

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–7, 11–13 см. REFERENCES)

1. Яковлев В.Н., Марченков Ю.В., Панова Н.С., Алексеев В.Г., Мороз В.В. Жировая эмболия. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (4): 50–8.
8. Кузьков В.В., Фот Е.В., Сметкин А.А., Комаров С.А., Киров М.Ю. Связь между концентрацией триглицеридов плазмы и тяжестью острого респираторного дистресс-синдрома. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 22–5.
9. Яковлев А.Ю., Певнев А.А. Лабораторные методы диагностики жировой глобулемии (обзор литературы и собственные данные). *Медицинский альманах*, 2016; 45 (5): 240–3.
10. Борисов М.Б., Гаврилин С.В. Синдром жировой эмболии при тяжелых сочетанных травмах. *Вестник хирургии имени И.И. Грекова*. 2006; 165 (5): 68–71.
14. Голохваст К.С., Чайка В.В. Альвеолярный макрофаг (краткий обзор). *Вестник новых медицинских технологий*. 2011; 18 (2): 23–4.
15. Титов В.Н., Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А. *Жирные кислоты, триглицериды, гипертриглицеридемия, гипергликемия и инсулин*. М.: «Инфра-М»; 2016.

REFERENCES

1. Yakovlev V.N., Marchenkov Y.V., Panova N.S., Alekseev V.G., Moroz V.V. Fat Embolism. *Obshchaya reanimatologiya*. 2013; 9 (4): 50–8. (in Russian)
2. Kwiat M.E., Seamon M.J. Fat embolism syndrome. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci*. 2013; 3: 64–8.
3. Gurd A.R. Fat embolism: an aid to diagnosis. *J. Bone Joint Surg*. 1970; 52 (4): 732–7.
4. Lehman E.P., Moore R.M. Fat embolism, including experimental production without trauma. *Arch. Surg*. 1927; 14: 621.
5. Szabó G., Magyar Z., Réffy A., The role of free fatty acids in pulmonary fat embolism. *Injury*. 1977; 8 (4): 278–83.

6. Nixon J.R., Brock-Utne J.G. Free fatty acid and arterial oxygen changes following major injury. A correlation between hypoxemia and increased free fatty acid level. *J. Trauma*. 1978; 18: 23–6.
7. Shi S., Gao Y., Wang L. et al. Elevated free fatty acid level is a risk factor for early postoperative hypoxemia after on-pump coronary artery bypass grafting: association with endothelial activation. *J. Cardiothorac. Surg*. 2015; 10: 122.
8. Kuzkov V.V., Fot E.V., Smetkin A.A., Komarov S.A., Kirov M.Y. The relationship between the plasma triglyceride concentration and the severity of acute respiratory distress syndrome. *Obshchaya reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 22. (in Russian)
9. Yakovlev A.Yu., Pevnev A.A. Laboratory methods of diagnostics of fat globulinaemia. *Meditsinskiy al'manakh*. 2016; 45 (5): 240–3. (in Russian)
10. Borisov M.B., Gavrilin S.V. The fat embolism syndrome in severe combined traumas. *Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova*. 2006; 165 (5): 68–71. (in Russian)
11. Lehman E.P., Moore R.M. Fat embolism, including experimental production without trauma. *Arch. Surg*. 1927; 14: 621.
12. Crocker G.H., Jones J.H. Effects of oleic acid-induced lung injury on oxygen transport and aerobic capacity. *Respir. Physiol. Neurobiol*. 2014; 196: 43–9.
13. Baker P.L., Pazell J.A., Peltier L.F. Free fatty acids, catecholamines, and arterial hypoxia in patients with fat embolism. *J. Trauma*. 1971; 11 (12): 1026–30.
14. Golokhvast K.S., Chayka V.V. Alveolar macrophage (brief review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2011; 18 (2): 23–4. (in Russian)
15. Titov V.N., Rozhkova T.A., Amelyushkina V.A. *Fatty Acids, Triglycerides, Hypertriglyceridemia, Hyperglycemia and Insulin* [Zhirnye kisloty, triglitseridy, gipertriglitseridemiya, giperqlikemiya i insulin]. Moscow: Infra-M; 2016. (in Russian)

Поступила 23.12.16

Принята к печати 19.01.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.155-053.32-073.537.9

Попова И.Г.¹, Ситникова О.Г.¹, Назаров С.Б.¹, Кузьменко Г.Н.¹, Абрамова И.В.², Чаша Т.В.¹, Парейшвили В.В.¹

ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ЛИЗАТЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК СОСУДОВ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА НОВОРОЖДЕННЫХ

¹ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново;

²ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 153012, Иваново

Обследованы новорожденные ($n = 28$), из которых 18 недоношенных детей составили основную группу (гестационный возраст – от 28 до 35 нед, масса тела $2067,3 \pm 76,7$ г), а группу сравнения – 10 доношенных детей (гестационный возраст от 38 до 41 нед, масса тела $3380,2 \pm 57,2$ г), родившихся от матерей с физиологически протекающей беременностью без экстрагенитальной патологии. У всех детей проводили определение в смешанной пуповинной крови и лизате эндотелиальных клеток, выделенных из вены пупочного канатика, показателей свободнорадикального окисления липидов, характеризующих окислительный стресс, и антиоксидантной активности методом хемилюминесценции. Результаты исследования показали у недоношенных новорожденных увеличение в пуповинной крови показателей хемилюминесценции быстрой вспышки (Itax), величины светосуммы (S) и тангенса угла наклона кинетической кривой (tga), а также повышение параметров Itax и tga в лизате эндотелиальных клеток пупочного канатика, что свидетельствует о развитии окислительного стресса у этих детей, сопровождающегося компенсаторным повышением антиоксидантной активности.

Ключевые слова: новорожденные; недоношенные новорожденные; окислительный стресс; антиоксидантная активность; хемилюминесценция.

Для корреспонденции: Попова Ирина Геннадьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клин. биохимии и мед. генетики ФГБУ ИвНИИМид им. В.Н. Городкова Минздрава РФ; e-mail: i_g_porova@mail.ru

Для цитирования: Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Абрамова И.В., Чаша Т.В., Парейшвили В.В. Оценка окислительного стресса в пуповинной крови и лизате эндотелиальных клеток сосудов пупочного канатика новорожденных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (5): 274-277. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-5-274-277>

Popova I.G.¹, Sitnikova O.G.¹, Nazarov S.B.¹, Kuzmenko G.N.¹, Abramova I.V.², Chasha T.V.¹, Pareishvili V.V.¹

THE EVALUATION OF OXIDATION STRESS IN UMBILICAL BLOOD AND LYSATE OF ENDOTHELIAL CELLS OF VESSELS OF UMBILICAL CORD OF NEWBORNS

¹The V.N. Gorodkov Ivanovskii institute of maternity and childhood of Minzdrav of Russia, 153045 Ivanovo, Russia

²The Ivanovskaia state medical academy of Minzdrav of Russia, 153012 Ivanovo, Russia

The sampling of newborns (n=28) was examined. Out of them, 18 premature children formed main group (gestation age from 28 to 35 weeks, body mass 2067,3±76,7g) and 10 mature children formed comparison group (gestation age from 38 to 41 weeks, body mass 3380,2±57,2g) born from mothers with physiologically occurring pregnancy without extra-genital pathology. In all children, the detection of endothelial cells isolated from umbilical cord vein in mixed umbilical blood and lysate was applied and indices of free radical oxidation of lipids, characterizing oxidizing stress as well and anti-oxidation activity using chemiluminescence technique. The study results demonstrated in premature newborns increasing in umbilical blood of indices of fast flash chemiluminescence (Imax), light sun value (S) and tangent of kinetic curve slope (tga) and also increasing of parameters Imax and tga in lysate of endothelial cells of umbilical cord. All these occurrences testify in these children development oxidation stress being accompanied by compensation increasing of antioxidant activity.

Key words: newborns; premature newborns; oxidation stress; ant-oxidant activity; chemiluminescence.

For citation: Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Kuzmenko G.N., Abramova I.V., Chasha T.V., Pareishvili V.V. The evaluation of oxidation stress in umbilical blood and lysate of endothelial cells of vessels of umbilical cord of newborns. *Klinicheskiy Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (5): 274-277. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-5-274-277>

For correspondence: Popova I.G., candidate of medical sciences, researcher of laboratory of clinical biochemistry and medical genetics. e-mail: i_g_popova@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 07.02.2017
Accepted 15.02.2017

Введение. Известно, что окислительный стресс – один из патогенетических механизмов нарушений гестационного периода, таких как бесплодие, невынашивание, преэклампсия, которые могут привести к рождению недоношенных детей [1]. Установлено, что продукты свободнорадикальных реакций – свободные радикалы, супероксиданион (O₂⁻), гидроксильный радикал (HO•), липидный радикал (ROO•) и радикалы оксида азота (NO) в значительных концентрациях приводят к образованию таких токсичных продуктов, как пероксинитрит (-ONOO), гидроксирадикал (HO•) [2]. Последние являются инициаторами перекисного окисления липидов и способны напрямую окислять клеточные компоненты, вызывая повреждение мембран клеток, способствуя развитию окислительного стресса [1–3], в том числе нарушения функции эндотелия [4].

Важную роль в развитии эндотелиальной дисфункции на клеточном уровне играют процессы повреждения эндотелиальных клеток с нарастанием числа десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ), свидетельствующих о степени повреждения сосудов и об интенсивности регенеративных процессов в эндотелии [5].

В проведенных нами ранее исследованиях удалось проследить изменения показателей функционального состояния эндотелия в пуповинной крови. Выявлено, что у новорожденного от матери с гестозом в 1-е сутки жизни нарушаются функции эндотелия, что сопровождается повышением количества ДЭ и концентрации суммарных нитратов и нитритов (NOx) [6–8].

По данным литературы, недоношенные новорожденные по сравнению с доношенными детьми более склонны к окислительному стрессу, поскольку у них отмечена сниженная функциональная активность антиоксидантной защиты, повышенная чувствительность к инфекционным и воспалительным процессам [1, 9–11].

Однако сообщения об одновременном исследовании в

пуповинной крови доношенных и недоношенных новорожденных и в лизате эндотелиальных клеток сосудов пупочного канатика показателей окислительного стресса и антиоксидантной активности (АОА) малочисленны.

Цель работы – оценка окислительного стресса в пуповинной крови и в лизате эндотелиальных клеток, выделенных из вены пупочного канатика новорожденных.

Материал и методы. Взятие пуповинной крови проводили у рожениц, поступивших в акушерскую клинику Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова.

Обследованы новорожденные (n = 28), из которых 18 недоношенных детей составили основную группу (гестационный возраст – от 28 до 35 нед, масса тела 2067,3±76,7 г), а группу сравнения – 10 доношенных детей (гестационный возраст от 38 до 41 нед, масса тела 3380,2±57,2 г), родившихся от матерей с физиологически протекающей беременностью без экстрагенитальной патологии.

У всех детей проводили определение в смешанной пуповинной крови и лизате эндотелиальных клеток сосудов пупочного канатика показателей окислительного стресса (концентрацию свободных радикалов, АФК) и антиоксидантной активности (АОА). Выделение эндотелиальных клеток из вены пуповины проводили методом J.C. Gerlach и соавт. [12]. К осадку клеток добавляли 1 мл физиологического раствора, подсчет клеток проводили с использованием камеры Горяева [13]. Полученную суспензию разливали на аликвоты, которые в необходимом объеме содержали 500 клеток. Аликвоты замораживали при -20°C для получения лизата. В кювету биохимилонометра помещали такой объем лизата, который предположительно содержит 500 клеток. Таким образом, интенсивность хемилюминесценции стандартизировалась на число клеток.

Оценивали показатели окислительного стресса и АОА в пуповинной крови и в лизате клеток при помощи метода железиндуцированной хемилюминесценции (ХЛ) на биохемилонометре БХЛ-07 (Россия). Для этого исполь-

Таблица 1

Показатели индуцированной хемилюминесценции пуповинной крови у доношенных и недоношенных новорожденных

Показатель	Доношенные	Недоношенные
<i>I</i> _{max} , мВ	146 [123; 158]	169* [133; 184]
<i>S</i> , мВ · с	2016 [1678; 2242]	2247* [1929; 2900]
<i>a</i>	0,461 [0,413; 0,489]	0,474 [0,438; 0,505]
<i>Z</i> , с	13,784 [12,364; 14,646]	13,962 [13,095; 15,185]
<i>tga</i> , мВ/с	20,25 [19,5; 22,5]	24* [21; 28,5]

Примечание. Здесь и в табл. 2: статистические показатели представлены в виде медианы – середины распределения изучаемого признака и интерквартильного интервала (ME[Q₂₅; Q₇₅]); * – достоверные отличия от группы сравнения ($p < 0,05$).

зовали параметры ХЛ, которые отражают потенциальную способность биологического объекта к интенсивности свободнорадикальных реакций: *I*_{max} – значение максимальной интенсивности свечения за время опыта, мВ; *S* – площадь под кривой интенсивности, или полная светосумма; мощность антиоксидантного потенциала: *Z* – нормированная светосумма; *a* – относительная светосумма; *tga* – тангенс угла максимального наклона кривой к оси времени, которые рассчитывались автоматически. Представленные параметры наиболее информативны для оценки ХЛ. Так, показатели *I*_{max} и *S* дают представление о потенциальной способности биологического объекта к свободнорадикальному окислению липидов, антиоксидантный потенциал коррелирует с параметрами *a*, *Z*, *tga*, снижение величин *a* и *Z* и повышение *tga* свидетельствует о повышении антиоксидантной активности.

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica 6,0 (Statsoft) for Windows. Учитывая характер распределения, отличный от нормального, описание представлено в виде медианы – середины распределения изучаемого признака и интерквартильного интервала (ME[Q₂₅; Q₇₅]). Сравнение средних величин в группах проводили с использованием критериев Колмогорова–Смирнова, Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проведен с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена [14].

Результаты и обсуждение. Результаты исследования СРО липидов и антиоксидантной активности у новорожденных в пуповинной крови представлены в табл. 1.

Кинетика индуцированной ХЛ, сопровождающая свободнорадикальное окисление липидов, показала, что максимум свечения, связанный с выходом свободных радикалов, наблюдался в течение первых 2 с от начала реакции. При

этом изменения относительных величин медиан интенсивности свечения – быстрой вспышки (*I*_{max}) сыворотки пуповинной крови недоношенных детей возрастали в среднем на 16% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями у доношенных новорожденных, что связано с усиленным образованием свободных радикалов липидов и активных форм кислорода (НО₂[•], О₂[•], О₂⁻, ОН[•]) (реакция Фентона). Значения изменения относительных величин медиан величин светосуммы (*S*) также оказались увеличенными на 11% ($p < 0,05$), что свидетельствует о развитии окислительного стресса у недоношенных детей.

Известно, что при нормальном функционировании организма существует оптимальный баланс между антиоксидантами и прооксидантами. В нашей работе изменения относительных величин медиан показателей *tga*, отражающих антиоксидантную активность организма в группе недоношенных новорожденных, превысила на 18% по сравнению с таковыми параметрами у доношенных детей ($p < 0,05$), что свидетельствует об активации антиоксидантной системы у недоношенных.

Данные исследования окислительного стресса и антиоксидантной активности у новорожденных в лизате эндотелиальных клеток представлены в табл. 2.

Количество выделенных эндотелиальных клеток из вены пуповины у недоношенных новорожденных было достоверно выше по сравнению с доношенными (см. табл. 2). Исследование у группы недоношенных детей интенсивности процессов СРО липидов в лизате клеток показало увеличение изменений относительных величин медиан параметров ХЛ – *I*_{max} и *tga* ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми в лизате у доношенных новорожденных. Показатели хемилюминесценции (*S*) достоверно не изменились.

На основании анализа с использованием критерия Спирмена в крови доношенных детей установлены следующие взаимосвязи между показателями ХЛ: положительные связи между быстрой вспышкой – *I*_{max} и величиной светосуммы свечения – *S* ($r = 0,81$, $p = 0,0038$), отрицательные зависимости между показателями ХЛ, отражающими АОО систему: *a* и *tga* ($r = -0,89$, $p = 0,0004$), *Z* и *tga* ($r = -0,89$, $p = 0,0004$), что подтверждает наличие баланса между про- и антиоксидантами.

В крови недоношенных новорожденных выявлены положительные корреляционные зависимости между показателями быстрой вспышки (*I*_{max}), величины светосуммы (*S*) и углом спада кинетической кривой *tga* ($r = 0,61$, $p = 0,0094$); в лизате клеток между показателями быстрой вспышки – *I*_{max} и углом спада кинетической кривой *tga* ($r = 0,75$, $p = 0,0000$). Обнаруженные связи свидетельствуют о компенсаторной активации антиоксидантной системы у недоношенных новорожденных, связанной с развитием окислительного стресса.

Заключение. На основании изменений относительных

Таблица 2

Показатели индуцированной хемилюминесценции в лизате эндотелиальных клеток вены пупочного канатика у доношенных и недоношенных новорожденных

Показатель	Доношенные	Недоношенные
<i>I</i> _{max} , мВ	43 [42; 49]	60* [51; 73]
<i>S</i> , мВ · с	408 [301; 488]	405 [348; 538]
<i>a</i>	0,278 [0,251; 0,333]	0,228 [0,210; 0,261]
<i>Z</i> , с	8,327 [7,525; 9,959]	6,824 [6,300; 7,804]
<i>tga</i> , мВ/с	13,5 [12,0; 13,5]	18* [15; 21]
Десквамированные эндотелиоциты, выделенные из вены пуповины, количество клеток/мкл	10 [9,0; 11]	13* [10,0; 15]

величин медиан параметров хемилюминесценции: интенсивности свечения, величины светосуммы, повышения тангенса угла наклона кинетической кривой у недоношенных новорожденных в пуповинной крови и лизате клеток сосудов пупочного канатика установлено развитие окислительного стресса, сопровождающегося повышением антиоксидантной активности. Корреляционный анализ у недоношенных новорожденных подтверждает эти изменения. Их можно расценить как компенсаторную реакцию организма, направленную на жизнеобеспечение и дальнейшую адаптацию организма ребенка к внеутробной жизни.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 9–12 см. REFERENCES)

1. Гармаза Ю.М., Козлова Н.М., Артюшевская М.В. и др. Маркеры окислительного стресса в плазме пуповинной крови недоношенных новорожденных. *Медицинский академический журнал*. 2013; 13 (4): 71–6.
2. Taylor C.T., Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30 (4): 643–7.
3. Poston L., Igosheva N., Mistry H.D., Seed P.T., Shennan A.H., Rana S. et al. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 94 (6): 1980–5.
4. Sidorova I.S., Borovkova E.I., Martynova I.V., Solonitsyn A.N., Rykunova O.V., Shemonaeva T.V. The role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2007; 3: 3–5. (in Russian)
5. Popova I.G., Chasha T.V., Kuz'menko G.N., Sitnikova O.G., Nazarov S.B. Clinical and laboratory evaluation of endothelial function in the development of perinatal CNS lesions in newborns from mothers with preeclampsia. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2010; 55 (4): 18–22. (in Russian)
6. Popova I.G., Nazarov S.B., Fil'kina E.V., Kuz'menko G.N., Sitnikova O.G. Features of early postnatal adaptation of newborns. *Pediatriya*. 2013; 92 (2): 16–20. (in Russian)
7. Popova I.G., Nazarov S.B., Fil'kina E.V., Kuz'menko G.N., Sitnikova O.G. The features of endothelial function in early postnatal adaptation in newborns from mothers with preeclampsia. *Mat' i ditya v Kuzbasse*. 2014; 2: 82–6. (in Russian)
8. Popova I.G., Nazarov S.B., Kuz'menko G. N., Sitnikova O.G. Circulating endothelial cells and growth factors in newborn infants of mothers with preeclampsia. *Tavricheskiy mediko-biologicheskiy vestnik*. 2015; 18 (1): 183–4. (in Russian)
9. O'Donovan D.J., Fernandes C.J. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid. Redox. Signal.* 2004; 6 (1): 169–76.
10. Dani C., Cecchi A., Bertini G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva. Pediatr.* 2004; 56 (4): 381–94.
11. Perrone S., Negro S., Tataranno M.L., Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2010; 23 (3): 63–5.
12. Cerlach J.C., Zeilinger K., Spatkowski G., Hentschel F., Schnoy N., Kolbeck S. et al. Large-Scale isolation endothelial cells from pig and human liver. *Journal of Surgical Research*. 2001; 100 (1): 39–45.
13. Petrishchev N.N., Berkovich O.A., Vlasov T.D., Volkova E.V., Zueva E.E., Mozgovaya E.V. Diagnostic value assessment of desquamated endothelial cells in the blood. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2001; (1): 50–2. (in Russian)
14. Rebrova O.Yu. *Statistical Analysis of Medical Data. Application Software Package STATISTICA [Statisticheskii analiz meditsinskikh dannyykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA]*. Moscow: Media Sfera; 2002. (in Russian)

REFERENCES

1. Garmaza Yu.M., Kozlova N.M., Artyushevskaya M.V. et al. Markers of oxidative stress in plasma of cord blood of premature infants. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2013; 13 (4): 71–6. (in Russian)