

**Состояние ферментного звена системы антиоксидантной защиты у детей с  
бронхолегочной дисплазией в стадии хронической болезни**

*1Белорусский государственный медицинский университет  
2Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси*

В статье представлены результаты определения активности ключевых ферментов системы антиоксидантной защиты (АОЗ) в эритроцитах детей с бронхолегочной дисплазией (БЛД) в стадии хронической болезни в возрасте 6 мес. - 3 года. Установлено: повышение активности каталазы, рассматриваемое как компонент компенсаторно-приспособительной реакции организма; снижение активности глутатионпероксидазы (ГП), свидетельствующее об истощении данного компонента системы АОЗ; неизменная активность супероксиддисмутазы (СОД).

Ключевые слова: бронхолегочная дисплазия, дети, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза.

Среди хронических заболеваний легких у детей БЛД занимает одно из ведущих мест. В настоящее время во всем мире данная патология представляет собой не только значимую медицинскую, но и социальную проблему. С современных позиций проблему БЛД следует рассматривать в зависимости от стадии заболевания. Выделяют стадию формирования данной патологии и стадию хронического заболевания. Доказана роль различных патогенетических факторов в развитии БЛД в стадии ее формирования. Одним из основных признан оксидантный стресс (ОС), обусловленный дисбалансом системы «оксиданты – антиоксиданты» за счет относительного избытка активных радикалов (АР) в сочетании с недостаточной эффективностью системы антиоксидантной защиты (АОЗ) по их нейтрализации [4, 8].

В доступной литературе не найдено работ, посвященных исследованию системы АОЗ при БЛД в стадии хронического заболевания. Однако исследования в этом направлении представляют значимый научный и практический интерес, поскольку воспалительный процесс в дыхательных путях персистирует длительно – в течение первых семи лет жизни [3] и может являться причиной повышенного образования АР. Кроме того, активность воспалительного процесса может увеличиваться за счет рецидивирующих респираторных инфекций, характерных для детей с БЛД в стадии хронической болезни. Известно, что альвеолярная стадия развития легких продолжается постнатально с наибольшей интенсивностью процесса альвеоляризации в первые годы жизни. Поэтому персистенция воспаления и ОС у детей с БЛД в стадии хронической болезни может вести к дополнительному повреждению ткани легких и нарушению их развития, обуславливая тяжесть течения и неблагоприятные исходы болезни. В связи с этим нам представлялось целесообразным изучение способности системы АОЗ противостоять токсическому воздействию АР в организме при БЛД в стадии хронической болезни.

Ранее нами были выявлены закономерности изменения общей антиоксидантной активности сыворотки крови у детей с БЛД в стадии хронической болезни в возрасте 6-15 мес., характеризующиеся ее увеличением у детей с легкой степенью тяжести заболевания. В связи с этим остается актуальным изучение состояния отдельных компонентов системы АОЗ у детей первых трех лет жизни с БЛД в стадии хронической болезни, что позволит

разработать патогенетически обоснованную терапию и повысить качество жизни пациентов.

Получение материала для исследования функционирования системы АОЗ в легких неинвазивными методами представляет определенные трудности. Поэтому ведутся поиски моделей, по метаболическим нарушениям в которых можно было бы составить представление о ее состоянии в организме в целом. Эритроциты являются наиболее простой и репрезентативной моделью для исследования активности внутриклеточных ферментов системы АОЗ, их популяция в периферической крови наиболее многочисленна, а продолжительность жизни достаточна для отображения специфических изменений [6, 7].

Цель исследования: изучить состояние ферментного звена системы антиоксидантной защиты у детей с бронхолегочной дисплазией в стадии хронической болезни на основании определения в эритроцитах активности ее ключевых ферментов.

Материалы и методы. В исследование (2007-2008 гг.) включено 92 ребенка (М-57 и Д-35) в возрасте от 6 до 35 мес. Все обследуемые были распределены на три группы, каждая из которых состояла из детей двух возрастных периодов (6-12 мес. и 1-3 года). В основную группу вошел 41 (21 и 20, соответственно) ребенок с БЛД, находившийся под динамическим наблюдением в городском амбулаторном пульмонологическом кабинете на базе УЗ «3-ая городская детская клиническая больница» г. Минска; в контрольную группу – 31 (15 и 16, соответственно) ребенок, наблюдавшийся в городских детских поликлиниках г. Минска; в группу сравнения вошли 20 (8 и 12, соответственно) детей, находившихся на стационарном лечении в инфекционном отделении детей раннего возраста на базе УЗ «3-ая городская детская клиническая больница» г. Минска. С целью установления закономерностей изменения изучаемых параметров 15 детям (6-12 мес.) исследование проводилось в динамике через 6-8 мес. Таким образом, в группу БЛД 1-3 года вошло 35 детей.

Критериями включения в исследование служили: основная группа – дети с БЛД в стадии хронической болезни, не имеющие на момент осмотра клинико-лабораторных данных в пользу инфекционного процесса; контрольная группа – практически здоровые дети, не болевшие по данным анамнеза и формы 112 в течение предшествующего обследованию месяца острыми инфекционными заболеваниями; группа сравнения – дети с клинико-рентгенологически подтвержденным диагнозом пневмония в первые 5–7 суток от начала заболевания. Группа сравнения сформирована с целью выявления механизмов антиоксидантной защиты и их интенсивности при воспалительном процессе с локализацией в легких. Перед обследованием детей обязательным было получение информированного согласия от родителей на проведение дополнительных исследований.

Диагноз и степень тяжести БЛД верифицированы согласно определению и классификации, принятыми на рабочем совещании по данной проблеме в 2000 г. [5].

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования образцов крови при 3000g в течение 15 мин и трижды отмывали в 155 мМ растворе NaCl. Активность СОД определяли по методу Костюка В.А. с соавт. в U/мл [9], активность каталазы – по методу Королюка М.А. с соавт. в мккат/мл [1], активность ГП – по методу Моина В.М. в мкМ/мин на 1 г Hb [2]. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре "Specord M-40" (Германия).

Статистический анализ данных проводился с использованием коммерческого пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Результаты считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости менее 0,05. Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами, а количественных признаков – в формате: среднее значение (среднеквадратичное отклонение) – M(s) или

медиана (интерквартильный размах) – Me(LQ/UQ) в зависимости от вида распределения. Проверка гипотез о виде распределения количественных признаков осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Результаты и обсуждение. Проанализирована сопутствующая патология, играющая важную роль в патогенезе БЛД в стадии ее формирования (по материалам архива ГУ РНПЦ «Мать и Дитя»). Врожденная пневмония диагностирована у 68 % (28/41), пневмония новорожденного – у 12 % (5/41), врожденный сепсис – у 24 % (10/41) пациентов. Обращает на себя внимание тот факт, что ни у одного ребенка с установленным диагнозом врожденная пневмония не развилась впоследствии пневмония новорожденного. Таким образом, 80% детей в стадии формирования заболевания переносили пневмонический процесс. Действительно, инфекционное поражение легких, врожденное или нозокомиальное, способствует развитию БЛД, вследствие повышения выработки медиаторов и притока клеток воспаления, пролонгируя при этом потребность в ИВЛ и кислородотерапии, что и является причиной дальнейшего их повреждения.

Так как на момент исследования все дети основной группы достигли возраста 12 мес., проанализированы особенности клинического течения БЛД на первом году жизни (табл. 1). Учитывая возрастную неоднородность группы детей с БЛД 1-3 года, провести аналогичный анализ не представлялось возможным.

Таблица 1. Структура заболеваний бронхолегочной системы у детей с БЛД на первом году жизни в зависимости от степени тяжести [абсолютные частоты]

Группа		Показатели				
		ООБ	РОБ	Пневмония с БОС	Базисная терапия ИГКС	Длительно персистирующая ДН
БЛД (n=41)	легкая (n=22)	8/22*	2/8*, **	2/22*	1/22*	1/22*
	средняя (n=14)	10/14	8/10**	2/14#	4/14	4/14
	тяжелая (n=5)	5/5*	4/5*	4/5*, #	4/5*	4/5*

Примечание: 1. ООБ (острый обструктивный бронхит), РОБ (рецидивирующий обструктивный бронхит), БОС (бронхообструктивный синдром), ИГКС (ингаляционные глюкокортикостероиды), ДН (дыхательная недостаточность); 2.\* – статистически значимые различия между подгруппами БЛД легкой и тяжелой степеней тяжести; 3. \*\* – статистически значимые различия между подгруппами БЛД легкой и средней степеней тяжести; 4. # – статистически значимые различия между подгруппами БЛД средней и тяжелой степеней тяжести

При сравнении подгрупп БЛД в зависимости от степени тяжести по структуре заболеваний бронхолегочной системы, а также по частоте длительно персистирующей ДН и необходимости применения базисной противовоспалительной терапии ИГКС мы использовали критерий Манна-Уитни в обратном применении (табл. 1). Выявлены статистически значимые различия по показателям: ООБ (p=0,033), РОБ (p<0,001), пневмония с БОС (p=0,021), базисная терапия ИГКС и длительно персистирующая ДН (p=0,002). Дальнейший внутригрупповой анализ (двусторонний точный критерий Фишера) обнаружил статистически значимые различия между подгруппами: легкой-средней степеней тяжести по показателю – РОБ (p=0,006); легкой-тяжелой степеней тяжести по

показателям – ООБ ( $p=0,016$ ), РОБ ( $p=0,004$ ), пневмония с БОС ( $p=0,004$ ), базисная терапия ИГКС и длительно персистирующая ДН ( $p=0,001$ ); средней-тяжелой степеней тяжести по показателю – пневмония с БОС ( $p=0,017$ ). Таким образом, нами выявлены особенности клинического течения БЛД на первом году жизни в зависимости от степени тяжести: рецидивирующий обструктивный бронхит характерен для средней и тяжелой, а пневмония с бронхообструктивным синдромом – для тяжелой степени тяжести заболевания. Полученные нами результаты подтверждают объективность оценки пульмонологического прогноза при использовании классификации степеней тяжести, принятой в 2000 году [10].

Предваряя описание результатов исследования, необходимо акцентировать внимание на том, что проведению статистического анализа по изучаемым параметрам предшествовало сравнение групп по возрасту (критерий Краскела-Уоллиса) и полу (анализ таблиц сопряженности с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона). Статистически значимых различий по вышеуказанным параметрам для групп БЛД-контрольная-сравнения 6-12 мес. (по возрасту  $p=0,6$ ; по полу  $p=0,68$ ) и БЛД-контрольная-сравнения 1-3 года (по возрасту  $p=0,77$ ; по полу  $p=0,63$ ) нами не выявлено (табл. 2, 3).

Таблица 2. Активность ферментов системы АОЗ в эритроцитах обследованных детей в возрасте 6-12 мес. [M(s); Me(LQ/UQ)]

Показатели	Группы		
	БЛД	Контрольная	Сравнения
Число детей, n	21	15	8
Возраст, мес.	8 (7/10)	7 (7/11)	10 (7,5/10,5)
Пол, м/д	11/10	10/5	5/3
СОД, У/мл	47,7 (9,9)	49,3 (7,7)	48,9 (8,5)
Каталаза, мккат/мл	5,4 (4,7/6,9)*	3,5 (2,8/4,6)*, **	4,76 (4,0/6,7)**
ГП, мкМ/мин на 1 г Нб	83,5 (68,9/118,1)*	140,4 (96,8/149,9)*	124,4 (87,7/159,15)

Примечание: 1. \* - статистически значимые различия между группами БЛД и контрольной; 2. \*\* - статистически значимые различия между группами сравнения и контрольной

В то же время при сравнении (параметрический однофакторный дисперсионный анализ вариаций или критерий Краскела-Уоллиса, в зависимости от вида распределения) групп БЛД-контрольная-сравнения в возрасте 6-12 мес. по активности ферментов системы АОЗ (табл. 2) статистически значимые различия получены по показателям активность каталазы ( $p=0,001$ ) и активность ГП ( $p=0,048$ ); по показателю активность СОД ( $p=0,85$ ) статистически значимых различий нами не обнаружено. Внутригрупповой анализ (критерий Манна-Уитни) выявил статистически значимые различия между группами по показателям активность каталазы (БЛД-контрольная  $p<0,001$ ; сравнения-контрольная  $p=0,033$ ) и активность ГП (БЛД-контрольная  $p=0,02$ ), и их отсутствие между группами по показателям активность каталазы (БЛД-сравнения  $p=1,0$ ) и активность ГП (БЛД-сравнения  $p=0,13$ ; сравнения-контрольная  $p=0,7$ ).

Таблица 3. Активность ферментов системы АОЗ в эритроцитах обследованных детей в возрасте 1-3 года [Me(LQ/UQ)]

Показатели	Группы		
	БЛД	Контрольная	Сравнения
Число детей, n	35	16	12
Возраст, мес.	19 (16/25)	19 (14,5/22,5)	19,5 (14,5/29)
Пол, м/д	20/15	11/5	7/5
СОД, У/мл	46,4 (41,4/50,3)	51,7 (43,8/56,1)	47,5 (46,0/55,4)
Каталаза, мккат/мл	4,8 (4,6/5,3)*	4,35 (4,05/4,75)*, **	4,95 (4,6/8,4)**
ГП, мкМ/мин на 1 г Нб	144,7 (99,2/207,6)*	177,6 (143,5/246,9)*	131,7 (100,5/181,8)

Примечание: 1. \* - статистически значимые различия между группами БЛД и контрольной; 2. \*\* - статистически значимые различия между группами сравнения и контрольной

При сопоставлении (критерий Краскела-Уоллиса) групп БЛД-контрольная-сравнения 1-3 года по активности ферментов системы АОЗ (табл. 3) статистически значимые различия получены по показателям активность каталазы ( $p=0,017$ ) и активность ГП ( $p=0,043$ ); по показателю активность СОД ( $p=0,14$ ) статистически значимых различий нами не обнаружено. Внутригрупповой анализ (критерий Манна-Уитни) выявил статистически значимые различия по показателям активность каталазы между группами (БЛД-контрольная  $p=0,02$  и сравнения-контрольная  $p=0,011$ ) и активность ГП между группами (БЛД-контрольная  $p=0,045$ ), и их отсутствие по показателям активность каталазы между группами (БЛД-сравнения  $p=0,32$ ) и активность ГП между группами (БЛД-сравнения  $p=0,79$ ; сравнения-контрольная  $p=0,057$ ).

С целью получения более детальных представлений о значениях изучаемых параметров нами проведено сопоставление групп БЛД легкой – средней и тяжелой степеней тяжести (t-критерий Стьюдента (учитывая условия его применимости) или критерий Манна-Уитни, в зависимости от вида распределения), которое не обнаружило статистически значимых различий по изучаемым параметрам в возрасте 6-12 мес. (активность СОД  $p=0,18$ ; активность каталазы  $p=0,42$ ; активность ГП  $p=0,72$ ) и 1-3 года (активность СОД  $p=0,2$ ; активность каталазы  $p=0,44$ ; активность ГП  $p=0,08$ ) (табл. 4).

Полученные данные указывают на повышение активности каталазы у детей с БЛД в возрасте 6 мес. – 3 года, которое следует рассматривать как компонент компенсаторно-приспособительной реакции организма. Нами установлена однонаправленность функционирования данного компонента системы АОЗ как у детей с БЛД, так и у детей с пневмонией (рис. 1, 2). Показано отсутствие изменений активности ферментов системы АОЗ в зависимости от степени тяжести БЛД, свидетельствующее об общности патогенетических механизмов при данной патологии (табл. 4).

Таблица 4. Активность ферментов системы АОЗ в эритроцитах детей с БЛД в возрасте 6-12 мес. и 1-3 года в зависимости от степени тяжести [M(s); Me(LQ/UQ)]

Показатели	Группы / степени тяжести			
	БЛД 6-12 мес.		БЛД 1-3 года	
	Легкая	Средняя и тяжелая	Легкая	Средняя и тяжелая
Число детей, n	13	8	18	17
СОД, U/мл	48,3 (11,2)	46,8 (8,1)	44,6 (6,6)	47,6 (7,1)
Каталаза, мккат/мл	6,2 (2,0)	5,2 (1,8)	4,9 (4,6/5,6)	4,7 (4,6/5,2)
ГП, мкМ/мин на 1 г Нб	95,8 (38,2)	89,4 (38,1)	126,0 (81,4/163,3)	173,5 (114,8/232,5)

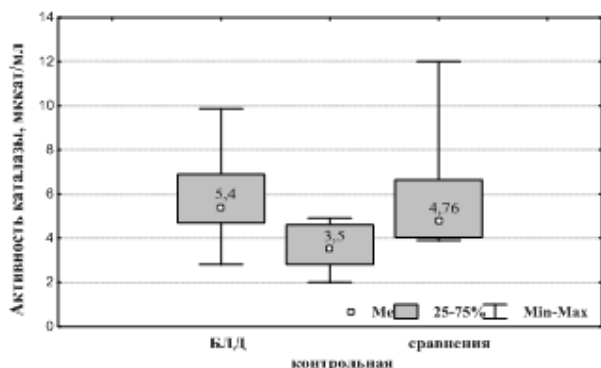


Рисунок 1. Активность каталазы у детей обследуемых групп в возрасте 6-12 мес.

Для выявления закономерностей изменения изучаемых параметров у детей с БЛД в стадии хронической болезни с возрастом (табл. 5) нами был проведен анализ их значений в группах 6-12 мес. и 1-3 года (критерий Манна-Уитни), который обнаружил статистически значимые различия по показателю активность ГП ( $p < 0,001$ ), и их отсутствие по показателям активность СОД ( $p = 0,59$ ) и активность каталазы ( $p = 0,07$ ). Аналогичные закономерности (t-критерий Стьюдента для зависимых групп (учитывая условия его применимости) или критерий Вилкоксона, в зависимости от вида распределения) выявлены при обследовании в динамике 15 детей с БЛД (табл. 6) по показателям активность ГП ( $p < 0,001$ ), активность СОД ( $p = 0,83$ ) и активность каталазы ( $p = 0,7$ ).

Таблица 5. Активность ферментов системы АОЗ в эритроцитах детей с БЛД в зависимости от возраста [M(s); Me(LQ/UQ)]

Группы	Показатели			
	Число детей, n	СОД, U/мл	Каталаза, мккат/мл	ГП, мкМ/мин на 1 г Нб
БЛД 6-12 мес.	21	46,7 (39,1/55,0)	5,4 (4,7/6,9)	83,5 (68,9/118,1)*
БЛД 1-3 года	35	46,4 (41,4/50,3)	4,8 (4,6/5,3)	144,7 (99,2/207,6)*

Примечание – \* - статистически значимые различия между группами БЛД 6-12 мес. и 1-3 года

Результаты исследований указывают на снижение активности ГП у детей с БЛД в возрасте 6 мес. – 3 года (табл. 2, 3), при наличии ее роста с возрастом (табл. 5, 6), что свидетельствует об истощении данного компонента системы АОЗ и снижении компенсаторно-приспособительных возможностей организма (рис. 3).

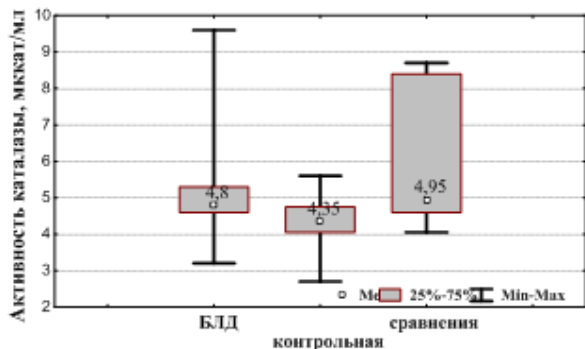


Рисунок 2. Активность каталазы у детей обследуемых групп в возрасте 1-3 года

Таблица 6. Активность ферментов системы АОЗ в эритроцитах детей с БЛД в динамике [M(s); Me(LQ/UQ)]

Группы	Показатели			
	Число детей, n	СОД, U/мл	Каталаза, мккат/мл	ГП, мкМ/мин на 1 г Нь
БЛД (первично)	15	43,8 (8,7)	4,9 (3,6/5,9)	88,0 (74,9/120,0)*
БЛД (повторно)	15	44,4 (8,3)	4,9 (4,6/5,3)	144,9 (119,6/230,8)*

Примечание – \* - статистически значимые различия между группами БЛД первично – повторно

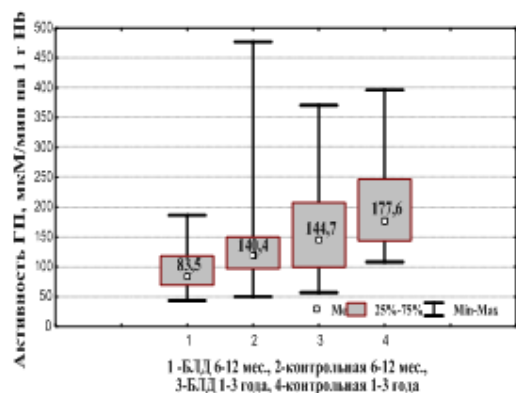


Рисунок 3. Активность ГП в группах БЛД-контрольная в зависимости от возраста

#### Выводы

Выявлены особенности клинического течения БЛД в стадии хронической болезни на первом году жизни в зависимости от степени тяжести: рецидивирующий обструктивный бронхит характерен для средней и тяжелой, а пневмония с бронхообструктивным синдромом – для тяжелой степени тяжести заболевания.

2. Показана объективность оценки пульмонологического прогноза у детей с БЛД при использовании классификации степеней тяжести, принятой на рабочем совещании по данной проблеме в 2000 году.

3. Установлены особенности состояния ферментного звена системы АОЗ у детей с БЛД в стадии хронической болезни в возрасте 6 мес. – 3 года: повышение активности каталазы у детей с БЛД и пневмонией, которое следует рассматривать как компонент универсальной компенсаторно-приспособительной реакции, направленной на поддержание гомеостаза системы «оксиданты – антиоксиданты»; снижение активности ГП, при наличии ее роста с возрастом свидетельствует об истощении данного компонента системы АОЗ и снижении компенсаторно-приспособительных возможностей организма; идентичная значениям контрольной группы активность СОД; отсутствие изменений активности ключевых ферментов системы АОЗ в зависимости от степени тяжести БЛД.

#### **Литература:**

1. Метод определения каталазной активности / М. А. Королук [и др.] // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–19.

2. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 724–727.

3. Хроническая обструктивная патология легких у взрослых и детей / под ред. А. Н. Кокосова. СПб., 2004. С. 263–284.

4. A catalytic antioxidant attenuates alveolar structural remodeling in bronchopulmonary dysplasia / Chang Ling-Yi L. [et al] // Am J Respir Crit Care Med. 2003. Vol. 167. P. 57–64.

5. Bronchopulmonary Dysplasia / A.H. Jobe, E. Bancalari // Am. J. Crit. Care Med. 2001. Vol. 163. P. 1723–1729.

6. Erythrocyte Cu/Zn superoxide dismutase activity in preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia / Ren-Huei Fua [et al] // Biol Neonate. 2005. Vol. 88. P. 35–41.

7. Lower erythrocyte glutathione peroxidase activity in bronchopulmonary dysplasia in the first week of neonatal life / Ren-Huei Fua [et al] // Neonatology. 2008. Vol. 93. P. 269–275.

8. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant / C. Dani, A. Cecchi, G. Bertini // Minevra Pediatr. 2004. Vol. 56. P. 381–394.

9. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovitch // Biochem. Int. 1989. Vol. 19. P. 1117–1124.

10. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia / Richard A. Ehrenkranz [et al] // Pediatrics. 2005. Vol. 116. № 6. P. 1353–1360.