

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО И СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРОВ РОСТА В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ

Котович И.Л.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», кафедра биологической химии

Воздействие высоких концентраций кислорода на незрелые легкие является одним из факторов развития тяжелой хронической патологии легких у недоношенных детей - бронхолегочной дисплазии (БЛД). Основными гистологическими признаками БЛД являются уменьшение альвеоляризации (увеличение объема и уменьшение количества альвеол), и нарушение васкуляризация легких (уменьшение количества артериол и капилляров), что в целом приводит к значительному сокращению эффективного газообмена (7).

Известно, что формирование альвеол активно продолжается и в постнатальном периоде (3). Процесс альвеологенеза является хорошо скоординированным и требует тонкого взаимодействия между интерстициальными, эпителиальными и сосудистыми компонентами легких. Показано, что среди сигнальных механизмов, ответственных за нормальное развитие альвеолярного отдела легких, важная роль принадлежит факторам роста. Принципиальным участником процесса септации (образования новых межальвеолярных перегородок) является трансформирующий фактор роста бета (transforming growth factor beta, TGF β), поскольку он стимулирует продукцию эластина фибробластами (2, 11). Формирование микроваскулярной сети в легких зависит от сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) (13). Важная роль VEGF в процессе созревания и поддержания нормальной структуры легких подтверждается тем, что применение ингибиторов ангиогенеза (антагонистов рецепторов VEGF, антител к данному фактору) в экспериментах приводило не только к нарушению васкуляризации, но и к подавлению септации и, в конечном итоге, к уменьшению числа альвеол в развивающихся легких (6, 10) и развитию эмфиземы у взрослых животных (8). Мы предположили, что высокие концентрации кислорода, используемые в процессе искусственной вентиляции легких при выхаживании недоношенных новорожденных, могут провоцировать изменение продукции факторов роста в легких и, тем самым, нарушать процесс альвеоляризации и способствовать развитию БЛД.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния длительной гипероксии в эксперименте на содержание трансформирующего и сосудистого эндотелиального факторов роста в легких новорожденных морских свинок.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. В эксперименте использовались новорожденные морские свинки. Животных опытных групп в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% (температура 20-25°C, относительная влажность 50-80%). Концентрацию кислорода в камере контролировали с помощью анализатора кислорода ПГК-06-100Р (ЗАО «Инсовт», РФ). Длительность воздействия гипероксии составляла 3, 7 и 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных; приводимые данные – результат двух независимых экспериментов для каждого из изучаемых сроков воздействия. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и выделяли легкие для исследования. После удаления крупных бронхов легкие взвешивали на аналитических весах (AS 220/C/2, Radwag, Польша), тщательно измельчали ножницами, после чего растирали в стеклянном гомогенизаторе на льду, добавляя по 2,0 мл на г ткани PBS, содержащего 0,05% NaN₃, 0,5% тритон X-100 и коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США), pH 7,4, до образования однородного гомогената.

Общий белок гомогенатах легких определяли по методу Lowry.

Содержание TGFβ1 определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора реагентов фирмы DRG Instruments GmbH (Германия). Измерение оптической плотности проб и стандартов проводили при 450 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200, США. Минимальное определяемое содержание TGFβ1 (чувствительность набора) составляло 1,9 нг·л⁻¹. Содержание TGFβ1 в гомогенатах выражали в пг·мг белка⁻¹.

Содержание VEGF определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора реагентов фирмы DRG international Inc. (США). Измерение оптической плотности проб и стандартов проводили при 450 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200, США. Минимальное определяемое содержание VEGF (чувствительность набора) составляло 14,04 нг·л⁻¹. Содержание VEGF в гомогенатах выражали в пг·мг белка⁻¹.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0. Для сравнительного анализа данных опытных и контрольных групп на первом этапе определяли нормальность распределения цифровых показателей с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Дальнейший статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-теста Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов, охватывающих 50% наблюдений.

Результаты и их обсуждение

При кратковременном воздействии гипероксии (в течение 3 суток) отмечалось увеличение содержания трансформирующего фактора роста

(TGFβ1) в легких новорожденных морских свинок в среднем до 133,5% от контроля (см. табл.). Более длительное воздействие гипероксии, напротив, сопровождалось снижением уровня данного фактора до 63,9% (через 7 суток) и 55,9% от контроля (через 14 суток воздействия гипероксии), $p < 0,05$. Существенного изменения уровня сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в гомогенатах легких животных, подвергавшихся воздействию гипероксии в течение 3 суток, выявлено не было. В опытной группе «7 суток» содержание VEGF в легких имело тенденцию к снижению, которая, однако, не была статистически достоверной. На 14-е сутки воздействия гипероксии уровень VEGF был достоверно снижен и составил в среднем 68,8% от контроля ($p < 0,05$).

Таблица. Содержание факторов роста (TGFβ1 и VEGF) в гомогенатах легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

Группа		TGFβ1, пг·мг белка ⁻¹	VEGF, пг·мг белка ⁻¹
3 сут	Контроль	13,1 (11,9; 15,4)	0,84 (0,80; 1,07)
	Опыт	17,4 (13,7; 29,1)*	0,77 (0,66; 0,98)
7 сут	Контроль	28,8 (26,3; 31,5)	0,87 (0,43; 1,31)
	Опыт	18,5 (9,9; 25,5)*	0,57 (0,54; 1,10)
14 сут	Контроль	17,7 (9,8; 30,2)	0,57 (0,49; 0,66)
	Опыт	9,9 (6,9; 14,1)*	0,39 (0,33; 0,47)*

Примечание. * – $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание TGFβ1 в легких новорожденных морских свинок, подвергавшихся действию гипероксии в течение 3 суток, увеличивалось. Ранее в ряде экспериментальных работ было показано, что длительная избыточная экспрессия данного фактора приводит к развитию морфологических изменений в легких, характерных для БЛД (2, 4). Повышенный уровень TGFβ был обнаружен в бронхоальвеолярной лаважной жидкости у недоношенных детей, у которых в последующем развивалась БЛД (9). В настоящем исследовании воздействие гипероксии в течение более продолжительного времени (7 и 14 суток) приводило к снижению уровня TGFβ1 в легких опытных животных по сравнению с контрольными. Вероятно, это могло быть обусловлено усилением протеолитических процессов в легких. Ранее нами было выявлено повышение активности протеиназ (нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ) в эти сроки воздействия гипероксии (1). Известно, что TGFβ1 стимулирует синтез и секрецию фибробластами основных структурных белков (коллагена и эластина). Снижение уровня этого фактора роста может частично обуславливать обнаруженное нами ранее уменьшение содержания коллагена в легких животных при длительной гипероксии (14 суток) (1).

Выявленное снижение уровня VEGF в легких новорожденных морских свинок в условиях длительной гипероксии соответствует данным, полученным другими исследователями, которые обнаружили уменьшение экспрессии VEGF и его рецепторов при гипероксическом повреждении легких у новорожденных крыс (5). Предполагают, что такой эффект может быть следствием окислительного повреждения регуляторов экспрессии VEGF, в частности, белков системы тиоредоксина (12). Кроме того, нельзя исключить и усиленное разрушение данного фактора в условиях гипероксии за счет повышения протеолитической активности. Снижение уровня VEGF в легких новорожденных представляется неблагоприятным фактором, который может нарушать процесс альвеологенеза и способствовать повреждению легких при гипероксии.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сформулировать следующие выводы:

1. Воздействие гипероксии в течение 3-х суток приводит к увеличению уровня трансформирующего фактора роста TGF β 1 в легких новорожденных морских свинок; при более длительном воздействии (7 и 14 суток) содержание TGF β 1 в легких снижается, вероятно, вследствие увеличения активности протеиназ.
2. В условиях длительной гипероксии содержание сосудистого эндотелиального фактора роста в легких уменьшается до 68,8% от контроля на 14-е сутки воздействия.

Обнаруженные изменения могут быть причастны к нарушению процессов альвеологенеза и ремоделирования соединительной ткани в легких новорожденных в условиях гипероксии и, тем самым, вносить вклад в патогенез БЛД. Фармакологическая коррекция сигнальных путей, задействованных в постнатальном созревании легких, представляется одним из возможных направлений патогенетической терапии и профилактики данной патологии.

Список литературы:

1. Котович, И.Л. Влияние экспериментальной гипероксии на активность нейтрофильной эластазы, матриксных металлопротеиназ и альфа1-протеиназного ингибитора в легких / И.Л. Котович, Ж.А.Рутковская, Л.В.Редько, Н.В.Волкова, А.Д.Таганович // Весці НАНБ, сер. мед. навук. – 2012. - №4. - С. 63-68.
2. Alejandre-Alcazar, M.A. Hyperoxia modulates TGF- β /BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia / M.A.Alejandre-Alcazar, G. Kwapiszewska, I. Reiss [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2007. – Vol. 292. – P. L537-L549.
3. Bourbon, J. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia / J. Bourbon, O. Boucherat, B. Chailley-Heu, C. Delacourt // Pediatr. Res. – 2005. - Vol.57. – P.38R-46R.
4. Gauldie, J. Transfer of the active form of transforming growth factor-beta1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary

- dysplasia / J. Gauldie, T. Galt, P. Bonniaud [et al.] // Am. J. Pathol. – 2003. – Vol.163(6). – P.2575-2584.
5. Hosford, G.E. Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2alpha in the newborn rat lung / G.E. Hosford, D.M. Olson // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2003. – Vol. 285. – P. L161-L168.
 6. Jakkula, M. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung / M. Jakkula, TD. Le Cras, S. Gebb [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. L600-L607.
 7. Jobe, A. The new BPD: an arrest of lung development / A. Jobe // Pediatr. Res. – 1999. – Vol.46. – P.641-643.
 8. Kasahara, Y. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema / Y. Kasahara, R.M. Tuder, L. Taraseviciene-Stewart [et al.] // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol.106. – P. 1311-1319.
 9. Kotecha, S. Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity / S. Kotecha, A. Wangoo, M. Silverman, RJ. Shaw // J. Pediatr. – 1996. – Vol.128. – P. 464-469.
 10. Le Cras, TD. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure / T.D. Le Cras, N.E. Markham, R.M. Tuder [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2002. – Vol. 283. – P. L555-L562.
 11. McGowan, S.E. Exogenous and endogenous transforming growth factor-beta influence elastin gene expression in cultured lung fibroblasts / S.E. McGowan, S.K. Jackson, P.J. Olson, T. Parekh, L.I. Gold // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 1997. – Vol.17. – P. 25-35.
 12. Tipple, T.E. Alterations of the thioredoxin system by hyperoxia. Implications for alveolar development / T.E. Tipple, S.E. Welty, L.D. Nelin [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2009. – Vol.41. – P. 612-619.
 13. Voelkel, N.F. Vascular endothelial growth factor in the lung / N.F. Voelkel, R.W. Vandivier, R.M. Tuder // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P. L209-L221.

Котович Ирина Леонидовна, доцент кафедры биологической химии УО «БГМУ»

Тел.служ. (017) 272 67 88

Тел.моб. (029) 962 63 13 (velcom)