

ОКСИД АЗОТУ: КЛІНІКО-ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ МЕТАБОЛІЗМУ У ДІТЕЙ З РЕВМАТОЇДНИМ АРТРИТОМ

І.В. Дудка, Л.І. Омельченко, А.Г. Ципкун, В.Б. Ніколаєнко, О.А. Ошлянська
Інститут педіатрії, акушерства та гінекології АМН України, м. Київ

Резюме. При ревматоїдному артриті у дітей в період загострення перебігу хвороби встановлено значне підвищення концентрації L-аргініну в сироватці крові та кінцевих продуктів метаболізму оксида азоту з підвищеннем вмісту нітратів/нітрітів у крові та сечі. Найбільш суттєві та значущі зміни концентрації L-аргініну та продуктів метаболізму NO у крові були виявлені у пацієнтів з системними формами захворювання при високому ступені активності запального процесу. При адекватній терапії ІОРА відбувається нормалізація як клініко-імунологічних параметрів, так і рівня нітратів/нітрітів в крові, що відображає чіткий зв'язок між метаболізмом NO та імунною відповіддю організму.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, оксид азоту, метаболізм, діти.

Вступ

Ювенільний ревматоїдний артрит (ІОРА) залишається предметом пильної уваги ревматологів, що пов'язано з його лідеруючою позицією в структурі ревматичних захворювань і наявністю низки невирішених питань щодо патогенезу, лікування, профілактики, насамперед, попередження розвитку й прогресування патологічного процесу. Поширеність РА серед дитячого населення різних регіонів України в останні роки залишається на одному рівні і становить, за даними МОЗ, від 0,2 до 0,4 %.

На сьогоднішній день, поряд із загальноприйнятими імунними механізмами патогенезу РА, значне місце відводиться порушенням обміну низки біологічно активних речовин та їх ролі в розвитку патофізіологічних процесів. Зокрема, звертається увага на оксид азоту (NO), який останнім часом розглядається як один із основних представників нового класу сигнальних молекул, що здійснюють міжклітинну комунікацію та регуляцію великої кількості фізіологічних функцій в різних тканинах і системах організму людини [5, 6].

Відомо, що NO в організмі синтезується двома шляхами: ферментативним окисленням L-аргініну за допомогою синтаз оксид азоту (NOS) в присутності кисню, внаслідок чого утворюється NO[•](нітроксиланіон), та нітритредуктазним відновленням: при гіпоксії нітрит відновлюється нітритредуктазними системами до NO⁺ (іон-нітрозонія). У фізіологічних умовах NO швидко, за ліченні секунди перетворюється в нітрати та нітрати, які легко виводяться з організму. В зв'язку з цим, біологічні ефекти NO обмежені областю його утворення.

За умов участі конститутивних ендотеліальної, нейрональної синтаз оксид азоту (сNOS) в організмі людини продукується невелика кількість оксида азоту, який виконує виключно регуляторні функції в клітинах-мішенях із зачлененням циклічного гуанозин монофосфату (цГМФ) [6, 9, 17, 20]. В той же час, під впливом бактеріальних ендотоксинів або імуногенних стимулів (γ -інтерферону, інтерлейкіну-1, фактора некрозу пухлини- α) відбувається експресія гена, відповідального за синтез індуцибельної оксид азотної синтази (iNOS), яка викликає підвищення продукції NO клітинами (макрофаги, нейтрофільні гранулоцити, моноцити, гепатоцити, фібробласти та інші клітини) в тисячі разів більшу, ніж після стиму-

ляції конститутивними NOS [1, 16]. У таких випадках NO сприяє імунному захистові організму, відіграючи роль іммунорегулятора [16, 23]. Однак при дуже високих концентраціях NO не реалізує свій вплив через гуанілаткіназу, а сприяє стимуляції процесів перекисного окислення ліпідів, локальний вазоділятації, а згодом ішемії та ураженню клітин, виявляючи цитотоксичні й цитостатичні ефекти, що стає причиною виникнення різного роду патологічних реакцій [1, 3, 7].

Встановлено, що недостатнє і надлишкове утворення NO серйозно позначається на функціонуванні багатьох органів та систем людини і може бути значущим фактором у патогенезі низки захворювань.

NO у високих концентраціях пригнічує проліферацію і збільшує частоту апоптозу лімфоцитів та макрофагів, що спричиняє розвиток вторинного імунодефіциту або посилює різні патологічні прояви імунного характеру. Також NO суттєво впливає на метаболізм ліпідів, зокрема, викликає значне підвищення їхнього перекисного окислення. Значний інтерес викликає той факт, що дія NO на тонус судин, а також на низку інших процесів за характером подібна до змін, що виникають під впливом деяких ейкозаноїдів – метаболітів арахідонової кислоти.

За останні роки на підставі експериментальних та клінічних досліджень була доведена наявність суттєвих неоднозначних змін рівня NO в біологічних рідинах при аутоімунних хворобах [2, 4, 10, 13, 15, 19, 22].

Встановлена висока концентрація нітратів/нітратів у спинномозковій рідині хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) з активним церебральним васкулітом; виявлене підвищення концентрації метаболітів NO у крові та сечі і висока активність iNOS у гломерулярних та тубулointерстиціальних клітинах при вовчковому нефріті, що корелює з важкістю клубочкових уражень; визначено багаторазове підвищення рівня кінцевих продуктів NO в активній фазі РА не тільки в крові, але й в синовіальній рідині. Під впливом прозапальних цитокінів у суглобових тканинах виявлено активація процесів синтезу NO і ЦОГ [21]. При артритах хондроцити, остеобласти і мононуклеари індукують iNOS [8], що викликає цитотоксичний (цитостатичний) ефект, обумовлений деструкцією активних центрів у залізомістких ферmentах [1, 9]. Ступінь

Показники вмісту L-аргініну та NOx в сироватці венозної крові і сечі у хворих на ЮРА, мкмоль/л

Група		Показник		
		L-аргінін	NOx крові	NOx сечі
Здорові діти		197,10±27,45	22,92±2,98	28,19±3,07
Хворі на ЮРА	суглобова форма	I ступінь активності	206,19±23,73*	30,38±4,88
		II ступінь активності	245,10±15,27*	33,28±6,26*
		середнє значення	216,56±18,15*	31,15±3,15*
Хворі на ЮРА	суглобово-вісцеральна форма	I ступінь активності	272,46±29,95* ##	27,69±3,65
		II ступінь активності	296,18±33,99* #	37,98±4,89* #
		середнє значення	216,56±18,15*	31,15±3,15*

* – Достовірність різниці показників у порівнянні з групою здорових дітей, $p < 0,05$; ** – достовірність різниці між показниками у хворих із суглобовою та суглобово-вісцеральною формами ЮРА, $p < 0,05$; # – достовірність різниці між показниками у хворих із різними ступенями активності при однаковій формі ЮРА, $p < 0,05$; ## – достовірність різниці між показниками у хворих із однаковим ступенем активності та різних формах перебігу ЮРА, $p < 0,05$.

апоптозу клітин суглобової рідини та хрящів у хворих на РА вищий, ніж у здорових, що відповідає експериментальним даним щодо ролі NO як медіатора апоптозу клітин синовіальної рідини при ревматоїдному ураженні суглобів [14].

На моделі остеопорозу, обумовленого запальним процесом, продукція NO у лабораторних тварин була в 3,4 рази вище, ніж у таких контрольної групи та супроводжувалася активацією iNOS у сегментах кісткового мозку. При цьому мінеральна цільність кісті знижувалася на 64 %, кількість остеобластів зменшувалася на 44 %, а остеокластів – збільшувалася на 38 %. Інгібтори iNOS нівелювали кісткову патологію, що розвивалась [12].

Переважна більшість досліджень, присвячених вивченю метаболізму NO при аутоімунній патології, здійснювалась в експерименті та в клініці у дорослих пацієнтів.

Метою роботи, враховуючи важливу роль NO в патогенезі РА, було детальне вивчення стану системи L-аргінін-оксид азоту у дітей, хворих на РА з урахуванням форми, клінічного перебігу та ступеня активності захворювання.

Матеріал і методи дослідження

Визначення вмісту L-аргініну в крові, нітритів та нітратів у сироватці крові та сечі було проведено у 30 дітей, хворих на РА (11 хлопчиків і 19 дівчаток), віком 6–14 років (середній вік – $10,61 \pm 2,1$ років), які перебували на лікуванні у відділенні захворювань сполучної тканини ПАГ АМНУ. Тривалість захворювання становила 1–6 років (середня тривалість – $4,69 \pm 1,67$ роки).

Діагноз РА був верифікований згідно з критеріями Американської ревматологічної асоціації (1987).

У 18 (60 %) пацієнтів було діагностовано суглобову форму РА, із них олігоартріт – у 3, поліартріт – у 15. Системні вісцеральні прояви у вигляді ліхоманки, лімфаденопатії, ревматоїдного васкуліту, ураження серця, легенів, печінки спостерігалися у 12 (40 %) пацієнтів, із них у 4 – діагностовано варіант Стіла, у 8 – алергосептичний. Активність ревматоїдного процесу I ступеня було зареєстровано у 13 (43,3 %) обстежених, II ступеня – у 17 (56,7%). Швидко прогресуючий перебіг захворювання спосіб

терігався у 7 (23,3 %) пацієнтів, повільно прогресуючий – у 23 (76,7 %).

Усі пацієнти перебували в активному періоді захворювання і отримували медикаментозну терапію, що включала базисні препарати (делагіл, метотрекат), нестероїдні протизапальні засоби (німесулід, вольтарен, ібупрофен), симптоматичні ліки, 18 дітей отримували глюкокортикоїди (ГК).

Результати лабораторних досліджень, отриманих під час обстеження хворих на РА, співставляли з аналогічними показниками у 10 здорових дітей, які склали контрольну групу.

Визначення вмісту L-аргініну в сироватці крові проводилось методом горизонтального високовольтного електрофорезу на апараті «Лабор» (Угорщина), а концентрації сумарних нітратів та нітритів (NOx) у крові та сечі – спектрофотометричним методом із використанням реактиву Гріssa.

Усі отримані цифрові дані були опрацьовані статистично за допомогою комп'ютерного пакету програм Microsoft Excel. Достовірність різниці оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Різницю між показниками вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

У ході дослідження у дітей, хворих на ЮРА, були виявлені суттєві та неоднозначні зміни в системі L-аргінін-NO.

В активному періоді захворювання середні рівні L-аргініну в сироватці крові, NOx в крові і сечі були вірогідно вищими, ніж у контрольній групі ($p < 0,05$). При цьому середні значення концентрації L-аргініну у пацієнтів з суглобово-вісцеральною формою захворювання перевищували такі в групі із суглобовою формою ЮРА майже в 1,5 рази, а рівні NOx у крові та сечі практично не відрізнялися при будь-якій формі захворювання (див. таблицю).

Більш ретельний аналіз показників вмісту L-аргініну в сироватці венозної крові у пацієнтів в активному періоді захворювання виявив значні розбіжності, які мали місце при обох формах РА. Так, підвищений рівень L-аргініну в сироватці крові було виявлено у 50 % дітей, у 36,7 % він був в межах нормальних значень, у 13,3 % – знижений. При суглобово-вісцеральній формі 60 % дітей було з підвищеним вмістом L-аргініну в крові (280,11–447,03 мкмоль/л), 26,6 % – з нормаль-

ним. При суглобовій формі суттєвої різниці щодо кількості хворих з нормальним та підвищеним рівнями L-аргініну не було виявлено (46,6 і 40 % відповідно). При цьому підвищення його рівня був більш вираженим у пацієнтів із суглобово-вісцеральною формою ЮРА. Знижений рівень L-аргініну в сироватці крові (55,1–98,73 мкмоль/л) відмічався лише у 13,3 % обстежених, які характеризувалися мінімальним ступенем активності патологічного процесу, а тривалість захворювання становила понад 6 років.

Під час проведення дослідження у пацієнтів не було виявлено чітких кореляційних зв'язків між підвищеннем вмісту L-аргініну в сироватці крові та ступенем активності при різних формах ЮРА, проте у дітей із суглобово-вісцеральною формою його рівень був значно вищий ($p > 0,05$), що можна пояснити надзвичайно важливою роллю аргініну при генералізованому імунозапальному процесі. Відомо, що аргінін не лише являє собою субстрат для синтезу NO, але, за принципом зворотного зв'язку, впливає на синтез iNOS і у такий спосіб безпосередньо бере участь у регуляції цього процесу в організмі [5], допомагає запобігти надлишковому утворенню та патологічній дії. При дефіциті L-аргініну iNOS генерує не оксид азоту, а агресивні щодо клітин і тканин супeroxid, перекис водню, гідроксильний радикал та синглетний кисень [5, 8].

Чіткої залежності вмісту L-аргініну в сироватці крові від ступеня активності захворювання не було встановлено. У хворих на суглобову форму ЮРА показники його рівня при різних ступенях активності запального процесу достовірно не відрізнялися і не перевищували таких у здорових дітей ($p > 0,05$). У пацієнтів із суглобово-вісцеральною формою вміст L-аргініну підвищувався і вірогідно відрізнявся від показників у здорових дітей та пацієнтів із суглобовою формою ($p < 0,05$). В той же час, достовірної різниці щодо вмісту L-аргініну в крові у обстежених з I і II ступенями активності РА не відмічалося ($p > 0,05$).

Вивчення показників сумарних нітратів та нітрітів (NOx) у крові та сечі дітей, хворих на ЮРА, показало, що зміни метаболізму NO при суглобовій та суглобово-вісцеральній формах і активному перебігу захворювання проявлялися достовірним підвищеннем вмісту NOx в крові та сечі у порівнянні з показниками контрольної групи – $31,15 \pm 3,15$ і $33,81 \pm 3,13$ мкмоль/л та $118,45 \pm 28,75$ і $126,25 \pm 40,81$ мкмоль/л відповідно ($p < 0,05$).

Збільшення вмісту NOx в крові у хворих на РА залежало від активності перебігу захворювання і було мінімальним при низькій і достовірнім – при середній активності аутоімунного запалення (див. таблицю). При суглобово-вісцеральній формі у хворих із I і II ступенем активності запального процесу відмічалося достовірна різниця між показниками вмісту NOx в крові ($p < 0,05$). У ході дослідження не було встановлено залежності екскреції NOx з сечею від ступеня активності запального процесу.

Матеріал та методи дослідження

Література

1. Ванин А.Ф. Оксид азота в біомедических исследованиях // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 4. – С. 3–5.
2. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемии-

У 8 пацієнтів в період загострення РА підвищення рівня L-аргініну в сироватці крові супроводжувалось збільшенням концентрації NOx в крові, у 7 – вона залишалась в межах нормальних значень. В той же час, у всіх 15 обстежених рівень NOx в сечі був вірогідно підвищений у порівнянні з показниками контрольної групи ($p < 0,05$).

Звертає на себе увагу той факт, що у хворих з активним запальним процесом на тлі згасання проявів захворювання при обох формах перебігу ЮРА, поряд із нормальними рівнями L-аргініну в крові, відмічалося вірогідне підвищення концентрації NOx в крові і сечі у порівнянні з показниками здорових дітей ($p < 0,05$). Це може свідчити, що в умовах згасання активності запалення гіперпродукція NO, що обумовлена iNOS, може виконувати захисну функцію, оскільки розширення судин поліпшує тканину перфузію, викликає інгібування адгезії й агрегації тромбоцитів [8].

Знижені рівні L-аргініну в крові, NOx в крові та сечі були виявлені лише у 4 (13,3 %) хворих з мінімальним ступенем активності і тривалим перебігом захворювання, із них 2 – зі швидко прогресуючим перебігом суглобово-вісцеральної форми ЮРА, які протягом 4-х і 6-ти років отримували кортикостероїдну терапію, і 2 – з повільно прогресуючим перебігом суглобової форми захворювання, які отримували тривалий час лише нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП).

Таким чином, ослаблення синтезу NO на тлі довготривалого застосування глюокортикоїдних гормонів, цитостатиків, НПЗП обумовлює підвищення судинного тонусу і згортуваності крові, що спричиняє розвиток васкулопатії і фіброзу [18].

Висновки

1. У всіх дітей, хворих на РА зі швидко прогресуючим перебігом, в активний період захворювання відмічався підвищений вміст L-аргініну в сироватці крові та кінцевих продуктів метаболізму NO в крові та сечі (NOx), що свідчить про участь NO в патогенезі ревматоїдного процесу.

2. Більш виражене підвищення вмісту L-аргініну та кінцевих продуктів метаболізму NO в крові (NOx) спостерігався у хворих з системними формами РА і високим ступенем активності запального процесу, тому ці показники можуть бути використані як маркер агресивності запального процесу та його активності.

3. На тлі медикаментозної та ефективної терапії у хворих на РА відмічалося зменшення концентрації нітратів/нітрітів в сироватці крові, тому показники рівня NOx у крові можуть служити маркером адекватності терапії у даного контингента хворих.

4. Регуляція функціонального стану системи L-аргінін – NO у хворих на РА може виявитися одним із перспективних напрямків підвищення ефективності лікування цього захворювання.

Статистична оцінка одержаних даних проводилася за допомогою пакету програм «Statistica 5.5» з використанням персонального комп’ютера. Для патологічної патології мозга // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 4. – С. 5–10.

3. Виноградов Р.Ф. Антимікробні властивості окису азота та регуляція їх біосинтеза в макроорганізмі // Антибіот. хіміотерапія. – 1998. – № 2. – С. 24–29.

4. Изучение метаболизма оксида азота при системной красной волчанке / Синяченко О.В., Звягина Т.В., Гринь В.К. и др. // Врачеб. Практика. – 2002. – № 2. – С. 42–46.
5. Марков Х.М. О биорегуляторной системе – аргинин – оксид азота // Пат., физ. экспер. терапия. – 2000. – № 1. – С. 34–39.
6. Марков Х.М. Оксид азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул // Успехи физiol. Наук. – 1996. – № 4. – С. 30–43.
7. Петухов В.И. Активные формы кислорода в прогрессировании хронического миелолейкоза: перспективы применения натуральных антиоксидантов // Тер. архив. – 2000. – № 8. – С. 64–67.
8. Ремизова М.И. Роль оксида азота в норме и при патологии // Вестн. Службы крови России. – 2000. – № 2. – С. 53–57.
9. Ткаченко М.М. Оксид азота та судинна регуляція // Журн. АМН України. – 1997. – № 2. – С. 241–254.
10. Cyclic tensile strain acts as an antagonist of IL-1 beta actions in chondrocytes / Xu Z., Buckley M.J., Evans C.H. et al. // J. Immunol. – 2000. – Vol. 165 (1). – P. 453–460.
11. Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjogrens syndrome / Wanchu A., Khullar M., Sud A. et al. // Clin. Rheumatol. – 2000. – Vol. 19 (5). – P. 360–364.
12. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis / Armour K.E., Van'T Hof R.J., Grabovski P.S. et al. // J. Bone Miner. Res. – 1999. – Vol. 14 (12). – P. 2137–2142.
13. Yang Y., Hutchinson P., Morand E.F. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis // Arthr. Rheum. – 1999. – Vol. 42 (7). – P. 1538–1544.
14. Kim H.A., Song Y.W. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis // Arthr. Rheum. – 1999. – Vol. 42 (7). – P. 1528–1537.
15. Lechner F., Schutte A., von Bodungen U. Inducible nitric oxide synthase is expressed in joints of goats in the stage of infection with caprine arthritis encephalitis virus // Clin. Exper. Immunol. – 1999. – Vol. 117 (1). – P. 70–75.
16. Lowenstein C.J., Dinerman J.I., Snyder S.H. Nitric oxide a physiologic messenger // Ann. Int. Med. – 1994. – Vol. 112. – P. 227–237.
17. Moncada S., Hogg A. The L-arginine – nitric oxide pathway // N. Engl. J. Med. – 1993. – Vol. 329. – P. 2002–2012.
18. Nava E., Noll G., Luseher A. Nitric oxide in cardiovascular diseases // Ann. Med. – 1996. – Vol. 27. – P. 343–351.
19. Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus / Wanchu A., Khullar M., Deodhar S.D. et al. // Rheumatol. Int. – 1998. – Vol. 18 (2). – P. 41–43.
20. Salazar F.J., Alberola A., Pinilla J.M. Sait: induced increase in arterial pressure during nitric oxide synthesis inhibition // Hypertension. – 1993. – Vol. 22. – P. 49–557.
21. Stephan B., Purcell W.M., Chander C.L. Colony stimulating factors regulate nitric oxide and prostaglandin E production in rat cartilage chondrocytes // Int. J. Tissue React. – 1999. – Vol. 21 (4). – P. 113–119.
22. Verbugge A., De Clerck L.S., Bridts C.H. Influence of blood and synovial fluid immune complexes of patients with rheumatoid arthritis on production of nitric oxide and growth and viability of chondrocytes // J. Rheumatol. – 2000. – Vol. 27 (1). – P. 35–40.
23. Virdili F., Kobuchl H., Packer L. Procyanidins extracted from Pinus maritima (Pycnogenol) scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism inactivated murine RAW 264,7 macrophages // Free Radical Biol. Med. – 1998. – Vol. 24 (7–8). – P. 1120–1129.

ОКСИД АЗОТА: КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА У ДЕТЕЙ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

И.В. Дудка, Л.И. Омельченко, А.Г. Ципкун, В.Б. Николаенко, О.А. Ошлянская

Резюме. При ревматоидном артите у детей в период обострения заболевания установлено значительное повышение концентрации L-аргинина и продукции метаболитов оксида азота с повышением содержания нитратов/нитритов в крови и моче. Наиболее существенные и значимые изменения концентрации L-аргинина и конечных продуктов метаболизма оксида азота в крови были выявлены у пациентов с системными формами болезни при высокой степени активности воспалительного процесса. При адекватной терапии РА происходит нормализация как клинико-иммунологических параметров, так и уровня нитратов/нитритов в крови, что отражает четкую связь между метаболизмом оксида азота и иммунным ответом организма.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, оксид азота, метаболизм, дети.

NITRIC OXIDE: CLINICAL AND DIAGNOSTIC IMPORTANCE OF METABOLISM'S PARAMETERS IN CHILDREN WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

I.V. Dudka, L.I. Omelchenko, A.H. Zipkun, V.B. Nikolaenko, O.A. Oshljanskaya

Summary. In the aggravation of the rheumatoid arthritis in children there was established a marked increase of the L-arginine's content and production of the nitric oxide metabolites with an increased content of nitrates/nitrites in blood and urine. The most essential and significant content changes of the L-arginine and end-products of the nitric oxides metabolism in blood were revealed in patients with systemic forms of illness at a high degree of the inflammatory process's activity. Adequate therapy of the RA provokes a normalization of the clinical and immunologic parameters, and a level of nitrates/nitrites in the blood. It reflects precise communication between a metabolism of nitrogen oxide and the immune-inflammatory response of the organism.

Key words: rheumatoid arthritis, nitrogen oxide, metabolism, children.