

УДК 616.831-002-005:612.015.3-053.3
DOI: 10.24061/2413-4260. XIV.4.54.2024.8

О. М. Ковальова¹, В. І. Похилько²,
Ю. І. Чернявська², С. М. Цвіренко²,
З. І. Россоха³, А. В. Давиденко²

Відділ розвитку програми медичних гарантій
Департаменту розвитку стратегії загального охоплення
медичними послугами Національної служби здоров'я
України¹ (Київ, Україна),
Полтавський державний медичний університет²
(Полтава, Україна),
Експертно-аналітичний медичний центр молекулярної
генетики Національного університету охорони здоров'я
України імені Шупика³ (Київ, Україна)

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ (ЗА РІВНЕМ
НІТРАТІВ, НІТРИТІВ, МАЛОНОВОГО
ДІАЛЬДЕГІДУ ТА СІАЛОВИХ КИСЛОТ)
У НЕМОВЛЯТ 6-9 МІСЯЧНОГО ВІКУ,
ЯКІ НАРОДИЛИСЯ ВІД МАТЕРІВ
З МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ
І ЯКІ МАЛИ ГІПОКСИЧНО-ІШЕМІЧНУ
ЕНЦЕФАЛОПАТІЮ В РАНЬОМУ
НЕОНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ

Резюме

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я основними неврологічними причинами інвалідності та смертності новонароджених дітей залишаються асфіксія та гіпоксично-ішемічна енцефалопатія. Ступінь ушкодження головного мозку та подальші неврологічні ускладнення визначаються низкою факторів, зокрема тривалістю гіпоксії/ішемії, мозковим кровообігом, незрілістю центральної нервової системи новонароджених, соматичним статусом матерів.

Метою дослідження було встановити особливості метаболізму (за рівнем нітратів, нітритів, малонового діальдегіду та сіалових кислот) у немовлят 6-9 місячного віку, які народилися від матерів з метаболічним синдромом, і які мали гіпоксично-ішемічну енцефалопатію в ранньому неонатальному періоді, а також вплив варіантів генів eNOS (G894T), IL-1b (C3953T) на обмін даних метаболітів.

Матеріали та методи. Для досягнення мети проведено проспективне дослідження «випадок-контроль», в яке включено 30 дітей віком 6-9 місяців. Основну групу дослідження склали 16 дітей, які народилися від матерів з метаболічним синдромом і які мали оцінку за шкалою Апгар менше за 7 балів на 5 хвилині, а також мали діагностичні клінічні та нейросонографічні ознаки гіпоксично-ішемічної енцефалопатії, що були виявлені при консультуванні дитячим неврологом у віці 6-9 місяців життя. Групу порівняння склали 14 рандомно відібраних відносно здорових дітей віком 6-9 місяців, які народилися від матерів без метаболічного синдрому і які не мали проявів гіпоксично-ішемічної енцефалопатії в ранньому неонатальному періоді.

Концентрацію нітритів визначали шляхом визначення діазосполук, що утворилися у реакції з сульфаніловою кислотою, а потім проводили реакцію з α -нафтиламином (Реактив Грісса-Ілосвая). Концентрацію вільного малонового діальдегіду визначали методом спектрофотометричного визначення. Концентрацію сіалових кислот в сечі визначали за реакцією з оцтво-сірчаноокислим реактивом (реакція Гесса). Молекулярно-генетичний аналіз було проведено з використанням букального епітелію в якості біологічного матеріалу. Визначення поліморфних варіантів IL-1b 3953C>T (rs1143634) та eNOS G894T (rs1799983) проводилось методом полімеразної ланцюгової реакції за допомогою комерційного набору «DreamTaq Green PCR Master Mix» (Thermo Scientific, США) та специфічних олігонуклеотидних послідовностей (Metabion, Німеччина). Статистичний аналіз. Для обробки кількісних величин використовували традиційні методи параметричної та непараметричної статистики: для аналізу якісних ознак, що виражалися в основному у відсотках, було застосовано непараметричні методи. За нормального розподілу даних використовували основні статистичні характеристики, а саме: середнє значення (M) для визначення центральної тенденції; стандартну похибку середнього значення (m) для точності оцінки середньої, довірчий інтервал (ДІ) для визначення 95 % інтервалу середньої. Гіпотези щодо рівності генеральних середніх перевіряли з використанням двостороннього t-критерію Стюдента. Порівняння відносних, або виражених у відсотках, величин виконували за допомогою критерію точного двостороннього критерію Фішера. Зв'язки між лічильними перемінними визначали за допомогою множинного регресійного аналізу за Пуассоном. Статистичний аналіз проводили за допомогою пакету прикладних програм STATA 14.0.

Дослідження виконане із дотриманням «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. та підтверджено висновком Комісії з питань біомедичної етики Полтавського державного медичного університету (Протокол № 233 від 21.11.2024 року) схвалила дослідження. На проведення досліджень було отримано письмову згоду батьків новонароджених дітей.

Дослідження виконано в рамках НДР кафедри педіатрії № 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету «Розробити клініко-лабораторні критерії, методи прогнозування та запобігання метаболічних порушень у дітей раннього віку», реєстраційний номер 0120U102856, термін виконання 2020-2024 рр.

Результати дослідження. Дослідження показників обміну оксиду азоту у групі обстежуваних дітей показало, що у малюків з гіпоксично-ішемічною енцефалопатією в період 6-9 місяців життя концентрація нітритів була значно вищою 2,69 нмоль/л порівняно зі здоровими дітьми 1,39 нмоль/л ($p < 0,001$). Аналогічні відмінності отримані і в концентрації нітратів (5,41 vs 2,62; $p < 0,001$). Нами не було отримано достовірних відмінностей у рівнях нітратів, нітритів та малонового діальдегіду залежно від генотипів гену IL1B (C3953T, rs1143634), проте ми виявили вищу (на рівні $p < 0,1$) концентрацію сіалових кислот у дітей з генотипом CC, ніж у дітей з генотипом CT або TT. При дослідженні гену eNOS (G894T, rs1799983) ми не отримали достовірних відмінностей у рівнях нітратів, нітритів, сіалових кислот та

малонового діальдегіду у дітей з різними генотипами. Дослідження виявило достовірний прямий зв'язок (на рівні $p < 0,1$) між рівнем нітратів в сечі у дітей обстежених груп та концентрацією сіалових кислот (Coef. 0,753, $p = 0,062$).

Висновок. Результати дослідження свідчать про підвищення рівнів нітратів (5,41 vs 2,62; $p < 0,001$) та нітритів (2,69 vs. 1,39; $p < 0,001$) у дітей від матерів з метаболічним синдромом у відновному періоді гіпоксично-ішемічної енцефалопатії, що може вказувати на прогресування патологічних процесів, викликаних гіпоксичним ураженням або ж свідчити про адаптивні механізми відновлення після ушкодження тканин головного мозку. Також було виявлено достовірний прямий зв'язок між рівнем нітратів в сечі у дітей обстежуваних груп та концентрацією сіалових кислот (Coef. 0,753, $p = 0,062$). При цьому ці зміни не асоціювалися з поліморфними варіантами генів eNOS (G894T, rs1799983) та IL1B (C3953T, rs1143634). Таким чином, визначення концентрації рівня нітратів та нітритів можуть бути впроваджені в клінічну практику для ранньої діагностики та прогнозування можливих ускладнень у дітей з гіпоксично-ішемічною енцефалопатією, оскільки підвищений рівень нітритів, нітратів та сіалових кислот може слугувати маркером віддалених наслідків гіпоксичного ураження. Це дозволяє розглядати їх як перспективні предиктори неоптимального нервово-психічного розвитку дитини.

Ключові слова: новонароджені; прогнозування; нітрати та нітрити; малоновий діальдегід; сіалові кислоти; гени eNOS (G894T, rs1799983) та IL1B (C3953T, rs1143634); катамнестичне спостереження; неонатальна захворюваність; гіпоксично-ішемічна енцефалопатія; ендотеліальна дисфункція; несприятливі наслідки.

Вступ

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я основними неврологічними причинами інвалідності та смертності новонароджених дітей залишаються асфіксія та гіпоксично-ішемічна енцефалопатія (ГІЕ). Розповсюдженість ГІЕ у розвинених країнах світу становить приблизно 1-4 на 1000 новонароджених. У країнах із низьким рівнем доходу захворюваність є значно вищою і складає 10-20 випадків на 1000 новонароджених. Майже у 35 % немовлят з ГІЕ розвиваються неврологічні ураження, такі як: затримки мовленнєвого, психічного та моторного розвитку, епілепсія, дитячий церебральний параліч, а 25 % дітей помирають протягом перших двох років життя [1].

Ступінь ушкодження головного мозку та подальші неврологічні ускладнення визначаються низкою факторів, зокрема, тривалістю гіпоксії/ішемії, незрілістю центральної нервової системи новонароджених, мозковим кровообігом та метаболізмом, соматичним статусом матерів тощо. Доведено, що зміни церебрального кровотоку при ГІЕ тісно пов'язані з дією оксиду азоту (NO). Роль NO в патогенезі ішемічного пошкодження мозку є суперечливою: він може проявляти як нейропротекторні, так і нейротоксичні властивості, що залежить від ізоформи NO-синтази (NOS) та типу клітин, які продукують NO. При оксидативному стресі NO, що продукується nNOS (нейрональною NOS), призводить до загибелі нейронів, спричиняючи пошкодження мітохондрій, втрату енергії та подальше порушення кальцієвого гомеостазу [2]. Ендотеліальна форма NOS має нейропротекторну функцію, яка реалізується через NO-опосередковане посилення перфузії мозку [3].

Продукція NO регулюється геном eNOS шляхом зміни його експресії або активності ферменту eNOS. Наявність G894T варіантів гену eNOS знижує NO та сприяє ендотеліальній дисфункції. Зниження рівня NO призводить до вазоконстрикції, сповільнення кровотоку та подальшої гіпоксії. Аніони NO_2^- та NO_3^- є кінцевими продуктами метаболізму оксиду азоту в організмі людини [4]. Зниження рівня нітратів і нітритів внаслідок дефіциту NO потенційно свідчить про ішемію судин і вазоспазм, а також про тяжкість оксидативного стресу. Ендотеліальна дисфункція, що проявляється втратою нейроваскулярних протективних функцій NO, може суттєво сприяти розвитку когнітивних розладів.

У патофізіологічних шляхах розвитку ГІЕ відіграє роль також реоксигенація та реперфузія попередньо ішемізованих тканин, що призводить до активації каскаду вільно-радикальних реакцій окислення, зокрема, утворення вільних радикалів кисню [5]. Вільні радикали можуть спричиняти пошкодження клітин шляхом перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), яке можна оцінити шляхом вимірювання рівня малонового діальдегіду (МДА) [6]. Його високий період напіврозпаду та реакційна здатність дозволяють йому діяти як всередині, так і поза клітинами, а взаємодія з білками та ДНК зумовлює його роль у різних патофізіологічних процесах. При травматичному ураженні центральної нервової системи (ЦНС) пошкодження, спричинене активними формами кисню, визначає початок ПОЛ і характеризується підвищеними рівнями малонового діальдегіду. Даний метаболіт реагує з кількома функціональними групами на білках, ліпопротеїнах і ДНК. Взаємодія МДА з ДНК демонструє потенційну генотоксичність – утворення адуктів ДНК, які викликають мутації та зміни в експресії генів. Разом з активацією ПОЛ у розвитку ГІЕ важливу роль відіграє і запалення [7], активація якого, у т.ч. зі збільшенням концентрації прозапальних цитокінів, може відбуватися під впливом NO [8,9]. Відомо, що в умовах гіпоксії та запалення саме інтерлейкін-1 бета (IL-1 β) активує індукцибельну NO-синтазу (iNOS), що різко збільшує вироблення NO, і, відповідно, потенціє пошкодження головного мозку після ішемічної перинатальної асфіксії [10].

Для з'ясування ролі запалення у розвитку ГІЕ нашу увагу привернули сіалові кислоти, оскільки саме ці сполуки є тим ключом або перемикачем, який контролює вроджену імунну відповідь у ЦНС, яка формується в мікроглії [11]. На сьогодні відомо, що саме мікрогліальні клітини відіграють ключову роль у розвитку мозку, дозріванні та гомеостазі, реагуючи на інфекцію, травму чи інші патологічні стани, перетворюючись на макрофагоподібні клітини з функцією вродженого імунного захисту, який можна регулювати за допомогою сіалювання [12,13].

Вище вказані зміни можуть у більшій мірі реалізуватися у матерів з метаболічним синдромом (МС), оскільки метаболічні розлади матері створюють внутрішньоутробне метаболічне середовище, яке негативно впливає на розвиток плода і, ймовірно, відіграє

важливу роль у програмуванні метаболічних порушень у дорослому житті [14].

Зважаючи на значущість порушень обміну азоту, ПОЛ та запалення у розвитку ГЕ, вивчення ключових метаболітів даних патофізіологічних шляхів на тлі дослідження варіантів генів, що кодують ці білки та впливають на їх функціональний стан, є надзвичайно актуальним.

Мета і завдання дослідження. Дослідити особливості метаболізму (за рівнем нітратів, нітритів, МДА та сіалових кислот) у немовлят 6-9 місячного віку, які народились від матерів з метаболічним синдромом (МС), і які мали ГЕ в ранньому неонатальному періоді, а також встановити асоціації між генотипами генів *eNOS* (G894T), *IL1B* (C3953T) та вище вказаними метаболітами.

Матеріали та методи дослідження

Для досягнення мети проведено проспективне дослідження «випадок-контроль», у яке включено 30 дітей віком 6-9 місяців, які перебувають на обліку у кабінеті катамнестичного спостереження дитячої консультативної поліклініки Центру спеціалізованої педіатричної допомоги м. Полтави. Основну групу дослідження склали 16 дітей, які народилися від матерів з МС і які мали оцінку за шкалою Апгар менше за 7 балів на 5 хвилині після народження, а також мали діагностичні клінічні та нейросонографічні ознаки гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС, що були встановлені при консультуванні дитячим неврологом у віці 6-9 місяців життя. Групу порівняння склали 14 рандомно відібраних відносно здорових дітей віком 6-9 місяців, які народились від матерів без МС і які не мали проявів ГЕ в ранньому неонатальному періоді. Розподіл дітей за статтю достовірно не відрізнявся, зокрема дівчат в основній групі було 7 (50 %), і в групі порівняння – 7 (43,75 %).

Критеріями віднесення матерів до основної групи (наявність МС) стали одноплідна вагітність та наявність трьох або більше з таких критеріїв: гіпертригліцеридемія >1,7 ммоль/л, високий кров'яний тиск > 130 на 85 мм рт. ст., ожиріння протягом першої половини вагітності, низький рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ): <1,3 ммоль/л, висока глюкоза в крові натще > 5,5 ммоль/л.

Критеріями віднесення дітей до основної групи були: клінічні та нейросонографічні ознаки гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС, термін гестації 25-36 (6/7) тижнів, маса тіла до 2500 г, наявність інформованої згоди батьків на участь у клінічному дослідженні.

Критеріями виключення із дослідження були наявність вроджених вад розвитку, генетичних захворювань та відмова батьків від участі у дослідженні.

Матеріалом для дослідження нітратів, нітритів, МДА та сіалових кислот була сеча, забір якої відбувався у дітей у віці 6-9 місяців під час відвідування центру катамнестичного спостереження.

Методика визначення нітратів та нітритів у сечі. Концентрацію нітритів визначали шляхом визначення діазосполук, що утворилися у реакції з сульфаниловою кислотою, а потім проводили реакцію з α -нафтиламином (реактив Грісса-Ілюсвая), в результаті якої утво-

рюються похідні червоного кольору (азобарвники). Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації нітритів. Концентрація нітратів визначалась по приросту концентрації нітритів після відновлення нітратів до нітритів сірчаноокислим гідразином. Для визначення концентрації нітратів та нітритів використовували аліквоти сечі по 0,2 мл [15, 16].

Методика спектрофотометричного визначення концентрації вільного малонового діальдегіду. Принцип методу заснований на тому, що вільний МДА специфічно реагує із 1-метил-2фениліндолом у суміші метанолу та ацетонітриту з утворенням хромогену (карбоціановий барвник) помаранчевого кольору з максимальним світлопоглинанням на довжині хвилі 586 нм.[17].

Методика визначення сіалових кислот в сечі за реакцією з оцтово-сірчаноокислим реактивом (реакція Гесса). Принцип методу заснований на тому, що сіалові кислоти, які являють собою похідні нейрамінової кислоти, звільняються в результаті гідролізу глікопротеїдів сечі і утворюють забарвлену сполуку при нагріванні з оцтово-сірчаноокислим реактивом (реакція Гесса). Вміст сіалових кислот визначали за допомогою побудови графіку залежності абсорбції від концентрації [18].

Молекулярно-генетичний аналіз. Біологічним матеріалом для проведення дослідження було використано букальний епітелій. Забір матеріалу здійснювався за допомогою одноразових стерильних щіточок та зберігався у пробірках з консервантом «DNA/RNA Shield» (Zymo Research, США). Для виділення ДНК було використано комерційний набір «Quick-DNA Mini Prep Plus Kit» (Zymo Research, США). Визначення поліморфних варіантів *IL-1 β* 3953C>T (rs1143634) [19] та *eNOS* G894T (rs1799983) [20] проводилось методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за допомогою комерційного набору «DreamTaq Green PCR Master Mix» (Thermo Scientific, США) та специфічних олігонуклеотидних послідовностей (Metabion, Німеччина). Відповідний температурний режим було забезпечено за допомогою ампліфікатора «FlexCycler BU» (Analytik Jena, Німеччина). Продукти ампліфікації генів *IL1B* та *eNOS* підлягали гідролітичному розщепленню згідно реакції ПДРФ (поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів) за допомогою ендонуклеаз рестрикції «TaqI (10U/ μ L)» та «MboI (10 U/ μ L)», (Thermo Fisher Scientific, США) відповідно. Оцінювання рестрикційних фрагментів здійснювалось в агарозному гелі (агароза «CSL-AG500», Cleaver Scientific Ltd, Великобританія; буфер «10xTBE Electrophoresis Buffer», Thermo Scientific, США; маркер молекулярної ваги «GeneRuler 100 bp DNA Ladder», Thermo Scientific, США) з додаванням бромистого етидію в якості барвника.

Статистичний аналіз. Для обробки кількісних величин використовували традиційні методи параметричної та непараметричної статистики; для аналізу якісних ознак, що виражалися в основному у відсотках, було застосовано непараметричні методи. За нормального розподілу даних використовували основні статистичні характеристики, а саме: середнє значення (М) для визначення центральної тенденції; довірчий інтервал (ДІ) для визначення 95 % інтервалу середньої. Гіпотези

щодо рівності генеральних середніх перевіряли з використанням двостороннього t-критерію Стюдента. Порівняння відносних, або виражених у відсотках величин виконували за допомогою критерію точного двостороннього критерію Фішера. Зв'язки між лічильними перемінними визначали за допомогою бінарного та множинного регресійного аналізу за Пуассоном. Статистичний аналіз проводили за допомогою пакету прикладних програм STATA 14.0.

Дослідження проводилося відповідно до Гельсінської декларації (переглянутої у 2013 році). Комісія з біоетики Полтавського державного медичного університету (протокол № 233 від 21.11.2024 року) схвалила дослідження. Індивідуальна інформована згода на це дослідження була отримана від усіх батьків дітей.

Дослідження виконано в рамках НДР кафедри педіатрії № 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету «Розробити клініко-лабораторні критерії, методи прогнозування та запобігання метаболічних порушень у дітей раннього віку».

реєстраційний номер 0120U102856, термін виконання 2020-2024 рр.

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження показників обміну оксиду азоту у групах обстежуваних дітей показало, що у малюків основної групи в період 6-9 місяців життя концентрація нітритів була значно вищою, ніж у дітей групи порівняння (2,69 нмоль/л проти 1,39 нмоль/л, $p < 0,001$). Як свідчать результати дослідження, представлені у табл. 1, аналогічні відмінності отримані і в концентрації нітратів ($p < 0,001$). Також ми звертаємо увагу на дещо вищий рівень сіалових кислот у дітей основної групи відносно дітей групи порівняння. І хоча рівень достовірності становить $p < 0,1$, ми вважаємо, що потрібні подальші дослідження на більшій когорті пацієнтів для з'ясування остаточної ролі сіалових кислот у розвитку та пролонгації гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС у малюків 6-9 місячного віку. Щодо стосується МДА, то нами не отримано достовірних відмінностей у його концентрації серед дітей обстежених груп.

Таблиця 1

Рівні нітритів, нітратів, МДА та сіалових кислот у дітей 6-9 місячного віку обстежених груп, М (95 % ДІ)

Показники	Основна група (n=16)	Група порівняння (n=14)	p
Нітрити сечі (нмоль/л)	2,69 (2,23-3,16)	1,39 (1,12-1,65)	<0,001
Нітрати сечі (нмоль/л)	5,41 (4,52-6,03)	2,62 (2,13-3,11)	<0,001
МДА (мкмоль/л)	2,25 (1,52-2,97)	1,96 (1,05-2,88)	0,6088
Сіалові кислоти (ммоль/л)	0,28 (0,16-0,41)	0,15 (0,07-0,24)	0,0803

Зважаючи на значущість eNOS та IL-1 β в розвитку ГПЕ, дослідження варіантів генів, що кодують ці білки та впливають на їх функціональний стан, є надзвичайно актуальним. Так, існують переконливі докази того, що надмірна продукція IL-1 β є провідною складовою розвитку запалення та подальшого ураження головного мозку у новонароджених з енцефалопатією [21]. Підвищені рівні IL-1 β спостерігали у новонароджених з асфіксією, що супроводжувалося порушенням церебрального метаболізму та подальшою затримкою розвитку [22, 23].

Наступним кроком нашого дослідження стало вивчення асоціацій між рівнем нітратів в сечі та концентрацією МДА та сіалових кислот (табл. 2). Дослідження виявило достовірний прямий зв'язок між МДА та сіаловими кислотами ($p = 0,014$) та зв'язок на рівні достовірності $p < 0,1$ між рівнем нітратів в сечі у дітей обстежених груп та концентрацією сіалових кислот (Coef. 0,753, $p = 0,062$) за бінарним логістичним аналізом за Пуассоном. Слід зазначити, що виявлено достовірний прямий зв'язок між МДА та сіаловими кислотами при множинному регресійному аналізі за Пуассоном після корекції на гестаційний вік дитини (Coef. 1,27 (95 % ДІ 0,25-0,29; $p = 0,014$).

Для вивчення зв'язку між варіантами генів *IL1B* (C3953T, rs1143634) та концентрацією нітратів, нітритів, МДА та сіалових кислот в сечі дітей сформовано дві групи. Першу групу (n=11) склали діти – носії алеля T гену *IL1B* (C3953T, rs1143634), а другу групу (n=19) – діти з генотипом CC. Для вивчення зв'язку між варіантами генів *eNOS* (G894T, rs1799983) та концентрацією нітратів, нітритів, МДА та сіалових кислот в сечі дітей також було сформовано дві групи. Першу групу (n=21) склали діти – носії алеля T гену *eNOS* (G894T, rs1799983), а другу групу (n=9) – діти з генотипом GG.

Нами не виявлено достовірних відмінностей у рівнях нітратів, нітритів та МДА в сечі обстежених дітей залежно від генотипів гену *IL1B* (C3953T, rs1143634), проте слід звернути увагу на вищу (на рівні $p < 0,1$) концентрацію сіалових кислот у дітей з генотипом CC, ніж у дітей з генотипом CT або TT (табл. 3).

Що стосується гену *eNOS* (G894T, rs1799983), то нами не отримано достовірних відмінностей у рівнях нітратів, нітритів, сіалових кислот та МДА у дітей з різними варіантами генів *eNOS* (G894T, rs1799983), *IL1B* (C3953T, rs1143634) (табл. 4)

Таблиця 2

Зв'язки між концентрацією нітратів в сечі, рівнем МДА та сіалових кислот (за бінарною регресією Пуассона)

Показник	Нітрати			Нітрити			МДА		
	Coef.	(95 % ДІ)	p	Coef.	(95 % ДІ)	p	Coef.	(95 % ДІ)	p
МДА	0,055	-0,062-0,173	0,359	0,047	-0,12-0,21	0,576	-	-	-
Сіалові кислоти	0,753	-0,038-1,545	0,062	0,67	-0,45-1,80	0,239	1,28	0,26-2,29	0,014

Таблиця 3

Концентрація нітратів, нітритів, МДА та сіалових кислот в сечі обстежених дітей залежно від генотипу гену *IL1B* (C3953T, rs1143634), M (95 % ДІ)

Показники M (95 % ДІ)	Генотип СТ або ТТ (n=11)	Генотип СС (n=19)	p
Нітрити сечі (нмоль/л)	2,07 (1,45-2,69)	2,09 (1,61-2,58)	0,9493
Нітрати сечі (нмоль/л)	4,09 (2,83-5,34)	4,12 (3,14-5,11)	0,959
МДА (мкмоль/л)	2,00 (1,05-2,95)	2,18 (1,46-2,9)	0,7455
Сіалові кислоти (ммоль/л)	0,15 (0,06-0,24)	0,27 (0,16-0,38)	0,077

Таблиця 4

Концентрація нітратів, нітритів, МДА та сіалових кислот в сечі обстежених дітей залежно від генотипу гену *eNOS* (G894T, rs1799983), M (95 % ДІ)

Показники	Генотип GT або ТТ (n=21)	Генотип GG (n=9)	p
Нітрити сечі (нмоль/л)	2,09 (1,68-2,52)	2,06 (1,19-2,92)	0,929
Нітрати сечі (нмоль/л)	4,15 (3,32-4,98)	4,01 (2,25-5,78)	0,8780
МДА (мкмоль/л)	2,26 (1,53-2,98)	1,78 (1,00-2,56)	0,3406
Сіалові кислоти (ммоль/л)	0,19 (0,13-0,26)	0,29 (0,07-0,51)	0,3626

Оксид азоту є важливим регулятором у багатьох системах, включаючи судинний ендотелій і гладком'язові клітини, макрофаги та нейрони [24]. Порушення синтезу або метаболізму NO є ключовим фактором у патофізіологічних механізмах розвитку ряду захворювань у немовлят. Зниження продукції NO призводить до персистоючої легеневої гіпертензії новонароджених [25]. Надлишок NO асоціюється з септичним шоком [26]. Крім того, NO може відігравати ключову роль у розвитку неонатального гіпоксично-ішемічного ураження головного мозку [27].

Нашими попередніми дослідженнями з'ясовано роль поліморфізму гену *eNOS* і порушень обміну азоту у розвитку гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС, зокрема доведено достовірний зв'язок між підвищенням рівня нітратів і нітритів в сечі з розвитком даного стану у ранньому неонатальному періоді, при чому відсоткова кількість немовлят із поліморфним геном була достовірно більшою серед передчасно народжених немовлят із гіпоксично-ішемічним ураженням ЦНС, ніж серед немовлят без даного стану [28]. Результати мета-аналізу показали, що варіант G894T впливає на вироблення оксиду азоту, зокрема, визначено, що носії алеля Т мали нижчі рівні NO (що еквівалентно нижчим рівням нітратів/нітритів) [29]. Дослідження Sofowota та ін. вказують на те, що клінічне значення цього генетичного варіанту може проявлятися лише за наявності ендотеліальної дисфункції [30].

На думку інших науковців, у дітей з асфіксією у відповідь на гіпоксію підвищується продукування (NO₂→NO₃⁻), що допомагає підтримувати кальцієвий гомеостаз клітин і захищає їх від пошкоджень [31]. Але за тривалого гіпоксичного стану продукування (NO⁻ + NO⁻) із L-аргініну ослаблюється. Ми отримали достовірно вищий рівень нітратів та нітритів в сечі у дітей віком 6-9 місяців з ГІЕ, ніж у здорових дітей. На нашу думку, вищий рівень концентрацій нітритів і нітратів у дітей з ГІЕ упродовж першого півріччя життя може вказувати на пролонгацію підвищеної активності

оксиду азоту в організмі, що є важливим показником функціонування ендотеліальної системи. Ця зміна може бути прямим доказом адаптації ендотеліальної системи до постнатальних умов, підвищення метаболічних процесів та розвитку імунної відповіді. Наші результати в поєднанні з даними інших авторів вказують на підвищену екскрецію оксиду азоту у більш старшому віці [32]. Даний результат може свідчити про те, що у дітей з ускладненим неонатальним періодом може бути більш активований метаболізм NO для забезпечення адекватної перфузії. У подальшому така активація може бути компенсаторною відповіддю організму на пошкодження тканин, обумовлене початковим гіпоксично-ішемічним ураженням, вказуючи на наявність тривалої ендотеліальної дисфункції.

Проте низька концентрація нітритів у плазмі крові протягом перших хвилин і годин після народження може бути спричинена кількома факторами. Передчасно народжені діти мають дефіцит L-аргініну, що призводить до зниження синтезу NO. У новонароджених також вища концентрація асиметричного диметиларгініну (АДМА), ендогенного інгібітора NOS, у порівнянні з дорослими [33]. Таким чином, низький рівень L-аргініну та підвищена концентрація АДМА можуть призвести до низької активності eNOS у новонароджених, що сприяє зниженню рівня нітритів у плазмі крові після народження. Зниження рівня нітратів і нітритів внаслідок дефіциту NO потенційно свідчить про ішемію судин і вазоспазм, а також про тяжкість оксидативного стресу. Ендотеліальна дисфункція, що проявляється втратою нейроваскулярних протективних функцій NO, може суттєво сприяти розвитку когнітивних розладів.

У дослідженні Schlenzig та ін. було виявлено вищу концентрацію МДА у немовлят, які потребували штучної вентиляції легень [34]. Дослідження Seif El Dein та ін. встановило кореляцію між стадіями тяжкості за шкалою Sarnat та рівнем МДА в сироватці крові. У новонароджених із підвищеним рівнем МДА частіше спостерігалися судоми, II-III стадії за шкалою Sarnat,

довший термін перебування у стаціонарі [35]. Дослідження Fulia та ін. стверджує, що новонароджені, які перенесли асфіксію, мали значно вищі рівні МДА та NO у плазмі крові, ніж здорові немовлята [36]. Наразі існують переконливі докази того, що посилене утворення NO внаслідок експресії індукцибельної ізоформи NO-синтази відіграє важливу роль при асфіксії, шоку та запаленні [37]. Ми отримали достовірний зв'язок між рівнем МДА та концентрацією сіалових кислот при множинному регресійному аналізі за Пуассоном після корекції на гестаційний вік дитини. Це підтверджує думку щодо єдності двох важливих патофізіологічних шляхів – ПОЛ та запалення [38], тобто активація ПОЛ переключає макроглію із гомеостатичного стану в активований за допомогою підвищення активності сіалових кислот [11].

У нашому дослідженні рівень сіалових кислот у малюків з генотипом СС гену *IL1B* (C3953T, rs1143634) був дещо вищим, ніж у малюків, які є носіями Т-алелі даного гена. На сьогодні відомо, що сіалові кислоти є компонентами глікопротеїнів і гліколіпідів, які входять до складу клітинних мембран, і їх вивільнення в кровоток та екскреція з сечею можуть бути ознакою пошкодження тканин під час гіпоксії. Також проведені клінічні та експериментальні дослідження демонструють, що сіалові кислоти є ключовим регулятором біології імунної клітини, від кровотворення до ефекторних функцій, при цьому даний метаболіт з потужними біофізичними характеристиками динамічно модулюється під час розвитку ЦНС [12, 13, 40,]. Сіалові кислоти можуть інгібувати активацію комплементу шляхом модуляції ключових функцій системи комплементу під час імунного контролю та гомеостазу вродженої імунної відповіді ЦНС [11, 43,], зв'язують та буферизують нейротрофічні фактори, фактори росту, нейротрансмітери та цитокіни [45, 46]. Нещодавні дослідження показали, що сіалілювання є критичним для захисту екстраембріональної тканини плода від атаки материнського комплементу [47], хоча точний механізм захисного ефекту на плід досі не з'ясований. Тобто ми припускаємо, що носії Т-алелю можуть бути більш

сприйнятливими до реалізації дії травми, інфікування та інших патологічних станів.

Враховуючи особливості когорти пацієнтів – неможливість повторних заборів крові у новонароджених дітей з міркувань безпеки пацієнта та враховуючи принципи біоетики, визначення показників обміну оксиду азоту концентрації МДА та сіалових кислот в сечі може бути корисним методом для оцінки оксидативного стресу у немовлят та моніторингу відповіді на новітні впроваджені методи лікування ГІЕ.

Висновок

Таким чином, результати дослідження свідчать про підвищення рівнів нітратів (5,41 vs 2,62; $p < 0,001$) та нітритів (2,69 vs. 1,39; $p < 0,001$) у дітей від матерів з метаболічним синдромом у відновному періоді ГІЕ, що може вказувати на прогресування патологічних процесів, викликаних гіпоксичним ураженням або ж свідчити про адаптивні механізми відновлення після ушкодження тканин головного мозку. Також було виявлено достовірний прямий зв'язок між рівнем нітратів та концентрацією сіалових кислот (Coef. 0,753, $p = 0,062$) та між МДА та концентрацією сіалових кислот в сечі у дітей обстежуваних груп (Coef. 1,27 (95 % ДІ 0,25-0,29; $p = 0,014$). При цьому ці зміни не асоціювалися з поліморфними варіантами генів *eNOS* (G894T, rs1799983) та *IL1B* (C3953T, rs1143634).

Отже, визначення концентрації рівня нітратів та нітритів можуть бути впроваджені в клінічну практику для ранньої діагностики та прогнозування можливих ускладнень у дітей з ГІЕ, оскільки підвищений рівень нітритів, нітратів та сіалових кислот може слугувати маркером віддалених наслідків гіпоксичного ураження. Це дозволяє розглядати їх як перспективні предиктори неоптимального нервово-психічного розвитку дитини.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Джерела фінансування. Стаття опублікована без будь-якої фінансової підтримки.

Література:

1. Bruschetti M, Romantsik O, Moreira A, Ley D, Thebaud B. Stem cell-based interventions for the prevention of morbidity and mortality following hypoxic-ischaemic encephalopathy in newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;8(8): CD013202. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013202.pub2>
2. Higuchi Y, Hattori H, Kume T, Tsuji M, Akaike A, Furusho K. Increase in nitric oxide in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine. *Eur J Pharmacol.* 1998;342(1):47-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)01524-0](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01524-0)
3. van Ierssel SH, Conraads VM, Van Craenenbroeck EM, et al. Endothelial dysfunction in acute brain injury and the development of cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2015;93(6):866-72. DOI: <https://doi.org/10.1002/jnr.23566>
4. Pappas G, Wilkinson ML, Gow AJ. Nitric oxide regulation of cellular metabolism: Adaptive tuning of cellular energy. *Nitric Oxide.* 2023;131:8-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.11.006>
5. Tasoulis MK, Douzinas EE. Hypoxic reperfusion of ischemic states: an alternative approach for the attenuation of oxidative stress mediated reperfusion injury. *J Biomed Sci.* 2016;23:7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0220-0>
6. Mas-Bargues C, Escriva C, Dromant M, Borrás C, Vina J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Arch Biochem Biophys.* 2021;709:108941. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>
7. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr.* 2015;169(4):397-403. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.3269>
8. Skrypnik I, Maslova G, Lymanets T, Gusachenko I. L-arginine is an effective medication for prevention of endothelial dysfunction, a predictor of anthracycline cardiotoxicity in patients with acute leukemia. *Exp Oncol.* 2017;39(4):308-11.
9. Soufli I, Toumi R, Rafa H, Touil-Boukoffa C. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2016;7(3):353-60. DOI: <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i3.353>

10. Torres-Merino S, Moreno-Sandoval HN, Thompson-Bonilla MDR, Leon JAO, Gomez-Conde E, et al. Association Between rs3833912/rs16944 SNPs and Risk for Cerebral Palsy in Mexican Children. *Mol Neurobiol.* 2019;56(3):1800-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1178-6>
11. Klaus C, Liao H, Allendorf DH, Brown GC, Neumann H. Sialylation acts as a checkpoint for innate immune responses in the central nervous system. *Glia.* 2021;69(7):1619-36. DOI: <https://doi.org/10.1002/glia.23945>
12. Puigdemivoll M, Allendorf DH, Brown GC. Sialylation and Galectin-3 in Microglia-Mediated Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:162. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00162>
13. Liao H, Klaus C, Neumann H. Control of Innate Immunity by Sialic Acids in the Nervous Tissue. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5494. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155494>
14. Scheidl TB, Brightwell AL, Easson SH, Thompson JA. Maternal obesity and programming of metabolic syndrome in the offspring: searching for mechanisms in the adipocyte progenitor pool. *BMC Med.* 2023;21(1):50. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12916-023-02730-z>
15. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnette D, et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):10957-61. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10957>
16. Akimov OY, Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *Ukr Biochem J.* 2016;88(6):70-5. DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj88.06.070>
17. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(10):1176-83. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx9701790>
18. Кайдашев ІІ, редактор. *Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині.* Полтава; 2003. 320с.
19. Heidari Z, Salimi S, Rokni M, Rezaei M, Khalafi N, Shahroudi MJ, et al. Association of IL-1 β , NLRP3, and COX-2 Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease Risk and Clinical Features in the Iranian Population. *Biomed Res Int.* 2021;2021:7729238. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/7729238>
20. Atli FH, Manduz S, Katrancioğlu N, Ozum U, Disli OM, Atahan E, et al. eNOS G894T Polymorphism and Abdominal Aortic Aneurysms. *Angiology.* DOI: <https://doi.org/10.1177/0003319709339589>
21. Kelly SB, Green E, Hunt RW, Nold-Petry CA, Gunn AJ, Nold MF, et al. Interleukin-1: an important target for perinatal neuroprotection? *Neural Regen Res.* 2023;18(1):47-50. DOI: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.341044>
22. Okazaki K, Nakamura S, Koyano K, Konishi Y, Kondo M, Kusaka T. Neonatal asphyxia as an inflammatory disease: Reactive oxygen species and cytokines. *Front Pediatr.* 2023;11:1070743. DOI: <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1070743>
23. O'Shea TM, Allred EN, Kuban KC, Dammann O, Paneth N, Fichorova R, et al. Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at 2 years of age in extremely preterm infants. *J Pediatr.* 2012;160(3):395-401.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.08.069>
24. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020;36(2):307-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>
25. Dollberg S, Warner BW, Myatt L. Urinary nitrite and nitrate concentrations in patients with idiopathic persistent pulmonary hypertension of the newborn and effect of extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Res.* 1995;37(1):31-4.
26. Shi Y, Li HQ, Shen CKWang JH, Qin SW, Liu R, Pan J. Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. *J Pediatr.* 1993;123(3):435-8. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)81753-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)81753-6)
27. Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibitor of nitric oxide synthesis reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 1994;35(1):10-4. DOI: <https://doi.org/10.1203/00006450-199401000-00003>
28. Kovalova OM, Cherniavska YuI, Pokhylko VI, Akimov OYe, Sliusareva AV. The effect of eNOS gene polymorphism and nitric oxide metabolism indicators on the neonatal consequences in premature babies born from mothers with metabolic syndrome. *Neonatology, Surgery and Perinatal Medicine.* 2023;13(3):44-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.24061/2413-4260.XIII.3.49.2023.6>
29. Luo Z, Jia A, Lu Z, Muhammad I, Adenrele A, Song Y. Associations of the NOS3 rs1799983 polymorphism with circulating nitric oxide and lipid levels: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J.* 2019;95(1125):361-71. DOI: <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2019-136396>
30. Sofowora G, Dishy V, Xie HG, Imamura H, Nishimi Y, Morales CR, et al. In-vivo effects of Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2001;11(9):809-14. DOI: <https://doi.org/10.1097/00008571-200112000-00009>
31. Безруков ЛО, Волосовець ОП, Шунько ЄС, Кривопустов СП, Годованець ЮД. *Неонатологія: навч. пос.* Чернівці; 2000. 236 с.
32. Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Tsuchida S, Hata I, Nishida K, et al. Urinary nitrite/nitrate excretion in infancy: comparison between term and preterm infants. *Early Hum Dev.* 1997;47(1):51-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-3782\(96\)01768-9](https://doi.org/10.1016/s0378-3782(96)01768-9)
33. Kavurt S, Demirel N, Bas AY, Ulubas Isik D, Ozcan B, Aydemir O. Increased ADMA levels are associated with poor pulmonary outcome in preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30(7):864-9. DOI: <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1190332>
34. Schlenzig JS, Bervoets K, von Loewenich V, Bohles H. Urinary malondialdehyde concentration in preterm neonates: is there a relationship to disease entities of neonatal intensive care? *Acta Paediatr.* 1993;82(2):202-5. Erratum in: *Acta Paediatr* 1993;82(6-7):630. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1993.tb12639.x>
35. Seif El Dein HM, Fahmy N, El Din ZE, Morgan M, Fattah MA, Elatawy SS. Correlation between increased serum malondialdehyde and spectrum of cranial ultrasonography findings in hypoxic ischemic encephalopathy: could it be used as a predictor of disease severity? *Egypt J Radiol Nucl Med.* 2020;51(1):250. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43055-020-00369-x>
36. Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P, et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res.* 2001;31(4):343-9. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.310409.x>
37. Leo F, Suvorava T, Heuser SK, Li J, LoBue A, Barbarino F, et al. Red Blood Cell and Endothelial eNOS Independently Regulate Circulating Nitric Oxide Metabolites and Blood Pressure. *Circulation.* 2021;144(11):870-89. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049606>
38. Aytekin I, Aksit H, Sait A, Kaya F, Aksit D, Gokmen M, et al. Evaluation of oxidative stress via total antioxidant status, sialic acid, malondialdehyde and RT-PCR findings in sheep affected with bluetongue. *Vet Rec Open.* 2015;2(1):e000054. DOI: <https://doi.org/10.1136/vetreco-2014-000054>

39. Villanueva-Cabello TM, Gutierrez-Valenzuela LD, Salinas-Marín R, Lepez-Guerrero DV, Martinez-Duncker I. Polysialic Acid in the Immune System. *Front Immunol.* 2022;12:823637. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.823637>
40. Christine Klaus, Huan Liao, David H Allendorf, Guy C Brown, Harald Neumann. Sialylation acts as a checkpoint for innate immune responses in the central nervous system. *Glia.* 2021;69(7):1619-36. DOI: <https://doi.org/10.1002/glia.23945>
41. Sato C, Kitajima K. Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. *J Biochem.* 2013;154(2):115-36. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvt057>
42. Sumida M, Hane M, Yabe U, Shimoda Y, Pearce OM, Kiso M, et al. Rapid trimming of cell surface polysialic acid (PolySia) by exovesicular sialidase triggers release of preexisting surface neurotrophin. *Journal of Biological Chemistry.* 2015;290(21):13202-14. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.638759>
43. Abeln M, Albers I, Peters-Bernard U, Flachsigs-Schulz K, Kats E, Kispert A, et al. Sialic acid is a critical fetal defense against maternal complement attack. *The Journal of Clinical Investigation.* 2019;129(1):422-36. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci99945>

PECULIARITIES OF METABOLISM (BY THE LEVEL OF NITRATES, NITRITES, MALONDIALDEHYDE AND SIALIC ACIDS) IN 6-9 MONTHS OLD INFANTS BORN FROM MOTHERS WITH METABOLIC SYNDROME, WHO HAD HYPOXIC-ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY IN THE EARLY NEONATAL PERIOD

O. Kovalova¹, V. Pokhylko², Yu. Cherniavska², S. Tsvirenko², Z. Rossokha³, A. Davydenko²

**Unit for Development Medical Guarantee Program of the Department Universal Health Coverage Strategy Development of National Health Service of Ukraine¹ (Kyiv, Ukraine),
Poltava State Medical University² (Poltava, Ukraine),**

Expert-analytical medical center for molecular genetics, Shupyk National Healthcare University of Ukraine,³ (Kyiv, Ukraine)

Summary.

According to the World Health Organization, asphyxia and hypoxic-ischemic encephalopathy remain the leading neurological causes of disability and mortality in newborns. The degree of brain damage and subsequent neurological complications is determined by a number of factors, including duration of hypoxia/ischemia, cerebral circulation, neonatal central nervous system immaturity, and maternal somatic status.

The aim of the study was to determine the metabolic characteristics (by nitrate, nitrite, malondialdehyde and sialic acid levels) of infants aged 6-9 months born to mothers with metabolic syndrome who had hypoxic-ischemic encephalopathy in the early neonatal period, and the effect of eNOS (G894T) and IL-1b (C3953T) gene variants on the metabolism of these metabolites.

Materials and methods. To this end, a prospective case-control study was conducted in 30 children aged 6-9 months. The main study group consisted of 16 children born to mothers with metabolic syndrome who had an Apgar score of less than 7 points at 5 minutes and diagnostic clinical and neurosonographic signs of hypoxic-ischemic encephalopathy, as determined during a consultation with a pediatric neurologist at 6-9 months of age. The comparison group consisted of 14 randomly selected relatively healthy children aged 6-9 months, born to mothers without metabolic syndrome and without manifestations of hypoxic-ischemic encephalopathy in the early neonatal period.

The concentration of nitrites was determined by determining the diazo compounds formed in the reaction with sulfanilic acid, and then the reaction was carried out with α -naphthylamine (Griss-Illosway reagent). The concentration of free malondialdehyde was determined by the spectrophotometric method. The concentration of sialic acids in urine was determined by the reaction with acetic-sulfuric acid reagent (Hess reaction). Molecular genetic analysis was carried out using buccal epithelium as biological material. Determination of IL1B 3953C>T (rs1143634) and eNOS G894T (rs1799983) polymorphic variants was carried out by polymerase chain reaction using the commercial kit «DreamTaq Green PCR Master Mix» (Thermo Scientific, USA) and specific oligonucleotide sequences (Metabion, Germany).

Statistical analysis. Traditional methods of parametric and non-parametric statistics were used to process quantitative values; non-parametric methods were used for the analysis of qualitative characteristics expressed mainly in percentages. Under the normal distribution of data, the main statistical characteristics were used, namely: the average value (M) to determine the central tendency; the standard error of the mean (m) for the precision of the estimate of the mean, the confidence interval (CI) for determining the 95 % interval of the mean. Hypotheses regarding the equality of general means were tested using a two-tailed Student's t-test. Comparison of relative or percentage values was performed using Fisher's exact two-sided test. Relationships between count variables were determined using Poisson multiple regression analysis. Statistical analysis was performed using the STATA 14.0 software package.

The study was conducted in compliance with the 'Rules for Ethical Principles for Scientific Medical Research Involving Human Subjects' approved by the Declaration of Helsinki (1964-2013), ICH GCP (1996), EEC Directive 609 (24.11.1986), Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 690 of 23.09.2009 and confirmed by the conclusion of the Biomedical Ethics Commission of Poltava State Medical University (Protocol No. 233 of 21.11.2024), which approved the study. Written consent was obtained from the parents of the newborns.

The study was conducted within the framework of the joint budget research work of the Department of Pediatrics № 1 with Neonatology of the Poltava State Medical University on the topic «Development of clinical and laboratory criteria, methods for predicting and preventing metabolic disorders in children of early age», state registration number 0120U102856, term of execution 2020-2024.

Research results. A study of the indicators of nitric oxide exchange in the group of examined children showed that the concentration of nitrites was significantly higher in children with hypoxic ischemic encephalopathy in the period of 6-9 months of life, 2.69 nmol/l compared to healthy children, 1.39 nmol/l ($p<0.001$). Similar differences were obtained in the concentration of nitrates (5.41 vs 2.62; $p<0.001$). We did not obtain significant differences in the levels of nitrates, nitrites and malondialdehyde depending on the genotypes of the IL1B gene (C3953T, rs1143634), but we found a higher (at the level of $p<0.1$) concentration of sialic acids in children with the CC genotype than in children with CT or TT genotype. When studying the eNOS gene (G894T, rs1799983), we did not find significant differences in the levels of nitrates, nitrites, sialic acids and malondialdehyde in children with different genotypes. The study revealed a reliable direct relationship (at the level of $p<0.1$) between the level of nitrates in the urine of children of the examined groups and the concentration of sialic acids (Coef. 0.753, $p=0.062$).

Conclusion. The results of the study indicate an increase in the levels of nitrates (5.41 vs. 2.62; $p<0.001$) and nitrites (2.69 vs. 1.39; $p<0.001$) in children of mothers with metabolic syndrome in the recovery period of hypoxic ischemic encephalopathy, which can indicate the progression of pathological processes caused by hypoxic damage or testify to the adaptive mechanisms of recovery after brain tissue damage. A reliable direct relationship was also found between the level of nitrates in urine in children of the examined groups

and the concentration of sialic acids (Coef. 0.753, $p=0.062$). At the same time, these changes were not associated with polymorphic variants of the eNOS (G894T, rs1799983) and IL1B (C3953T, rs1143634) genes. Thus, determining the concentration of nitrates and nitrites can be implemented in clinical practice for early diagnosis and prediction of possible complications in children with hypoxic ischemic encephalopathy, because the increased level of nitrites, nitrates and sialic acids can serve as a marker of distant consequences of hypoxic damage. This allows us to consider them as promising predictors of a child's suboptimal neuropsychological development.

Key words: Neonates; Prognosis; Nitrates and Nitrites; Malondialdehyde; Sialic Acids; eNOS (G894T, rs1799983) and IL1B (C3953T, rs1143634) genes; Follow-up; Neonatal Morbidity; Hypoxic-Ischemic Encephalopathy; Endothelial Dysfunction; Adverse Outcomes.

Контактна інформація:

Ковальова Олена – професор кафедри педіатрії No 1 із неонатологією (Полтавський державний медичний університет), головний спеціаліст відділу стратегічного розвитку програми медичних гарантій управління розробки програми медичних гарантій Департаменту стратегії універсального охоплення населення медичними послугами (м. Київ, Україна)
e-mail: slcogor@yandex.ua
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2458-6865>
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/H-6559-2017>

Похилько Валерій – доктор медичних наук, професор, професор кафедри педіатрії No 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна).
e-mail: v.i.pokhylko@gmail.com
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1848-0490>
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/HGU-3751-2022>
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=16245511700>

Цвіренко Світлана – кандидат медичних наук, доцент, завідувачка кафедри педіатрії No 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна)
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-8062-057X>
Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/31234731>
Scopus author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6602431937>

Чернявська Юлія – кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри педіатрії No 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна).
e-mail: ycherniavska32@gmail.com
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4522-7538>
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/IAP-0661-2023>
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57031925700>

Россоха Зоя – кандидат медичних наук, директор Експертно-аналітичного медичного центру молекулярної генетики, Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика (м.Київ, Україна)
email: zoiroh071@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4767-7364>
Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/792854>

Давиденко Аліна – асистент кафедри анестезіології та інтенсивної терапії Полтавського державного медичного університету (м.Полтава, Україна)
e-mail: a.davydenko@pdmu.edu.ua
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4042-644X>
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=59212899500&origin=recordpage>

Contact information:

Olena Kovalova – professor of the department of Pediatrics #1 with neonatology (Poltava State Medical University), Chief Specialist of the Unit for Development Medical Guarantee Program of the Department Universal Health Coverage Strategy Development of National Health Service of Ukraine (Kyiv, Ukraine)
e-mail: slcogor@yandex.ua
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2458-6865>
Scopus ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57204652374>
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/H-6559-2017>
Scopus author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57204652374>

Valerii Pokhylko – Doctor of Medical Science, Full Professor, Professor of the Department of Pediatrics No. 1 with Neonatology of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine).
e-mail: v.i.pokhylko@gmail.com
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1848-0490>
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/HGU-3751-2022>
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=16245511700>

Yuliia Cherniavska – PhD, Associate Professor of the Department of Pediatrics No. 1 with Neonatology of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine).
e-mail: ycherniavska32@gmail.com
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4522-7538>
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/IAP-0661-2023>
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57031925700>

Svitlana Tsvirenko – PhD, associate professor, head of Department of Pediatrics No. 1 with Neonatology of Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-8062-057X>
Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/31234731>
Scopus author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6602431937>

Zoia Rossokha – PhD, director of Expert-analytical medical center for molecular genetics, Shupyk National Healthcare University of Ukraine
email: zoiroh071@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4767-7364>
Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/792854>
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=3662124100>

Alina Davydenko – assistant professor of the Department of Anesthesiology and Intensive Care of Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)
e-mail: roha21@ukr.net
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4042-644X>
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=59212899500&origin=recordpage>

Надійшло до редакції 11.06.2024 р.
Підписано до друку 15.09.2024 р.

