

УДК 616.24.-003.823-053.31-092-085.835.3-07

Ю.Б. Яценко

Л.В. Яценко

Буковинський державний медичний  
університет, м. Чернівці

## МЕТАБОЛІТИ ОКСИДУ АЗОТУ В ПЛАЗМІ КРОВІ НОВОНАРОДЖЕНИХ ЯК ДІАГНОСТИЧНИЙ МАРКЕР ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В РОЗВИТКУ ГОСТРОГО УШКОДЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ

**Ключові слова:** новонароджені,  
синдром гострого ушкодження  
легень, критерії діагностики.

**Резюме.** У роботі проведено дослідження факторних навантажень активності протеолізу та фібринолізу, рівней метаболітів оксиду азота, інтерлейкінів-6 та 8 у новонароджених з метою виявлення їх значимості при діагностиці гострого ушкодження легень. Вивчена діагностична значимість цих показників на підставі чутливості та специфічності тестів їх дослідження.

### Вступ

Вивчення особливостей ендотеліальної фізіології при дослідженні метаболічних порушень при гострому ушкодженні легень на фоні критичних станів згідно з сучасними поглядами щодо патофізіологічних змін в організмі при даному синдромі на сьогодні є актуальним та перспективним напрямком у діагностиці початкових стадій його розвитку. Це зумовлено тим, що основна роль у формуванні легеневого ушкодження відводиться саме біологічно активним речовинам, які утворюються ендотелієм. Патогенетичні наслідки даних механізмів проявляються змінами легеневої ендотеліальної фізіології (проникність судинної стінки; регулювання швидкості кровотоку; зв'язок з гемостазом, як внутрішнім, так і зовнішнім його шляхами; з імунологічними реакціями, вплив на синтез оксиду азоту) [5, 6].

### Мета дослідження

Дослідити фактори порушення ендотеліальної фізіології у новонароджених при критичних станах та їх діагностичне значення в розвитку гострого ушкодження легень.

### Матеріал і методи

Під нашими спостереженням перебували 93 немовлят із респіраторним дистрес-синдромом на фоні різної неонатальної патології. Критеріями включення дітей у дослідження були: 1) маса тіла при народженні більша ніж 2500 г та/або гестаційний вік дитини більший ніж 37 тижнів; 2) клінічні, рентгенологічні та лабораторні ознаки респіраторного дистрес-синдрому; 3) потреба лікувати дихальну недостатність із використанням методики самостійного дихання під постійним позитивним тиском або штучної вентиляції легень у

жорстких режимах; 4) відсутність значних природжених вад розвитку в новонароджених.

Враховуючи, що в основі розвитку синдрому гострого ушкодження легень є активація нейтрофілів крові з подальшою їх агресією щодо "органамішені", яким виступає мікроциркуляторне русло легень [4], проведено дослідження нейтрофільних показників - фагоцитарне число та фагоцитарна активність нейтрофільних лейкоцитів крові за методикою Чернушенко Е.Ф. та Когосової Л.С.; активність нейтрофільних гранулоцитів крові за показниками їх киснезалежного метаболізму за даними НСТ-тесту, спонтанного та стимульованого (Park B. et al., (1968) у модифікації Климова В.В. та співавт., (1988). Сумарний вміст метаболітів оксиду азоту (NO) - нітрит-аніона (NO<sub>2</sub>) та нітрат-аніона (NO<sub>3</sub>) визначали методом фотометрії за реакцією Грейса. Дослідження концентрацій у плазмі крові інтерлейкінів проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи набори реагентів "ProCon II-6" для визначення інтерлейкіну-6 та "Іл-8-ІФА-БЕСТ" для визначення інтерлейкіну-8. Стан необмеженого протеолізу оцінювали за лізисом азоальбуміну (лізис низькодисперсних білків), азоказеїну (лізис високомолекулярних білків) та азоколу (лізис колагену) за допомогою реактивів фірми "Simko Ltd.", Україна), використовуючи колорогенні сполуки з реєстрацією екстинції на фотокалориметрі КФК-2. низькодисперсних білків), азоказеїну (лізис високомолекулярних білків) та азоколу (лізис колагену) за допомогою реактивів фірми "Simko Ltd.", Україна), використовуючи колорогенні сполуки з реєстрацією екстинції на фотокалориметрі КФК-2. Використовуючи реактиви цієї ж фірми, досліджували фібринолітичну активність шляхом інкубації азофібрину зі стандартною кількістю плазми-

ногена. Інтенсивність фібринолізу оцінювали за ступенем забарвлення розчину в лужному середовищі в присутності  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти (неферментативна фібринолітична активність, НФА), або без неї (сумарна фібринолітична активність, СФА). Різниця між ними відповідає ферментативній фібринолітичній активності (ФФА) (Кухарчук О.Л., 1996). Біохімічне дослідження крові також включало визначення активності антитромбіну III (АТ III) та фібринстабілізувального фактора (фактор XIII).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми Statistica v5.5A модуль "Факторний аналіз". Діагностична цінність тестів визначалася методами клінічної епідеміології за R.C. Greenberg, 1995.

### Обговорення результатів дослідження

Клінічне спостереження за новонародженими свідчило, що всі діти знаходилися в критичному стані, що проявлялося киснево резистентною гіпоксією, кардіодепресією, гіпоперфузією, що потребувало проведення медикаментозної інотропної серцевої дотації та апаратного протезування дихальної функції. Діагноз "синдром гострого ушкодження легень" (СГУЛ) виставлявся на підставі клінічної картини гострої дихальної недостатності, функціональних, лабораторних та рентгенологічних методів дослідження (Система стандартизації в здравоохранении Российской Федерации. Протокол ведения больных "Диагностика и интенсивная терапия синдрома острого повреждения легких и острого респираторного дистресс-синдрома" ОСТ 91500.11.0001-2002).

За нозологічними характеристиками до сформованої групи ввійшли діти з постасфіктичним синдромом внаслідок тяжкої асфіксії в пологах (30 новонароджених - 32,3%), новонароджені з реалізацією внутришньоутробної інфекції - 35,5% дітей (14 дітей з неонатальним сепсисом; 11 - з уродженою пневмонією; 8 - із неонатальним сепсисом на фоні постасфіктичного синдрому), 9 дітей із постаспіраційним синдромом унаслідок масивної меконіальної аспірації під час пологів у вигляді постаспіраційної пневмонії (9,7% дітей), діти з травматичним пошкодженням унаслідок пологової травми (7 новонароджених - 7,5%), із респираторним дистресом на фоні нейроінфекції (бактеріальний менінгіт, вірусний енцефаліт - 5 дітей, 5,4%), гемолітичної хвороби новонароджених (2 дитини - 2,2%). Змішана нозологічна патологія спостерігалася в 7,5% випадків (7 дітей).

Дослідження вмісту в периферичній крові новонароджених рівнів метаболітів NO показало їх збільшення порівнянно з групою контролю (10

новонароджених, які перебували на реабілітаційному лікуванні у відділенні патології новонароджених після гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС) майже удвічі ( $17,4 \pm 1,4$  та  $9,3 \pm 1,7$  мкмоль/л). Підвищення метаболітів NO в системному кровотоці можна розцінити як наслідок системної запальної відповіді та залучення NO до регуляції імунної відповіді.

Відомо, що NO при запаленні залучається до регуляції багатьох функцій, зокрема судинний тонус, серцеву скоротливість, агрегацію тромбоцитів, пейротрапемісію, синтез АТФ та білків, імунний захист [3]. З однієї сторони процес утворення NO можна розглядати як захисну реакцію ендотелію, в тому числі й легеневого, на медіаторну агресію, що призводить до релаксації звужених судин та бронходилатації. З іншого боку, надмірне утворення метаболітів NO, неконтрольована генерація активних форм кисню, перш за все  $O_2^-$ , складає передумови для утворення пероксинітриду, з дією якого, як свідчать дані літератури, пов'язано ушкодження білків [2]. Саме нітрозилування сульфгідрильних центрів у білках є найбільш характерною особливістю модифікуючої дії оксиду азоту та пероксинітриду, наслідком чого є підвищення білків до протеолітичної деградації. Указані передумови на фоні підвищеної протеїназної активності за рахунок вивільнення лізосомальних ферментів (еластази, колагенази та ін.) сприяють процесам руйнування клітин в тому числі й альвеоло-капілярної мембрани.

Таким чином, на підставі отриманих результатів, які свідчать про системне підвищення метаболітів NO в новонароджених із гострим ушкодженням легень, можна стверджувати про розвиток ендотеліальної легеневої дисфункції, а підвищення рівнів метаболітів NO в периферичній крові пов'язано з надмірним їх утворенням у мікросудинах легень.

Для узагальнення результатів дослідження проведений факторний аналіз методом головних компонентів, при якому за показник якості ендотеліального порушення застосовано рівень метаболітів NO в плазмі крові.

Таблиця факторних навантажень (табл. 1) показує, що головні системні гомеостатичні компоненти розвитку синдрому гострого ушкодження легень можна поділити на 4 групи. Фактори 2 та 4 відображають участь нейтрофільних гранулоцитів у розвитку синдрому гострого пошкодження легень, а фактори 1 та 3, як наслідок активації, свідчать про порушення в системному гомеостазі при гострому ушкодженні легень.

Дана модель достатньо повно описує системні зміни гомеостазу при розвитку СГУЛ у новона-

Таблиця 1

## Показники факторних навантажень головних компонентів аналізу

Показники	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
Сумарна фібринолітична активність	<b>,981139 *</b>	,007187	-,029162	-,016928
Неферментативна фібринолітична активність	<b>,953402 *</b>	,141667	,078924	-,045298
Ферментативна фібринолітична активність	<b>,956341 *</b>	-,028459	,016250	,076412
Лізіс азоальбуміну	,226317	<b>,811092 *</b>	-,037229	,015709
Лізіс азоказеїну	-,375245	<b>,776213 *</b>	,139174	-,036791
Лізіс азоколу	,387272	-,279204	-,096515	,184319
Інтерлейкін-6	-,126067	-,153367	<b>,774496 *</b>	,118653
Інтерлейкін-8	-,091269	-,264830	,324872	<b>,824563 *</b>
Антитромбін III	-,117835	-,630262	-,615865	,100846
Фібринстабілізуючий фактор	,025276	,018807	<b>,800383 *</b>	-,006854
Фагоцитарна активність нейтрофілів крові	,302878	,141667	,480202	,603257
Фагоцитарне число	,307572	,181196	,314494	<b>,758913 *</b>
НСТ-тест спонтанний	,000164	<b>,702574 *</b>	-,189410	,535586
НСТ-тест стимульований	,011519	,646935	-,366251	,504809
Метаболіти оксиду азота	<b>,368420</b>	<b>,148037</b>	<b>,135890</b>	<b>-,643783</b>
Загальна дисперсія	3,480825	2,767321	2,175144	1,964055
Частка загальної дисперсії	,248630	,197666	,155367	,140290

Примітка: \* - відмічені навантаження більш ніж 0,7000

роджених. Так, ендотеліальна дисфункція, маркером якої в нашому випадку виступив оксид азоту (метаболіти NO), стимулює метаболічну активність нейтрофільних гранулоцитів крові, про що свідчить фактор 2, який вклучає два компоненти - показник спонтанного НСТ-тесту нейтрофілів крові (факторне навантаження 0,70) та активність необмеженого протеолізу (факторні навантаження становили відповідно 0,81 та 0,77 для лізису низькодисперсних білків та високомолекулярних). Відомо, що NO на початкових стадіях запального процесу стимулює адгезію, еміграцію та хемотаксис нейтрофілів. Тому саме підвищення метаболічної активності нейтрофільних гранулоцитів крові, а також зростання протеолітичної активності, як наслідок нейтрофільного протеазного вибуху, знаходиться в прямій залежності від NO-сигнальної молекули.

Одночасно з підвищенням активності індукційної NO-синтази, яка експресується під дією медіаторів запалення вже у вогнищі запального процесу, в даному випадку ендотеліоцитами легеневих капілярів, оксид азоту починає виступати в ролі медіатора запалення та виконувати цитотоксичну та регуляторну функції. Результатом дії NO в цьому випадку є вазодилатація, накопичення ексудату та утримання активованих нейтрофілів у мікроциркуляторному руслі легень, фагоцитоз. Тому фактор 4, який містить у собі показник навантаження фагоцитарного числа в

розвитку ендотеліальної дисфункції, має від'ємний показник (-)0,76, але є найбільш значимий в даній математичній моделі. Також потужним маркером порушення ендотеліальної фізіології виступає інтерлейкін-8 (факторне навантаження 0,82), який активує долегеновий хемотаксис нейтрофілів, активує ці клітини, тобто ініціює розвиток неспецифічного запалення легень.

Активация системного протеолізу сприяє розвитку дисбалансу у фібринолітично-антипротеазній системі про що свідчить фактор 1. Так, навантаження показників фібринолітичної активності крові становлять достатньо високі значення, при чому, як ферментативної фібринолітичної активності (0,96), так і неферментативної (0,95) активності.

Фактор 3 об'єднав у собі показники, які можуть вказувати на ендотеліальну дисфункцію та активацію згортальної системи крові, а саме, в легеневих судинах. Це відбувається як наслідок пошкодження ендотеліоцитів легеневих капілярів продуктами протеолізу та підвищення судинної проникливості внаслідок деструкції клітин, сладжа, запуску внутрішньосудинного згортання крові, блокади мікроциркуляції. Факторне навантаження фібринстабілізуючого фактора (0,80) може свідчити про залучення даного фактора згортальної системи крові в процесах тромбоутворення в мікросудинах легень та його регіонарне споживання. Про участь інтерлейкіну-6 в даному

патофізіологічному каскаді ураження легень (факторне навантаження 0,78) можна думати у зв'язку з тим, що інтерлейкін-6 підсилює продукцію факторів згортання, інгібує фібриноліз, а також сприяє підсиленню синтезу тканинного прокоагулянта [1].

Враховуючи результати та показники головних компонентів факторного аналізу нами відтворена регресійна модель ендотеліального пошкодження залежно від змін системного гомеостазу.

На підставі даних таблиці 2 можна вивести формулу регресійної моделі розвитку ендотеліальної дисфункції (ЕД) у новонароджених при гострому ушкодженні легень.

$ED = 79,5 \pm 16,1 (p=0,000007) + 2,87 \pm 0,88$  (лізис низькодисперсних білків)  $+ 4,35 \pm 0,66$  (інтерлейкін-

8)  $- 8,05 \pm 1,8$  (лізис високомолекулярних білків)  $- 0,36 \pm 0,09$  (антитромбін III)  $- 0,67 \pm 0,17$  (фагоцитарне число) (табл. 3).

Враховуючи, що маркером ендотеліальної дисфункції легень у нашому випадку обраний рівень метаболітів оксиду азоту в системному кровообігу, регресійна формула включила три значення з від'ємним знаком. Це можна пояснити тим, що не завжди показники системного гомеостазу можуть відображати регіонарні порушення, в даному випадку в легневих капілярах. Підвищення рівнів у системному кровотоці метаболітів NO в нашому випадку вірогідно обумовлено саме легневими ендотеліальними порушеннями, які й ініціюють надходження до системного кровообігу метаболітів оксиду азоту. Тому від'ємність

Таблиця 2

**Регресійний аналіз розвитку ендотеліальної дисфункції в новонароджених із системним порушенням гомеостазу**

Коефіцієнт множинної кореляції (R)=,709818; Коефіцієнт детермінації (RІ)=,503842; Критерій F(10,55)=5,5852; p<,00001; Стандартна похибка вільного члена:2,4429						
	БЕТА	похибка БЕТА	В	Похибка В	t(80)	p-рівень
<b>Вільний член</b>			<b>79,46607</b>	<b>16,05522</b>	<b>4,94955</b>	<b>,000007</b>
Сумарна фібринолітична активність	,19725	,852586	2,25461	9,74539	,23135	,817900
Неферментативна фібринолітична активність	-,11824	,602469	-2,97737	15,17122	-,19625	,845137
Ферментативна фібринолітична активність	-,22957	,490881	-4,77175	10,20338	-,46766	,641873
<b>Лізис азоальбуміну</b>	<b>,59100</b>	<b>,181284</b>	<b>2,87419</b>	<b>,88163</b>	<b>3,26008</b>	<b>,001914</b>
<b>Лізис азоказеїну</b>	<b>-1,04462</b>	<b>,236068</b>	<b>-8,04887</b>	<b>1,81892</b>	<b>-4,42509</b>	<b>,000046</b>
Інтерлейкін-6	,10983	,113120	,01691	,01741	,97095	,335824
<b>Інтерлейкін-8</b>	<b>,82456</b>	<b>,162584</b>	<b>4,35811</b>	<b>,65712</b>	<b>4,3597</b>	<b>,000568</b>
<b>Антитромбін III</b>	<b>-,84713</b>	<b>,216636</b>	<b>-,35650</b>	<b>,09117</b>	<b>-3,91040</b>	<b>,000255</b>
Фібринстабілізуючий фактор	-,18533	,134305	-,05077	,03679	-1,37992	,173196
<b>Фагоцитарне число</b>	<b>-,49542</b>	<b>,125587</b>	<b>-,67121</b>	<b>,17015</b>	<b>-3,94481</b>	<b>,000228</b>
Спонтанний НСТ-тест	-,03463	,132088	-,01657	,06319	-,26219	,794157

регресійних коефіцієнтів антитромбіну III, лізису високомолекулярних білків та фагоцитарного числа порівняно з метаболітами оксиду азоту в периферичній крові вказує на те, що зміни показників вищенаведених компонентів регресійної моделі відбуваються регіонарно, тобто, в легневих капілярах, що обумовило проведення подальшого дослідження, а саме: вивчення діагностичного значення виявлених змін гомеостазу та можливість їх застосування в діагностиці синдрому ГУІ.

### Висновки

1. Розвиток неспецифічного ураження легень у новонароджених відбувається, не дивлячись на

чисельність тригерних факторів, за однаковим патофізіологічним механізмом.

2. Ключовим ланцюгом у розвитку синдрому гострого ушкодження легень відіграють нейтрофільні гранулоцити крові, які запускають каскад системного та регіонарного (легеневого) неспецифічного запалення, при цьому в системному кровотоці їх кількість, а особливо активованих нейтрофілів може зменшуватися за рахунок їх споживання в легневих капілярах.

3. Серед чисельних пошкоджувальних чинників агресії при розвитку синдрому гострого ушкодження легень особливе значення мають необмежений протеоліз, який запускає протеазний каскадний вибух; інтерлейкіни-8 та 6, які підтри-

Таблиця 3

**Діагностична значимість показників порушення гомеостазу в діагностиці розвитку гострого ушкодження легень**

Діагностичний тест	Чутливість тесту (%)	Специфічність тесту (%)
Рівень метаболітів оксиду азоту (діагностична межа 2 мкМ/л)	80	83,3
Рівень інтерлейкіну-6 (діагностична межа 80 нг/мл)	79	64
Рівень інтерлейкіну-8 (діагностична межа 300 пг/мл)	84	86
Колагенолітична активність (діагностична межа лізису азоколу 0,46 мкМ/мл год)	50	85,7
Сумарна фібрinolітична активність (діагностична межа 0,7 мкМ азофібрину/мл год)	60	61,5

мують клітинну кооперацію при запаленні. Тести визначення даних показників у новонароджених при критичних станах достатньо чутливі та специфічні при діагностиці дебюту розвитку синдрому гострого ушкодження легень у новонароджених.

#### Перспективи подальших досліджень

Перспективною роботою в даному напрямку вважається розробка лікувальної тактики корекції порушень гомеостатичних показників у новонароджених при критичних станах із ризиком розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому новонароджених.

**Література.** 1. Мищенко В.П., Мищенко И.В. Физиология системы гомеостаза. - Полтава: ООО "АСМИ". - 2003. - С.57. 2. Рябов Г.А., Азизов Ю.М., Дорохов С.И. и соавт. Окислительная модификация белков плазмы крови у больных в критических состояниях // Анестезиол. и реаниматол. - 2000. - №2. - С. 72-75. 3. Hart C. Nitric Oxide in Adult Lung Disease // Chest. - 1999. - Vol. 115. - P. 1407 - 1417. 4. Hotchkiss J.R., Simonson D.A., Marek D.J. et al. Pulmonary microvascular fracture in patient with acute respiratory distress syndrome // Crit. Care Med. - 2002. - Vol. 30, N10. -P. 2368-2370. 5. Kupfner J. G., Arcaroli J. J., Yum H.-K. et al. Role of NF- $\kappa$ B in Endotoxemia-Induced Alterations of Lung Neutrophil Apoptosis // J. Immunol. - 2001. - Vol.167. - P. 7044 - 7051. 6. Skidgel R. A., Gao X., Brovkovich V. et al. Nitric Oxide Stimulates Macrophage Inflammatory Protein-2 Expression in Sepsis // J. Immunol. - 2002. - Vol. 169. - P. 2093 - 2101.

#### МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА В ПЛАЗМЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ РАЗВИТИИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ

*Ю.Б. Яценко, Л.В. Яценко*

**Резюме.** В работе проведено исследование факторных нагрузок активности протеолиза и фибринолиза, уровней метаболитов оксида азота, интерлейкинов-6 и 8 у новорожденных с целью определения их значимости в диагностике острого повреждения легких. Изучена диагностическая значимость данных показателей на основе чувствительности и специфичности тестов их исследования.

**Ключевые слова:** новорожденные, синдром острого повреждения легких, критерии диагностики.

#### NITRIC OXIDES METABOLITES IN NEWBORNS BLOOD SERUM AS A DIAGNOSTIC MARKER OF THE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION DURING THE DEVELOPMENT OF THE ACUTE LUNG INJURY

*Yu.B. Yaschenko, L.V. Yaschenko*

**Abstract.** The investigation of the factor loadings of the proteolysis and fibrinolysis activity, levels of the nitric oxide metabolites, interleukins-6 and 8 in newborns was done in order to evaluate their validity in the diagnosing of the acute lung injury. The diagnostic value of these indices was investigated according to sensitivity and specificity of these tests.

**Key words:** newborns, acute lung injury syndrome, diagnostic criteria.

**Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)**

*Clin. and experim. pathol. - 2006. - Vol.5, №2. -P.99-103.  
Надійшла до редакції 12.04.2006*