

Ю.Б.Ященко, А.Г.Буряк

Нитроксидергические изменения у новорожденных при синдроме острого повреждения легких

Буковинский государственный медицинский университет МЗ Украины: 58000, Украина, Черновцы, Театральная пл., 2

Yu.B. Yashchenko, A.G. Buryak

Nitroxide changes in newborns with acute lung injury syndrome

Summary

Investigation of informative value of NO metabolite measurement in the exhaled breath condensate (EBC) has been performed. NO metabolites were considered as a biochemical marker for detection and monitoring of course of the acute respiratory distress syndrome (ARDS) in newborns. Measurement of NO metabolites in EBC was performed using spectrophotometry with Grace's reagent in 80 newborns with different stages of ARDS. Two-fold increase in NO metabolite concentration was found in early stage ARDS (the acute lung injury syndrome) and 3- to 4-fold increase was found in advanced ARDS. In the terminal stage of ARDS, NO synthesis decreased to the level measured in controls. Multifactorial nitroxide changes in the lungs depending on activity of pulmonary proteolysis and fibrinolysis and functional activity of blood neutrophils were describes. Measurement of NO metabolites in EBC is a sensitive and informative test to diagnose ARDS in newborns and could be used for diagnosis of parenchymal type respiratory failure and evaluation of its clinical course in newborns.

Key words: acute lung injury syndrome, newborns, nitric oxide (NO), exhaled breath condensate (EBC), diagnosis.

Резюме

В работе проведено исследование информативности определения содержания метаболитов оксида азота (NO) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) в качестве биохимического маркера диагностики и мониторинга течения острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у новорожденных. Определение содержания метаболитов NO в КВВ проводили методом спектрофотометрии с помощью реактива Грейса у 80 новорожденных в различной стадии ОРДС. Установлено повышение содержания метаболитов NO в КВВ при начальных стадиях ОРДС – синдром острого повреждения легких (в 2 раза) и при реализованном ОРДС (в 3–4 раза). В терминальной стадии ОРДС синтез NO уменьшается до показателей группы контроля. Показана многофакторность нитроксидергических изменений в легких в зависимости от изменений активности легочного протеолиза и фибринолиза, а также функциональной активности нейтрофилов крови. Определение содержания метаболитов NO в КВВ является чувствительным и информативным тестом для диагностики СОПЛ у новорожденных и может быть использовано с целью диагностики дыхательной недостаточности паренхиматозного типа у новорожденных и ее клинического течения.

Ключевые слова: синдром острого повреждения легких, новорожденные, оксид азота (NO), конденсат выдыхаемого воздуха, диагностика.

В последние годы появилось большое количество исследований метаболитов оксида азота (NO) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) при различной патологии органов дыхания [1–4]. NO имеет причастность к регуляции сосудистого тонуса, сердечной сократительности, агрегации тромбоцитов, нейротрансмиссии, синтезу макроэргических субстанций и белков, иммунной защите. Установлено, что наибольшая стимуляция синтеза NO происходит в результате цитокинового прессинга γ -интерфероном, интерлейкинами, фактором некроза опухолей и бактериальными липополисахаридами [5]. Но остаются неясными механизмы, в результате которых роль молекул NO изменяется от защитной к повреждающей.

В современной литературе недостаточно данных об особенностях функционирования нитроксидергических систем при синдроме острого повреждения легких (СОПЛ) у новорожденных. Однако в экспериментальных исследованиях доказана важная роль NO в реализации многих патофизиологических эффектов, и NO рассматривается как маркер активности воспалительного процесса [6].

Цель исследования – определить возможность использования показателей содержания метаболитов NO в выдыхаемом воздухе у новорожденных с тяжелой острой дыхательной недостаточностью для диагностики СОПЛ.

Материалы и методы

Исследование проведено среди новорожденных детей, находившихся на лечении в отделении интенсивной терапии новорожденных ОДКБ № 1 (Черновцы, Украина). Все дети были в крайне тяжелом состоянии вследствие респираторно-гемодинамических расстройств, что определяло проведение поддерживающей терапии (искусственная вентиляция легких, инфузионная поддержка с назначением вазоактивных препаратов). Клинически начальная стадия острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) – СОПЛ – была у 60 новорожденных (1-я группа сравнения). У 20 детей (2-я группа сравнения) отмечалась выраженная кислородная зависимость на фоне полиорганной недостаточности. Диагноз ОРДС в данной группе был подтвержден патоморфологически. Группу контроля составили 20 практически здоровых новорожденных, которые находились в больнице на реабилитационном лечении после гипоксически-ишемического поражения центральной нервной системы.

Исследование проводили в КВВ, который собирали из системы дыхательного контура аппарата искусственной вентиляции легких (на выдохе).

Биохимическое исследование включало в себя изучение в КВВ методом фотометрии показателей

содержания метаболитов NO, фибринолитической и протеолитической активности, а также перекисного окисления белков [7–9].

Иммунологическое исследование включало в себя изучение фагоцитарной активности и окислительной микробицидности нейтрофильных гранулоцитов крови по результатам цитохимических реакций восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) в спонтанном и стимулированном вариантах. Методом иммуноферментного анализа, используя набор реактивов ProCon II-6 ("Протеиновый контур", Россия), исследовали концентрацию интерлейкина-6 (IL-6) в КВВ и плазме крови.

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики в программе *Statistica 6.0 for Windows* (блок "Факторный анализ").

Результаты и обсуждение

Полученные результаты показали вариабельность содержания метаболитов NO в КВВ у новорожденных с критической гипоксемией в зависимости от тяжести клинического состояния. Динамика легочного синтеза метаболитов NO изучалась в 2 группах: 1-я — 60 детей с начальной стадией развития ОРДС (СОПЛ), 2-я — 20 детей с ОРДС (рисунок).

Повышение уровня стабильных метаболитов NO в КВВ у новорожденных с СОПЛ, согласно современным представлениям о патофизиологических механизмах развития ОРДС, свидетельствует о стимуляции индуцибельной NO-синтазы провоспалительными цитокинами. Теоретически повышение метаболитов NO на уровне аэрогематического барьера в начальных стадиях ОРДС можно рассматривать как компенсаторную функцию системы легочной микроциркуляции на фоне легочной вазоконстрикции, направленную на восстановление кровотока. В дальнейшем избыточное образование NO приводит к повреждению легочных структур и углублению тяжести дыхательной недостаточности в результате его метаболизации в пероксинитрит, повреждающий эффект которого направлен на белки и липиды (активация перекисного окисления) базальных мембран. Данное предположение подтверждается клиническим наблюдением, которое свидетельствует

о развитии тяжелой резистентности к кислороду при дыхательной недостаточности у новорожденных с ОРДС.

Последующее наблюдение за динамикой уровня метаболитов NO в КВВ показало, что в терминальной стадии ОРДС содержание метаболитов NO у всех детей резко уменьшалось. Уменьшение количества метаболитов NO в КВВ при нарастании критической нечувствительности к кислороду при дыхательной недостаточности свидетельствует об истощении метаболической функции легких и / или об избыточном окислении NO активными формами кислорода с развитием окислительного стресса на фоне высоких концентраций кислорода в дыхательной смеси. Как показывают данные литературы и результаты настоящего исследования, снижение уровня метаболитов NO в КВВ < 1,0 мкмоль/л в условиях нарастания неконтролируемой гипоксемии является неблагоприятным маркером прогноза критического состояния новорожденного [10].

В ходе многофакторного анализа (таблица) выделены наиболее значимые показатели, участвующие в активации нитроксидазных процессов в легких на фоне СОПЛ у новорожденных:

$$\text{Метаболиты NO} = 0,47f_1 - 0,20f_2 + 0,30f_3 + 0,62f_4$$

Проведенный анализ показал, что наиболее значимым показателем СОПЛ является уровень в КВВ IL-6 и лизис высокомолекулярных белков (4-й фактор). Современные данные свидетельствуют о том, что увеличение концентрации IL-6 в КВВ у больных с развитием ОРДС является фактором риска развития синдрома, а также фактором, который детерминирует летальность в данной группе больных [11, 12].

1-й фактор объединяет показатели протеиназно-фибринолитической активности КВВ: суммарная фибринолитическая активность за счет клеточного фибринолиза и протеолитическая — за счет активности лизиса азокола. Повышение колагенолитической активности приводит к выборочному расщеплению альвеолярного коллагена на фрагменты, что влияет на базальную мембрану и приводит к некрозу эпителиальных клеток. Это повреждает легочные капилляры и нарушает кровообращение на микроциркуляторном уровне.

3-й фактор обобщает состояние окислительного стресса (отрицательные нагрузки показателей перекисного окисления белков). Полученные результаты совпадают с данными литературы: в окислительно-модифицированных белках протеолитическое расщепление белков протеазами значительно повышается [13].

2-й фактор объединяет показатели активности нейтрофилов периферической крови и свертывающей системы крови. Отрицательные факторные нагрузки показателей активности нейтрофилов крови свидетельствуют о том, что при СОПЛ в системном кровотоке снижается количество активных нейтрофильных гранулоцитов за счет их потребления в легочных капиллярах и уменьшается активная фракция нейтрофилов в периферической крови.

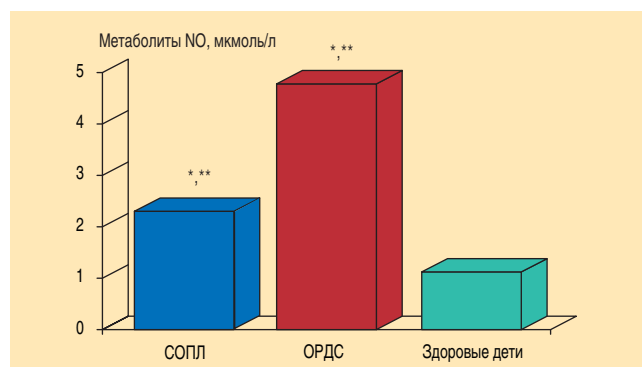


Рисунок. Содержание стабильных метаболитов NO у новорожденных с СОПЛ и ОРДС

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых детей; ** — $p < 0,05$ при сравнении показателей у новорожденных с СОПЛ и ОРДС.

Таблица
Связь NO в КВВ с показателями системного и легочного гомеостаза у новорожденных с СОПЛ, по результатам многофакторного анализа

Показатели	1-й фактор	2-й фактор	3-й фактор	4-й фактор
Суммарная фибринолитическая активность КВВ	0,761340*	0,017208	0,322203	0,279431
Неферментативная фибринолитическая активность КВВ	0,818402*	-0,084912	0,257581	0,239714
Ферментативная фибринолитическая активность КВВ	0,697881	0,053707	0,359737	0,298053
Лизис азоальбумина КВВ	0,412869	0,176796	0,340876	0,514025
Лизис азоказеина КВВ	0,367628	0,011741	0,380832	0,709268*
Лизис азокола КВВ	0,897993*	0,029763	0,013176	0,179748
IL-6 КВВ	0,077191	0,010015	-0,097017	0,892290*
Фагоцитарная активность	0,297165	0,787863*	-0,033059	0,090526
Фагоцитарное число	0,164207	0,861323*	-0,138932	-0,149225
Спонтанный НСТ-тест	-0,375484	0,764202*	0,333330	0,048097
Стимулируемый НСТ-тест	-0,346501	0,762174*	0,407117	0,031227
Общий белок КВВ	0,259585	0,121489	0,845676*	0,128782
Пероксидное окисление белков КВВ	-0,085078	0,038338	-0,91391*	-0,115164
Метаболиты NO КВВ	0,473646	-0,197653	0,297457	0,624104
Общая дисперсия	3,733611	2,780564	3,226220	2,330051
Частица общей дисперсии	0,219624	0,163563	0,189778	0,137062

Примечание: * – нагрузки > 0,7000.

Отрицательные коэффициенты показателей активности нейтрофилов крови, по сравнению с показателем содержания метаболитов NO в КВВ, подтверждают современные представления [14] о способности NO удерживать и накапливать в очаге воспаления активные нейтрофилы, способствуя при этом уменьшению активной фракции нейтрофилов в периферической крови.

С учетом достоверного повышения уровня метаболитов NO в КВВ у новорожденных с СОПЛ была проанализирована возможность применять исследование содержания метаболитов NO в КВВ в диагностике начальных стадий ОРДС (СОПЛ). Повышение у новорожденных в КВВ метаболитов NO > 2 мкмоль/л можно рассматривать как ранний диагностический маркер СОПЛ. Вариабельность уровня метаболитов NO в КВВ можно использовать в качестве биохимической диагностики стадий развития ОРДС, а также для мониторинга и прогнозирования клинического течения СОПЛ. По результатам данного исследования, чувствительность диагностического теста исследования уровней метаболитов NO (диагностическая граница теста > 2 мкмоль/л) в диагностике начальных стадий ОРДС у новорожденных составила 94,1 %, специфичность – 60,0 %. Абсолютный риск СОПЛ у новорожденных с тяжелой дыхательной недостаточностью при условии увеличения в КВВ метаболитов NO > 2,0 мкмоль/л составляет 80,0 %. Абсолютный риск у новорожденных с тяжелой дыхательной недостаточностью при клиническом отсутствии СОПЛ воспалительного процесса в легких при повышении в КВВ метаболитов NO > 2 мкмоль/л – 14,3 %.

При увеличении в КВВ уровня метаболитов NO > 2 мкмоль/л относительный риск (ОР) наличия

СОПЛ составляет 5,6; показатель отношения шансов (ОШ) – 24. Полученные данные относительно значимости данного теста в диагностике СОПЛ можно считать достоверными, что подтверждается доверительными интервалами (95%-ный ДИ) показателей ОР и ОШ: 1,1–348,0 и 2,3–252,2 соответственно.

Атрибутивный риск СОПЛ у новорожденных при повышении в КВВ уровня метаболитов NO > 2,0 мкмоль/л, согласно полученным результатам, составляет 65,7 %. Исходя из показателя атрибутивного риска, можно утверждать, что у новорожденных детей при повышении в КВВ метаболитов NO > 2 мкмоль/л на фоне тяжелой дыхательной недостаточности у каждого 2-го ребенка респираторный дистресс обусловлен СОПЛ (95%-ный ДИ – 1,11–2,08).

Заключение

У новорожденных при развитии СОПЛ независимо от основного патологического состояния происходит активация нитроксидергических процессов. Исследование метаболитов NO в КВВ можно использовать в качестве маркера СОПЛ.

Литература

1. Гельцер Б.И., Кривенко Л.Е., Невзорова В.А. и др. Респираторное влаговыведение и значение его исследования в пульмонологии. Тер. арх. 2000; 72 (3): 46–50.
2. Hare J.M., Nguyen G.C., Massaro A.F. et al. Exhaled nitric oxide: a marker of pulmonary hemodynamics in heart failure. J. Am. Coll. Cardiol. 2002; 40: 1114–1119.
3. Hunt H., Barnes P. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. Eur. Respir. J. 2005; 26: 523–548.

4. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163 (7): 1693–1722.
5. Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. М.: Наука; 1998.
6. Узунова А.Н., Красовская Е.В. Нитроксидергические процессы в патогенезе пневмонии у детей. *Педиатрия* 2003; 5: 8–11.
7. Фланаган Р.Дж., Брейтуэйт Р.А., Браун С.И. и др. Основы аналитической токсикологии. Женева: ВОЗ; 1997.
8. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. и др. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопр. мед. химии* 1995; 1: 24–26.
9. Кухарчук О.Л. Патогенетична роль та методи корекції інтегративних порушень гормонально-месенджерних систем регуляції гомеостазу натрію при патології нирок: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Одеса; 1996.
10. Шуматов В.Б., Шуматова Т.А., Маркелова Е.В. и др. Биорегуляторные молекулы и цитокиновый профиль у больных с респираторным дистресс-синдромом взрослых. *Вестн. интенсив. тер.* 2002; 1: 9–11.
11. Проценко Д.Н., Ярошецкий А.И., Гельфанд Б.Р. Значение цитокиногенеза в развитии вентилятор-ассоциированного повреждения легких (обзор литературы). *Вестн. интенсив. тер.* 2005; 3: 5–10.
12. Tamura D.Y., Moore E.E., Partrick D.A. et al. IL-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release. *J. Surg. Res.* 1998; 76: 91–94.
13. Рябов Г.А., Азизов Ю.М., Дорохов С.И. и др. Окислительная модификация белков плазмы крови у больных в критических состояниях. *Анестезиол. и реаниматол.* 2000; 2: 72–75.
14. Гоженко А.И., Бабий В.П., Бабиенко В.В. Эмиграция лейкоцитов и обмен оксида азота при воспалительных и опухолевых процессах. Одесса: Черноморье; 2005.

Информация об авторах

Яценко Юрий Борисович – д. м. н., доцент кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней Буковинского государственного медицинского университета МЗ Украины; тел.: (380 372) 55-37-54; e-mail: office@bsmu.edu.ua.

Буряк Александр Григорьевич – магистрант кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней Буковинского государственного медицинского университета МЗ Украины; тел.: (380 372) 55-37-54; e-mail: office@bsmu.edu.ua.

Поступила 27.11.07

© Яценко Ю.Б., Буряк А.Г., 2009

УДК 616.24-001-036.11-053.31-092