

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.1:616-053.2/6

©Литвиненко Л.А., Данилова Л.А.

### ИЗМЕНЕНИЯ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

*Л.А. Литвиненко, Л.А. Данилова, Н.П. Шабалов.*

Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия,  
Министерство здравоохранения Российской Федерации.  
Кафедра биохимии СПбГПМА, Россия, 194100, Санкт-Петербург, Литовская, 2,  
тел./факс 245-40-85

Обнаружены изменения активности антиоксидантных ферментов крови в зависимости от сроков гестации и разных заболеваний. Низкая активность супероксиддисмутазы и каталазы крови отмечена у недоношенных и новорожденных детей после острой или хронической гипоксии. Значительное возрастание активности ферментов по сравнению со здоровыми доношенными детьми наблюдалось при гемолитической болезни новорожденных. Эта работа также показала преимущества метода гемосорбции над заменным переливанием крови. Так, антиоксидантная активность крови снижалась после гемотрансфузии и оставалась на высоком уровне после гемосорбции. Низкая антиоксидантная активность крови новорожденных способствует проявлению токсических эффектов кислорода. Для таких состояний необходимо использовать антиоксиданты.

**Ключевые слова:** супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмин, новорожденные, патология.

**ВВЕДЕНИЕ.** Изучение становления и роли антиоксидантной системы (АОС) в адаптационных реакциях у новорожденных детей в норме и при патологии является одной из актуальных задач неонатологии. Период новорожденности наиболее уязвим в развитии свободно-радикальных повреждений. Дети рождаются в состоянии, близком к оксидативному стрессу. У новорожденных детей обнаружены высокие показатели содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1]. Интенсификация ПОЛ мембран клеток у них может быть вызвана как относительной гипероксией в момент рождения, так и повышенным содержанием всех классов липидов в мембранах клеток, большим содержанием в них полиненасыщенных жирных кислот, являющихся субстратом для ПОЛ. Усиление свободнорадикального окисления (СРО) у новорожденных может объясняться недостаточной активностью антиоксидантной защиты (АОЗ). Показано, что в крови новорожденных содержание витамина Е невелико и повышено количество окисленного токоферола (хинона) по сравнению со взрослыми людьми [2]. Отмечено снижение глутатионового звена АОЗ в этот период [3]. Свободнорадикальные повреждения могут составлять патогенетический механизм развития серьезных заболеваний у

#### АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ ПАТОЛОГИИ

детей этого возраста. В литературе в последнее время стали использовать термин "оксидативные заболевания новорожденных" (к ним относят бронхолегочные дисплазии, внутричерепные кровоизлияния, ретинопатии и другие [4]). Корректный вывод о роли СРО в патогенезе любого заболевания может быть сделан на основании комплексного исследования компонентов системы АОЗ. Большое значение имеет сбалансированное соотношение основного антиоксидантного фермента - супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) и ферментов, метаболизирующих перекись водорода, - каталазы (КТ, КФ 1.11.1.6) и пероксидазы, что определяет жизнеспособность клетки и устойчивость к действию активных форм кислорода (АФК).

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование активности основных антиоксидантных ферментов в крови у здоровых новорожденных детей и при различных патологических состояниях для оценки информативной значимости этих показателей.

**МЕТОДИКА.** Обследовано 109 новорожденных детей (43 здоровых новорожденных ребенка в возрасте от момента рождения до 7 дней, 27 детей с гемолитической болезнью новорожденных (ГБН) с желтушно-анемической формой средней и тяжелой степени, 19 недоношенных детей (менее 32 недель беременности), 20 детей, перенесших сочетанное воздействие острой и хронической гипоксии). Последняя группа от матерей с поздним токсикозом. Дети родились в асфиксии, роды были затяжными с длительным безводным промежутком (оценка по шкале Апгар 4-6 баллов). У недоношенных детей также отмечалось постгипоксическое состояние, развитие пневмонии. В качестве группы сравнения исследовали кровь 35 здоровых взрослых доноров в возрасте 17-35 лет.

Определение активности супероксиддисмутазы проводили по реакции восстановления нитросинего тетразолия (0,407 мМ) в присутствии NADH (1 мМ) и феназинметасульфата (1,8 мкМ). Активность фермента выражали в условных единицах (у.е.), отнесенных на 1 мг гемоглобина. Количество фермента, вызывающее 50% торможение реакции, соответствует одной у.е. [5]. Активность каталазы оценивали по скорости разрушения перекиси водорода в ммольях за минуту и выражали в международных единицах (МЕ) на г гемоглобина [6]. Одновременно проводили оценку соотношения активности СОД к КТ у новорожденных детей каждой обследованной группы. Для этого предварительно вычисляли относительное количество фермента в процентах от соответствующих показателей донорской крови, принятых за 100%. Последние рассматривали как нормативные, свидетельствующие об оптимальной активности и соотношении компонентов АОС для практически здоровых взрослых лиц. Содержание церулоплазмينا в мг/л исследовали методом Ревина в модификации Колба [7].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ активности антиоксидантных ферментов эритроцитов у здоровых новорожденных и детей с различными патологическими состояниями показал неоднозначные результаты. Так, обнаружены различия в активности СОД и КТ в пуповинной крови и у детей первых 3-7 дней жизни (рис.1,2). На фоне более высокой активности СОД в эритроцитах пуповинной крови определяются более низкие значения активности КТ по сравнению с данными, полученными у новорожденных в возрасте 3-7 дней. Однако активность обоих ферментов в пуповинной крови была выше, чем в донорской соответственно на 25% и 11% (соотношение между ними было повышено (1,13)). Более высокая активность СОД, чем КТ, метаболизирующей перекись водорода, может приводить к повышению концентрации последней. По литературным данным в пуповинной крови определяются низкие показатели активности глутатионпероксидазы, миелопероксидазы, также метаболизирующих перекись водорода - конечный продукт супероксиддисмутазной реакции [3,8]. Поэтому изолированное возрастание активности СОД без соответствующего повышения пероксидазы и каталазы может рассматриваться как цитотоксичный фактор. К концу первой недели жизни нами выявлено снижение соотношения в

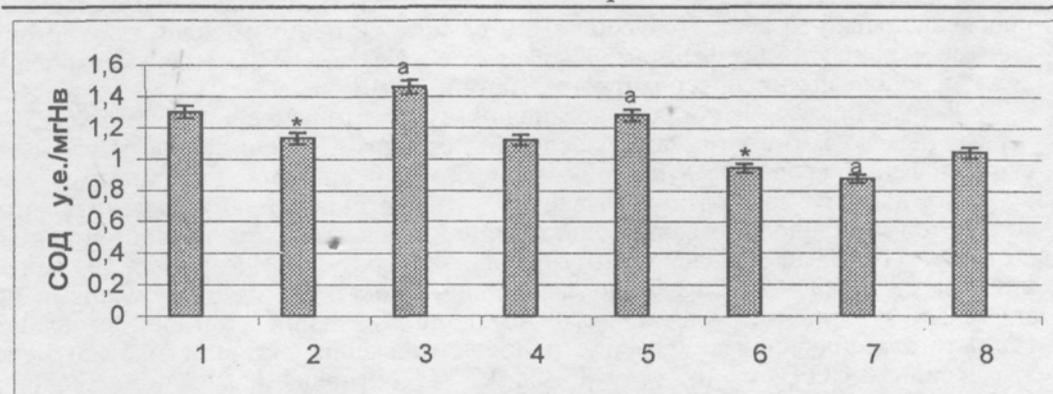


Рисунок 1

Активность супероксиддисмутазы крови у новорожденных детей в норме и при патологии. 1. Здоровые новорожденные (пуповинная кровь); 2. Здоровые новорожденные (3-7 дней); 3. Дети с ГБН (до лечения); 4. Дети с ГБН (после ЗПК); 5. Дети с ГБН (после гемосорбции); 6. Дети, перенесшие сочетанное воздействие хронической и острой гипоксии (пуповинная кровь); 7. Недоношенные дети; 8. Доноры (17-35 лет). Здесь и далее значимость различий: \* - с группой 1, ( $p < 0,05$ ); а - с группой 2 ( $p < 0,05$ )

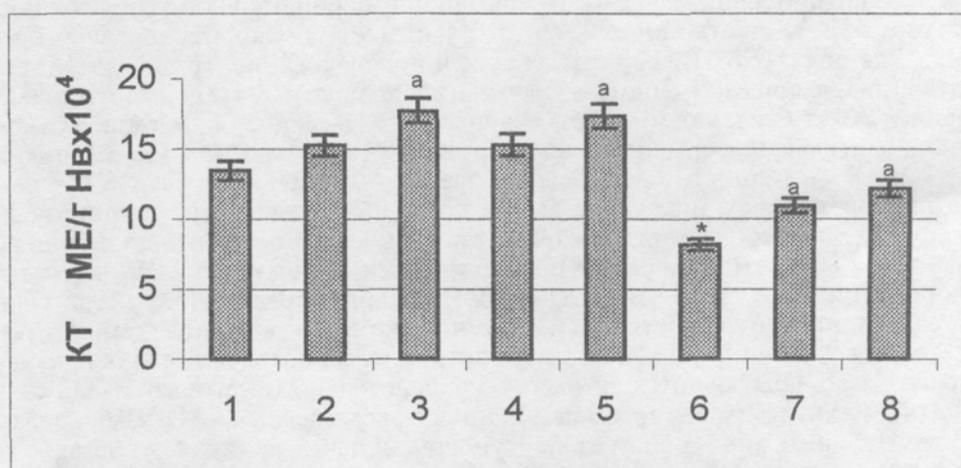


Рисунок 2.

Активность каталазы крови новорожденных детей в норме и при патологии. □ КТ в ME/g Hbx10<sup>4</sup>. 1. Здоровые новорожденные (пуповинная кровь); 2. Здоровые новорожденные (3-7 дней); 3. Дети с ГБН (до лечения); 4. Дети с ГБН (после ЗПК); 5. Дети с ГБН (после гемосорбции); 6. Дети, перенесшие сочетанное воздействие хронической и острой гипоксии (пуповинная кровь); 7. Недоношенные дети; 8. Доноры (17-35 лет).

активностях ферментов (0,86) в сторону уменьшения активности СОД и повышения активности КТ, что имеет значение в последовательной детоксикации АФК. При сравнении со значениями здоровых взрослых активность и СОД, и КТ так же была выше соответственно на 8,7% и на 26%.

Содержание церулоплазмينا по нашим данным в плазме пуповинной крови значительно ниже, чем у взрослых. Активность фермента возрастала к 3-7-му дням жизни в соответствии с адаптационными изменениями других антиокислительных ферментов крови. Однако ее величины не достигали показателей взрослых людей и были ниже их в 2-3 раза (рис.3), что свидетельствует о низкой антиоксидантной активности плазмы крови. Церулоплазмин не только участвует в разрушении супероксидного радикала, но и играет роль в гомеостазе меди и железа, обладает ферроксидазной активностью, тем самым переводя железо в окисленную форму и предупреждая его

#### **АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ ПАТОЛОГИИ**

прооксидантный эффект. Церулоплазмин служит источником меди для клеток в синтезе медьзависимых ферментов, в частности, Cu, Zn - СОД. Все эти механизмы лежат в основе его антиоксидантного действия [9,10].

Таким образом, наши исследования показали, что изменения системы АОС в первую неделю жизни отражают перестройку организма ребенка к новым условиям существования и соответствуют срокам общей метаболической адаптации.

По данным литературы известно, что активность антиокислительных ферментов у плодов возрастает постепенно в зависимости от гестационного возраста [11]. Нами выявлено, что у недоношенных детей активность СОД была ниже на 23%, КТ - на 28,3 % по сравнению с показателями, полученными для здоровых доношенных детей того же периода жизни. При сопоставлении результатов, полученных в группе доноров, снижение активности было менее выраженным: СОД - на 16,4% , КТ - на 9,7 % (соотношение между ними - 0,93) (рис.1,2). Результаты проведенного исследования подтверждают мнение о том, что формирование стабильных концентраций СОД и КТ происходит в течение последних месяцев внутриутробного развития и свидетельствуют о функциональной незрелости АОЗ у недоношенных детей, что может лежать в основе развития свободнорадикальной патологии (например, ретинопатий [3,11]).

Тяжесть течения различных заболеваний в периоде новорожденности может быть обусловлена усилением процессов ПОЛ и нарушениями в системе антиоксидантной защиты [2-4]. Среди причин перинатальной заболеваемости и смертности существенное место занимает гемолитическая болезнь новорожденных (ГБН) [12]. Мы провели обследование групп детей с ГБН желтушно-анемической формы в начальный период и в зависимости от метода лечения. Так, до лечения у них отмечались более высокие показатели активности антиокислительных ферментов, чем у здоровых новорожденных детей и доноров (рис.1,2,3). Активность СОД была выше на 40%, а активность КТ - на 46% (соотношение между ними - 0,96) при сравнении с данными группы доноров. Содержание церулоплазмينا у детей с гемолитической болезнью до лечения было выше на 51,8%, чем у здоровых новорожденных, но ниже на 24%, чем в группе доноров (рис.3). Известно, что гемолиз эритроцитов и функциональная незрелость печени являются основными факторами в генезе гемолитической болезни новорожденных [12]. Гемолиз эритроцитов и появление в крови продуктов их распада сопровождаются активацией окислительного фагоцитоза. Он связан с работой мультиферментного мембранного комплекса NADPH-оксидазы. В результате реакции образуется супероксидный радикал. Одновременно активируется миелопероксидаза, участвующая в генерации других АФК. В свою очередь последние индуцируют ферментное звено АОС [13]. Определенная нами в этой работе однонаправленная активация всей системы АОЗ у детей с ГБН возможно обусловлена увеличением генерации АФК в условиях повышения окислительного фагоцитоза в ответ на усиленный гемолиз и может рассматриваться как важный приспособительный процесс.

Лечение детей с ГБН проводили путем заменного переливания крови /ЗПК/ и методом гемосорбции. Последний осуществлялся пропусканием крови через колонку, наполненную активированным углем с селективным покрытием из группы "акцелераторных" веществ типа кофеин-бензоата натрия. Нами установлено, что после ЗПК активность всех антиоксидантных ферментов снижалась (по сравнению со значениями, полученными у детей до лечения), но она оставалась выше, чем в группе доноров (СОД - на 7,7%, КТ - на 26%), соотношение между ними составило 0,85 (рис. 1, 2, 3). При применении метода гемосорбции активности исследованных ферментов снизились незначительно по сравнению с цифрами до лечения и были выше значений, полученных в группе доноров (СОД - на 23%, КТ - на 42%, соотношение между ними 0,86) (рис.1, 2, 3). Содержание церулоплазмينا в плазме крови у детей с ГБН после гемосорбции было выше по сравнению со значениями, полученными у детей после ЗПК и у здоровых новорожденных детей, на 67% (рис.3). Во всех группах обследованных детей с ГБН содержание церулоплазмينا

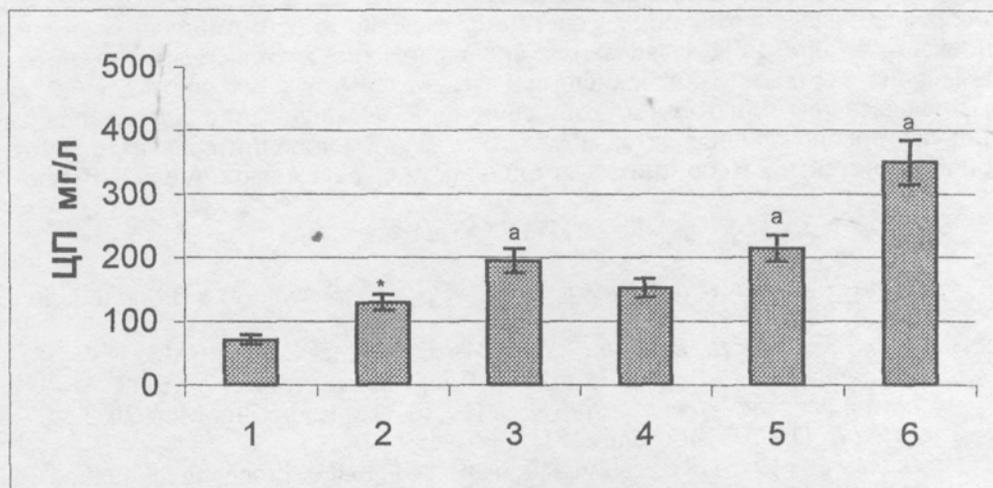


Рисунок 3.

Содержание церулоплазмينا (ЦП) в плазме крови новорожденных (мг/л).

1. Здоровые новорожденные (пуповинная кровь); 2. Здоровые новорожденные (3-7 дней); 3. Дети с ГБН (до лечения); 4. Дети с ГБН (после ЗПК); 5. Дети с ГБН (после гемосорбции); 6. Доноры (17-35 лет).

было ниже, чем в группе здоровых взрослых людей (рис.3). Результаты наших исследований совпадают с данными литературных источников. Сообщалось, что добавление донорской крови к крови новорожденных в трансфузионной модели *in vitro* вызывает постепенное снижение ее антиоксидантной способности [14]. Следовательно, метод гемосорбции позволяет сохранять высокую антиоксидантную активность крови новорожденных с ГБН, что может иметь значение в защите от мембранотоксических эффектов АФК.

Рядом авторов показано, что усиление ПОЛ является частью общего адаптационного синдрома в ответ на действие неблагоприятных факторов (например, гипоксии). В этих условиях требуется мобилизация эндогенных резервов антиоксидантной системы как компонента неспецифической резистентности организма. Было показано, что АОЗ имеет ограниченные возможности при различных формах гипоксии, синдроме дыхательных расстройств у новорожденных. Они выражаются в мембранотоксических эффектах АФК, проявляющихся в развитии бронхолегочных дисплазий, внутричерепных кровоизлияний и других поражений тканей [3,8,15,16].

Нами проведено исследование активности антиокислительных ферментов у детей, перенесших сочетанное воздействие острой и хронической гипоксии. Были обнаружены более низкие показатели активности антиоксидантных ферментов эритроцитов, чем у здоровых новорожденных детей (СОД меньше на 27,7%, КТ - на 39%). При сравнении активности СОД и КТ, обнаруженной у детей в постгипоксическом состоянии с данными здоровых взрослых доноров, также отмечались различия (соответственно ниже на 9,6% и на 32,5%). Соотношение между активностями ферментов было увеличено (1,34). Такой дисбаланс активностей СОД и каталазы в сторону более выраженного снижения последней может привести к повышению концентрации цитотоксичной перекиси водорода, продукта супероксиддисмутазной реакции и повреждению клеток. Ряд авторов также отмечают у детей с гипоксией дефицит ферментов, метаболизирующих перекись водорода - глутатионпероксидазы, миелопероксидазы [3,8].

Анализ собственных данных показал, что активность ключевых ферментов АОС (супероксиддисмутазы и каталазы) в крови новорожденных детей имеют более высокие значения, чем у здоровых взрослых людей. В течение первой недели жизни происходят изменения их активности и соотношения в соответствии со сроками общей метаболической адаптации. У недоношенных детей,

## АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ ПАТОЛОГИИ

новорожденных, перенесших сочетанное воздействие острой и хронической гипоксии, и при ГБН выявляются специфические антиоксидантные профили. Изменения активности антиоксидантных ферментов и их соотношений могут быть вовлечены в патогенез этих состояний. Исследование антиоксидантного статуса у новорожденных детей может стать важным дополнительным показателем общей резистентности организма, устойчивости к повреждающему действию АФК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ohno H., Ookawara T., Nakao C. *Et al.* (1998) *Rew.Farm.e Bioquim.Univ. Sao Paulo.* **34**, supl.1.
2. Jain S.K., Wise R., Bocchini J.J.Jr. (1996) *J. Amer.Coll.Nutr.* **15**, 1, 44-48.
3. Русанов С.Ю., Токарь В.И. (1988) *Вопр.мед.химии* **34**, 7, 55-59.
4. Lackmann G.M., Hesse L., Tollner U. (1996) *Free Radic.Biol.Med.* **20**, 3, 407-409.
5. Fried R. (1975) *Biochemie* **57**, 5, 657-660.
6. Beutler E. (1975) *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods.*-New York-San Francisco-London.
7. Колб В.Г., Камышников В.С. (1982) *Справочник по клинической химии.* Минск, 290-291.
8. Раменская Н.П. (2000) *Педиатрия на рубеже веков. Проблемы, пути развития. Сборник материалов конференции, ч.2, СП-б, с.199-202.*
9. Добротина Н.А., Рутницкий А.Ю., Гладышева М.В. и др. (1999) *Успехи соврем.биологии* **119**, 375-379.
10. Мжельская Т.И. (2000) *Бюлл. эксп.биол. и мед.*, **130**, №8, 124-133.
11. Vazowska G., Jendryczko A. (1996) *Ginekol.Pol.* **67**, 2, 70-74.
12. Шабалов Н.П. (1997) *Неонатология: Учебник.* СПб: Специальная литература, **2**, 100-124.
13. Шепелев А.П., Корниенко И.В., Шестопалов А.В. и др. (2000) *Вопр.мед. химии* **46**, 110-116.
14. Moison R.M., van-Hoof E.J., Clahsen P.C., *et al.* (1996) *Acta Paediatr.* **852**, 220-224.
15. Софронова Л.Н. (1987) *Антиоксидантная защита эритроцитов и функциональное состояние эритроцитарной мембраны при острой и хронической гипоксии новорожденных детей.* Автореф. канд.дисс. Ленинград, 23.
16. Contreras M., Hariharan N., Lewandoski J.R. *et al.* (1996) *Crit Care Med.* **24**, 1, 29-37.

Поступила 30.07.01.

## CHANGES IN SYSTEM OF ANTIOXIDANT BLOOD DEFENCE IN NEWBORNS WITH DIFFERENT PATHOLOGY.

L.A. Litvinenco, L.A.Danilova, N.P.Shabalov

Saint-Petersburg Pediatric Medical Academy,  
Russia, 194100, Saint-Petersburg, Lytovskaya 2, tel/fax 245-40-85

Blood antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, ceruloplasmin) were investigated in gestational ages and diseases. Low activity of blood superoxide dismutase and catalase were observed in premature babies and in newborns after acute and chronic hypoxia. In hemolytic disease the activity of antioxidant enzymes of newborns was significantly higher than in healthy infants. This work demonstrates advantages of haemosorption compared to exchange blood transfusion. So the antioxidant activity in blood, decreased after blood transfusion, remained at a high level after haemosorption.

Any deficiency of antioxidant enzymes in newborns may lead to toxic oxygen effects. Antioxidants are potential therapeutic agents in the above mentioned conditions.

**Key words:** superoxide dismutase, catalase, ceruloplasmin, newborns, pathology.