

ИНВАЗИВНЫЕ МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ВНЕГОСПИТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

© Парфёнова И.В., Максимович Н.А.

*Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230015, Гродно, ул. Горького, 80**Резюме*

Цель. Установить роль оксида азота, NO-синтаз (eNOS и iNOS) и циркулирующих эндотелиальных клеток как инвазивных маркеров эндотелиальной дисфункции в формировании воспалительных процессов у детей с острой внегоспитальной пневмонией.

Методика. У 100 детей с острой внегоспитальной пневмонией оценивали содержание в сыворотке крови оксида азота (определяемое по концентрации его конечных стабильных метаболитов), циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК), а также эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) синтаз.

Результаты. У детей с острой внегоспитальной пневмонией по сравнению с контролем установлены более высокие уровни оксида азота (26,5(19,8-30,5) мкмоль/л и 15,33 (14,1-16,9) мкмоль/л соответственно, $p < 0,001$), ЦЭК 15,0 (11,5-17,0) клеток в 100 мкл плазмы и 6,6 (4,0-9,0) клеток в 100 мкл плазмы соответственно, $p < 0,001$), iNOS-синтазы (5671,2 (5276,3-5915,4) пг/мл и 597,7 (180,7-720,7) пг/мл соответственно, $p < 0,001$), а также низкие уровни eNOS (3236,7 (2868,2-3487,8) пг/мл и 4627,8 (4523,0-4646,6) пг/мл соответственно, $p < 0,001$) зависящие от степени вовлечения легочной ткани в воспалительный процесс.

Заключение. Уровни оксида азота, ЦЭК, iNOS и eNOS-синтаз в периферической крови предполагается использовать в качестве ранних критериев оценки выраженности воспалительного процесса у детей с острой внегоспитальной пневмонией.

Ключевые слова: оксид азота, синтазы, острая внегоспитальная пневмония, дети, эндотелиальные клетки

INVASIVE MARKERS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN CHILDREN WITH ACUTE PNEUMONIA

Parfionova I.V., Maksimovich N.A.

*Grodno state medical University, 80, Gorkogo Str., Grodno, 230015, Belarus**Abstract*

Objective. To establish the role of nitric oxide, NO-synthase (eNOS and iNOS) and circulating endothelial cells as invasive markers of endothelial dysfunction in the formation of inflammatory processes in children with acute pneumonia.

Methods. In 100 children with acute pneumonia, serum levels of nitric oxide (determined by the concentration of its final stable metabolites), circulating endothelial cells (CEC), and levels of endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) synthases were assessed.

Results. In children with acute pneumonia, higher levels of nitric oxide (26.5(19.8-30.5) mmol/l and 15.33 (14.1-16.9) mmol/l, respectively, $p < 0.001$), CEC 15.0 (11.5-17.0) cells in 100 ml of plasma and 6.6 (4.0-9.0) cells in 100 ml of plasma, respectively, $p < 0.001$), iNOS-synthase (5671.2 (5276.3-5915.4) PG/ml and 597.7 (180.7-720.7) PG/ml, respectively, $p < 0.001$), as well as low eNOS values (3236.7 (2868.2-3487.8) PG/ml and 4627.8 (4523.0-4646.6) PG/ml, respectively, $p < 0.001$) depending on the degree of involvement of the lung tissue in the inflammatory process.

Conclusion. The levels of nitric oxide, CEC, iNOS and eNOS-synthase in peripheral blood are supposed to be used as early criteria for assessing the severity of the inflammatory process in children with acute pneumonia.

Keywords: nitric oxide, synthases, acute pneumonia, children, endothelial cells

Введение

Острая внегоспитальная пневмония (ВП) является одной из важнейших проблем современной клинической педиатрии, что связано с её тяжестью и не снижающейся частотой. По классическим канонам к пневмониям относят различные по этиологии и патогенезу, морфологической характеристике острые, преимущественно бактериальные заболевания, характеризующиеся очаговыми поражениями респираторного отдела легких с обязательным наличием внутриаальвеолярной экссудации [1].

За последние годы, достигнут значительный прогресс в разработке ранних методов диагностики и лечения пневмоний. Несмотря на это, социальная значимость острых внегоспитальных пневмоний и материальный ущерб, наносимый ею, остаются значимыми для многих стран мира. Поиск современных диагностических подходов основанных на изучении механизмов ее развития является одним из приоритетных направлений современной педиатрии.

Многочисленными исследованиями последних лет установлено, что эндотелий имеет ключевое значение в развитии большинства патологических процессов, в том числе и в системе органов дыхания. Однако лишь в единичных работах рассматриваются частные аспекты изменений взаимосвязи эндотелия с отдельными признаками внегоспитальной пневмонии [2, 3].

В формировании патогенетических нарушений при ВП неоднозначная роль отводится оксиду азота (NOx), продуцируемому различными формами NO-синтаз (NOS). Считают, что в физиологических условиях базовое количество оксида азота, синтезируемого эндотелиальной NO-синтазой (eNOS), оказывает опосредованное (через расширение сосудов) бронходилатирующее и противовоспалительное действие, в то время как при развитии воспалительных процессов избыточный синтез оксида азота индуцибельной NO-синтазой (iNOS) приводит к реализации обратных эффектов [4, 5].

Анализируя роль циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) следует отметить, что это зрелые дифференцированные клетки, которые отделяются от стенки эндотелия в процессе его повреждения [9] и являются прямым клеточным маркером дисфункции эндотелия. Содержание циркулирующих эндотелиальных клеток в периферической крови у здоровых людей очень низкое, так как при отсутствии патологических состояний процесс обновления эндотелия медленный, а нежизнеспособные ЦЭК быстро удаляются из кровотока ретикулоэндотелиальной системой [6]. Рядом авторов показано, что увеличение количества циркулирующих эндотелиальных клеток может наблюдаться при различных патологических состояниях, включающих инфекционные заболевания, злокачественные новообразования и широкий спектр сердечно-сосудистых заболеваний [7, 8].

В литературе не встречено работ, в которых дана характеристика изменения представленных выше эндотелиальных маркеров в зависимости от степени вовлечения в патологический процесс легочной ткани при ВП. Исследования в этой области представляются перспективными для решения практических вопросов патогенеза и ранней диагностики острых внегоспитальных пневмоний у детей.

Цель исследования: установить роль продуктов деградации оксида азота, эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз и циркулирующих эндотелиальных клеток как инвазивных маркеров эндотелиальной дисфункции в формировании различной степени выраженности воспалительного процесса в легких у детей с острыми внегоспитальными пневмониями.

Методика

Для решения вопроса о роли инвазивных маркеров эндотелиальной дисфункции в формировании выраженности воспалительного процесса у детей с острой внегоспитальной пневмонией было обследовано 100 детей в возрасте от 10 до 18 лет. Диагноз ВП, устанавливался по клинико-лабораторным, инструментальным и рентгенологическим данным. Средний возраст пациентов составил 12 (10-13) лет. Среди обследованных мальчики составили 43 (43%), девочек – 57 (57%). Контрольную группу составили 30 практически здоровые дети, сопоставимы по возрасту и полу, госпитализированных для проведения плановой операции грыжесечения. Группы обследованных детей не отличались между собой по возрасту, массе тела и росту ($p > 0,05$).

Содержание оксида азота в сыворотке крови определяли по уровню продуктов его деградации – нитритов и нитратов (NOx) в плазме крови общепринятым спектрофотометрическим методом («Specord», Германия) с использованием кадмия и реактива Грисса. Уровень эндотелиальной и

индуцибельной NO-синтаз определяли методом иммуноферментного анализа (Sunrise TECAN, Австрия) с использованием наборов Human NOS2/iNOS ELISA Kit cat. № E-EL-H0753 и Human NOS3/eNOS ELISA Kit cat. № E-EL-H0755. Определение количества ЦЭК в периферической крови осуществляли путем изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами и последующим осаждением тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата и их микроскопирования.

Статистический анализ результатов проводился с использованием методов непараметрической статистики с помощью программы «Statistica 10.0». Данные представлены в виде Me (25-75), где Me – медиана показателя; (25-75) – интерквартильный размах показателя. Достоверность различий количественных показателей между двумя группами оценивалась по критерию Манна-Уитни. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при (p) менее 0,05. Корреляционный анализ включал определение коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно полученным данным у детей с острой ВП, уровни исследуемых эндотелиальных маркеров: NOx и ЦЭК превышали аналогичные показатели у детей контрольной группы (рис. 1 и 2).

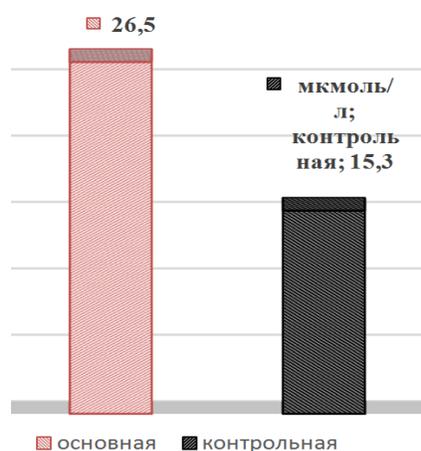


Рис. 1. Медиана содержания продуктов деградации оксида азота у детей обследованных групп. Основная – дети с острой пневмонией, контрольная – здоровые дети

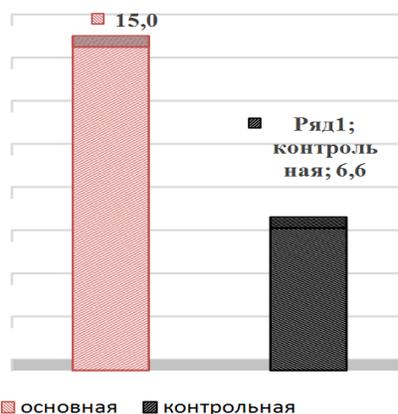


Рис. 2. Медиана содержания циркулирующих эндотелиальных клеток у детей обследованных групп. Основная – дети с острой пневмонией, контрольная – здоровые дети

Так, содержание NOx в сыворотке крови у детей основной и контрольной групп составило 26,5 (19,8-30,5) мкмоль/л и 15,33 (14,1-16,9) мкмоль/л /мл соответственно ($p < 0,001$), что позволяет констатировать его повышенный уровень.

Уровень ЦЭК в сыворотке крови у детей основной группы составил 15,0 (11,5-17,0) клеток в 100 мкл плазмы, а в контрольной – 6,6 (4,0-9,0) клеток в 100 мкл плазмы соответственно, ($p < 0,001$), что в 2,3 раза выше уровня контрольной группы.

Уровень iNOS в плазме крови пациентов с острой пневмонией у детей группы контроля составили 5671,2 (5276,3-5915,4) пг/мл и 597,7 (180,7-720,7) пг/мл соответственно ($p < 0,001$), а eNOS – 3236,7 (2868,2-3487,8) пг/мл и 4627,8 (4523,0-4646,6) пг/мл соответственно, ($p < 0,001$) (рис. 3 и 4).

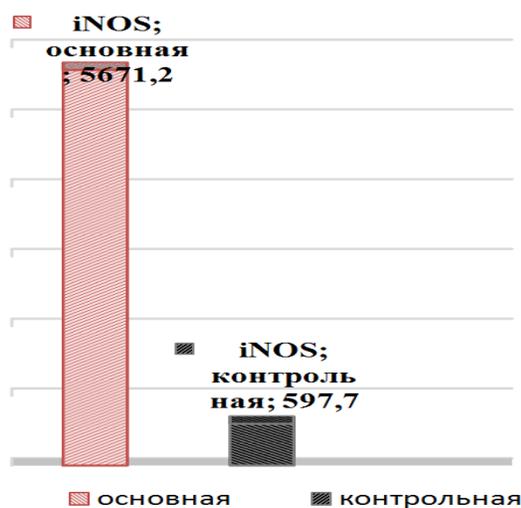


Рис. 3. Медиана содержания макрофагальной синтазы оксида азота у детей обследованных групп. Основная – дети с острой пневмонией, контрольная – здоровые дети

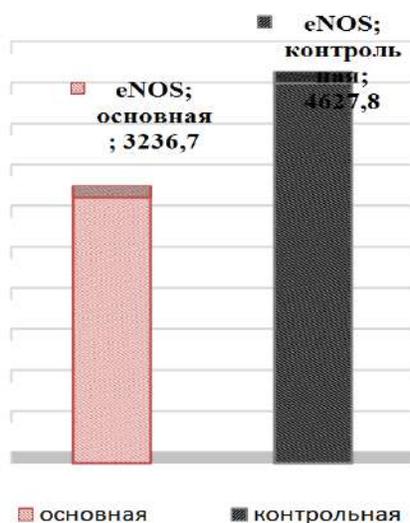


Рис. 4. Медиана содержания эндотелиальной синтазы оксида азота у детей обследованных групп. Основная – дети с острой пневмонией, контрольная – здоровые дети

Изложенное выше подтверждается реализованной положительной корреляционной взаимосвязью между содержанием iNOS и NOx у детей основной группы $R=0,70$ $p=0,0001$.

Кроме того, у детей основной группы выявлена прямая корреляционная связь показателя ЦЭК с активностью макрофагальной NO-синтазы $R=0,70$; $p=0,0001$ и обратная взаимосвязь между eNOS и уровнем NOx $R = -0,70$ $p=0,0001$. Кроме этого, установлена корреляционная зависимость между активностью eNOS с ЦЭК $R=-0,70$ $p=0,0001$, что свидетельствует о депрессии эндотелиальной NOS и о повышении процессов десквамации эндотелия у пациентов с ВП со сниженной эндотелий-зависимой вазодилатацией, что свидетельствует о выраженности воспалительного процесса у детей с пневмониями.

В связи с этим, проведена оценка роли изученных эндотелиальных маркеров в формировании степени вовлечения в патологический процесс легочной ткани при ВП. Результаты исследования содержания NOx в сыворотке крови детей, в зависимости от рентгенологической характеристики пневмоний представлены на рис. 5.

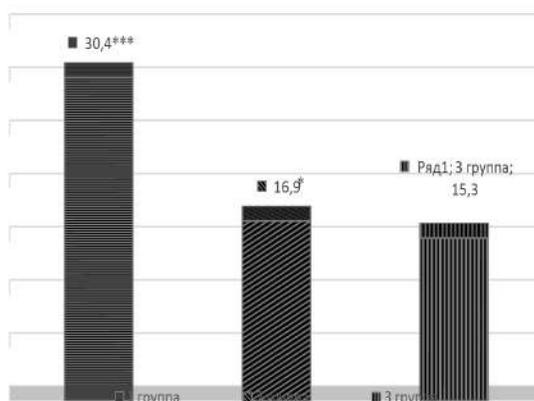


Рис. 5. Уровень продуктов деградации оксида азота в сыворотке крови детей, с пневмонией в зависимости от степени вовлечения в патологический процесс легочной ткани. 1-я группа – сегментарные и долевые пневмонии, 2-я группа – очаговые пневмонии, 3 – здоровые дети.* – $p < 0,05$ по отношению 2-й группы к контрольной группе, ** – $p < 0,001$ по отношению 1-й группы к контрольной

У пациентов с сегментарными и долевыми ВП зарегистрированы повышение уровня NOx по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$, а также с группой с очаговой ВП $p < 0,05$). При очаговой пневмонии более высокий уровень продуктов деградации оксида азота также был выше, чем у детей контрольной группы. В итоге у пациентов с сегментарными и долевыми пневмониями содержание в крови NOx почти в два раза превышало его уровень у здоровых детей контрольной группы.

Выявлена положительная ранговая корреляционная взаимосвязь между уровнем NOx со степенью выраженности патологического процесса легочной ткани $R = 0,5$ $p = 0,0001$. По сравнению с контрольной группой (597,7 (180,7-720,7) пг/мл) медиана iNOS у детей с острой сегментарной и долевыми пневмониями составила – 5671,2 (5276,3-5915,4) пг/мл, а при очаговой – 1766,8 (1186,1-2764,5) пг/мл ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно) икратно превышала уровень данного показателя у здоровых детей.

Анализ содержания iNOS у детей с сегментарной, долевыми и очаговой пневмониями показал, что более высокие его значения iNOS зарегистрированы при сегментарной и долевыми пневмониях, чем при очаговой ($p < 0,01$). Медиана eNOS у детей с ВП была ниже показателя контрольной группы (4627,8 (4523,0-4646,6)) пг/мл, составляя при сегментарной и долевыми пневмониях 3236,7 (2868,2-3487,8) пг/мл, а при очаговой – 4283,6 (4172,7-4383,7) пг/мл ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно). Содержание eNOS у детей с сегментарной, долевыми и очаговой пневмониями демонстрировало более высокие значения показателя при очаговой, чем при сегментарной и долевыми пневмониях ($p < 0,01$). Установлена положительная корреляционная взаимосвязь средней силы между уровнем iNOS $R = 0,5$ $p = 0,0001$ и слабая отрицательная – между eNOS $R = -0,4$ $p = 0,02$ показателем, характеризующем степень вовлечения в патологический процесс легочной ткани.

Характеристика уровней ЦЭК у детей в группах с различной степенью вовлечения в патологический процесс легочной ткани отражена на рис. 6. Уровень ЦЭК у пациентов основной группы превышал показатель контрольной группы (6,6 (4,0-9,0) в 100 мкл), составляя при сегментарной и долевыми пневмониях 16,2 (15,0-18,0) в 100 мкл ($p < 0,001$), а при очаговой – 10,1 (9,0-11,0) в 100 мкл ($p < 0,01$). Более высокие значения ЦЭК зарегистрированы при сегментарной и долевыми пневмониях по сравнению с очаговой ($p < 0,001$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о различной степени вовлечения сосудистого эндотелия в патологический процесс при очаговых, сегментарных и долевыми пневмониях. Это позволяет рассматривать изученные нами инвазивные эндотелиальные маркеры в качестве объективных критериев оценки различной степени вовлечения в патологический процесс легочной ткани при внегоспитальных пневмониях.

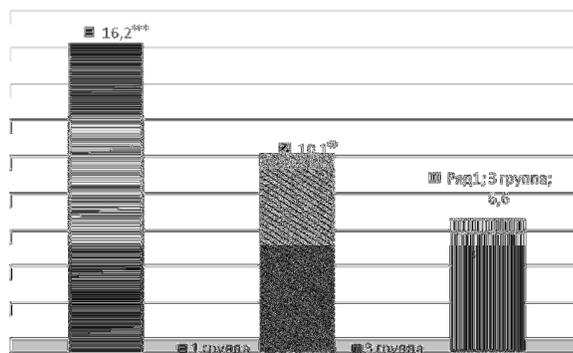


Рис. 6. Уровень циркулирующих эндотелиальных клеток в сыворотке крови у детей с острой пневмонией в зависимости от степени вовлечения в патологический процесс легочной ткани. 1-я группа – сегментарные и долевые пневмонии, 2-я группа – очаговые пневмонии, 3 – здоровые дети. ** – $p < 0,01$ по отношению 2-й группы к контрольной группе, *** – $p < 0,001$ по отношению 1-й группы к контрольной

Выводы

1. У детей, общей группы с острой внегоспитальной пневмонией, установлено повышение содержания в крови продуктов деградации оксида азота, индуцибельной NO-синтазы и циркулирующих эндотелиальных клеток, а также снижение эндотелиальной NO-синтазы. Наиболее значимое повышение продуктов деградации оксида азота, iNOS, ЦЭК и снижение eNOS зарегистрировано у пациентов с сегментарными и долевыми пневмониями.
2. Установлено, что содержание в периферической крови уровня циркулирующих эндотелиальных клеток на фоне сниженной активности эндотелиальной NO-синтазы являются высоко объективными признаками степени вовлечения эндотелия сосудов в патологический процесс у детей с острыми внегоспитальными пневмониями.
3. Повышенное содержание продуктов деградации оксида азота и активности индуцибельной NO-синтазы у детей с острой внегоспитальной пневмонией свидетельствуют о вовлечении макрофагальной системы в формирование выраженного воспалительного процесса в легочной ткани в виде сегментарных и долевого пневмоний.

Литература (references)

1. Чучалин А.Г., Синопальников А.И. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике – Москва. – 2010. – 82 с. [Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I. *Vnebolnichnaya pnevmoniya u vzroslykh: prakticheskie rekomendatsii po diagnostike, lecheniyu i profilaktike*. Community-acquired pneumonia in adults: practical recommendations for diagnosis, treatment and prevention – Moscow. – 2010. – 82 p. (in Russian)]
2. Бурдули Н.М., Габуева А.А. Коррекция эндотелиальной дисфункции у больных внебольничной пневмонией с помощью низкоинтенсивного лазерного облучения крови // Пульмонология. – 2015. – №2. – С.196-198. [Burduli N.M., Gabueva A.A. Correction of endothelial dysfunction in patients with community-acquired pneumonia using low-intensity laser blood irradiation. *Pul'monologiya*. Pulmonology. – 2015. – N2. – P.196-198. (in Russian)]
3. Соодаева С.К., Климанов И.А., Никитина Л.Ю. Нитрозивный и оксидативный стресс при заболеваниях органов дыхания // Пульмонология. – 2017. – №2. – С. 262-273. [Soodaeva S.K., Klimanov I.A., Nikitina L.Yu. Nitrosini and oxidative stress in diseases of the respiratory system. *Pul'monologiya*. Pulmonology. – 2017. – N2. – P. 262-273. (in Russian)]
4. Рыбкин А.И., Побединская Н.С., Глазова Т.Г. Патогенетические механизмы респираторных дисфункций при бронхиальной астме у детей // Медицинский альманах. – 2016. – №2. – С.80-83. [Rybkin A.I., Pobedinskaya N.S., Glazova T.G. Pathogenetic mechanisms of respiratory dysfunctions in children with bronchial asthma. *Meditsinskii al'manakh*. Medical Almanac. – 2016. – N2. – P.80-83. (in Russian)]
5. Семушина М.А. Эндотелиальная дисфункция и нарушение гемостаза при острой внебольничной

- пневмонии // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2013. – №1. – С. 157-158. [Semushina M.A. Endothelial dysfunction and hemostasis disorders in acute community-acquired pneumonia. *Byulleten' Severnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. Bulletin of the Northern State Medical University. – 2013. – N1. – P. 157-158. (in Russian)]
6. Афонасьева, Т.М. Эндотелиальная дисфункция. Возможности ранней диагностики // The Journal of scientific articles «Health and Education Millennium». – 2016. – Т.18, №1. – С. 101–104. [Afonas'eva, T.M. Endothelial dysfunction. The possibility of early detection. *The Journal of scientific articles «Health and Education Millennium»*. The Journal of scientific articles «Health and Education Millennium». – 2016. – Т.18, N1. – P. 101-104. (in Russian)]
 7. Попович О.М., Страту Е.А., Корецкий Я.В. Эффективность ингибиторов NO-синтаз при воспалении // Вестник современной науки. – 2016. – №10. – С. 104-108. [Popovich O.M., Stratu E.A., Koretskii Ya.V. Efficacy of NO-synthase inhibitors in inflammation. *Vestnik sovremennoi nauki*. Bulletin of Modern Science. – 2016. – N10. – P. 104-108. (in Russian)]
 8. Пожилова Е.В., Новиков В.Е. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид в физиологии и патологии клетки // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т14, №2. – С. 35-41. [Pozhilova E.V., Novikov V.E. Nitric oxide synthase and endogenous oxide in cell physiology and pathology. *Vestnik Smolenskoï gosudarstvennoï meditsinskoi akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2015. – Т.14, N2. – P. 35-41. (in Russian)]
 9. Li C., Wu Q., Liu B., Yao Y., Chen Y. et al. Detection and Validation of Circulating Endothelial Cells, a Blood-based Diagnostic Marker of Acute Myocardial Infarction // *PL OS ONE* – 2013. – V.8, N3. – P. 58478.

Информация об авторах

Парфёнова Инна Владимировна – ассистент 1-й кафедры детских болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: meblomax@mail.ru

Максимович Николай Андреевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий 1-й кафедрой детских болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: drmaximovich@mail.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.