

УДК 546..172.6+611.81+616.831-053.31

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И ПЕРОКСИНИТРИТА В РАЗВИТИИ ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ ЦНС У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Афонин А. А., Логинова И. Г., Друккер Н. А.

*ФГБУ «Ростовский Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России,
г. Ростов-на-Дону*

Россия (344012, г. Ростов-на-Дону, ул.Мечникова, 43) logirina243@gmail.com

Представлены результаты проведенного комплексного обследования 60 детей первых трех месяцев жизни. В зависимости от наличия и степени тяжести перинатального поражения центральной нервной системы все новорожденные были разделены на 3 группы. Оценивались показатели ультразвукового сканирования головного мозга, и содержание некоторых производных L-аргинина (оксида азота, NO-синтазы, пероксинитрита) в сыворотке крови у наблюдаемых детей. Выявлены достоверные отличия продукции оксида азота, активности NO-синтазы и пероксинитрита у детей с нарушениями функции ЦНС по сравнению с контрольными значениями. Данные изменения лежат в основе формирования перинатального поражения ЦНС, что позволяет рассматривать их не только как маркеры ранней диагностики перинатального поражения мозга, но и в качестве критериев адекватности терапии.

Ключевые слова: новорожденный, оксид азота, NO-синтаза, пероксинитрит.

THE ROLE OF NITRIC OXIDE AND PEROXYNITRITE IN THE DEVELOPMENT OF PERINATAL HYPOXIC-ISCHEMIC CNS LESIONS IN NEWBORNS

Afonin A. A., Loginova I. G., Drukker N. A.

*FGSFO «Scientific-research Institute of obstetrics and Pediatrics» the Ministry of Health of the Russian Federation,
Rostov-on-Don*

Russia (344012, Rostov-on-Don, st. Mechnikov, 43) logirina243@gmail.com

Represents the results of a comprehensive survey of 60 children in the first three months of life. Depending on the presence and severity of perinatal lesions of the central nervous system all infants were divided into 3 groups. Evaluates performance of ultrasound scanning of the brain, and the content of some derivatives of L-arginine (nitric oxide, NO-synthase, peroxyinitrite) in the blood serum of children observed. There were significant differences between production of nitric oxide, NO-synthase activity and peroxyinitrite in children with disorders of the central nervous system in comparison with the control values. These changes are the basis of the formation of perinatal CNS lesions, which can be regarded not only as markers of early diagnosis of perinatal brain injury, but also as a criterion of adequacy of therapy.

Key words: the newborn, nitrogen oxide, NO-synthase, peroxyinitrite.

Актуальность. По данным современной литературы до 72 % новорождённых, перенесших гипоксию-ишемию в перинатальном периоде, имеют неврологическое поражение мозга различной степени тяжести, при этом у 25 % формируются устойчивые расстройства в виде задержки умственного и двигательного развития, детского церебрального паралича, эпилепсии и других состояний с последующей инвалидностью с детства [1].

Чрезвычайно важное значение приобретает ранняя диагностика перинатального поражения центральной нервной системы (ППЦНС), степени тяжести, особенно в первые 72 часа жизни после рождения ребенка, когда существует "терапевтическое окно". Именно в этот период назначение адекватной патогенетической терапии имеет наибольший эффект для восстановления функций поврежденных нейронов головного

мозга. В этой связи разработка наиболее информативных биохимических показателей на ранних этапах развития церебральных нарушений позволят не только снизить частоту и тяжесть течения заболевания, но и объективно оценивать эффективность проводимой терапии.

Цель исследования – выяснение роли производных L-аргинина в развитии перинатальных поражений центральной нервной системы у новорождённых.

Материал и методы исследования

Нами проведено проспективное изучение клинического состояния 60 детей из группы перинатального риска. В зависимости от наличия и степени тяжести церебральной патологии все новорождённые были разделены на 3 группы. Первую группу составили 8 новорожденных, угрожаемых по развитию перинатального повреждения центральной нервной системы (ПП ЦНС). Во 2 группу вошли 19 детей с церебральной ишемией (ЦИ) I степени, в 3 группу – 18 новорожденных с ЦИ II-III степени. Контрольную группу составили 15 здоровых новорожденных, родившихся у женщин с физиологическим течением беременности и родов. Материалом для исследования служила сыворотка крови, полученная путем центрифугирования, забор которой осуществлялся в первые сутки (пуповинная кровь) и в возрасте 1 и 3 месяцев жизни. Критериями для включения в исследование являлись следующие положения: наличие симптомов, свидетельствующих о перинатальном поражении ЦНС; гестационный возраст не менее 38 недель; масса тела при рождении не менее 2500 граммов; отсутствие клинических признаков бактериального инфицирования и наследственной патологии (синдром Дауна и другие). Наряду с этим проводили анализ данных материнского анамнеза и состояния ребёнка после рождения. При оценке поражения ЦНС пользовались классификацией, утверждённой МЗ РФ в 2007 году.

Эндогенный уровень оксида азота в форме нитрит-аниона (NO^-) определяли с помощью реактива Грисса (коммерческий набор «Aldrich Chemical CO», USA) [2]. Активность нитрооксидсинтазы (NO-синтазы) оценивали по увеличению продукции оксида азота из L-аргинина в присутствии НАДФ-Н [5], концентрацию пероксинитрита определяли методом спектрофотометрии. Одновременно проводили нейросонографическое исследование структур головного мозга на аппарате ультразвуковой диагностики "Sim 5000 Plus" с секторальным датчиком мощностью 5 мГц. Ультразвуковое сканирование проводилось по общепринятой методике через большой родничок.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы "Statistika-6" с применением основных методов описательной статистики и непараметрических методов

рождении	2,52-9,58	5,00-9,66	6,80-10,43	6,22-13,52						
1 месяц	10,70 7,63-12,04	8,68 5,58-10,58	7,71 5,83-10,67	10,27 8,68-15,8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
3 месяца	10,23 8,06-12,89	10,90 10,32-12,88	8,62 6,19-11,31	10,43 6,82-12,68	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
P1	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-
P2	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-
P3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-

Примечание: (здесь и далее обозначения аналогичные)

r_{I-II} – статистически обоснованные различия между I и II группами;

r_{I-III} – статистически обоснованные различия между I и III группами;

r_{II-III} – статистически обоснованные различия между II и III группами.

r_{0-1} – статистически обоснованные различия между контрольной и I группами;

r_{0-2} – статистически обоснованные различия между контрольной и II группами;

r_{0-3} – статистически обоснованные различия между контрольной и III группами.

P1 – статистически обоснованные различия между показателями крови пуповины и в 1 месяц;

P2 – статистически обоснованные различия между показателями крови пуповины и в 3 месяца;

P3 – статистически обоснованные различия между показателями в 1 месяц и 3 месяца.

Нами не выявлена статистически достоверная связь между концентрацией метаболитов NO в сыворотке крови и степенью тяжести перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС в клинических группах.

В динамике наблюдения статистически достоверное увеличение содержания NO_x выявлено у детей 2 группы при сравнении показателей крови пуповины и в 3 месяца.

Анализ активности NO-синтазы в крови у детей разных групп выявил следующие особенности (табл. 2). У обследованных детей 3 группы в возрасте 3-х месяцев отмечается статистически достоверное снижение содержания NO-синтазы по сравнению с показателями детей контрольной группы ($p < 0,05$). Сопоставление результатов значений NO-синтазы у детей наблюдаемых групп не отличалось от показателей контрольной группы в другие возрастные периоды.

Таблица 2

Содержание NO-синтазы в сыворотке крови детей с перинатальным поражением ЦНС с учётом сроков возникновения и тяжести церебральных нарушений (медиана, нижний-верхний квартили мкмоль\л).

Сроки наблюдения	I группа (n=8)	II группа (n= 19)	III группа (n= 18)	Контрольная группа (n= 15)	p I-II	p I-III	p II-III	p 0-1	p 0-2	p 0-3
При рождении	18,0 9,32- 25,30	29,30 10,66- 39,30	15,32 11,30- 17,30	21,35 8,3-24,9	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
1 месяц	23,30 13,99- 35,30	24,97 14,70- 32,63	13,99 12,65- 19,65	23,8 11,7- 33,8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
3 месяца	15,32 14,99- 20,32	11,68 9,99- 14,68	24,00 9,99- 34,63	21,9 15,1- 28,3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
P1	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-
P2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	--
P3	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-

Следует отметить, что в динамике наблюдения у детей с ЦИ I степени в возрасте 3 месяцев отмечено существенное снижение активности NO-синтазы по сравнению с показателями первого месяца жизни ($p < 0,05$). В других группах достоверных отличий выявлено не было.

Показатели пероксинитрита (ONOO^-) в сыворотке крови у детей обследованных групп отражены в таблице 3. Так, у новорожденных с проявлениями ЦИ II–III степени тяжести сывороточная концентрация ONOO^- была достоверно выше показателей контрольной группы ($p < 0,05$). У детей с ЦИ I степени в возрасте 3-х месяцев отмечалось статистически достоверное увеличение содержания пероксинитрита в сыворотке крови по сравнению с данными контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 3

Содержание пероксинитрита в сыворотке крови детей с перинатальным поражением ЦНС с учётом сроков возникновения и тяжести церебральных нарушений (медиана, нижний-верхний квартили нмоль\мг).

Сроки наблюдения	I группа (n=8)	II группа (n= 19)	III группа (n= 18)	Контрольная группа (n= 15)	p I-II	p I-III	p II-III	p 0-1	p 0-2	p 0-3
------------------	----------------	-------------------	--------------------	----------------------------	--------	---------	----------	-------	-------	-------

При рождении	109,52 73,21- 132,14	114,88 98,81- 150,60	146,73 115,48- 171,43	100,7 85,22-137,54	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
1 месяц	143,75 119,94- 183,04	152,98 122,62- 189,29	122,02 91,07- 135,71	112,3 99,4-131,55	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
3 месяца	102,09 93,37- 130,06	186,9 152,38- 213,10	122,62 75,60- 186,31	109,7 94,86-127,62	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
P1	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-
P2	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-
P3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	-	-	-	-	-

При этом сывороточная концентрация ONOO^- у новорожденных 1 группы оказалась значительно ниже по отношению к показателям 3 группы ($p < 0,05$). В возрасте 1 месяца жизни максимальные значения ONOO^- обнаружены в крови у пациентов с ЦИ I степени. Эти показатели достоверно отличались от результатов, полученных у детей с ЦИ II степени (3 группа). Следует отметить, что у детей II группы в возрасте 3-х месяцев жизни величина сывороточной концентрации ONOO^- была значительно выше по сравнению с I группой ($p < 0,05$), но не отличалась от значений у пациентов III группы.

Наблюдение в динамике показало, что у детей 1 группы показатели ONOO^- существенно увеличивались в возрасте 1 месяца (по сравнению с показателями крови пуповины), а в 3 месяца жизни приближались к исходным. У детей II группы в возрасте 1 месяца жизни отмечался рост концентрации ONOO^- по сравнению с показателями крови пуповины ($p < 0,05$), достигая максимума в 3 месяца жизни ($p < 0,05$). В динамике наблюдения у детей III группы отличий не выявлено как в 1, так и в 3 месяца жизни.

Обсуждение

Согласно современным представлениям, нейродеструкция ишемического генеза сопровождается развитием сложных патобиохимических каскадов в нейроне – нарушением энергетического метаболизма, развитием транзиттерного аутокоидоза, формированием стойкой митохондриальной дисфункции, сопровождающейся гиперпродукцией активных форм кислорода и азота.

При сопоставлении результатов исследования в возрастной динамике выявлено повышение уровня метаболитов оксида азота только у детей с церебральной ишемией I степени (2 группа) в 3-х месячном возрасте по сравнению с данными крови пуповины. Можно полагать, что увеличение у последних продукции NO в этом периоде обусловлено не

повышением активности NO-синтазы (селективного фермента синтеза NO), так как, по нашим данным, имело место снижение ее активности в 2 раза как относительно контрольных значений, так и по сравнению с данными в возрасте 1 месяца жизни ребенка. Эти результаты свидетельствуют о том, что у детей с церебральной ишемией I степени в 3-х месячном возрасте повышение продукции оксида азота осуществляется без участия кислорода, поскольку NO-синтаза является кислородзависимым ферментом [3]. В этом случае, по-видимому, участвует нитритредуктазный путь синтеза NO, чего не наблюдается у детей со II и III степенью ишемии (3 группа). Выявленное увеличение NO у детей 2 группы, очевидно, может быть источником пероксинитрита, образующегося в результате взаимодействия оксида азота с O_2^- , что и наблюдалось у детей данной группы [4].

Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее значимые изменения ангиогенных соединений обнаружены у детей 2 группы в 3-х месячном возрасте. Модификация баланса биоактивных регуляторов оксида азота и активности NO-синтазы, наряду с отклонениями в продукции пероксинитрита, в сыворотке крови детей данной группы является подтверждением метаболических нарушений, развивающихся к этому возрасту. Из представленных в таблицах данных следует, что изменения в содержании изученных клеточных регуляторов у пациентов, как угрожаемых по развитию ПП ЦНС (I группа), так и с церебральной ишемией I, II–III степенью тяжести (2 и 3 группы), касаются, прежде всего, пероксинитрита. Так, при рождении высокое содержание пероксинитрита в крови пуповины имело место у новорожденных со II и III степенью ишемии, в то время как в возрасте 1 месяца этот показатель был больше у пациентов с I степенью ишемии, чем со II и III степенью ишемии в 3-х месячном возрасте, когда уровень $ONOO^-$ оказался выше относительно данных у детей с угрозой развития ПП ЦНС.

Следует отметить, что выявленное повышение $ONOO^-$ у новорожденных 3 группы (ЦИ II и III степени) в крови пуповины сочеталось с более тяжелыми клиническими проявлениями ПП ЦНС. У пациентов с легкой степенью ЦИ при рождении отмечено нормальное содержание пероксинитрита, при этом клинические проявления ППЦНС были минимальны. Однако в возрасте 3 месяцев у данных детей этот показатель оказался повышенным относительно данных как 1, так и 3 групп. Обнаруженные изменения содержания пероксинитрита в сыворотке крови у наблюдаемых детей свидетельствуют о том, что, вероятнее всего, дети 2 группы своевременно не получили адекватной патогенетической терапии, в отличие от детей 3 группы с проявлениями ЦИ II–III степени.

Поскольку изменения содержания пероксинитрита выявляются еще на доклинической стадии ППЦНС, он может служить не только маркером данного заболевания, но и критерием адекватности лечения.

Список литературы

1. Голосная Г. С. Нейрохимические аспекты патогенеза гипоксических поражений мозга у новорожденных. – М.: ИД "Медпрактика-М", 2009. – 128 с.
2. Дмитриенко Н. П., Снов С. В., Смердова Л. Н. и соавт. Влияние акцепторов оксида азота на критериальнозначимые биохимические показатели у крыс с нитратной нагрузкой // Современные проблемы токсикологии. – 1998. – № 1. – С. 24-28.
3. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охтин В. Е., Косицин Н. С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 155 с.
4. Степуро Т. П., Зинчук В. В. Влияние нитрозоцистеина на кислородсвязывающие свойства крови // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. – 2012, № 2. – С. 83-86.
5. Julio J. L., Gude N. U., Riug R. L. Human fetal membrane nitric oxide synthase // Reproduction and Development. – 1995. – Vol. 7. – № 6. – P. 1505-1508.

Рецензенты:

Бережанская Софья Борисовна, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник педиатрического отдела ФГБУ "Ростовский НИИ акушерства и педиатрии" Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.

Летифов Гаджи Муталибович, д-р мед. наук, профессор, и.о. заведующего кафедрой педиатрии с курсом неонатологии ФПК ППС ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.