

УДК 616-092.9:612.014.464

## Изменение уровня сосудистого эндотелиального фактора роста и метаболитов оксида азота в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

Котович И. Л.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Нарушения ангиогенеза и формирования альвеол в постнатальном периоде на фоне длительно персистирующего окислительного стресса являются важным патогенетическим аспектом бронхолегочной дисплазии. В настоящем исследовании изучено влияние длительной гипероксии, а также препаратов антиоксидантного действия при их ингаляционном введении на содержание регуляторов ангиогенеза (сосудистого эндотелиального фактора роста и монооксида азота) в легких новорожденных морских свинок. Полученные данные свидетельствуют о возможности коррекции уровня сосудистого эндотелиального фактора роста в легких у новорожденных животных, подвергавшихся длительной гипероксии, с использованием водного раствора N-ацетилцистеина и липосомных форм  $\alpha$ -токоферола и ретиноидов.

**Ключевые слова:** гипероксия, легкие, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), нитриты, антиоксиданты.

**Введение.** В основе развития тяжелой хронической патологии легких (бронхолегочной дисплазии) лежит незрелость альвеолярного отдела легких у недоношенных новорожденных и нарушения постнатального процесса формирования и васкуляризации альвеол. Ключевую позицию в патогенезе занимает окислительный стресс, развивающийся на фоне кислородотерапии и врожденного дефицита антиоксидантов у новорожденных и сопровождающий длительно персистирующий воспалительный процесс, приводящий к необратимым структурно-функциональным изменениям в легких.

Процесс формирования альвеол тесно связан с процессом ангиогенеза и находится под контролем регуляторных факторов, основным из которых является сосудистый эндотелиальный фактор роста (*vascular endothelial growth factor, VEGF*). В пользу этого свидетельствуют экспериментальные исследования, показывающие нарушение процессов ангиогенеза и развития альвеол в легких при введении блокатора рецептора *VEGF*, а также нарушение экспрессии *VEGF* рецептора 2-го типа у недоношенных крыс, подвергавшихся постнатально гипероксии [1]. Клинические данные показали снижение уровня *VEGF* в бронхоальвеолярной лаважной жидкости у пациентов с бронхолегочной дисплазией [2].

Наряду с эндотелием, в продукции *VEGF* принимают участие и другие клеточные элементы, включая клетки крови (моноциты, макрофаги), участвующие в воспалении. По имеющимся данным, изменение окислительно-восстановительного баланса при воспалении оказывает регуляторное влияние на экспрессию *VEGF* [3]. Причем избыточная продукция свободных радикалов клетками может оказывать двоякое действие на ангиогенез в зависимости от уровня активных форм кислорода: в присутствии высоких концентраций пероксида водорода происходила гибель эндотелиальных клеток, тогда как менее высокие концентрации способствовали ангиогенезу. Кроме активных форм кислорода, в регуляции экспрессии *VEGF* принимает участие монооксид азота, основным источником которого в физиологических условиях является эндотелиальная NO-синтаза, а в условиях воспаления — индуцибельная изоформа этого фермента [4].

Учитывая важную роль *VEGF* в постнатальном формировании альвеол и наличие взаимосвязи между нарушениями *VEGF*-сигналикации и свободнорадикальными процессами, мы предприняли попытку оценить в условиях экспериментального моделирования бронхолегочной дисплазии возможность коррекции уровня *VEGF* в легких при введении препаратов антиоксидантного действия. Представляло интерес также изучить изменения продукции монооксида азота в легких в указанных условиях.

**Цель работы** — изучение характера изменения уровня сосудистого эндотелиального фактора роста и метаболитов монооксида азота в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии и ингаляционного введения антиоксидантов.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили с использованием новорожденных морских свинок, которые находились на стандартном рационе вивария БГМУ, с соблюдением этических норм

и правил проведения работ с лабораторными животными. Для создания условий гипероксии новорожденных животных сразу после рождения помещали в плексигласовую камеру, где поддерживали концентрацию кислорода не менее 75%. Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 3 и 14 суток (по данным ранее проведенных нами исследований, именно в эти сроки наблюдались наиболее выраженные изменения оксидантно-антиоксидантного баланса в легких). Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. Для ингаляционного введения препаратов использовали компрессорный небулайзер *CompAir* (NE-C28-E, *Omron*, Китай). Ингаляции проводили раз в два дня, всего дважды в течение 3 суток и 7 раз в течение 14 суток воздействия гипероксии.

Выбор препаратов основывался на данных литературы о наличии у них антиоксидантных свойств и возможности ингаляционного введения как гидрофильных, так и липофильных антиоксидантов в составе липосом. В данном исследовании изучены четыре вида препаратов: 1) водный раствор *N*-ацетилцистеина (20%-ный раствор для ингаляций, Белмедпрепараты, Беларусь) из расчета 250 мг/кг в натрий-фосфатном буфере (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH = 7,4; 2) мультиламеллярные липосомы, содержащие *N*-ацетилцистеин (250 мг/кг), *L*- $\alpha$ -дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) (50 мг/кг), и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH = 7,4; 3) мультиламеллярные липосомы, содержащие  $\alpha$ -токоферол (12,5 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH = 7,4; 4) мультиламеллярные липосомы, содержащие ретинол (6 мг/кг), ретиновую кислоту (0,6 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH = 7,4. Мультиламеллярные липосомы получали общепризнанным методом механического диспергирования путем добавления буферного раствора к сухой липидной пленке и встряхивания на миксере *Maxi-Mix 1* (*Thermolyne*, США) до образования однородной дисперсии.

По окончании эксперимента животных наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг интраперитонеально). В качестве материала для исследования использовали гомогенаты легких и бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ). Легкие обескровливали путем перфузии 0,9 % NaCl через легочную артерию, выделяли, тщательно измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе во льду с добавлением 0,9 % NaCl (2,0 мл на г ткани) и коктейля ингибиторов протеаз (*Sigma*, США). Полученный гомогенат центрифугировали (15 мин, 1500 g, 4°C) и использовали для анализа. Для получения БАЛЖ проводили промывание легких через эндотрахеальный зонд трижды по 8 мл раствором 0,9 % NaCl. Полученную БАЛЖ центрифугировали 10 мин при 200 g, 4°C (рефрижераторная центрифуга PC-6, Кыргызстан) для осаждения клеток.

Общий белок определяли по Лоури.

Содержание сосудистого эндотелиального фактора роста (*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 *StatFax 3200*, США. Минимальное определяемое содержание *VEGF* (чувствительность набора) составляло 14,04 нг/л. Содержание *VEGF* в гомогенатах выражали в пг/мг белка.

О продукции монооксида азота (NO) судили по содержанию нитрит-ионов (одного из конечных стабильных метаболитов NO) в БАЛЖ. Для определения содержания нитрит-ионов использовали стандартную методику с реактивом Грисса. Количество нитритов выражали в мкмоль/л.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ *Statistica 10,0*. Определяли нормальность распределения цифровых показателей в группах с использованием критерия Колмогорова – Смирнова. В дальнейшем достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического *U*-теста Манна – Уитни для независимых выборок. Для выявления корреляционной взаимосвязи показателей рассчитывали коэффициент Спирмена (R). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (медиана (25–75 процентиль)).

**Результаты и их обсуждение.** Данные, полученные в ходе исследования, представлены в таблице.

При исследовании содержания сосудистого эндотелиального фактора роста в легких опытных животных, подвергавшихся гипероксии в течение 3 суток, статистически достоверных изменений по сравнению с соответствующей контрольной группой выявлено не было. Введение антиоксидантов также не оказывало значимого влияния на уровень *VEGF* в легких в эти сроки.

При увеличении продолжительности воздействия высоких концентраций кислорода содержание *VEGF* в легких достоверно снижалось и на 14-е сутки составляло 64 % от контрольных значений ( $p < 0,05$ ). Выявленные нами изменения соответствуют данным, полученным другими исследователями, которые обнаружили уменьшение экспрессии *VEGF* и его рецепторов при гипероксическом повреждении легких

у недоношенных бабуинов [5]. Предполагают, что такой эффект может быть следствием окислительного повреждения регуляторов экспрессии *VEGF*, в частности, белков системы тиоредоксина [6]. Ингаляционное введение водного раствора *N*-ацетилцистеина и липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол и ретиноиды, в условиях длительной гипероксии сопровождалось восстановлением нормального уровня *VEGF* в легких, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий показателя в этих группах с группой «контроль 14 суток». Можно предположить, что действие данных препаратов на содержание *VEGF* обусловлено нормализацией оксидантно-антиоксидантного баланса в легких, при этом ожидаемым благоприятным эффектом будет нормализация процесса альвеологенеза. Однако в группе, получавшей ингаляции с липосомной формой *N*-ацетилцистеина, содержание *VEGF* оставалось сниженным и не отличалось от группы «гипероксия 14 суток», вероятно, вследствие подавляющего влияния других регуляторных факторов на продукцию *VEGF* в этих условиях.

Таблица — Содержание сосудистого эндотелиального фактора роста (*VEGF*) в легких и нитрит-ионов в БАЛЖ новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

Группа		<i>VEGF</i> , пг/мг белка	Нитрит-ионы, мкМ/л
3 суток	Контроль	0,84 (0,80–1,07)	0,16 (0,11–0,27)
	Гипероксия	0,73 (0,59–1,07)	0,44 (0,33–0,77) *
	Гипероксия + N-ацетилцистеин (водн.)	0,99 (0,91–1,07)	0,47 (0,38–0,55) *
	Гипероксия + N-ацетилцистеин (липос.)	0,78 (0,62–0,81)	0,65 (0,51–0,71) *
	Гипероксия + $\alpha$ -токоферол (липос.)	0,66 (0,56–0,86)	0,11 (0,07–0,11) ^
	Гипероксия + ретиноиды (липос.)	0,68 (0,50–0,79)	0,22 (0,11–0,55)
14 суток	Контроль	0,66 (0,53–1,03)	0,30 (0,16–0,57)
	Гипероксия	0,42 (0,28–0,53) *	0,08 (0–0,18) *
	Гипероксия + N-ацетилцистеин (водн.)	1,45 (0,66–1,58) ^	0,25 (0–0,79) ^
	Гипероксия + N-ацетилцистеин (липос.)	0,35 (0,31–0,61) *	1,01 (0,87–1,09) ^*
	Гипероксия + $\alpha$ -токоферол (липос.)	0,52 (0,34–0,64)	0,16 (0,10–0,19)
	Гипероксия + ретиноиды (липос.)	0,48 (0,37–0,61)	0,11 (0,05–0,27)

\* $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «контроль»;

^ $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «гипероксия».

Мы исследовали также уровень нитрит-ионов в БАЛЖ в условиях гипероксии с целью оценки интенсивности продукции NO клетками легких. Уровень нитритов в БАЛЖ опытных животных в группе «3 суток» достоверно превышал контрольные значения в среднем в 2,8 раза ( $p < 0,05$ , см. таблицу). Такое повышение уровня катаболитов оксида азота в бронхоальвеолярном пространстве новорожденных морских свинок на ранних этапах воздействия гипероксии может рассматриваться как важный физиологический механизм защиты от повреждающего действия кислорода, обусловленный противовоспалительными, антиапоптотическими эффектами NO и его антиспазматическим влиянием на тонус сосудов и бронхов. Введение водной и липосомной форм *N*-ацетилцистеина не оказывало существенного влияния на уровень нитритов в БАЛЖ в эти сроки наблюдения, тогда как на фоне ингаляций с токоферолом и ретиноидами в составе липосом концентрация нитрит-ионов снижалась до уровня контроля. Колебания уровня нитрит-ионов на фоне 3-суточной гипероксии не сопровождалось изменениями содержания *VEGF* в легких.

На 14-е сутки воздействия гипероксии у животных выявлено выраженное снижение концентрации нитритов в БАЛЖ. Аналогичные результаты были получены другими авторами, изучавшими продукцию NO в сосудах легких артериального типа крыс в условиях хронической гипероксии [7]. Наблюдаемое падение уровня нитрит-ионов в легких при действии длительной гипероксии, как представляется, не-

благоприятно для легких. Помимо участия в свободно-радикальных процессах, задействованных в механизмах фагоцитоза и бактерицидности, NO является важнейшей сигнальной молекулой, участвующей в регуляции сосудистого тонуса, апоптоза, и стимулирующей продукцию VEGF [4]. В этой связи согласованное снижение уровня нитрит-ионов и VEGF в группе «гипероксия 14 суток», обнаруженное в нашем исследовании, представляется закономерным. На фоне ингаляционного введения антиоксидантов в условиях двухнедельной гипероксии продукция NO в легких усиливалась: в результате использования водного раствора *N*-ацетилцистеина, липосом с токоферолом и ретиноидами концентрация нитритов в БАЛЖ увеличивалась и соответствовала нормальным значениям, а при использовании липосомной формы *N*-ацетилцистеина даже превышала в 3,4 раза (см. таблицу). Выявленные в нашем исследовании эффекты ингаляционного введения антиоксидантов в условиях моделирования бронхолегочной дисплазии согласуются с данными, полученными с использованием других моделей *in vivo* и *in vitro* в отношении влияния *N*-ацетилцистеина, токоферола и ретиноидов на активность NO-синтаз и продукцию NO [8–10]. Более выраженный эффект *N*-ацетилцистеина в составе липосом по сравнению с водным раствором этого препарата может быть обусловлен усилением его эффекта и увеличением продолжительности действия, что является характерным для липосомной формы лекарств.

В то же время нельзя не отметить, что гиперпродукция NO в группе «гипероксия + *N*-ацетилцистеин липосомный» сочеталась со сниженным уровнем VEGF в легких. Вероятно, как недостаточное, так и избыточное образование NO в течение длительного времени является неблагоприятным фактором, приводящим к снижению содержания VEGF в легких. Причины данного явления требуют отдельного изучения, можно лишь предположительно отметить вероятное усиление апоптоза клеток эндотелия и повреждение самого VEGF или белков, участвующих в его синтезе, высокореактивными продуктами метаболизма оксида азота (например, пероксинитритами). На основании результатов, полученных в данном исследовании, мы рассчитали коэффициент корреляции Спирмена, который не показал наличия достоверной связи между уровнями VEGF и нитрит-ионами ( $r = 0,15$ ,  $p = 0,8$ ), что также свидетельствует в пользу более сложных взаимодействий между этими факторами, нежели простая прямо пропорциональная зависимость.

**Заключение.** Воздействие гипероксии в течение 3 суток не сопровождается изменением уровня сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в легких новорожденных морских свинок. Увеличение продолжительности инкубации в условиях гипероксии до 14 суток приводит к достоверному снижению содержания VEGF в легких до 64 % от контрольных значений, что может предопределять нарушения процессов ангиогенеза и образования новых альвеол и способствовать развитию диспластических изменений в легких. Одновременно со снижением уровня VEGF в легких наблюдается снижение уровня метаболитов монооксида азота (нитрит-ионов) в БАЛЖ.

На фоне длительной гипероксии (14 суток) ингаляционное введение водного раствора *N*-ацетилцистеина, липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол, и липосом, содержащих ретинол и ретиноевую кислоту, способствует нормализации уровня VEGF и нитрит-ионов в легких.

При введении липосом, содержащих *N*-ацетилцистеин, уровень VEGF остается сниженным, как и при изолированном действии длительной гипероксии (14 суток). Возможной причиной может служить чрезмерная стимуляция продукции оксида азота клетками легких вследствие усиления и пролонгирования эффекта *N*-ацетилцистеина в составе липосом.

Полученные данные свидетельствуют о возможности коррекции уровня сосудистого эндотелиального фактора роста в легких у новорожденных животных в условиях гипероксии с использованием препаратов антиоксидантного действия и создают предпосылки для разработки новых терапевтических подходов к профилактике и лечению бронхолегочной дисплазии.

### Литература

1. Oak, P. The BPD trio? Interaction of dysregulated PDGF, VEGF, and TGF signaling in neonatal lung disease / P. Oak, A. Hilgendorff // Mol. Cell. Pediatrics. — 2017. — Vol. 4:11. — DOI: 10.1186/s40348-017-0076-8.
2. Been, J. V. Early alterations of growth factor patterns in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia / J. V. Been, A. Debeer, J. F. van Iwaarden, N. Kloosterboer, V. L. Passos [et al.] // Pediatr. Res. — 2010. — Vol. 67, № 1. — P. 83–89.
3. Kim, Y.-W. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease / Y.-W. Kim, T.V. Byzova // Blood. — 2014. — Vol. 123, № 5. — P. 625–631.
4. Dong, J. Function of inducible nitric oxide synthase in the regulation of cervical cancer cell proliferation and the expression of vascular endothelial growth factor / J. Dong, M. Cheng, H. Sun // Mol. Med. Reports. — 2014. — Vol. 9, № 2. — P. 583–589.



5. Tambunting, F. Impaired lung vascular endothelial growth factor in extremely premature baboons developing bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease / F. Tambunting, K. D. Beharry, J. Waltzman, H. D. Modanlou // J. Investig. Med. — 2005. — Vol. 53(5). — P. 253–262.
6. Tipple, T. E. Alterations of the thioredoxin system by hyperoxia. Implications for alveolar development / T. E. Tipple, S. E. Welty, L. D. Nelin, J. M. Hansen, L. K. Rogers // Am. J. Respir. — Cell. Mol. Biol. — 2009. — Vol. 41. — P. 612–619.
7. Belik, J. Chronic O<sub>2</sub> exposure in the newborn rats results in decreased pulmonary arterial nitric oxide release and altered smooth muscle response to isoprostane / J. Belik, R. P. Jankov, J. Pan, M. Yi, I. Chaudhry [et al.] // Am. J. Appl. Physiol. — 2004. — Vol. 96. — P. 725–730.
8. Xia, Z. Antioxidant N-acetylcysteine restores systemic nitric oxide availability and corrects depressions in arterial blood pressure and heart rate in diabetic rats / Z. Xia, P. R. Nagareddy, Z. Guo, W. Zhang, J. H. McNeill // Free Radic. Res. — 2006. — Vol. 40, № 2. — P. 175–184.
9. Heller, R. Alpha-Tocopherol and endothelial nitric oxide synthesis / R. Heller, G. Werner-Felmayer, E. R. Werner // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2004. — Vol. 1031. — P. 74–85.
10. Moon, K.-Y. Upregulation of nitric oxide synthase activity by all-trans retinoic acid and 13-cis retinoic acid in human malignant keratinocytes / K.-Y. Moon // Biomed. Sci. Letters. — 2019. — Vol. 25. — P. 196–200.

## **Change in vascular endothelial growth factor and nitrogen oxide metabolites in the lungs of newborn guinea pigs under hyperoxia**

*Kotovitch I. L.*

*Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus*

Impaired angiogenesis and the alveoli formation in the postnatal period along with the long-term persistent oxidative stress are important aspects of bronchopulmonary dysplasia pathogenesis. This study examined the effects of prolonged hyperoxia, as well as aerosolized antioxidant drugs, on the content of angiogenesis regulators (vascular endothelial growth factor and nitric monoxide) in the lungs of newborn guinea pigs. The data obtained indicate the possibility to restore the level of vascular endothelial growth factor in the lungs of newborns subjected to prolonged hyperoxia using an aqueous solution of N-acetylcysteine and liposomal forms of  $\alpha$ -tocopherol and retinoids.

**Keywords:** hyperoxia, lungs, vascular endothelial growth factor (VEGF), nitrites, antioxidants.

*Поступила 30.10.2019*