации плазминогена.

В последние годы значимая роль уделяется матриксным металлопротеиназам как сывороточным маркерам фиброза. Так развитие хронического гепатита сопровождается умеренными изменениями функциональных проб печени без изменения активности матриксных металлопротеиназ. Повышение активности металлопротеиназ и наличие у больного явлений холестаза характеризует хронический гепатит, трансформирующийся в цирроз. В то время как обнаружение в фибробластах высокой активности металлопротеиназ подтверждает их участие в развитии фиброза с последующим переходом в цирроз печени.

Ряд патологических состояний, таких как периодонтит, остеоартрит, ревматоидный артрит, гипертензия, аутоиммунные заболевания, а также опухолевая инвазия и метастазирование развиваются с нарушением регуляции деградации экстрацеллюлярного матрикса, а значит, с участием металлопротеиназ [37, 38].

Значение матриксных металлопротеиназ в развитии патологических процессов может быть разделено на следующие группы:

- разрушение ткани при инвазии и метастазировании рака, остеоартрите, ревматоидном артрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, заболеваниях пародонта, колоректальной язве, нейровоспалительных заболеваниях.
- фиброзные изменения при заболеваниях легких, циррозе печени, отосклерозе и рассеянном склерозе.
- ослабление матрикса при аневризме аорты, дилатационной кардиомиопатии, рестенозных поражениях.

Инвазия опухолевых клеток и метастазирование обусловлены нарушением деградации межклеточного матрикса. Следовательно, матриксные металлопротеиназы играют немаловажную роль в этих процессах. Известно, что в эпителии нет сосудов, и питание осуществляется диффузно через базальную мембрану. Именно при разрушении базальной мембраны и прорастании опухоли за ее пределы можно говорить об инвазивных формах рака и возможности метастазирования. Матриксные металлопротеиназы играют роль ферментов в дальнейшем развитии опухоли, которые разрушают интактную ткань и способствуют прогрессированию процессов метастазирования [39].

Деградация базальной мембраны и стромы является ключом, необходимым для начала опухолевого роста и метастазирования. Клетки некоторых опухолей сами образуют матриксные металлопротеиназы и, независимо от этого, любая опухоль является мощным индуктором образования металлопротеиназ. Способствуя инвазии опухолевого роста и

метастизированию, матриксные металлопротеиназы в то же время являются мощными стимуляторами неоангиогенеза.

В верхних дыхательных путях, а также в бронхах крупного и среднего калибра функции лабильных ингибиторов гранулоцитов являются значительно ограниченными. Они отвечают за 15-20% антипротеолитической активности секрета бронхиального эпителия. Однако в легочной ткани, на уровне альвеол  $\alpha$ 1-ИП по значимости становится главной антилейкопротеиназой, которая предотвращает развитие эмфиземы легких.

$\alpha$ -1-ингибитор протеиназ является положительным реактантом острой фазы. Он представляет собой ингибитор для большинства протеолитических ферментов, в состав активного участка которых включается аминокислота серии. Важнейшей физиологической ролью  $\alpha$ -1-ингибитора металлопротеиназ является торможение протеаз, особенно эластаз, которые выделяются из лейкоцитов в процессе фагоцитоза [40].

Имея небольшой размер молекулы, он легко подвергается диффузии из плазмы в другие жидкости тела, в том числе и в бронхиальный секрет. Протективный и противовоспалительный эффект  $\alpha$ -1-ингибитора протеиназ представляет собой предотвращение протеолитического повреждения тканей легких за счет ингибирования нейтрофильной эластазы. Помимо этого эластаза осуществляет также разрушение фосфатидилсериновых рецепторов, которые осуществляют инициацию фагоцитоза погибших в зоне воспаления клеток.

По данным некоторых авторов, механизм противовоспалительного действия  $\alpha$ -1-ингибитора металлопротеиназ представлен усиливающим действием на каскадную иммунную реакцию в ответ на стимуляцию липополисахаридными компонентами клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которые являются частыми возбудителями и причиной обострений хронических легочных заболеваний.  $\alpha$ -1-ингибитор металлопротеиназ обладает способностью к оказанию влияния на уровень



противовоспалительной активности, увеличивая количество циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в клетках.

$\alpha$ -1-ингибитор металлопротеиназ обладает высоким сродством к поверхностным рецепторам клеточных мембран. Снижение катаболизма цАМФ или активация мембранных рецепторов является причиной повышения содержания в клетках воспаления цАМФ и торможения высвобождения цитокинов и хемокинов при стимуляции липополисахаридами клеточной стенки, уменьшения миграции лейкоцитов, подавления активации и пролиферации Т-лимфоцитов. Такая противовоспалительная способность  $\alpha$ -1-ингибитора протеиназ не связана с его антипротеазной активностью, присуща физиологически измененным формам  $\alpha$ -1-ингибитора протеиназ в равной степени с нативными формами.

Ведущую роль в формировании необратимого компонента бронхиальной обструкции при хронических обструктивных болезнях легких играют ремоделирование стенок бронхов и формирование пневмофиброза, зависящие от многих факторов, в частности и от увеличения активности коллагенообразования в легких [41].

Фиброз традиционно рассматривается как прогрессирующий патологический процесс, в который вовлекаются многочисленные клеточные и молекулярные механизмы, приводящие к накоплению в избытке углеводно-белковых компонентов матрикса в межклеточном пространстве. Если этот процесс сопровождается неэффективной резорбцией соединительной ткани, а также чрезмерной регенерацией и репарацией, то нарушается нормальная архитектура легочной ткани и в итоге развивается пневмофиброз.

Ремоделирование стенок бронхов и формирование пневмофиброза зависят от многих факторов, в особенности от выраженности и длительности воспаления. Хронический воспалительный процесс в бронхолегочной системе стимулирует опосредованные различными цитокинами и другими факторами процессы накопления фибрина в просвете альвеол и мелких бронхов и повышение коллагенообразования в легких. В общей

пульмонологии рядом исследователей приводится точка зрения, что изучением механизмов развития хронического бронхита должен быть, анализ клеточных коопераций и межклеточных взаимодействий.

В патогенезе бронхолегочной патологии можно выделить три ведущих составляющих: хроническое воспаление, дисбаланс в системе протеолиз-антипротеолиз и оксидативный стресс. Вдыхание промышленной пыли способствует активации альвеолярных макрофагов и нейтрофилов и выработке ими ферментов с мощным деструктивным действием, таких как эластаза, катепсины В, С и в, коллагеноза, металлопротеиназы [42].

Как известно, экстрацеллюлярный матрикс легочной паренхимы состоит из длинных белковых цепей, представленных эластином, коллагеном, желатином, ламинином. Несмотря на то, что эластин составляет лишь 2,5% от сухого веса легочной ткани, его роль в поддержании тонуса и предотвращении экспираторного коллапса терминальных отделов нижних дыхательных путей является первостепенной. Деструкция коллагена, обеспечивающего жесткость внутрилегочного каркаса, тоже имеет значение в развитии эмфиземы легких.

Дыхательная недостаточность при эмфиземе усугубляется сдавлением гигантскими буллами нормальной в функциональном отношении легочной ткани. Нарушение газообмена при эмфиземе легких обусловлено: ухудшением легочной вентиляции, поддерживающей постоянный газовый состав альвеолярного воздуха; нарушением кровообращения в легких и корреляцией между процессами вентиляции и перфузии в альвеолах; затруднением диффузии газов через альвеолокапиллярную мембрану из-за ее деструкции; раскрытием в легких артериовенозных анастомозов. Сложная патофизиологическая картина эмфиземы легких в каждом конкретном случае имеет свои особенности, зависящие от ее формы и тяжести течения.

Протеолитические ферменты вызывают деградацию всех компонентов внеклеточного матрикса паренхимы легких, включая эластин, коллаген, протеогликаны, ламинин и фибронектин. При этом происходит разрушение

эластического каркаса тканей и нарушение нормальной архитектоники легких, причем тонкие эластические волокна межалвеолярных перегородок разрушаются быстрее, чем их пучки в стенках, – формируется эмфизема легких.

Возникает обструктивный синдром, в основе которого лежит нарушение равновесия эластического натяжения между легочной паренхимой и бронхами. Вместе с тем на всех этапах развития воспаления высвобождаются антимедиаторы, предупреждающие избыточное накопление медиаторов воспаления. Соотношение медиаторов и антимедиаторов во многом определяет формирование и индивидуальные особенности течения воспаления.

Биологический баланс в системе протеолиз-антипротеолиз является залогом нормального протекания физиологических процессов, в которых участвует эта система. Начальная деструкция коллагена определяется либо активностью матриксных металлопротеиназ, либо снижением фоновой активности тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ

При патологических процессах роль матриксных металлопротеиназ является несомненной и очевидной. В связи с этим активно изучаются ингибиторы этих ферментов в качестве терапевтических средств в онкологии, пульмонологии, ревматологии, кардиологии, неврологии и гинекологии. Большинство из исследуемых препаратов находится на стадии клинических испытаний и одной из проблем является их низкая или недостаточная активность в живом организме.

## **Глава 2 Объем и методы исследования**

### **2.1. Общая клиническая характеристика обследованных больных**

В соответствии с целью и задачами работы исследования были направлены на изучение роли матриксных металлопротеиназ в развитии бронхолегочных заболеваний для оценки патогенетической значимости данной системы в развитии и течении профессиональных заболеваний легких и разработки критериев ранней диагностики и профилактики.

Для решения поставленных в работе задач обследовано 35 человек, имеющих профессиональную бронхиальную астму и 17 работников асбестоцементного комбината (АЦК), не имеющих установленной профессиональной патологии бронхов и легких.

Результаты биохимических исследований сопоставлялись с группой из 40 практически здоровых лиц, не имевших заболеваний кожи и контакта с веществами раздражающего и сенсибилизирующего действия (по результатам обследований в клинике ФГБНУ «НИИ МТ»).

Во время проведения обследования все больные находились в стационаре клиники ФГБНУ «НИИ МТ». Диагнозы больным устанавливались на основе применения клинических, аллергологических, клинико-лабораторных методов исследования.

Условия труда оценивались нами с учётом результатов научных разработок сотрудников гигиенических подразделений института, а также по данным характеристик условий труда, представленных территориальными ЦГСЭН с мест работы заболевших.

Большая часть обследованных пациентов заняты в строительстве и связаны с производством строительных материалов (59,2%). Эти рабочие в процессе производственной деятельности контактируют с промышленным аэрозолем сложного состава, который включает в себя вещества раздражающего, фиброгенного и сенсибилизирующего действия. Пациенты указанной группы по профессии являются отделочницами, плиточниками, штукатурами, малярами, слесарями, формовщиками, монтажниками,

машинистами. У большинства пациентов отмечается контакт с цементом или асбоцементом, содержащими свободный диоксид кремния  $\text{SiO}_2$  менее 10%. В составе цемента и асбоцемента имеются также соединения металлов-аллергенов (хрома, кобальта, никеля).

Кроме того, работники, занятые в строительстве, контактировали с факультативными раздражителями (красками, лаками, органическими растворителями). Работу они не всегда выполняли с использованием индивидуальных средств защиты. Наряду с этим их труд был связан с воздействием неблагоприятных микроклиматических условий.

Профессии 15,8% обследованных пациентов были связаны с обработкой металла. Среди них были токари, слесари, шлифовщики, электромонтеры, гальваники, прессовщики, сверловщики, фрезеровщики. В процессе своей трудовой деятельности эти пациенты имели контакты с хромированными или никелированными покрытиями, с хром-, никель- и кобальтсодержащими сталями, а также с полиэтиленполиамином, формальдегидом, смолами. 18,5% обследованных лиц были медицинскими работниками и работниками фармацевтической промышленности и в процессе работы контактировали с медикаментами, формальдегидом, хлорамином, 6,5% обследованных были заняты в сельском хозяйстве и контактировали с органической пылью (рисунок 1).



Рисунок 1 - Профессиональная занятость обследованных

## 2.2. Методы исследования

Для определения биохимических показателей матричных металлопротеиназ был использован метод иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных макромолекул, низкомолекулярных соединений, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.

Схема реакций, проходящих в процессе иммуноферментного анализа, представлена на рисунке 2.

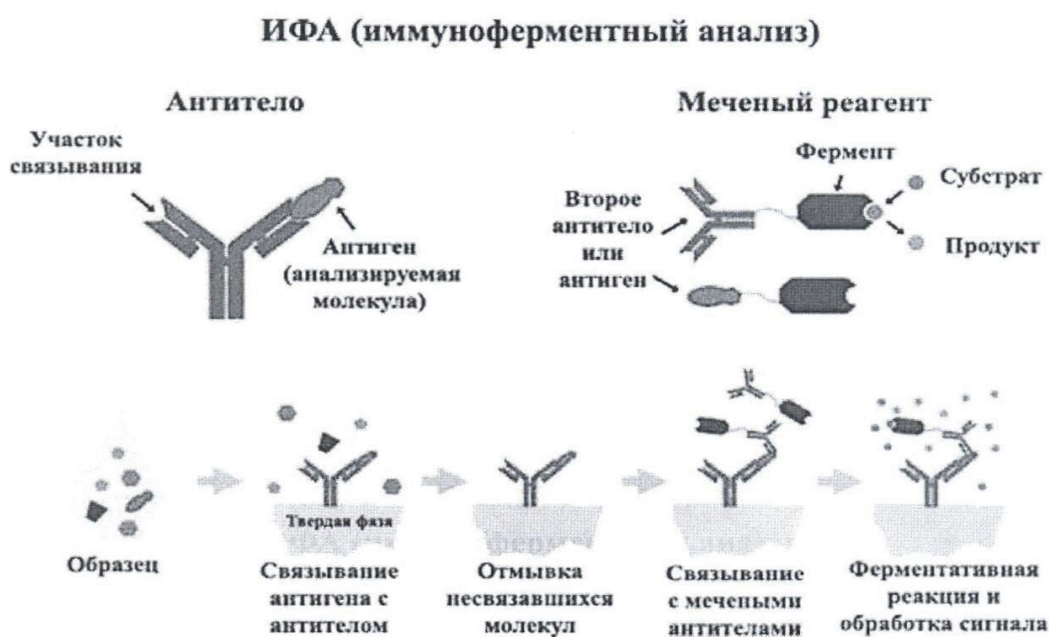


Рисунок 2 - Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, который основан на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующим ее выявлением с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску.

Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями.

Различают несколько видов модификаций ИФА:

- ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) – метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами;
- EIA (enzyme immunoassay) – метод на основе определения ферментов;
- EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) – способ, основанный на связи с ферментами.

ELISA и EIA – это методы гетерогенного или твердофазного анализа, EMIT является гомогенным ИФА. Для определения антигенов и антител применяются твердофазный (гетерогенный) вариант иммуноферментного анализа.

Использование твердой фазы упрощает процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции. Твердофазный ИФА основан на двух принципиальных научных открытиях. Первое заключается в способности энзимов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, т.е. расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены/антитела; второе базируется на создании комплекса антитело-фермент в виде конъюгата, который сохраняет свою биологическую активность в растворе. Конъюгаты антитело-фермент характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью, достигающей 97-99%.

Первичным процессом в иммуноферментном анализе является стадия «узнавания» анализируемого соединения специфическим к нему антителом.

Классические методы иммуноферментного анализа основываются на образовании антителами в присутствии антигена преципитата (осадка), однако для визуальной регистрации процесса преципитации необходимы высокие концентрации компонентов и длительное время проведения реакции.

Так как процесс образования иммунохимических комплексов происходит в строго количественном соотношении, обусловленном аффинностью, концентрациями компонентов и условиями реакции, то достаточным для определения исходной концентрации анализируемого соединения является количественная оценка образовавшихся иммунных комплексов.

Для такой оценки возможно либо прямое определение концентрации образующихся иммунных комплексов (тип 1), либо количественная оценка оставшихся свободными мест специфического связывания (тип 2). Второй общей стадией любого метода иммуноферментного анализа является формирование связи меченного ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. Заключительным обязательным процессом в иммуноферментном анализе является трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом (спектрофотометрическим, флуориметрическим, люминесцентным и т.д.), что достигается путем измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени.

Принимая во внимание вышеописанные подходы для определения специфических комплексов, дальнейшую классификацию методов иммуноферментного анализа, можно осуществить по типу реагентов, используемых на первой стадии анализа.

Если на первой стадии в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является неконкурентным. Для неконкурентного анализа типа 1 оптимальным является соотношение компонентов, при котором концентрация центров связывания значительно превышает концентрацию определяемого соединения. Необходимым условием для неконкурентного анализа типа 2 является соблюдение соотношения избытка или сравнимой концентрации определяемого



соединения (антигена) и мест специфического связывания, так как в этом случае определяется разность общего числа мест связывания и числа образовавшихся иммунных комплексов.

Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся в относительном недостатке центры специфического связывания, то метод является конкурентным. Необходимым условием конкурентного метода является недостаток центров специфического связывания по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога.

Следующим принципом классификации методов иммуноферментного анализа является их разделение по типу проводимых на каждой из иммунохимических стадий реакций. В соответствии с этим все методы можно разделить на две группы – гомогенные и гетерогенные.

В настоящее время разработаны различные варианты твердофазного иммуноферментного анализа:

- “Сэндвич”-метод. Общая схема проведения метода заключается в следующем. На твердой фазе адсорбированы антитела к исследуемому антигену. После инкубации исследуемого материала и образования комплекса «антитело-антиген» проводится удаление несвязанных компонентов, добавляется конъюгат, т.е. антитела к искомому антигену, меченые ферментом. По завершении инкубации, с последующим удалением непрореагировавшего конъюгата промывкой, образуется комплекс, в котором антиген как бы заключен между двумя слоями антител. Наличие меченных ферментом антител определяется при помощи соответствующего субстрата. “Сэндвич”-метод используется для выявления HBsAg, HBeAg, антигена вируса гепатита А.

## Иммуноферментный анализ (ИФА) ("Сэндвич"-метод)

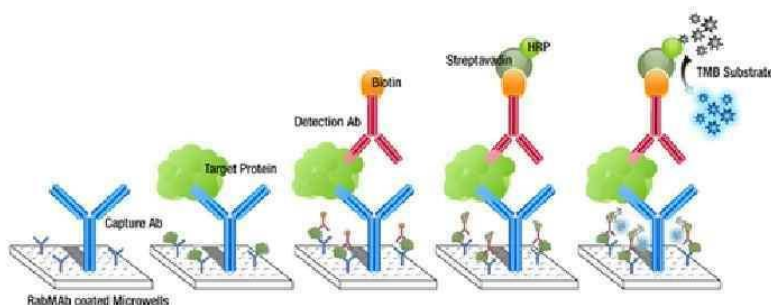


Рисунок 3 - «Сэндвич»-метод

- Непрямой ИФА. На твердой фазе иммобилизуют антиген, после инкубации исследуемого материала и удаления несвязавшихся компонентов добавляют меченые ферментом антитела к иммуноглобулинам человека класса IgG, которые взаимодействуют с Fc-фрагментом к IgG.

После проведения субстрат-ферментативной реакции проводят учет полученных результатов. При наличии антител уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных образцов. Этот метод применяется для определения антител к вирусу гепатита С.

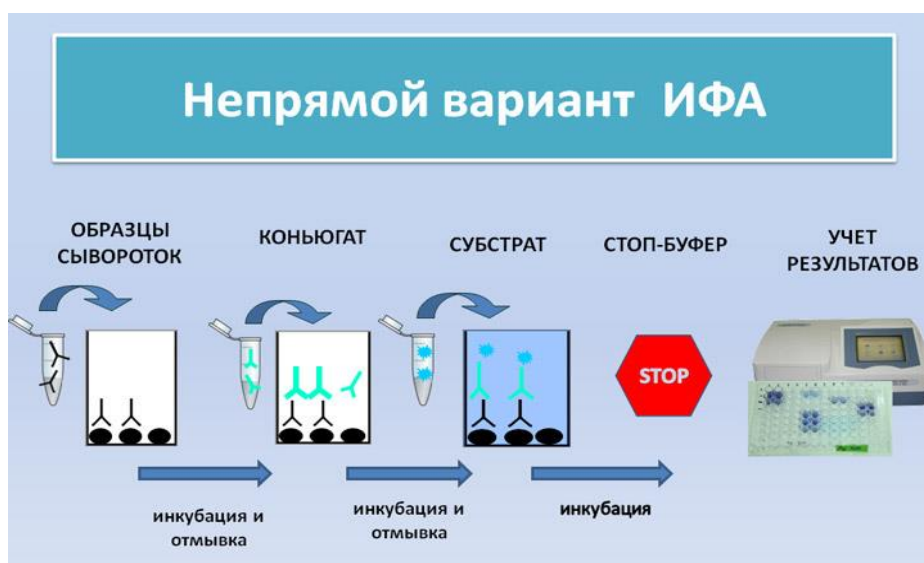


Рисунок 4 - Непрямой ИФА

- Конкурентный метод. К антигену, иммобилизованному на твердой фазе одновременно добавляют исследуемый материал и конъюгат. При проведении реакции меченые и исследуемые антитела конкурируют за активные центры антигена, иммобилизованного на твердой фазе. После завершения инкубации и удаления не прореагировавших компонентов проводится ферментативная реакция, результаты которой обратно пропорциональны количеству антител в исследуемом образце.

- Ингибирующий ИФА. На полистироловом шарике адсорбирован стандартный антиген, после инкубации с исследуемым материалом и удаления непрореагировавших компонентов добавляется антиген, меченный ферментом, который взаимодействует со свободными центрами связывания антител, которые осуществили взаимодействие с антигеном, сорбированным на твердой фазе. При наличии антител в исследуемой пробе уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных контрольных образцов.

- Прямой ИФА. На первом этапе реакции исследуемый образец фиксируют на твердой фазе. Затем к нему добавляют конъюгат. После удаления непрореагировавших компонентов реакции проводится ферментативная реакция, интенсивность которой прямо пропорциональна содержанию исследуемых антигенов в образце и вообще говорит об их наличии в исследуемом материале.

Конкурентные твердофазные методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с неконкурентными. Предел обнаружения различных соединений для них ограничен как чувствительностью регистрации ферментной метки, так и аффинностью антител, в то время, как для неконкурентных методов, при отсутствии неспецифических взаимодействий, — только чувствительностью определения фермента. Поэтому для достижения высокой чувствительности анализа конкурентным методом необходимо использовать высокоаффинные антитела.

- Гомогенный ИФА. К гомогенным относятся методы, осуществляемые в однофазной системе, и не требующие стадии механического разделения образовавшихся комплексов. Во всех схемах проведения гомогенного иммуноферментного анализа регистрируется концентрация не образующегося специфического комплекса антитело-антиген, а оставшихся свободными центров специфического связывания.

Однако, в противоположность гетерогенным схемам, наблюдаемая ферментативная активность, соответствующая концентрации незанятых мест специфического связывания, может как уменьшаться, так и увеличиваться, что обусловлено различной природой воздействия связывания лигандов на ферментативную активность. Введение метки в молекулу антигена является одним из наиболее распространенных подходов в гомогенных методах иммуноферментного анализа.

Все гомогенные методы относятся к конкурентным и основаны на одновременном взаимодействии с антителами анализируемого и меченого антигенов. После образования в растворе соответствующего иммунохимического комплекса проводят измерение ферментативной активности, которая пропорциональна концентрации свободного или связанного меченого лиганда.

Для определения матриксных металлопротеиназ в качестве материала для исследования использовали сыворотку.

Забор крови производился из кубитальной вены в утренние часы с 8-30 до 9-30, натощак. Прием пищи, курение, употребление алкоголя непосредственно перед проведением исследования исключались.

Образцы венозной крови подвергались первичной сепарации на лабораторных центрифугах в течение 20 минут (3000 оборотов в 1 минуту) (рисунок 5).



Рисунок 5 - Центрифуга лабораторная

Содержание в сыворотке крови матриксной металлопротеиназы 8, проММР-1 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы «RsD Systems» (США) (рисунок 6). Для определения MMP-8 был использован набор Human Total MMP-8 Quantikine ELISA Kit. Определение про MMP-1 осуществлялось с использованием набора Human Total Pro-MMP-1 Quantikine ELISA Kit.



Рисунок 6 - Тест-система фирмы «RsD Systems» (США)

Диапазон измерения составляет 0,095-10,0 нг/мл, аналитическая чувствительность – 0,095 нг/мл. В работе использовался одностадийный

«сэндвич» ИФА. Измерения осуществлялись на автоматическом иммуноферментном анализаторе DSX компании DynexTechnologies (рисунок 7)



Рисунок 7 - Иммуноферментный анализатор DSX (DynexTechnologies)

Методика проведения реакций иммуноферментного анализа:

- Образцы сыворотки и стандарты добавляются в определенные лунки планшета.
- Затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена добавляется в каждую лунку планшета и проводится инкубация.
- После добавления субстратного раствора тетраметилбензидина цвет изменяется только в лунках, содержащих матриксные металлопротеиназы, антитела с биотином и авидин с пероксидазой хрена.
- Ферментативная реакция прекращается добавлением стоп-реagenta.
- Интенсивность окраски раствора измеряют как оптическую плотность на автоматическом иммуноферментном анализаторе DSX компании DynexTechnologies при длине волны 450 нм.
- Строится калибровочная кривая, по которой находятся искомые уровни матриксных металлопротеиназ в образцах сыворотки.

Характеристики определения про-ММП-1 представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Характеристика ИФА с применением Human Total Pro-MMP-1 Quantikine ELISA Kit

Характеристика	Показатель
Тип анализа	одностадийный «сэндвич» ИФА
Формат	планшет с 96 лунками
Продолжительность	4,5 ч
Объем образца	100 нг
Чувствительность	0,095 нг\мл
диапазон	0,2-10,0 нг\мл

Методика определения ММП-8:

1. Подготовить все реагенты и образцы
2. Добавить 100 мкл разбавителя в каждую лунку
3. Промойте каждую лунку 3 раза. После последней промывки тщательно удалите промывочный буфер.
4. Добавьте 200 мкл конъюгата в каждую лунку. Накройте новой клейкой полосой. Инкубировать в течение 1 часа при комнатной температуре.
- 5.Промойте каждую лунку ( см. п. 3)
6. Добавить 200 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре на столе. Беречь от света.
7. Добавить 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Цвет в лунках должен измениться с синего на желтый. Если цвет в лунках зеленый или изменение цвета неравномерно, аккуратно постучите по пластине, чтобы обеспечить тщательное перемешивание.
8. Определите оптическую плотность каждой лунки в течение 30 минут, при длине волны 450 нм.

Таблица 2 – Характеристика ИФА с применением Human Total Pro-MMP-1 Quantikine ELISA Kit

Характеристика	Показатель
Тип анализа	одностадийный «сэндвич» ИФА
Формат	планшет с 96 лунками

Продолжительность	3,5 ч
Объем образца	100 нг
Чувствительность	0,095 нг\мл
диапазон	0,2-10,0 нг\мл

Для статистической обработки материала использовались методы описательной статистики, которые включали в себя вычисление средней величины, стандартной ошибки средней величины, нахождения минимального и максимального значения каждого показателя в обследованных группах.

При проверке степени достоверности межгрупповых различий по клиническим, биохимическим признакам при условии выполнения нормальности распределения для каждой из выборок применялись методы параметрической статистики критерий Стьюдента – при сравнении двух групп.



### Глава 3. Результаты исследования

Развитие патологического процесса при заболеваниях бронхолегочной системы сопровождается изменением иммунной реактивности, а также нарушением метаболических процессов в организме. При воздействии экзогенных факторов происходит мобилизация разных систем, направленных на поддержание основных жизненных функций и повышение резистентности к раздражителю. К настоящему времени целым рядом исследований доказано, что длительное воздействие комплекса неблагоприятных факторов производственной среды и трудового процесса (промышленная пыль, стресс, микроклимат, физические, химические, биологические факторы и др.) приводит к интенсификации протеолитических процессов.

В силу цепного лавинообразного характера высвобождения протеолитических ферментов из клеток, реагирующих на воздействие вредного производственного фактора при нарушении контроля за этим процессом имеет место эффект многократного усиления первичного повреждающего воздействия. Отсюда очевидна роль мобилизации резервов физиологической антипротеазной защиты организма в молекулярных механизмах неспецифической резистентности и адаптации клетки и организма в целом к действию повреждающих факторов. Истощение и срыв различных звеньев антипротеазной системы, приводящее к неконтролируемому повышению активности протеаз, во многом определяет характер и интенсивность возникновения и развития того или иного патологического процесса.

Для решения поставленных в работе задач у обследованных больных профессиональной бронхиальной астмой и у работников асбестцементного комбината, не имеющих профессиональной патологии и лиц контрольной группы был проведен анализ биохимических показателей системы протеолиз-антипротеолиз на уровне предшественника матриксной металлопротеиназы-1 и матриксной металлопротеиназы 8.

У всех обследованных больных были выявлены изменения в состоянии системы матричных металлопротеиназ (таблица 4).

Таблица 3 - Показатели протеазно-ингибиторной системы у обследованных больных

Группа	n	проММР-1	ММР-8
бронхиальная астма	35	0,95±0,15*	40,42± 4,95
работники АЦК	17	4,72±0,78	28,31±6,97
контроль	40	3,49±0,61	42,10±5,58

\* - достоверность различий с контрольной группой -  $p \leq 0,001$

Известно, что ММР-1 вовлечен в широкий круг биологических процессов, в которых происходит деградация коллагена. Сюда входят ревматоидный артрит, остеоартрит, заболевания периодонта, опухолевая инвазия, ангиогенез, изъязвление роговицы, тканевое ремоделирование, воспалительные заболевания кишечника, атеросклероз, аневризма и рестеноз. Про-ММР-1 является предшественником матричной металлопротеиназы-1 синтезируется фибробластами, хондроцитами, макрофагами, кератиноцитами, эндотелиальными клетками и остеобластами. Синтез ММР-1 стимулируется разными агентами, включая цитокины (например, эпидермальный фактор роста, интерлейкины и ФНО- $\alpha$ ) и химические соединения, такие как цАМФ и эфиры форбола. ММР-1 ингибируется ТИМР-1 и -2, а также  $\alpha 2$ -макроглобулином. ММР-1 принимает участие в деградации коллагеновых нитей в процессе ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса.

При исследовании содержания профермента матричной металлопротеиназы-1 у пациентов с профессиональной бронхиальной астмой было выявлено достоверное снижение про ММР1 по сравнению с контрольными значениями (рисунок 8). Колебание уровня профермента у пациентов этой группы составило от 0,1 до 4,12 нг/мл. При этом у 96 % больных отмечалась концентрация про-ММП-1 ниже нормы.

Концентрация про-ММП-1 в крови больных профессиональной бронхиальной астмой представлена на рисунке 8.

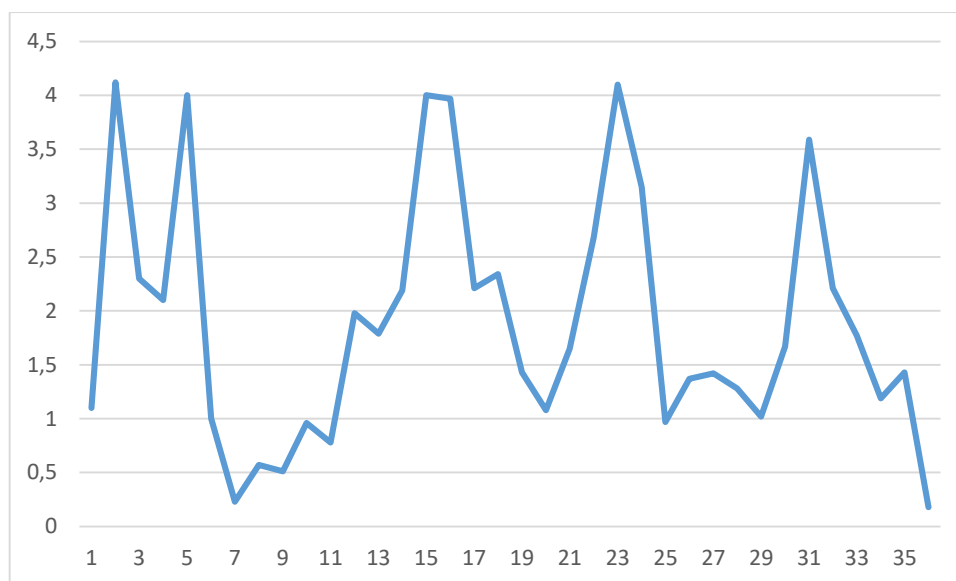


Рисунок 8 - Концентрация про-ММП-1 в крови больных профессиональной бронхиальной астмой

У работников асбестоцементного комбината, не имеющих профессиональных заболеваний, среднестатистические значения профермента матриксной металлопротеиназы были сопоставимы с контрольными величинами. Индивидуальный анализ этих показателей выявил, что у 40% лиц отмечалось снижение уровня про-ММП-1. Диапазон уровня ферментов в этой группе составил для показателей про-ММП-1 от 1,86 до 5,6 нг/мл (рисунок 9).

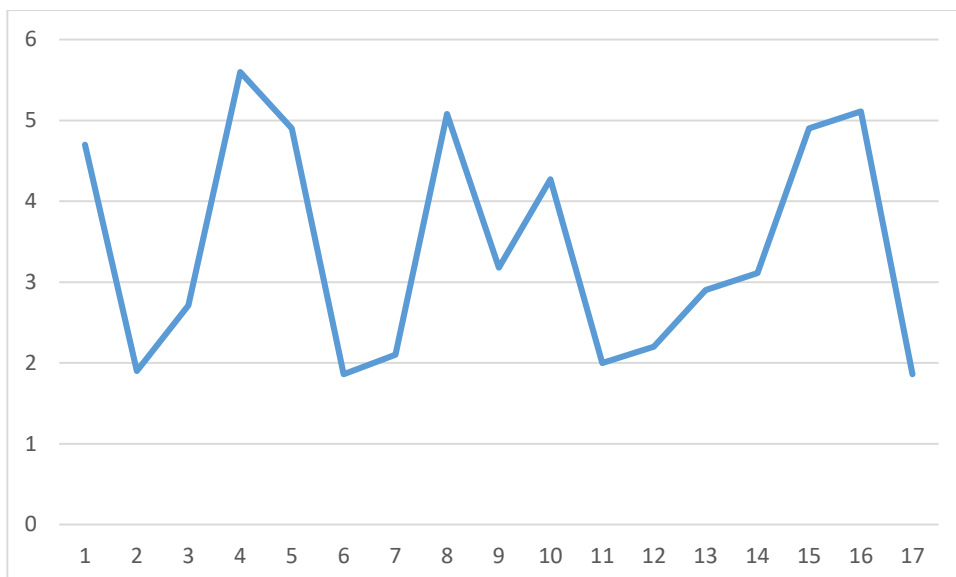


Рисунок 9 - Концентрация про-MMP-1 в крови работающих на АЦК

По данным литературы матриксная металлопротеиназа-8 рассматривается как одна из наиболее активных коллагеназ, которая способна к иницированию разложения коллагена I типа, что может свидетельствовать о развитии под действием неблагоприятных производственных факторов фиброзных поражений легких. Дисперсионный анализ не выявил достоверных различий между группами.

При индивидуальном анализе уровня матриксной металлопротеиназы-8 у пациентов с профессиональной бронхиальной астмой было обнаружено увеличение этого показателя в 1,5 раза и более в сравнении с референсными значениями.

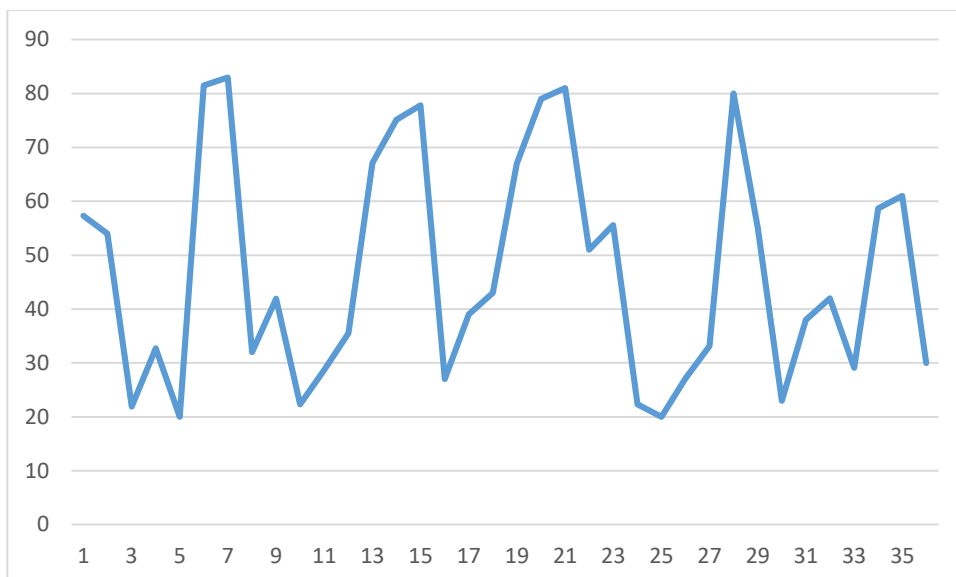


Рисунок 10- Концентрация ММП-8 в крови больных профессиональной бронхиальной астмой

Среднестатистические значения матричной металлопротеиназы-8 у обследованных работников асбестоцементных производств было в пределах нормы. Колебания уровня ММП-8 составили в этой группе от 10 до 30 нг/мл, (рисунок 12).

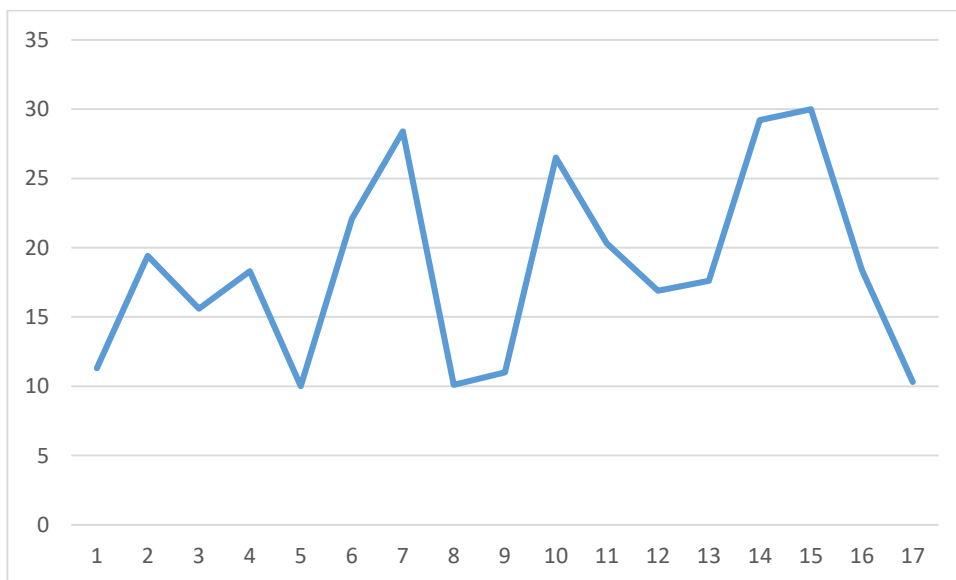


Рисунок 12- Концентрация ММП-8 в крови работающих на АЦК

Обращает на себя внимание тот факт, что в группе больных профессиональной бронхиальной астмой отмечается достоверное снижение

уровня про-ММП-1 - 0,95 нг/мл (контроль 3,49 нг/мл) на фоне нормального уровня матричной металлопротеиназы-8.

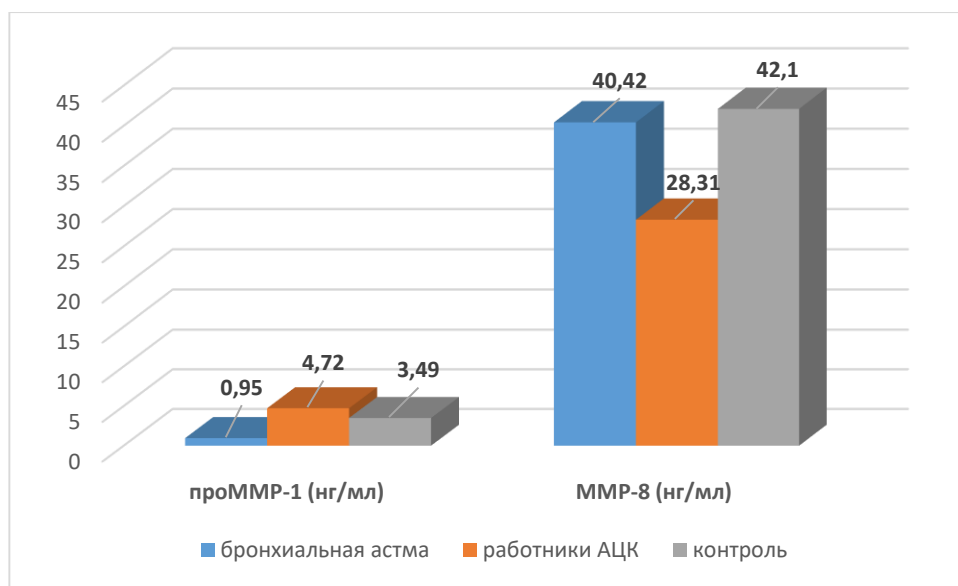


Рисунок 11 - Содержание про ММП1 и ММП 8 в крови обследованных

В соответствии с современным определением бронхиальная астма трактуется как хронический воспалительный процесс нижних дыхательных путей. При наличии острого или хронического воспалительного процесса происходит развитие комплекса защитных биохимических реакций, в которых участвуют многочисленные ферментные белки, выполняющие различные функции - антиоксидантные, транспортные, ингибиторные.

Таким образом, полученные данные являются свидетельством прогностической значимости исследованных показателей в плане оценки риска развития заболеваний системы органов дыхания при продолжительном воздействии вредных производственных факторов.

## **ВЫВОДЫ**

1. У больных профессиональными заболеваниями системы органов дыхания обнаружено нарушение баланса матриксных металлопротеиназ и ингибиторов, в основу которого положено изменение их соотношения.
2. Наиболее выраженные изменения системы (сниженный уровень проММП-1) были обнаружены у пациентов с профессиональной бронхиальной астмой. Полученные результаты являются свидетельством преобладания деструктивно-склеротических процессов при данной нозологической форме.
3. У больных профессиональной бронхиальной астмой обнаружено достоверное понижение уровня проММП-1, при нормальном значении уровня матриксной металлопротеиназы-8, что является свидетельством протекания воспалительных процессов.
4. Проведенный анализ полученных результатов дает возможность выявления комплекса биохимических маркеров системы ингибирования протеаз, которые возможно использовать для оценки индивидуальных рисков развития и прогноза профессиональных заболеваний системы органов дыхания.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вишниковский, И.И. Семинар "Диагностика и лечение бронхиальной астмы в свете рекомендации GINA" [Электронный ресурс]/ И. И. Вишниковский, А. И. Дядык// Республиканский Институт Последипломного Обучения Врачей. – 17.09.2015. – Режим доступа: <http://med-obuch.kz/questionary/view/31.html#full>. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 11.06.2020).
2. Профессиональные заболевания органов дыхания: национальное руководство / под ред. Н. Ф. Измерова, А. Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 792 с.: ил. – (Серия «Национальные руководства»).
3. Карнаух Н.Г., Ковальчук Т.А. Актуальные вопросы профессиональной пылевой патологии легких. К.: Книга, 2004. 104 с.
4. Корытина Г.Ф., Янбаева Д.Г., Загиддулин Ш.З. и др. Полиморфные варианты матриксных металлопротеиназ (ММР-1, ММР-9 и ММР-12) и их роль в развитии хронической обструктивной болезни легких у жителей Республики Башкортостан // Сборник тезисов XV Национального конгресса по болезням органов дыхания. — М., 2005. — С. 229.
5. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких. В кн.: Респираторная медицина. Под ред. А.Р.Чучалина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007; 1:597-650
6. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Дефицит  $\alpha$ 1-антитрипсина и хроническая обструктивная болезнь легких // Пульмонология. — 2007. №3.-С. 103-109.
7. Пузырев В.П., Савюк В.Я. Молекулярные основы и клинические аспекты недостаточности  $\alpha$ 1 -антитрипсина // Пульмонология. - 2003. №1.-С. 105-115.
8. Кузьмина Л.П. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы развития профессиональных заболеваний бронхолегочной системы. Медицина труда и пром. экология-2003; 6:10-14.



9. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких. В кн.: Респираторная медицина. Под ред. А.Р.Чучалина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007; 1:597-650.
10. Чиненная О.В. Фено- и генотипические особенности протеиназно-ингибиторной системы у больных профессиональными заболеваниями органов дыхания Дис... .канд.мед.наук, Москва, 2003
11. Корицина Г.Ф., Янбаева Д.Г., Загиддулин Ш.З. и др. Полиморфные варианты матричных металлопротеиназ (ММП-1, ММП-9 и ММП-12) и их роль в развитии хронической обструктивной болезни легких у жителей Республики Башкортостан // Сборник тезисов XV Национального конгресса по болезням органов дыхания. — М., 2005. — С. 229.
12. Кузьмина Л.П. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы развития профессиональных заболеваний бронхолегочной системы. Медицина труда и пром. экология-2003; 6:10-14.
13. Карнаух Н.Г., Ковальчук Т.А. Актуальные вопросы профессиональной пылевой патологии легких. К.: Книга, 2004. 104 с.
14. Диева Л.А. Иммунологические аспекты клиники профессиональных бронхолегочных заболеваний. Медицина труда и пром. экология 2003; 6: 5-10.
15. Мельникова О.В. Клинико-биохимическая характеристика хронического воспаления при профессиональном бронхите// Медицина труда и пром. Экология 2003.-№2-с.3 5-39
16. Мельникова О.В. Клинико-биохимические особенности хронического воспаления при профессиональном бронхите// автореферат диссертации канд.мед.наук М., 2001-24с.
17. Кузьмина Л.П. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы развития профессиональных заболеваний бронхолегочной системы. Медицина труда и пром. экология-2003; 6:10-14.

18. Румянцева О.И. Клинико-биохимические особенности формирования и течения бронхолегочной патологии от воздействия аэрозолей цветных металлов-Дис... .канд.мед.наук, Москва, 2005
19. Румянцева О.И., Кузьмина, Л.П., Ожиганова В.Н.. Состояние протеиназно-ингибиторной системы у больных профессиональной бронхиальной астмой от воздействия аэрозолей цветных металлов. // Медицина труда и промышленная экология. --2005. № 23-27.
20. Карнаух Н.Г., Ковальчук Т.А. Актуальные вопросы профессиональной пылевой патологии легких. К.: Книга, 2004. 104 с.
21. Корытина Г.Ф., Янбаева Д.Г., Загидуллин Ш.З. и др. Полиморфные варианты матричных металлопротеиназ (ММР-1, ММР-9 и ММР-12) и их роль в развитии хронической обструктивной болезни легких у жителей Республики Башкортостан // Сборник тезисов XV Национального конгресса по болезням органов дыхания. — М., 2005. — С. 229.
22. Дугева Л.А. Иммунологические аспекты клиники профессиональных бронхолегочных заболеваний. Медицина труда и пром. экология 2003; 6: 5-10.
23. Румянцева О.И. Клинико-биохимические особенности формирования и течения бронхолегочной патологии от воздействия аэрозолей цветных металлов-Дис... .канд.мед.наук, Москва, 2005
24. Румянцева О.И., Кузьмина, Л.П., Ожиганова В.Н.. Состояние протеиназно-ингибиторной системы у больных профессиональной бронхиальной астмой от воздействия аэрозолей цветных металлов. // Медицина труда и промышленная экология. --2005. № 23-27.
25. Вахрушев Я.М., Ермаков Г.И., Шараев П.Н. Оценка метаболизма основного вещества, соединительной ткани при хронической обструктивной болезни легких. Тер. архив 2006; 3: 13—16.
26. Герштейн ЕС, Муштенко ВВ, Короткова ЕА, Бежанова СД, Морозов АА, Алферов АА, Казанцева ИА, Кушлинский НЕ. Матриксные

- металлопротеиназы-2, 7, 8, 9 и их тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки: клинко-морфологические корреляции. Альманах клинической медицины. 2017;45(2): 94-101.
27. Шадрин А.С. Матриксные металлопротеиназы: структура, функции и генетический полиморфизм // Патогенез. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 14–23
28. Baker A. B. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities / A. Baker, D. Edwards, G. Murphy // J. Cell Science. - 2002. - Vol. 115. - P. 3719-3727.
29. Cieplak P, Strongin AY. Matrix metalloproteinases - From the cleavage data to the prediction tools and beyond. Biochim Biophys Acta. 2017. pii: S0167-4889(17)30064-2. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.03.010.
30. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):221-33.
31. Basargina, M.A. Activity of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitor in Children with Bronchopulmonary Dysplasia / I.V. Davydova, G.V. Yatzik, T.V. Bershova, M.A. Basargina // European Respiratory Journal.- Austria.- 2009.-P.719.
32. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):221-33.
33. Checa M, Ruiz V, Montano M, Velázquez-Cruz R, Selman M, Pardo A. MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis. Hum Genet. 2008;124(5):465-72.
34. Исследование полиморфных вариантов гена матриксной металлопротеиназы 3 (ММП-3) в качестве маркера риска развития артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у населения Республики Карелия / Коломейчук С. Н., Корнева В. А., Илюха В. В. , Кузнецова А. С., Кузнецова Т. Ю. // Журнал биомедицинских технологий. 2014. № 2. С. 10-16.

- 35.Чиненная О.В. Фено- и генотипические особенности протеиназно-ингибиторной системы у больных профессиональными заболеваниями органов дыхания Дис... .канд.мед.наук, Москва,2003
- 36.Клишо, Е.В. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе / Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. // Сибирский онкологический журнал. – 2003 – N 2 – С. 63–70
- 37.Герштейн ЕС, Муштенко ВВ, Короткова ЕА, Бежанова СД, Морозов АА, Алферов АА, Казанцева ИА, Кушлинский НЕ. Матриксные металлопротеиназы-2, 7, 8, 9 и их тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки: клинко-морфологические корреляции. Альманах клинической медицины. 2017;45(2):94–101.
- 38.Кушлинский НЕ, Герштейн ЕС. Матриксные металлопротеиназы и компоненты системы активации плазминогена в патогенезе и клиническом течении рака толстой кишки. Патогенез. 2013;11(3):4 – 12.
- 39.Исследование полиморфных вариантов гена матриксной металлопротеиназы 3 (ММП-3) в качестве маркера риска развития артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у населения Республики Карелия / Коломейчук С. Н., Корнева В. А., Илюха В. В. , Кузнецова А. С., Кузнецова Т. Ю. // Журнал биомедицинских технологий. 2014. № 2. С. 10-16.
- 40.Basargina, M.A. Activity of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitor in Children with Bronchopulmonary Dysplasia / I.V. Davydova, G.V. Yatzik, T.V. Bershova, M.A. Basargina // European Respiratory Journal.- Austria.- 2009.-P.719.
- 41.Герштейн ЕС, Огнерубов НА, Кушлинский НЕ. Ассоциированные с опухолью протеазы и их тканевые ингибиторы. В: Кушлинский НЕ, Красильников МА, ред. Биологические маркеры опухолей:

фундаментальные и клинические исследования. М.: Издательство РАМН; 2017. с. 197-230.

42. Шадрина А.С. Матриксные металлопротеиназы: структура, функции и генетический полиморфизм // Патогенез. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 14–23
43. Дуева Л.А. Иммунологические аспекты клиники профессиональных бронхолегочных заболеваний. Медицина труда и пром. экология 2003; 6: 5-10.
44. Мельникова О.В. Клинико-биохимическая характеристика хронического воспаления при профессиональном бронхите// Медицина труда и пром. Экология 2003.-№2-с.3 5-39

Выпускная квалификационная работа на тему:


«Изучение матричных металлопротеиназ у больных с бронхолёгочной патологией»

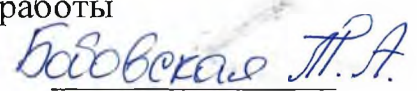
по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

выполнена мной самостоятельно. Все использованные в работе материалы и положения из научной литературы и других источников имеют ссылки на них.

« 15 » июня 2020

Автор выпускной квалификационной работы

  
\_\_\_\_\_  
(подпись)

  
\_\_\_\_\_  
(Ф.И.О. студента)