

## БИОМАРКЕРЫ НАРУШЕНИЯ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

А.А. Селиверстова, И.В. Давыдова\*, А.П. Фисенко, М.А. Басаргина, М.А. Сновская, А.А. Жужула  
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

## BIOMARKERS OF ANGIOGENESIS DISORDERS IN DEVELOPING BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA IN PREMATURE INFANTS

A.A. Seliverstova, I.V. Davydova\*, A.P. Fisenko, M.A. Basargina, M.A. Snovskaya, A.A. Zhuzhula  
National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

\* E-mail: davydova@nczd.ru

### Аннотация

При преждевременных родах и послеродовом повреждении развивающегося легкого нарушаются процессы ангиогенеза и альвеоляризации, что приводит к упрощению дистального воздушного пространства легких. Исследования биомаркеров ангиогенеза могут быть полезны для выявления младенцев с большей вероятностью развития бронхолегочной дисплазии (БЛД). **Цель исследования** – определить значимые биомаркеры ангиогенеза в формировании БЛД у недоношенных детей для совершенствования прогнозирования и ранней диагностики данного заболевания. **Материалы и методы.** В исследование было включено 65 недоношенных детей, находящихся на госпитализации в отделении патологии новорожденных и детей раннего детского возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» (Москва). Все пациенты были разделены на две группы: сформировавшие БЛД – 46 (71%) пациентов и не сформировавшие данное заболевание – 19 (29%) пациентов. Для исследования наиболее значимых биохимических маркеров ангиогенеза в сыворотке крови использовали метод иммуноферментного анализа. **Результаты.** Получены следующие достоверно значимые результаты: уровень PDGF в группе детей с БЛД оказался на 30% ниже, чем в группе детей без БЛД (3180 против 4783 пг/мл); уровень PECAM-1 – на четверть выше в основной группе (3624.3 пг/мл), чем в контрольной группе детей без БЛД (2724 пг/мл); уровень CTGF в группе детей с БЛД практически в два раза (217.3 пг/мл) превышал уровень в группе детей без БЛД (117.3 пг/мл). **Заключение.** Выявлено значимое превышение уровней некоторых ключевых биомаркеров ангиогенеза у детей с БЛД, а также определенная тенденция в изменении уровня других биомаркеров, играющих существенную роль в патогенезе БЛД, в том числе в процессах альвеоляризации и формирования микрососудистого русла легких.

**Ключевые слова:** бронхолегочная дисплазия, недоношенные дети, факторы ангиогенеза, легочная гипертензия.

### Abstract

In preterm childbirth and in postpartum disorders in the developing lung, angiogenesis and alveolarization processes are damaged, what may cause simplification of the distal lung airspace. Angiogenesis biomarkers may be useful in identifying infants with a greater likelihood of developing bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Purpose.** To determine important angiogenesis biomarkers in developing bronchopulmonary dysplasia in premature infants so as to improve prognosis and early diagnostics of this disease. **Materials and methods.** 65 premature infants who were hospitalized in the department of pathology of newborns and infants in the National Research Center for Children's Health (Moscow) were taken in the trial. All patients were divided into two groups: those who had formed bronchopulmonary dysplasia (46 patients, 71%) and those who had not formed it (19 patients, 29%). The most significant biochemical markers of angiogenesis in the blood serum were examined with the enzyme immunoassay technique. **Results.** The following reliable and marked results were obtained: PDGF level in children with BPD was lower by 30% than in children without BPD (3180 vs. 4783 pg/ml); PECAM-1 level was a quarter higher in the main group (3624.3 pg/ml) than in the control group without BPD (2724 pg/ml); CTGF level in children with BPD was almost twice higher (217.3 pg/ml) than in children without BPD (117.3 pg/ml). **Conclusion.** The researchers have revealed a significant excess in levels of some key biomarkers of angiogenesis in children with BPD; they also saw a definite trend in level changes in other biomarkers which play a significant role in BPD pathogenesis, including alveolarization and microvascular bed development.

**Key words:** bronchopulmonary dysplasia, premature infants, angiogenesis factors, pulmonary hypertension.

*Ссылка для цитирования: Селиверстова А.А., Давыдова И.В., Фисенко А.П., Басаргина М.А., Сновская М.А., Жужула А.А. Биомаркеры нарушения ангиогенеза при формировании бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2023; 3: 56–59.*

### Введение

Благодаря достижениям в области перинатальной медицины за последние десятилетия увеличилась выживаемость преждевременно рожденных детей. Тем не менее недоношенные дети по-прежнему подвергаются высокому риску респираторной заболеваемости и смертности, вызванной

развитием бронхолегочной дисплазии (БЛД) – хронического заболевания легких, которое возникает у младенцев, нуждающихся в интенсивной респираторной поддержке в неонатальном периоде.

Неоднократно было продемонстрировано, что БЛД является многофакторным заболеванием, которое связано

со сложными взаимодействиями между молекулярно-генетическими и внешнесредовыми факторами, но его патогенез до сих пор остается не до конца изученным, а стратегии профилактики БЛД – крайне ограниченными. При преждевременных родах и послеродовом повреждении развивающегося легкого нарушаются процессы ангиогенеза и альвеоляризации, что приводит к упрощению дистального воздушного пространства легких. Эти характерные гистологические изменения БЛД клинически проявляются персистирующим респираторным заболеванием с длительной потребностью в кислородной поддержке, повторяющимися респираторными обострениями с частыми госпитализациями, непереносимостью физических нагрузок, легочной гипертензией (ЛГ) [1].

Раннее нарушение роста легочных сосудов, эндотелиальная дисфункция и нарушение ангиокринной сигнализации могут способствовать развитию БЛД. При экспериментальном нарушении ангиогенеза у новорожденных животных снижается рост альвеол, что способствует легочной гипертензии и доказывает, что раннее повреждение развивающейся сосудистой сети может быть причиной устойчивых нарушений структуры и функции легких (сосудистая гипотеза) БЛД [2].

Преыдушие исследования показали, что изучение биомаркеров ангиогенеза может быть использовано для выявления младенцев с большей вероятностью развития БЛД [3]. Однако не ясно, могут ли ранние изменения в циркулирующих ангиогенных белках или других сигнальных путях приводить к риску БЛД и ЛГ у недоношенных детей.

Наиболее значимыми факторами ангиогенеза являются ангиопоэтин 1 (Ang1), ангиопоэтин 2 (Ang2), сосудистый эндотелиальный фактор роста А (VTGF-A), сосудистый эндотелиальный фактор роста D (VEGF-D), фактор роста соединительной ткани (CTGF), молекула адгезии эндотелиальных клеток тромбоцитов (PECAM-1).

Ангиопоэтины – важные модуляторы физиологической и патологической неоваскуляризации. Введение VEGF и Ang1 в качестве комбинированной генной терапии новорожденным крысам стимулировало рост легких и созревание сосудов более эффективно, чем только терапия VEGF. Ang2 также может взаимодействовать с VEGF, стимулируя ангиогенез в условиях гипоксии. Но в отсутствие достаточно сильных проангиогенных сигналов Ang2 может вызывать гибель эндотелиальных клеток и регрессию сосудов [4].

VEGF играет критическую роль в развитии сосудов и присутствует в высоковаккуляризованных тканях. Нарушение синтеза VEGF может привести к долгосрочному повреждению паренхимы легких. Установлено значимое снижение уровней VEGF в трахеальных аспиратах у недоношенных новорожденных, родившихся на сроке 28–29 недель гестации, которые позже сформировали БЛД [5].

В 2022 г. в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России завершилась большая научная работа по определению клинико-генетических особенностей развития новой формы БЛД у недоношенных детей, в которой проведено полноэкзомное секвенирование у 100 пациентов с БЛД. В результате отобраны восемь генетических вариантов, значимых для патогенеза БЛД, частота представленности которых у пациентов значимо отличалась от таковой в контрольной выборке. Установлена важная

роль генов *CPA3* и *CTGF*. Ген *CTGF* кодирует CTGF. Уникальная молекулярная структура CTGF позволяет ему связывать различные факторы роста: трансформирующий (TGFβ), сосудистый (VEGF) и др. Генетические варианты rs12489516 в гене *CPA3* (98,5% в группе детей с БЛД; 93,5% в группе детей без БЛД) и rs45488997 в гене *CTGF* (4% в группе детей с БЛД; 0,1% в группе детей без БЛД) имели статистически значимые различия частот аллелей в двух исследуемых группах ( $p < 0,05$ ) [6].

*CTGF* играет важную роль в патогенезе различных форм легочного фиброза и сосудистых заболеваний у взрослых. Экспрессия *CTGF* активируется несколькими факторами, участвующими в ремоделировании тканей, включая TGF-β, искусственную вентиляцию и воздействие кислорода. Связывание *CTGF* с TGF-β усиливает димеризацию TGF-β с его рецепторами, таким образом облегчая передачу сигналов TGF-β. Наоборот, связывание *CTGF* с VEGF снижает доступность VEGF для его рецепторов, ингибируя индуцированный VEGF ангиогенез [7].

PDGF – тромбоцитарный фактор роста, который является важным стимулятором восстановления тканей и содержится в α-гранулах тромбоцитов. Рецепторами PDGF обладают фибробласты и гладкомышечные клетки сосудистой стенки. Стимулируя их пролиферацию, PDGF играет важную роль в формировании кровеносных сосудов. Имеются данные о том, что уровень PDGF снижается при БЛД, что приводит к нарушению альвеоляризации, необходимой для формирования структуры здоровых легких [8]. Однако в других исследованиях при определении уровней PDGF-AA и PDGF-BB в аспирационной жидкости трахеи не было получено различий между аспиратами от детей, у которых развилась БЛД, по сравнению с аспиратами от детей, у которых БЛД не развилась [9].

PECAM 1 – гликопротеин, мембранный белок из суперсемейства иммуноглобулинов, относится к классу молекул клеточной адгезии. Ученые проанализировали образцы легких у младенцев, умерших от БЛД, и младенцев, умерших от внелегочных причин. Было показано снижение экспрессии VEGF и PECAM-1, а также снижение плотности окрашивания альвеолярных капилляров у младенцев с БЛД, что указывает на то, что развитие легочной микроциркуляторной сети у пациентов с БЛД было нарушено [10].

**Цель исследования** – определить значимые биомаркеры ангиогенеза в формировании БЛД у недоношенных детей для совершенствования прогнозирования и ранней диагностики данного заболевания.

## Материалы и методы

В исследование было включено 65 недоношенных детей, находящихся на госпитализации в отделении патологии новорожденных и детей раннего возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» г. Москвы и в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных ГБУЗ МО «МОПЦ» г. Балашихи.

Была проведена оценка анамнестических данных (анамнез матери – наличие/отсутствие хориоамнионита, введение препаратов экзогенного сурфактанта недоношенному ребенку, оценка по шкале Апгар на первой и пятой минутах жизни, длительность и методы проводимой искусственной вентиляции легких, оценка наличия легочной гипертензии по данным эхокардиографии).

Показатели биомаркеров ангиогенеза у детей, сформировавших БЛД и не сформировавших БЛД (пг/мл)

Фактор	БЛД/без	Me	Q1	Q3	p-value
Ang1 (n=58)	БЛД (n=41)	11 550.40	7172.00	14 037.00	0.6
	Без (n=17)	13 300	7536.60	19 003.60	
Ang2 (n=65)	БЛД (n=46)	7018.90	5726.15	8700.25	0.81
	Без (n=19)	6623.80	5877.10	9304.60	
VEGF-A (n=58)	БЛД (n=40)	108.7	47.77	197.17	0.9
	Без (n=18)	78.4	48.03	234.63	
VEGF-D (n=51)	БЛД (n=36)	1.8	1.5	2.4	0.87
	Без (n=15)	1.9	1.7	2.2	
PDGF-BB (n=49)	БЛД (n=34)	3180	2503	5016	0.024
	Без (n=15)	4783	3372	6170	
PECAM-1 (n=60)	БЛД (n=43)	3624.3	1413	4845	0.24
	Без (n=17)	2724.0	1171	3565	
CTGF (n=30)	БЛД (n=19)	217.3	167.3	759	0.044
	Без (n=11)	117.3	72.3	192.3	

Факторы ангиогенеза в сыворотке крови были исследованы с помощью метода иммуноферментного анализа.

В работе использовали аппарат математико-статистического системного анализа с применением пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и процессора электронных таблиц Microsoft® Excel-2010 (Microsoft, США). Сравнение совокупностей проводили путем расчета t-критерия Стьюдента, корреляцию показателей оценивали с помощью ранговой корреляции Спирмена.

### Результаты и обсуждение

Срок гестации при рождении пациентов составил от 23 до 33 недель (Me = 28 недель [26; 30]). Из них 32 (49%) ребенка родились на сроке гестации от 23 до 27 недель 6 дней и 33 (51%) ребенка – на сроке гестации от 28 до 33 недель.

Масса тела пациентов при рождении составила от 480 до 1840 г (Me = 970 г [790; 1200]). Большинство недоношенных детей имели экстремально низкую массу тела при рождении (43 (66%) пациента), остальные пациенты родены с очень низкой (14 (22%) пациентов) и низкой массой тела (8 (12%) пациентов).

Все недоношенные дети были разделены на две группы: сформировавшие БЛД (46 (71%) пациентов) и не сформировавшие данное заболевание (19 (29%)).

Диагноз БЛД выставлялся детям старше 28 суток жизни при сохраняющейся потребности в дозации кислорода, а также при наличии специфической клинико-рентгенологической симптоматики.

В группе детей, сформировавших БЛД, средний гестационный возраст был ниже (Me = 27 недель [26; 28.6]), чем в группе с БЛД (Me = 30 недель [29.3; 31.6]). Масса тела при рождении у детей с БЛД также была достоверно ниже (Me = 920.00 г [772.5; 987.5] в сравнении с Me = 1150 г [1046; 1510], p = 0.0002).

Оценка по шкале Апгар на первой и пятой минутах жизни также была ниже у детей, сформировавших в последующем БЛД (на первой минуте Me = 5 баллов [4; 5], на пятой минуте Me = 6 баллов [6; 7]), в сравнении с детьми без БЛД (на первой минуте Me = 6 баллов [5; 6], на пятой

минуте Me = 6 баллов [6; 7]), что указывает на значимость перенесенной гипоксии (p = 0.0029; p = 0.048). Инвазивную вентиляцию легких проводили чаще в группе детей с БЛД (у 44 из 46 детей – 95,65%), чем в группе пациентов без БЛД (у 7 (36,84%) из 19 пациентов). Полученные данные подтверждают общепризнанные критерии формирования БЛД.

При оценке клинического анализа крови определились более низкие уровни гемоглобина у детей с БЛД (Me = 111 г/л [101; 126]), тогда как у детей без данного заболевания средний уровень составил 122 г/л [106.5; 137], что указывает на уменьшение кислородной емкости крови у детей с БЛД. Значимой корреляции по данным лейкоцитарной формулы получено не было. По данным неоднократно проведенных эхокардиографических исследований, ни у одного пациента не было отмечено легочной гипертензии.

Результаты анализа уровней исследуемых маркеров ангиогенеза отображены в табл. 1.

У обследованных нами детей с БЛД медиана концентрации PDGF-BB составила 3180 пг/мл, а у детей без БЛД – 4783 пг/мл (p = 0.024), что свидетельствует о характерных изменениях в легочной ткани при формировании БЛД: нарушении ангиогенеза, септации и альвеоляризации при формировании структуры легких.

Уровень PECAM-1 в группе детей с БЛД был на четверть ниже (3624.3 пг/мл), чем в группе детей без БЛД (2724 пг/мл), что совпадает с результатами проведенных ранее исследований, где было выявлено его достоверное снижение в группе детей с БЛД. Это свидетельствует о нарушении развития легочной микроциркуляторной сети у данных пациентов.

Уровень CTGF в группе детей с БЛД практически в два раза (217.3 пг/мл) превышает уровень в группе детей без БЛД (117.3 пг/мл). Это объясняется тем, что экспрессия CTGF активируется искусственной вентиляцией и токсическим воздействием кислорода на этапе формирования БЛД с индуцированием воспаления в легочной ткани. Также при повышении CTGF происходят ингибирование VEGF и повреждение рецептора 2 VEGF, что приводит к значимому разрушению воздушных полостей и сосуди-

стой сети, формированию пневмофиброза, характерного для патогенеза БЛД. Полученные результаты согласуются с данными молекулярно-генетических исследований, установивших важную роль гена *CTGF* в патогенезе БЛД [6].

Корреляционный анализ клинико-анамнестических данных и показателей биомаркеров ангиогенеза продемонстрировал, что имеется обратная связь между уровнем Ang2 и возрастом пациента на момент взятия крови ( $R = -0.48$ ,  $p = 0.004$ ), что доказывает его антиангиогенное действие в условиях гипоксии (первые дни жизни), приводящее к гибели эндотелиальных клеток и регрессии сосудов.

Отмечена прямая корреляция между уровнем VEGF-D и возрастом пациента ( $R = 0.46$ ,  $p = 0.0006$ ), а также массой тела на момент забора крови ( $R = 0.5$ ,  $p = 0.0002$ ). У детей, рожденных с меньшей массой, а также меньшим сроком гестации, в большей степени нарушается ангиогенез сосудов легких, чем и объясняются более низкие концентрации VEGF-D в сыворотке крови. Именно эта когорта детей чаще формирует БЛД. В противоположность этому дети, рожденные с большей массой тела, а также большим сроком гестации, имеют более высокие концентрации VEGF-D в сыворотке крови, в связи с чем у них ангиогенез нарушается в меньшей степени.

Для остальных биомаркеров ангиогенеза достоверных различий выявлено не было. Нельзя исключить, что некоторые из изученных факторов не играют решающей роли в альвеоло- и ангиогенезе при формировании БЛД. Но мы предполагаем, что при расширении выборки, а также изменении критериев подбора пациентов (например, включение пациентов с подтвержденной по данным эхокардиографии легочной гипертензией) для исследования возможно получение более достоверных результатов. На сегодняшний день нет информации о том, что происходит при нормальном развитии ребенка в неонатальном периоде. Возможно, у многих факторов тканевого роста и созревания есть определенная возрастная динамика, но по понятным причинам показатели здоровых новорожденных в научной литературе отсутствуют.

### Заключение

При оценке клинико-анамнестических данных пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД, были получены результаты, соответствующие общепризнанным критериям формирования данной патологии.

По результатам иммуноферментного анализа содержания биомаркеров ангиогенеза, проведенного у пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД, выявлено значимое превышение уровней некоторых ключевых показателей в группе детей с БЛД (PDGF-BB, CTGF), а также определенная тенденция в изменении уровней других биомаркеров. Необходимо проведение дальнейших исследований данных факторов ангиогенеза на более обширных группах, так как именно эти биомаркеры могут помочь предсказать формирование хронической респираторной патологии у недоношенных новорожденных.

Понимание взаимодействия факторов роста, факторов транскрипции и воспалительных процессов, регулирующих нормальное развитие паренхимы и микрососудистого русла легких, а также их роли в патогенезе БЛД является принципиально значимым. Изучение данной проблемы будет способствовать разработке новых методов лечения,

направленных на стимулирование правильного альвеоло- и ангиогенеза, а также на профилактику пневмофиброза и легочной гипертензии у недоношенных детей.

*Авторы выражают особую благодарность главному научному сотруднику, заведующей лабораторным отделом д.м.н. Е.Л. Семикиной; заведующей лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии, ведущему научному сотруднику, к.м.н. Н.М. Алябьевой; заместителю главного врача по педиатрической части ГБУЗ МО «МОПЦ», главному внештатному специалисту-неонатологу Министерства здравоохранения Московской области, к.м.н. А.С. Петровой.*  
Конфликт интересов отсутствует.

### Литература

1. Селиверстова А.А. и др. Механизмы развития легочной гипертензии у детей с бронхолегочной дисплазией // Доктор.Ру. – 2022. – Т. 21. – № 3. – С. 6–11. [Seliverstova A.A. et al. Mechanisms of pulmonary hypertension development in children with bronchopulmonary dysplasia // Doctor.ru. – 2022. – V. 21 – № 3. – P. 6–11. In Russian].
2. Mourani P.M. et al. Early PVD in preterm infants is associated with late respiratory outcomes in childhood // Am J Respir Crit Care Med. – 2018. – V. 199. – № 8. – P. 1020–1027.
3. Lal C.V. et al. Biomarkers, early diagnosis, and clinical predictors of bronchopulmonary dysplasia // Clin Perinatol. – 2015. – V. 42. – № 4. – P. 739–754.
4. Sato T. et al. Vitreous levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in eyes with retinopathy of prematurity // Am J Ophthalmol. – 2011. – V. 151. – № 2. – P. 353–357.
5. Been J.V. et al. Early alterations of growth factor patterns in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia // Pediatr Res. – 2010. – V. 67. – № 1. – P. 83–89.
6. Бондарь В.А. и др. Роль генетических предикторов в доклинической диагностике бронхолегочной дисплазии // Кремлевская медицина. – 2022. – № 1. – С. 5–9. [Bondar V.A. et al. The role of genetic predictors in preclinical diagnostics of bronchopulmonary dysplasia // Kremlin Medicine Journal. – 2022. – № 1. – P. 5–9. In Russian].
7. Wang X. et al. CTGF: a potential therapeutic target for bronchopulmonary dysplasia // Eur J Pharmacol. – 2019. – V. 860. – P. 172588.
8. Oak P. et al. The BPD trio? Interaction of dysregulated PDGF, VEGF, and TGF signaling in neonatal chronic lung disease // Mol Cell Pediatr. – 2017. – V. 4. – № 1. – P. 11.
9. Popova A.P. et al. Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2014. – V. 307. – № 3. – P. 231–239.
10. Bhatt A.J. et al. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia // Am J Respir Crit Care Med. – 2001. – V. 164. – P. 1971–1980.