

STRESUL OXIDATIV ÎN DISPLAZIA BRONHOPULMONARĂ LA COPIII NĂSCUȚI PREMATUR

**Ceahlău Mariana, Tagadiuc Olga, Selevestru Rodica,
Șciuca Svetlana**

*Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”,
Chișinău, Republica Moldova, ceahlau.mariana@inbox.ru*

Abstract. *Bronchopulmonary dysplasia begins in the neonatal period and is responsible for recurrent respiratory morbidity, chronic bronchopulmonary diseases of the child.*

The purpose of the research - evaluation of biochemical markers of oxidative stress in children with bronchopulmonary dysplasia (BPD). A cohort study was conducted that included 41 children with a history of preterm birth and postnatal oxygen therapy in respiratory distress who achieved BPD. The comparative study with preterm infants who did not perform BPD (40 infants) identified a 4.86-fold ($p < 0.001$) increase in total pro-oxidant activity and a significant 62% ($p < 0.001$) increase in malondialdehyde content in children. With BPD, but also a 12% ($p < 0.001$) reduction in nitric oxide.

Children with bronchopulmonary dysplasia show disorders of the redox status by triggering oxidative/nitrosative stress, which are included in the pathogenic mechanisms of chronic bronchopulmonary processes in children born prematurely.

Key words. *oxidative stress, bronchopulmonary dysplasia, children.*

Introducere

După frecvență și importanță clinică, displazia bronhopulmonară (DBP) ocupă primul loc printre patologiile cronice pulmonare în perioada neonatală, dar și cu procent major de agravare în timp. Nivelul înalt de invalidizare a acestor pacienți, prezența multiplelor patologii comorbide, diverse grade de dificultate în diagnosticul și tactica de conduită a acestor pacienți, redau problemei studierii DBP o importanță nu numai din punct de vedere medical, dar și social [1, 1]. La fel și stresul oxidativ (SO) și diferite aspecte ale SO continuă să rămână un subiect de interes pentru comunitatea științifică până în prezent [2, 3].

Patologia organelor respiratorii ocupă un loc de frunte în structura morbidității la copii și adolescenți, devenind astfel un pericol, ce necesită noi tactici și conduite în profilaxie, diagnostic și tratament. Odată cu

perfecționarea tehnicilor de îngrijire, metodelor de suport respirator intensiv al nou-născuților prematuri cu masă mică și extrem de mică la naștere, devine un imperativ al timpului de a soluționa multiplele situații ce duc la dezvoltarea patologiei cronice pulmonare la acest contingent de copii [5].

Displazia bronhopulmonară este o boală care afectează pulmonii, cu debut în perioada neonatală, care poate fi responsabilă de morbiditate respiratorie recurentă în perioada copilăriei, de maladii cronice bronhopulmonare ale copilului și adultului [6, 22]. Dezvoltarea pulmonilor este un proces complex cu mai multe etape morfofuncționale distincte și de lungă durată, cu debut în perioada intrauterină și continuă în primii ani de viață. La copii prematuri, în special cei cu grad important de prematuritate (până la 30 săptămâni de gestație), la momentul nașterii, pulmonii sunt la faza embriologică de dezvoltare și se caracterizează prin mai multe particularități – subdezvoltare morfologică, carență de surfactant, apărare antioxidantă insuficientă etc., ce creează premise pentru lezarea organului și afectarea altor organe și țesuturi. Printre factorii principali care determină dezvoltarea DBP este concentrația crescută de oxigen în aerul inhalat și efectul ventilației artificiale asupra țesutului pulmonar imatur al nou-născuților prematuri. Ca urmare, excesul formelor active de oxigen în combinație cu o deficiență a sistemului de apărare antioxidant facilitează un dezechilibru în sistemul „oxidant-antioxidant” cu instalarea excesivă a stresului oxidativ în organismul copiilor din nașterile premature. Se cunoaște că plămânii unui copil prematur cu insuficiență respiratorie sunt expuși la influențe negative, cum ar fi stresul oxidativ și ventilația mecanică [20, 21] .

Stresul oxidativ (SO) se manifestă prin diverse tulburări de homeostazie la nivel celular și tisular: dezechilibru între citokinele pro- și antiinflamatorii (inflamație aseptică cronică sistemică subclinică), ischemie (disfuncție endotelială), hipoxie (membranopatie datorată activării peroxidării lipidice a membranelor celulare), tulburări ale recepției și percepției celulare (areflexia și hiporeflexia celulei), disfuncție vegetativ-mediatoare a celulei (tulburări în metabolismul aminelor biogene), tulburări energetice și metabolice (disfuncție mitocondrială), tulburări ale activității telomerazei cromozomilor celulari. Cel mai cunoscut produs secundar al peroxidării lipidelor – dialdehida malonică (DAM), care este un biomarker al stresului oxidativ, leziunilor membranei celulare, dar și al leziunilor oxidative ale țesuturilor și celulelor [7, 15, 16]. DAM este o cetoaldehidă care se formează ca

urmare a procesului de peroxidare a acizilor grași polinesaturați și este frecvent folosită pentru evaluarea leziunilor cauzate de specii reactive de oxigen (SRO), fiind și un indicator bine cunoscut al dereglării integrității și permeabilității membranelor biologice [17, 18, 19].

Oxidul nitric (NO) și speciile reactive de azot sunt implicate în dezvoltarea stresului nitrosativ. Multe procese fiziologice și patologice în organism sunt influențate de oxidul nitric, inclusiv ale sistemului cardiovascular (reglarea tonusului și structurii vasculare, efectul antitrombotic), organelor sistemului respirator (efect bronhodilatator), sistemului nervos (participarea la reglarea tonusului musculaturii netede vasculare, bronhiilor și digestive), sistemului imun (reglarea inflamației și protecției imune). În concentrații mici, oxidul nitric reglează tonusul și structura vaselor, inhibă agregarea și adeziunea trombocitelor, funcționează ca antiinflamator și împiedică proliferarea și migrarea celulelor musculare netede, se implică în reglarea proceselor de regenerare a endoteliului vascular, precum și a chemotaxiei leucocitare și a aderenței plachetare. Fenomenele de degradare a celulelor, apoptoză și îmbătrânirea fiziologică sunt favorizate de concentrațiile mari de oxid nitric [7, 12, 14].

Scopul cercetării a fost de a evalua markerii biochimici ai stresului oxidativ la copiii născuți prematuri care au realizat displazie bronhopulmonară.

Materiale și metode

A fost realizat un studiu de cohortă care a inclus 81 de pacienți internați în IMSP Institutul Mamei și Copilului cu antecedente pozitive pentru nașteri premature și oxigenoterapie postnatală în suferință respiratorie. Pacienții au fost cercetați după un protocol unic, care a inclus examinarea complexă clinică și explorativă a copiilor născuți prematur. Grupurile de comparare au fost evaluate prospectiv, prin examenul clinic, paraclinic și instrumental. Copiii au fost divizați în lotul de bază (copiii născuți prematur care au realizat DBP) – 41 copii (50,6%: 95%CI 39,3-61,9) și lotul martor (copii născuți prematur care nu au dezvoltat DBP) – 40 copii (49,4%: 95%CI 38,1-60,7). Vârsta medie a copiilor cu DBP (41 copii) a fost egală cu $1,2 \pm 0,5$ ani, iar a copiilor fără DBP (40 copii) nesemnificativ mai mare – $1,28 \pm 0,93$ ani, $F \text{ stat} = 0,048$, $p > 0,05$. Cercetarea a fost efectuată conform metodologiei descrise în „Noțiuni de bază de epidemiologie și metode de cercetare” [13].

Determinarea dialdehidei malonice (DAM), care este un produs final al peroxidării lipidelor, s-a efectuat conform procedeului descris de către Галактионова Л.П. și coaut., în modifi cația Gudumac V. și coaut. [8]. Metoda dată se bazează pe determinarea spectrofotometrică a complexului trimetinic colorat, format în urma interacțiunii acidului tiobarbituric cu DAM.

Dozarea metaboliților oxidului nitric (NO) a fost realizată conform procedeului descris de Метельская В.А. și Гуманова Н.Г. în modifi carea Gudumac V. și coaut. [9]. Principiul acestei metode constă în deproteinizarea materialului biologic, reducerea nitratilor în nitriți, prelucrarea cu reactivul Griss a supernatantului și măsurarea densității optice a produsului reacției. Calculul concentrației nitritului s-a efectuat cu ajutorul curbei de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de nitrit de sodiu și a fost exprimat în $\mu\text{mol/L}$.

Baza de date a materialului de studiu a fost procesată statistic operând tehnici electronice de evaluare computerizată a gradului de relaționare între parametrii de sănătate a celor două loturi de studiu, utilizând programele *Microsoft Excel*, *Epi Info* – 3,5 și *SPSS* (IBM SPSS Statistics for Windows, version 22.0).

Rezultate și discuții

Copiii cu DBP incluși în cercetare au prezentat o respirație dificilă, stridor, tahipnee, *wheezing*, tuse, bătăi ale aripioarelor nazale, tiraj intercostal sau costal, participarea mușchilor accesorii în actul respirator, tegumente palide, oboseală la supt, încetinire a dezvoltării fizice etc., iar frecvența respiratorie fiind un parametru de evaluare clinică de primă intenție la copilul cu probleme bronhopulmonare. Analiza frecvenței respiratorii la copiii cu DBP în cadrul examenului clinic a constatat valori de $45,54 \pm 1,6$ respirații/minut comparativ cu frecvența respiratorie a copiilor prematuri fără DBP – $31,9 \pm 1,7$ respirații/minut, care este semnifi cativ mai redusă ($T \text{ stat} = 7,6$, $p < 0,0001$).

Rezultatele cercetării statutului redox la copiii din studiu a pus în evidență o majorare excesivă a proceselor oxidative la copiii cu DBP comparativ cu copiii din lotul martor (tabelul 1). Studiul comparativ a identifi cat o creștere de 4,86 ori ($p < 0,001$) a activității prooxidante totale la copiii cu displazie bronhopulmonară comparativ cu cei fără afectare pulmonară. Acest fenomen marchează o intensifi care a producerii și acumulării prooxidanților de diferită natură, care poate amplifi ca

procesele de oxidare de speciile reactive de oxigen și speciile reactive de azot (SRO/SRN) până la nivel de stres oxidativ/nitrozativ.

Tabelul 1. Valorile markerilor stresului oxidativ la copiii cu displazie bronhopulmonară

Marker	Copii fără DBP (n = 40)		Copii cu DBP (n = 41)		Veridicitatea diferențelor dintre loturi
APT ($\mu\text{M/L}$)	28,42 $\pm$ 14,3	100%	138,15 $\pm$ 38,9	486%	p<0,001
NO ($\mu\text{M/L}$)	64,93 $\pm$ 3,8	100%	57,13 $\pm$ 4,8	88%	p<0,001
DAM ($\mu\text{M/L}$)	20,42 $\pm$ 8,2	100%	33,03 $\pm$ 8,9	162%	p<0,001

Notă: Variabilele sunt prezentate drept Mean $\pm$ SD; APT – activitatea prooxidantă totală; NO – oxidul nitric; DAM – dialdehida malonică.

Nivelul oxidului nitric a fost la copii prematuri din lotul cu DBP concludent statistic diminuat (cu 12%, p<0,001) comparativ cu copiii din lotul martor. Scăderea conținutului de NO indubitabil a avut impact negativ asupra echilibrului prooxidant/antioxidant dat fiind consumul lui în procesele de generare a speciilor reactive de azot (peroxinitrit, peroxinitrit protonat), care pot promova stresul nitrozativ și, în același timp, sustrag NO din procesele fiziologice de reglare a tonusului vascular cu efecte vasodilatatoare. Modificările nivelurilor de NO la copiii cu DBP trebuie investigate în continuare pentru a stabili cu certitudine dacă diminuarea constatată de noi este rezultatul consumului compusului în căile de generare a altor specii reactive ale azotului și a exacerbării stresului nitrozativ cu nitrozilarea macromoleculelor, în special a proteinelor, sau este determinată de afectarea sintezei lui de către nitric oxid sintaza, inclusiv de eNOS și iNOS.

Cercetarea noastră a constatat și deteriorarea lipidelor cu acumularea produsului final al peroxidării lipidelor – DAM (+62%, p<0,001). DAM este o cetoaldehidă, marker al leziunilor cauzate de SRO la nivelul membranelor biologice, cu efect de deteriorare a integrității structurale și a permeabilității lor, deoarece se formează în rezultatul oxidării

peroxidice a acizilor grași polienici membranari [19]. Fiind produsă în cantități patologice, DAM va deteriora macromoleculele datorită proprietăților aldehidelor de a interacționa rapid cu și de a se lega la proteinele intracelulare (factorul 2 de elongare al translației, factorul H de activare a complementului, protein kinaza C, etc.) și membranare. Instalarea statutului prooxidant la copiii cu displazie bronhopulmonară, a inițiat oxidarea atipică a lipidelor pe cale peroxidativă, ce s-a manifestat prin creșterea semnificativă cu 62% a conținutului de DAM, produsul final al peroxidării acizilor grași nesaturați, preponderent din membranele celulare.

Evaluarea sistemului redox la copiii cu displazie bronhopulmonară din studiul nostru a constatat o amplificare a reacțiilor de producere a SRO/SRN, instalarea unui statut prooxidant și declanșarea stresului SRO/SRN, care în final determină deteriorarea biomoleculelor și structurilor macromoleculare celulare, membrane.

Concluzii

Copiii cu displazie bronhopulmonară prezintă tulburări ale statutului redox prin declanșarea stresului oxidativ/nitrozativ, majorarea activității prooxidante, a dialdehidei malonice, care se includ în mecanismele patogenice ale proceselor cu caracter cronic realizate în sistemul bronhopulmonar al copiilor născuți prematur.

Bibliografie

1. Van Keulen B.J., Romijn M. et al. Sex-specific differences in HPA axis activity in VLBW preterm newborns. *Endocr Connect.* 2021;10(2):214-219. doi:10.1530/EC-20-0587. PMID:33480864; PMCID: PMC7983523.
2. Ovsyannikov D.Yu., Petruk N.I. et al. Bronchopulmonary dysplasia in children. *Pediatriya* 2004; 1:91–94.
3. American Academy of Pediatrics. Committee on Fetus and Newborn. Postnatal corticosteroids to treat or prevent chronic lung disease in preterm infants. *Pediatrics*, 2002;109(2):330-338. <https://doi.org/10.1542/peds.109.2.330>.
4. Dweik R.A. et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;184(5):602-615. doi:10.1164/rccm.9120-11ST. PMCID: PMC4408724. PMID : 21885636.
5. Adeva-Andany M., López-Ojén M., Funcasta-Calderón R. et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*. 2014; 17: 76-100. doi: 10.1016/j.mito.2014.05.007. PMID: 24929216.

6. Bancalari E., Jain D. Bronchopulmonary Dysplasia: 50 Years after the Original Description. *Neonatology*. 2019;115(4):384–391. doi:10.1159/000497422. PMID: 30974430.
7. Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Volodin N.N., Davydova I.V., et al. Managing Children with Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatric pharmacology*. 2016;13(4):319–333. <https://doi.org/10.15690/pf.v13i4.1603>.
8. Grotto D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova*. 2009;32(1):169–174. doi:10.1590/S0100-40422009000100032.
9. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Știrba O., Pantea V. Procedeu de dozare a dialdehidei malonice în materialul biologic. *Certificat de inovator nr. 5157 din 14.12.2012*.
10. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V., Sardari V., Pantea V. et al. Investigații biochimice. Volumul II. Micrometode. *Elaborare metodică*. Tipogr. “Elena-VI”, 2010;97 p. ISBN 978-9975-106-06-1.
11. Abe A., Yamashita S., Noma A. Sensitive, direct colorimetric assay for copper in serum. In: *Clinical chemistry*, 1989;35(4), 552–554. <https://doi.org/10.1093/clinchem/35.4.552>
12. Ambalavanan N., Carlo W.A. Ventilatory strategies in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in perinatology*, 2006;30(4):192–199. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2006.05.006>. PMID: 16860159.
13. Desjardins F., Balligand J.L. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg*. 2006;61(6):326–334. doi:10.1179/acb.2006.052. PMID: 17323842.
14. Bogdanova A.V., Boitsova E.V., Starevskaya S.V., Popov S.D., Murygina G.L. Clinical features and course of bronchopulmonary dysplasia. *Pulmonologiya*. 2002;1:28–32.
15. Luiking Y.C., Engelen M.P., Deutz N.E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(1):97–104. doi: 10.1097/MCO.0b013e328332f99d. PMID: 19841582; PMCID: PMC2953417.
16. Panda S., Kar A., Biswas S. Preventive effect of agnucastolide C against isoproterenol-induced myocardial injury. *Scientific reports*. 2017;7(1):1–14. doi:10.1038/s41598-017-16075-0.
17. Singh Z., Karthigesu I.P. et al. Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. *Iran J Pub Health*. 2015;43(3):7–16.
18. Siddique Y.H., Ara G., Afzal M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. Dose Response. 2012;10(1):1–10. doi: 10.2203/dose-response.10-002.Siddique. PMID:22423225; PMCID: PMC3299524.

19. Timercan T., Timercan V. Malondialdehyde variations in experimental myocardial infarction. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine. Collection of abstracts*. 2018;2(2):78-79. ISSN 2570-5911. doi:10.29256/v.02.02.2018.esbcm69.

20. Ceahlău M., Selevestru R., Tagadiuc O., Şciuca S. Harmfulness of prooxidants in bronchopulmonary dysplasia in premature children. In: *Moldovan Journal of Health Sciences*. Chişinău, 2023, vol. 10, issue 3, pp. 3-10. ISSN 2345-1467.

21. Ceahlău M., Tagadiuc O., Şciuca S. Stresul oxidativ la copiii cu displazie bronhopulmonară. În: *Culegerea de lucrări a conferinţei cu participare internaţională „Actualităţi în pneumologia copilului”*. Chişinău, 2023, pp. 56-61. ISBN 978-9975-82-328-9.

22. Ceahlău M., Tagadiuc O., Cotoman A., Conica C., Selevestru R., Şciuca S. Activitatea prooxidantă în displazia bronhopulmonară la copiii din naşterile premature. În: *Materialele Conferinţei Naţionale Zilele Pediatriei Iaşene „N.N. Trifan”, ediţia a XXXV-a*. Iaşi, România, 2023, pp. 57-58. ISBN 978-606-13-7701-5.

23. Şciuca S., Ceahlău M., Cotoman A., Selevestru R. Impactul antecedentelor perinatale în realizarea displaziei bronhopulmonare la copiii născuţi prematuri. În: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţe Medicale*. Chişinău, 2023, nr. 2(76), pp.56-62. ISSN 1857-0011.