

©Н.В. Банадига, О.Р. Боярчук

**ЗМІНИ В НІТРОКСИДЕРГІЧНІЙ СИСТЕМІ У ДІТЕЙ З ГОСТРОЮ РЕВМАТИЧНОЮ ЛИХОМАНКОЮ ТА ХРОНІЧНОЮ РЕВМАТИЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ***ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»*

ЗМІНИ В НІТРОКСИДЕРГІЧНІЙ СИСТЕМІ У ДІТЕЙ З ГОСТРОЮ РЕВМАТИЧНОЮ ЛИХОМАНКОЮ ТА ХРОНІЧНОЮ РЕВМАТИЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ. Досліджено вміст стабільних метаболітів оксиду азоту при гострій ревматичній лихоманці та хронічній ревматичній хворобі серця у дітей. Встановлено активацію нітроксидергічної системи, яка проявляється підвищенням вмісту нітритів і нітратів в сироватці крові та має компенсаторно-приспосувальне значення. Зниження сумарного вмісту нітритів та нітратів у 27,0 % дітей з хронічною ревматичною хворобою серця свідчить про напруження в роботі оксид-азотсинтезуючої системи та може бути патогенетичним чинником прогресування хвороби. Зменшення активності супероксиддисмутази може свідчити про зниження антиоксидантного захисту та зростання окисного стресу.

ИЗМЕНЕНИЯ В НИТРОКСИДЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕВМАТИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ РЕВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЮ СЕРДЦА. Исследовано содержание стабильных метаболитов оксида азота у детей с острой ревматической лихорадкой и хронической ревматической болезнью сердца. Установлено активацию нитроксидергической системы, которая проявлялась повышением содержания уровня нитритов и нитратов в сыворотке крови и имела компенсаторно-приспособительное значение. Снижение суммарного содержания нитритов и нитратов у 27,0 % детей с хронической ревматической болезнью сердца свидетельствует о напряжении в работе оксид-азотсинтезирующей системы и может быть патогенетическим фактором прогрессирования болезни. Уменьшение активности супероксиддисмутазы может свидетельствовать о снижении антиоксидантной защиты и нарастании окислительного стресса.

CHANGES OF NITRIC OXIDE SYSTEM IN CHILDREN WITH ACUTE RHEUMATIC FEVER AND RHEUMATIC HEART DISEASE. Levels of stable metabolites of nitric oxide were measured in children with acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. Activation of nitric oxide system: the increasing of nitrite and nitrate in serum was shown and it might serve as a compensatory mechanism. Reducing the total content of nitrites and nitrates in 27.0% of children with chronic rheumatic heart disease shows intension in the nitric oxide system and can be pathogenetic factor in disease progression. Reduced superoxide dismutase activity may indicate a decrease in antioxidant defense and increased oxidative stress.

**Ключові слова:** гостра ревматична лихоманка, хронічна ревматична хвороба серця, метаболіти оксиду азоту, супероксиддисмутаза.

**Ключевые слова:** острая ревматическая лихорадка, хроническая ревматическая болезнь сердца, метаболиты оксида азота, супероксиддисмутаза.

**Key words:** acute rheumatic fever, chronic rheumatic heart disease, nitric oxide metabolites, superoxide dismutase.

**ВСТУП.** В останні роки активно вивчається роль ендотеліальної дисфункції у розвитку кардіоваскулярних захворювань [3, 4, 16]. Ендотеліальна дисфункція характеризується зниженням синтезу судинорозширюючих субстанцій, збільшенням продукції чи підвищенням чутливості судин до судинозвужуючих середників та розвитком резистентності до ендотеліязалежних вазодилаторів. Це призводить до підвищення судинної реактивності, активації тромбоцитів і підвищення тромбогенності, лейкоцитарної адгезії та міграції моноцитів [18]. Важливе значення в початкових процесах і подальшому розгортанні дисфункції ендотелію відіграє система оксиду азоту.

Ступінь вираженості ендотеліальної дисфункції в значній мірі визначається зростанням окисного стресу в судинній стінці [20]. Окисний стрес – це стан, при якому активні кисневі метаболіти чинять токсичну дію внаслідок їх підвищеного утворення або в результаті порушення механізмів антиоксидантного захисту [9, 13]. Ендотеліальна синтаза оксиду азоту може активувати як продукцію оксиду азоту через оксигеназні функції, так і супероксид через редуктазні властивості [20]. Супероксид представляє собою один з найменш реактивних форм кисню, які мають найнебезпечніше значення в окисному стресі. Проте, спонтанно або під

впливом перехідних металів (заліза та міді) супероксид перетворюється в більш агресивні реактивні форми кисню (гідроксильний радикал та ін.), які призводять внаслідок окислення до пошкодження клітинних структур. Можливість NO розширювати судини залежить від балансу між реактивними формами кисню в судинній стінці та продукцією оксиду азоту. Важливе значення в антиоксидантному захисті на цьому етапі надається таким металопротеїнам як трансферрин та церулоплазмін, які регулюють утворення вільних радикалів, зв'язуючи іони металів змінної валентності перешкоджають їх втягненню в реакції Фентона [9].

Отже, дія оксиду азоту змінюється в умовах окисного стресу та залежить від стану антиоксидантного захисту, що має важливе значення при патологічних процесах, в тому числі ендотеліальної дисфункції [21]. Таким чином, оксид азоту може мати як позитивну регуляторну дію, так і негативні ефекти, які призводять до патологічних станів.

Метою нашої роботи було дослідити вміст стабільних метаболітів оксиду азоту при гострій ревматичній лихоманці (ГРЛ) та хронічній ревматичній хворобі серця (ХРХС) та визначити їх роль в механізмах розвитку даних захворювань.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Обстежено 124 пацієнтів віком від 4 до 17 років. У 22 дітей було діагностовано ГРЛ, у 67 хворих – ХРХС та у 35 дітей в анамнезі була перенесена ГРЛ без формування вади серця, тобто, можна вважати цю групу дітей з ГРЛ, одужанням. Контрольну групу склали 30 здорових дітей. Діагностику ГРЛ проводили за критеріями Киселя-Джонса (в модифікації Асоціації ревматологів України, 2004), ХРХС – за наявності вади серця чи післязапального краєвого фіброзу стулок клапанів серця. Всім хворим було проведено загальноприйняте клініко-лабораторне обстеження, електрокардіографію та ехокардіографію серця.

Для оцінки інтенсивності синтезу оксиду азоту використовують його стабільні метаболіти [19], так як оксид азоту не є стійкою сполукою, середня тривалість його життя в організмі людини складає декілька секунд. Оксид азоту, який не взяв участі в хімічних реакціях швидко окислюється до неактивних сполук – нітритів та нітратів.

Визначення рівня азотистих сполук ( $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) проводили за стандартною методикою з використанням реактиву Грісса. Відновлення нітратів до нітритів проводилося металічним цинком в розчині оцтової кислоти. Іони  $\text{NO}_2^-$  виявляли діазореакцією з реактивом Грісса, з наступним колориметричним визначенням азоз'єднання рожево-червоного кольору [7, 14]. Розрахунок кількості нітрат-іонів проводили за різницею сумарної кількості нітрат- і нітрит-іонів та кількості нітрит-іонів з коефіцієнтом перерахунку 1,3. Активність ферменту супероксиддисмутази (СОД) визначали за його здатністю інгібувати відновлення нітротетразолу синього в присутності коферменту нікотинамідаденіндинуклеотиду ( $\text{НАДН}^+\text{H}^+$ ) [5]. Результат виражали в умовних одиницях активності. Рівень церулоплазміну в сироватці крові визначали за Равінім. Вміст метаболітів оксиду азоту, активність СОД та рівень церулоплазміну в сироватці крові визначали у 74 хворих: 12 дітей з ГРЛ, 37 – з ХРХС та у 25 з ГРЛ, одужанням.

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи програми «Microsoft Excel» та «Statistica – 6,0». Вірогідність середніх величин визначали за допомогою критерію Стюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** Найчастішим проявом ГРЛ у дітей був кардит, який зустрічався у 17 (77,3 %) дітей, дещо рідше – мігруючий поліартрит – у 11 (50,0 %) хворих, мала хорея – у 6 (27,3 %). Зрідка спостерігалися ревматичні вузлики – у 4 (18,2 %) пацієнтів та анулярна еритема – у 3 (13,6 %). Фебрильна лихоманка відмічалася у 17 (77,3 %) хворих. Передуюча стрептококова інфек-

ція спостерігалася у 16 (72,7 %) дітей, у більшості випадків відмічали гострий тонзиліт чи фарингіт та у 2-х дітей скарлатину.

У дітей з ХРХС найчастіше зустрічалася недостатність мітрального клапана – у 27 (40,3 %) дітей. У 5 (7,5 %) спостерігалася комбінована мітральна вада, частіше (у 4 випадках) з перевагою недостатності та в одному випадку – з перевагою стенозу. Поєднані вади з недостатністю мітрального та аортального клапанів виявляли у 7 (10,4 %) хворих. В одного підлітка була комбінована мітральна вада з перевагою недостатності та недостатність аортального клапана. Недостатність аортального клапана зустрічалася рідше – у 6 (9,0 %) дітей, у 3 (4,5 %) хворих мала місце комбінована аортальна вада з перевагою недостатності. У 8 дітей (11,9 %) спостерігався краєвий фіброз стулок мітрального та/чи аортального клапанів. У 10 (14,9 %) пацієнтів розвинувся пролапс мітрального клапана з регургітацією різного ступеня тяжкості.

Тривалість захворювання (від перших проявів ГРЛ) у групах дітей з ХРХС та ГРЛ, одужанням становила від 1 до 10 років. Діти обох груп знаходилися на диспансерному спостереженні у кардіоревматолога, вони щорічно проходили ретельний огляд, обстеження та отримували вторинну профілактику препаратами пеніциліну пролонгованої дії.

Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту ( $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) представлено в таблиці.

Порівнюючи середні показники вмісту метаболітів оксиду азоту найсуттєвіші зміни встановлено у групі дітей з ГРЛ, де вірогідно зростали показники як нітритів, нітратів та сумарний вміст метаболітів. Підвищення сумарного вмісту метаболітів оксиду азоту спостерігалось у 91,7 % дітей з ГРЛ і лише в одній дитині показник був в межах норми. Інші дослідники також спостерігали зростання даного показника при ГРЛ у дітей [12]. Вірогідне зростання рівня нітратів та сумарного показника метаболітів виявили у дітей з ХРХС та у дітей з ГРЛ, одужанням. Проте у дітей з перенесеною ГРЛ і одужанням підвищення рівня нітратів виявлено у 68,0 % дітей, нормальні показники – у 20,0 % та у 12,0 % показник був знижений. Сумарний вміст метаболітів оксиду азоту у даній групі був в межах норми у 28,0 % дітей, в одній дитині (4,0 %) – зниженим та у решти (68,0 %) був підвищеним (рис. 1). У дітей з ХРХС зниження рівня нітрат-іонів відмічалось у 18,9 % пацієнтів, у решти – підвищений рівень, а сумарний показник вмісту нітратів та нітритів був зниженим у 27,0 % хворих, у решти – підвищеним.

Таблиця. Вміст метаболітів оксиду азоту, СОД та церулоплазміну у сироватці крові дітей з ГРЛ та ХРХС ( $M \pm m$ )

Група	Контрольна група	ГРЛ	ХРХС	ГРЛ, одужання
Нітрити, мкмоль/л	0,96±0,03	1,18±0,09*	0,95±0,05	0,99±0,08
Нітрати, мкмоль/л	1,13±0,08	1,57±0,15*	1,64±0,19*	1,48±0,12*
Нітрити + нітрати, мкмоль/л	2,38±0,07	3,10±0,13***	2,88±0,20*	2,77±0,16*
СОД, ум.од.акт.	63,13±1,50	55,94±1,98*	44,32±3,98**	52,46±1,99**
Церулоплазмін, мг/л	233,53±9,54	449,22±23,66 ***	419,64±28,79***	366,91±19,65 ***

Примітки: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  – порівняно з контрольною групою.

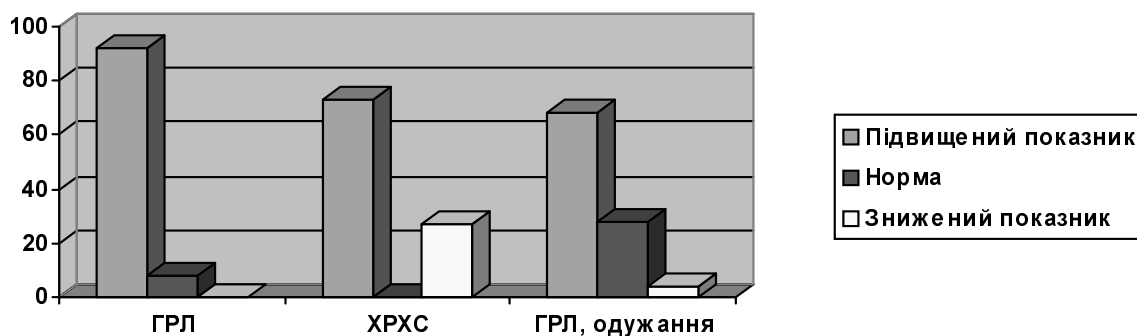


Рис. 1. Частота (%) змін показника сумарного вмісту метаболітів оксиду азоту у різних групах хворих.

Середній показник вмісту нітритів у дітей з ХРХС та ГРЛ, одужанням був в межах норми. Проте нами відмічено строкатість змін даного показника. У дітей з ХРХС нормальний рівень нітрит-іонів виявляли у 37,8 % дітей, підвищення рівня – у 29,8 % та у 32,4 % пацієнтів мало місце зниження вказаного показника.

Достовірно зниження активності СОД спостерігалося у всіх групах. Тоді як рівень церулоплазміну був підвищеним також у всіх групах, максимальні величини виявлено у дітей з ГРЛ, нижчі значення – у дітей з ГРЛ, одужанням.

Таким чином, у дітей з різними формами ревматизму встановлено активацію синтезу оксиду азоту, про що свідчить зростання його стабільних метаболітів, особливо у дітей з ГРЛ. Активація оксиду азоту при гострих запальних процесах виконує захисну функцію, забезпечуючи максимальну перфузію тканин. Зростання рівня оксиду азоту у дітей з ГРЛ та ХРХС також можна розглядати з позитивної сторони як захисну реакцію на сповільнення темпів формування легеневої гіпертензії і попередження внутрішньосудинних ускладнень. При регургітації на мітральному клапані зменшується серцевий викид, що призводить до активації симпато-адреналової та ренін-ангіотензин-альдостеронової системи та є ще одним механізмом, який призводить до підвищення рівня оксиду азоту в сироватці крові. Проте насторожує зниження сумарного вмісту метаболітів оксиду азоту у 27 % дітей, що вказує на напруження в роботі оксид-азотсинтезуючої системи та може бути патогенетичним чинником прогресування хвороби. Інші автори також пов'язують прогресування ХРХС з трансформацією у комбіновані та поєднані вади серця за відсутності ознак активності процесу та перенесених повторних ревматичних лихоманок як наслідок небактеріального тромботичного ендокардиту, що розвивається під впливом гемодинамічних факторів [8], в яких не останню місце займає система оксиду азоту.

Інактивація оксиду азоту відбувається кількома шляхами: реактивацією з гемоглобіном в просвіті судин, супероксидним радикалом в стінці судин з утворенням пероксинітриту та киснем з утворенням метаболітів оксиду азоту – нітритів та нітратів [11]. Встановлено, що нітрит-аніон утворюється спонтанно, при нормоксії, тоді як нітрат-аніони – при розпаді пероксинітриту в умовах окисного стресу або при окисленні

оксиду азоту гемвмісними білками [10]. Автором зазначено, що зростання кількості нітрат-аніонів пов'язано з підвищенням рівня пероксинітриту в організмі, що вказує на наявність окисного стресу. Отже, зростання кількості нітратів у дітей з тривалим перебігом процесу, особливо при ХРХС може вказувати на наявність окисного стресу.

Зменшення активності СОД також може свідчити про гіперпродукцію вільних радикалів, зниження антиоксидантного захисту та підвищення окисного стресу. За даними літератури оксид азоту підвищує антиоксидантний захист, стимулюючи активність СОД [20]. Хоча результати інших досліджень також показали початкове підвищення і подальше зниження активності СОД в експерименті [15]. Саме при дефіциті СОД підвищений синтез NO може проявляти цитотоксичну дію, пов'язану з утворенням пероксинітритів [1, 17], що може мати і негативні наслідки. Надлишок оксиду азоту інгібує білки-ферменти дихального ланцюжка мітохондрій і циклу Кребса, знижує синтез АТФ, що призводить до некрозу чи апоптозу [6]. Процеси окисного стресу в кардіоміоциті запускають каспазний каскад та призводять до прогресування хвороби. Літературні джерела стверджують, що високі концентрації оксиду азоту, володіючи цитотоксичною дією, призводять до поглиблення аутоімунних реакцій [1].

Якщо СОД є основним внутрішньоклітинним антиоксидантом, то церулоплазмін свою антиоксидантну функцію виконує в плазмі крові [2]. Він попереджає не ферментативні реакції, які дають початок вільним радикалам і подальшому розвитку переокислення ліпідів. Проте антиоксидантні властивості церулоплазміну є дещо нижчими, ніж у СОД. Крім того церулоплазмін являє собою гострофазовий білок, який реагує на інфекційно-запальні процеси, що і зумовило його зростання у наших пацієнтів, особливо у дітей з ГРЛ.

#### ВИСНОВКИ.

1. У дітей з ГРЛ та ХРХС спостерігається активація нітросидергічної системи, яка проявляється підвищенням вмісту нітритів і нітратів в сироватці крові.

2. Підвищення вмісту метаболітів оксиду азоту у дітей з ревматизмом, очевидно має компенсаторно-приспосувальне значення, а зниження сумарного вмісту нітритів та нітратів у 27,0 % дітей з ХРХС свідчить про напруження в роботі оксид-азотсинтезуючої системи

та може бути патогенетичним чинником прогресування хвороби.

3. Підвищення рівня нітратів у дітей з ГРЛ та ХРХС та зменшення активності СОД може свідчити про зниження антиоксидантного захисту та зростання окисного стресу.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ванін А.Ф. Оксид азота – регулятор клітинного метаболізму / А.Ф. Ванін // Соросовський образовальний журнал. – 2001. – Том 7. – № 11. – С. 7–12.
2. Ващенко В.І. Біологія і фармакологія церулоплазміна: від експерименту до лікарської терапії / В.І. Ващенко, Т.Н. Ващенко // Обзори по клінічній фармакології і лікарській терапії. – 2008. – Том 6. – №. – С. 31–44.
3. Волосовець О.П. Роль оксиду азоту та ендотеліальної дисфункції в атерогенезі у дітей / О.П. Волосовець, С.П. Кривопустов, Т.С. Мороз // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2007. – № 4. – С. 68–69.
4. Гнатейко О.З. Зміна рівня маркерів дисфункції ендотелію в сироватці крові новонароджених із вродженими вадами серця / О.З. Гнатейко, О.Ю. Кулачковська, О.Ю. Авраменко // Перинатологія і педіатрія. – 2007. – № 1. – С. 11–13.
5. Гонський Я.І. Посібник до практичних занять з біологічної хімії / Я.І. Гонський. – Тернопіль, 1992. – с. 119–121.
6. Звенигородська Л.А. Оксид азоту як маркер запалення при стеатогепатиті у дітей з метаболічним синдромом / Л.А. Звенигородська, Т.В. Нілова // РМЖ. – 2008. – № 2 (10). – С. 47–50.
7. Кіселик І.О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І.О. Кіселик, М.Д. Луцик, Л.Ю. Шевченко // Лабораторна діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
8. Мамалуй Н.І. Повторна ревматична лихоманка у дітей та підлітків: фактори ризику і еволюція / Н.І. Мамалуй, В.М. Савво // Педіатрія, акушерство та гінекологія – 2007. – № 4. – С. 76.
9. Окислювальний стрес. Прооксиданти і антиоксиданти / Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкін, Н.К. Зенков [и др.]. – М., Слово, 2006, – 556 с.
10. Окисний стрес та стан системи з'єднання крові й фібринолізу в дітей з недиференційованою дисплазією сполучної тканини / Т.В. Починок, А.В. Коцюруба, П.Г. Гриценко [та ін.] // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2011. – № 1. – С. 27–33.
11. Содержание оксида азота в периферической крови детей и подростков с вегетативными дисфункциями / В.Г. Майданник, Н.В. Хайтович, Е.П. Сидорик [и др.] // Педіатрія. – 2006. – Том 86, № 1. – С. 15–19.
12. Adrenomedullin and total nitrite levels in children with acute rheumatic fever / A. Balat, M. Kilina, M.B. Cekmen [et al.] // Clin. Biochem. – 2005. – N 38 (6). – P. 526–530.
13. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy / F. L. Muller, W. Song, Y. Liu [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – N 40. – P. 1993–2004.
14. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski [et al.] // Anal Biochem. – 1982. – № 1.- P. 131–138.
15. Aorta of apoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes / P.A.C. Hoen, C.A.C. Van der Lans, M. Van Eck [et al.] // Circ. Res. – 2003. – № 93. – P. 262–269.
16. Cai H. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress / H. Cai, D.O. Harrison // Circ. Res. – 2000. – Vol. 87. – P. 840–844.
17. Channon K.M. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury / K.M. Channon, H. Qian, S.E. George // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2000. – N 20 (8). – P. 1873–1881.
18. Endemann D.H. Endothelial dysfunction / D.H. Endemann, E.L. Schiffrin. // J. Am. Soc. Nephrol. – 2004. – N 15. – P. 1983–1992.
19. Guevara I. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction / I. Guevara, J. Iwanejko, A. Dembinska-Kiec // Clin. Chim. Acta. – 1998. – N 274 (2). – P. 177–188.
20. Schiffrin E. L. Oxidative Stress, Nitric Oxide Synthase, and Superoxide Dismutase / E. L. Schiffrin // Hypertension. – 2008. – N 51. – P. 31–34.
21. The interaction between coronary endothelial dysfunction local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans / S. Lavi, E. Yang, A. Prasad [et al.] // Hypertension. – 2008. – N 51. – P. 127–133.

Отримано 5.01.12 р.