

**ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕИНАЗ В ЛЕГКИХ И ПЛАЗМЕ  
НОВОРОЖДЕННЫХ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ**

*Котович И. Л., Рутковская Ж. А., Таганович А. Д.*

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

**Реферат.** Показано, что продолжительное воздействие гипероксии сопровождается увеличением содержания матриксных металлопротеиназ 2 и 9 (на 3, 7, 14-е сут гипероксии) и нейтрофильной эластазы (на 7 и 14 сут) в легких новорожденных морских свинок. Повышение уровня протеиназ в плазме крови животных происходит позднее: на 7-е сут для ММП и на 14-е сут для нейтрофильной эластазы. Спустя 14 сут гипероксии в легких новорожденных морских свинок уменьшается содержание коллагена, что может быть следствием активации протеолитических процессов. Полученные данные свидетельствуют о наличии выраженных изменений уровня протеиназ в легких у новорожденных животных, длительно находившихся в условиях гипероксии, что может вносить вклад в развитие диспластических изменений в легких.

**Ключевые слова:** гипероксия, легкие, нейтрофильная эластаза, матриксные металло-протеиназы.

**Введение.** Внеклеточный матрикс играет важную роль в сохранении целостности легких. Процессы образования и распада компонентов внеклеточного матрикса имеют важное значение в морфогенезе легких (ветвлении бронхиального дерева и формировании альвеол и межальвеолярных перегородок), а также в развитии патологии и восстановлении легочной ткани после повреждения.

Метаболизм компонентов внеклеточного матрикса регулируется системой «протеиназы–антипротеиназы». В развитии острых и хронических воспалительных процессов в легких основную роль играют играют нейтрофильная эластаза и матриксные металлопротеиназы [1]. Нейтрофильная эластаза относится к классу сериновых протеиназ. Секрецию эластазы осуществляют нейтрофилы после адгезии к эндотелиальным или эпителиальным клеткам, а также к элементам внеклеточного матрикса. Семейство матриксных металлопротеиназ (далее — ММП) включает более 20 представителей, отличающихся субстратной специфичностью. Источниками ММП являются, главным образом, клетки стромы (фибробласты, эндотелиальные клетки), а также макрофаги и нейтрофилы.

Известно, что дисбаланс в системе «протеиназы–антипротеиназы» причастен к нарушению архитектуры легочной ткани при бронхиальной астме, хронической обструктивной болезни легких [2]. Роль протеолитических ферментов в развитии бронхолегочной дисплазии (далее — БЛД) на разных этапах развития данной патологии изучена недостаточно.

**Цель работы** — изучение характера изменения уровня нейтрофильной эластазы, матриксных металлопротеиназ в легких и плазме новорожденных морских свинок при экспериментальном моделировании бронхолегочной дисплазии в динамике гипероксии.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовались новорожденные морские свинки, которые находились на стандартном рационе вивария БГМУ. Исследования проводили 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 70 %. Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 1; 3; 7 и 14 сут. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг интраперитонеально). В качестве материала для исследования использовали плазму крови и гомогенаты легких. Легкие обескровливали путем перфузии через легочную артерию 0,9 % NaCl, выделяли, тщательно измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе во льду с добавлением 0,9 % NaCl (2,0 мл на г ткани). Полученный гомогенат центрифугировали (15 мин, 1500 г, 4 °С) и использовали для анализа. Определение содержания нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ 2 и 9 (далее — ММП-2 и ММП-9) проводили в плазме и гомогенате методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием готовых наборов реагентов (DRG Instruments GmbH, Германия). Для определения содержания коллагена в гомогенатах легких использовали метод экстракции его кислыми растворителями после предварительного удаления примесей растворимых неколлагеновых белков [3]. Экстракцию неколлагеновых белков проводили раствором  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,02 М), экстракцию коллагена — уксусной кислотой (0,5 М), содержащей ЭДТА (5 мМ), при встряхивании. В дальнейшем нерастворимые в уксусной кислоте фракции осаждали центрифугированием (1500 г, 20 мин, ОПн-3, Кыргызстан). О содержании коллагена в легких судили по количеству общего белка в супернатанте кислого экстракта, полученного в результате 24-часового экстрагирования. Содержание коллагена в гомогенатах выражали в мкг/г ткани.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10,0. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический U-тест Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (медиана (25 процентиль – 75 процентиль)).

**Результаты и их обсуждение.** При исследовании содержания нейтрофильной эластазы в легких опытных животных, подвергавшихся гипероксии в течение 1 и 3 сут, статистически достоверных изменений по сравнению с соответствующими контрольными группами выявлено не было (таблица 1). При увеличении продолжительности воздействия высоких концентраций кислорода содержание эластазы в легких достоверно увеличивалось и на 7 и 14-е сут превышало контрольные значения в 2,0 и 2,9 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). В плазме крови достоверный рост уровня эластазы был зарегистрирован лишь у животных опытной группы, подвергавшихся гипероксии в течение 14 сут (таблица 1).

Таблица 1. — Содержание нейтрофильной эластазы в легких и плазме крови новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

| Группа   |            | Гомогенат легких, пг/мг<br>белка/г ткани | Плазма, нг/л         |
|----------|------------|--|----------------------|
| 1-е сут  | контроль   | 9,3 (7,9–11,5)                           | 0 (0–92,6)           |
|          | гипероксия | 9,6 (6,6–12,7)                           | 0 (0–246,6)          |
| 3-е сут  | контроль   | 10,4 (9,5–15,4)                          | 152,9 (0–237,9)      |
|          | гипероксия | 8,7 (5,7–17,2)                           | 345,1 (45,3–446,6)   |
| 7-е сут  | контроль   | 13,3 (11,8–14,1)                         | 0 (0–0)              |
|          | гипероксия | 26,8 (23,9–42,3)*                        | 0 (0–357,3)          |
| 14-е сут | контроль   | 13,5 (10,2–19,2)                         | 0 (0–0)              |
|          | гипероксия | 40,1 (22,0–63,4)*                        | 150,3 (72,1– 215,3)* |

\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Уровень матричных металлопротеиназ у новорожденных морских свинок в группе «гипероксия 1 сут» нами не определялся из-за недостаточного количества материала. На 3-е сут гипероксии содержание ММП-2 и ММП-9 в легких повышалось до 166 и 244 % от контроля соответственно ( $p < 0,05$ ) и оставалось таковым при увеличении длительности воздействия гипероксии (таблица 2). Уровни ММП-2 и ММП-9 в плазме животных, подвергавшихся гипероксии в течение 3 сут, достоверно не отличались от контроля. Более длительное воздействие гипероксии (в течение 7 и 14 сут) сопровождалось достоверным ростом содержания ММП-2 и ММП-9 в плазме новорожденных морских свинок (таблица 2).

Таблица 2. — Содержание ММП-2 и ММП-9 в легких и плазме крови новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

| Группа, показатель |            | Гомогенат легких, пг/мг<br>белка/г ткани | Плазма, нг/л      |
|--------------------|------------|--|-------------------|
| <b>ММП-2</b>       |            |  |                   |
| 3-е сут            | контроль   | 0,302 (0,265–0,443)                      | 53,2 (46,7–53,8)  |
|                    | гипероксия | 0,500 (0,388–0,608)*                     | 49,4 (48,2–52,6)  |
| 7-е сут            | контроль   | 0,501 (0, 499–0,605)                     | 51,5 (46,7–54,6)  |
|                    | гипероксия | 0,999 (0,681–1,303)*                     | 63,8 (56,5–71,2)* |
| 14-е сут           | контроль   | 0,250 (0,23–0,293)                       | 46,4 (43,8–49,1)  |
|                    | гипероксия | 0,399 (0,268–0,457)*                     | 54,0 (52,0–56,5)* |
| <b>ММП-9</b>       |            |  |                   |
| 3-е сут            | контроль   | 1,3 (0,9–1,8)                            | 18,1 (16,4–26,4)  |
|                    | гипероксия | 3,2 (2,1–4,7)*                           | 30,8 (22,9–39,3)  |
| 7-е сут            | контроль   | 1,3 (1,2–1,4)                            | 16,5 (15,8–27,1)  |
|                    | гипероксия | 1,6 (1,4–1,9)*                           | 47,1 (28,6–73,3)* |
| 14-е сут           | контроль   | 3,1 (2,3–4,5)                            | 17,0 (15,5–22,3)  |
|                    | гипероксия | 7,3 (4,8–9,0)*                           | 40,7 (37,4–81,2)* |

\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Было проведено также исследование содержания коллагена в гомогенатах после предварительного удаления примесей полярных неколлагеновых белков. Полученные данные показали, что содержание коллагена в легких подопытных животных на 1; 3 и 7-е сут воздействия высоких концентраций кислорода достоверно не отличалось от контроля, а на 14-е сут гипероксии составляло 364,9 (242,9–453,3) мкг/г ткани, что значительно меньше, чем в контроле (512,8 (443,2–563,5) мкг/г ткани,  $p < 0,05$ ).

Как следует из приведенных данных, гипероксия приводит к увеличению содержания нейтрофильной эластазы и матриксных протеиназ (в частности, ММП-2, специфически активной в отношении коллагена IV типа базальных мембран, и ММП-9, играющей важную роль в деградации компонентов внеклеточного матрикса наряду с нейтрофильной эластазой) в легких новорожденных морских свинок. Повышение содержания этих ферментов в плазме крови также имеет место, но в более поздние сроки в сравнении с аналогичными данными, полученными при исследовании легочной ткани.

По данным литературы, содержание эластазы в крови повышается при ряде патологий легких, таких как эмфизема, хроническая обструктивная болезнь легких и респираторный дистресс синдром взрослых [2]. Повышенное содержание ММП было обнаружено в крови недоношенных детей, у которых развивалась БЛД [1]. Известно, что в большинстве случаев нейтрофильная эластаза и другие протеазы попадают в кровоток из поврежденных тканей, что объясняет определенное «запаздывание» появления ферментов в плазме, обнаруженное в нашем исследовании. Полученные данные позволяют заключить, что длительная гипероксия в условиях предпринятого эксперимента приводит к усилению протеолитических процессов в легких с участием нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ, следствием чего может быть значительное уменьшение на 14-е сут воздействия гипероксии содержания коллагена в легких опытных животных. Обнаруженный дефицит коллагена в этот период гипероксии согласуется с описанной в литературе морфологической картиной, типичной для второй и третьей стадии БЛД, в частности, с наличием эмфизематозных изменений в легких [4]. Аналогичные данные были получены при изучении влияния гипероксии на содержание коллагена и эластина в легких недоношенных кроликов [5] и на культуре фибробластов, выделенных из легких [6]: в условиях гипероксии отмечалось подавление пролиферации клеток и ингибирование экспрессии иРНК проколлагенов I и III типа.

**Заключение.** Продолжительное воздействие гипероксии (3–14 сут) сопровождается увеличением содержания матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-9) и нейтрофильной эластазы в легких новорожденных морских свинок. Повышение уровня протеаз в плазме крови животных происходит позднее: на 7-е сут для ММП и на 14-е сут для нейтрофильной эластазы. Спустя 14 сут гипероксии в легких новорожденных морских свинок уменьшается содержание коллагена.

Полученные данные свидетельствуют о наличии выраженных изменений уровня протеиназ в легких у новорожденных животных, длительно находившихся в условиях гипероксии, что может вносить вклад в развитие диспластических изменений в легких.

#### Литература

1. Матриксные металлопротеиназы как биомаркеры формирования бронхолегочной дисплазии у детей / И. В. Давыдова [и др.] // Пульмонология. — 2009. — № 4. — С. 80–83.
2. Аверьянов, А. В. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких / А. В. Аверьянов // Цитокины и воспаление. — 2007. — № 4. — С. 3–8.
3. Кухарева, Л. В. Метод получения коллагена из телячьей кожи для тканевой инженерии и клеточного культивирования / Л. В. Кухарева, И. И. Шамолина, Е. В. Полевая // Цитология. — 2010. — Т. 52, № 7. — С. 597–602.
4. Northway, W. H. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia / W. H. Northway, R. C. Rosan, D. Y. Porter // N. Engl. J. Med. — 1967. — Vol. 276. — P. 357–368.
5. Lung morphometry, collagen and elastin content: changes after hyperoxic exposure in preterm rabbits / R. S. Mascaretti [et al.] // Clinics. — 2009. — Vol. 64, № 11. — P. 1099–1104.
6. Hyperoxia inhibits fetal rat lung fibroblast proliferation and expression of pro-collagens / N. Hussain [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. — 1997. — Vol. 273, № 17. — P. L726–L732.

### CHANGE OF THE PROTEINASE CONTENT IN LUNGS AND PLASMA OF NEWBORN GUINEA PIGS EXPOSED TO HYPEROXIA

*Kotovich I. L., Rutkovskaya Zh. A., Taganovich A. D.*

*Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus*

It was shown that prolonged exposure to hyperoxia is accompanied by an increase in the content of matrix metalloproteinases 2 and 9 (on days 3, 7, 14 of hyperoxia) and neutrophil elastase (on days 7 and 14) in the lungs of newborn guinea pigs. An increase in the level of proteinases in animal plasma occurs later: on the day 7 for matrix metalloproteinases and on the day 14 for neutrophil elastase. After 14 days of hyperoxia in the lungs

of newborn guinea pigs, the content of collagen decreases, which may be a consequence of the activation of proteolytic processes. The obtained data display the presence of pronounced changes in the level of proteinases in the lungs in newborn animals exposed to prolonged hyperoxia, which can contribute to the development of dys-plastic changes in the lungs.

**Keywords:** hyperoxia, lungs, neutrophil elastase, matrix metalloproteinases.