

УДК 616.-612.015:546.172.6.08

ОКСИД АЗОТУ ЯК ЧИННИК, ЩО ВИЗНАЧАЄ ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ СТАН КРОВІ У ХВОРИХ НА СИСТЕМНУ СКЛЕРОДЕРМІЮ

М.В. Єрмолаєва, Т.Б. Бевзенко, Т.В. Звягіна, О.В. Синяченко

Донецький державний медичний університет

Ключові слова: системна склеродермія, оксид азоту, кров, біофізичний стан.

Системній склеродермії (ССД) властивий розвиток дисбалансу білкового обміну, який багато в чому зумовлений розладами біосинтезу макромолекул — різних типів колагенів, протеогліканів, еластину та структурних глікопротеїдів, що спричинює збільшення в крові рівнів глікозаміногліканів і оксипроліну. Це своєю чергою призводить до змін концентрацій низки сурфактантів, котрі порушують стан динамічного поверхневого натягу сироватки крові [9, 17—19]. Доведено велику діагностичну значущість міжфазної (адсорбційної) тензіометрії сироватки крові (вимірювання її поверхневої активності) у хворих на ССД, що дає змогу надійно проводити диференційовану діагностику, прогнозувати перебіг захворювання і контролювати лікувальні заходи [8—10, 12, 14, 18].

Фізико-хімічний стан крові, її реологічні властивості багато в чому визначає система оксиду азоту (NO) [1, 2, 13]. Порушення метаболізму NO відіграють неабияку роль у патогенезі ССД [6, 7, 15]. У високих концентраціях NO виявляє не регуляторну, а цитотоксичну дію, що зумовлює збільшення кількості різних виявів аутоімунного характеру [1, 3]. Нітрування білків за участю NO підвищує їхню антигенність, сприяючи поглибленню патологічного процесу [2].

Мета роботи — оцінка можливих взаємовідношень між параметрами обміну NO і фізико-хімічними властивостями крові (поверхневим натягом, в'язкоеластичністю, релаксацією) у хворих на ССД.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Під спостереженням перебувало 45 жінок і 6 чоловіків з ССД. Вік пацієнтів — $(39,1 \pm 1,65)$ року, тривалість захворювання — $(10,4 \pm 0,93)$ року. Помірний ступінь активності патологічного процесу зауважено у 45,1% хворих, високий — у 15,7%. Пацієнти різної статі практично не відрізнялися між собою за віком і активністю ССД, але хвороба тривала довше у жінок ($S = 6,97$, $P < 0,001$).

У 84,3% хворих виявлено синдром Рейно, у 19,6% — алопецію, у 15,7% — лихоманку, в 82,4% — ура-

ження суглобів (артрит, артралгія), у 74,5% — шкіри, у 62,8% — міокарда (міокардит, міокардіосклероз, міокардіодистрофія), у 56,9% — легень (пневмосклероз), у 52,9% — стравоходу і/або шлунка, у 45,1% — ендокарда і/або клапанів серця, у 43,1% — м'язів (міозит, міалгія), у 33,3% — нирок (гломерулонефрит, нефросклероз), у 31,4% — печінки (гепатит, гепатодистрофія), у 21,6% — центральної нервової системи, у 17,7% — периферичної нервової системи, у 5,9% — перикарда. При цьому спостерігався вплив статі на розвиток клінічних ознак захворювання ($W = 0,379$, $R = 3,817$, $P = 0,001$), зокрема на частоту суглобового ($KW = 7,02$, $P = 0,008$), м'язового ($KW = 9,95$, $P = 0,002$) і легеневого ($KW = 7,37$, $P = 0,007$) синдромів.

Рівень нітритів (кінцевих стабільних продуктів обміну NO) вивчали за методикою L.C. Green et al. [16] у модифікації П.П. Голікова та співавт. [5] з використанням реактиву Гріса. Абсорбцію розчинну вимірювали спектрофотометричним методом («СФ-46», Росія) при довжині хвилі 546 нм. Як стандарт використовували натрію нітрит. Слід зазначити, що через дифузію нітритів із судинного русла в тканини показники концентрації цих аніонів у крові не завжди точно відбивають їхню присутність в організмі. Як відомо, нітрити виводяться з організму переважно (95%) із сечею [20]. Таким чином, величина ниркової екскреції нітритів вказує на кількість NO, синтезованого організмом [4].

Ми досліджували рівень метаболітів нітритів у крові і сечі, їхній кліренс та співвідношення останнього до кліренсу ендогенного креатиніну. Крім того, на автоматичному амінокислотному аналізаторі «ААА339М-Microtechna» (Чехія) вивчали вміст попередника NO — вільної амінокислоти аргініну в плазмі. Концентрацію циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) у плазмі крові, який є вторинним месенджером NO в організмі, визначали за допомогою радіоімунного методу (лічильник «Гамма-800», Україна, набори «Amersham», Велика Британія).

Динамічний поверхневий натяг крові досліджено за допомогою методу максимального тиску в

бульбашці. Використано комп'ютерний адсорбційний тензіометр «MPT2-Lauda» (Німеччина). Результати були представлені у вигляді тензіограм — кривих залежності його від часу (t), на яких комп'ютер визначав точки, що відповідають $t = 0,01$ с (σ_1), $t = 1$ с (σ_2) і $t = 100$ с (σ_3) [9, 10, 14, 19]. Крім того, вивчали кут нахилу кривих тензіограм (λ). Абсолютна похибка вимірів у MPT2 не перевищує 0,5 мН/м, а значною перевагою цього тензіометра є висока швидкість виконання аналізу, повна автоматизація процесу калібрування, тестування, вимірів і розрахунків, комп'ютерна обробка отримуваної інформації.

Для визначення поверхневого натягу на межах рідина—газ або рідина—рідина використовується метод висячої краплі. Аналіз форми вісьсиметричних крапель покладено в основу апарата «ADSA-Toronto» (Канада). Експериментальна похибка вимірів у ньому становить 0,1 мН/м. Основною перевагою ADSA є широкий діапазон вимірів часу формування краплі (10 000 с і більше). Окрім того, за допомогою цього методу можна вивчати у хворих дилатаційні реологічні (механічні) характеристики адсорбційних шарів крові шляхом стрибкоподібної чи гармонійної зміни площі краплі та наступного аналізу зміни поверхневого натягу, а також фазового кута (μ) — кута між амплітудними значеннями деформації. За допомогою ADSA ми оцінювали реологічні властивості крові, що складаються з еластичної частини (яка визначається тільки процесами в моношарі) і в'язкої (пов'язаної із втратою енергії внаслідок релаксаційних процесів на межі розділу або поблизу міжфазної межі) [10, 14, 21, 22]. У наших дослідженнях використано швидку стресову деформацію розширення поверхні (при $t = 12000$ с) з визначенням модуля в'язкоеластичності (ϵ). Після розширення краплі σ_4 (рівноважний або статичний поверхневий натяг при $t \rightarrow \infty$) повільно релаксував, тобто повертався до свого первісного значення. Час релаксації (τ) характеризував здатність моношару відновлювати початковий стан (відбивав кінетику адсорбції з розчину і процеси перебудови станів адсорбованих молекул в умовах майже рівноважного моношару).

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проведено на персональному комп'ютері за допомогою програм «Microsoft Excel», «Stadia.6.1/prof» і «Statistica». Оцінювали середні значення (M), їхні похибки (m), коефіцієнти кореляції (r), критерії Стюдента (S), Вілкоксона (W), Рао (R), Крускала—Уолліса (KW) і достовірність статистичних показників (P).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

У здорових людей вміст нітритів у крові та сечі відповідно становить ($5,06 \pm 0,064$) мкмоль/л та ($5,14 \pm 0,049$) мкмоль/л, їхній кліренс — ($2,04 \pm 0,031$) мл/хв, а співвідношення кліренсу до швидкості клубочкової фільтрації — ($1,93 \pm 0,031$) %. При цьому рівень попередника NO аргініну дорівнює ($6,52 \pm 0,141$) мг/л, а концентрація вторинного месенджеру NO цГМФ — ($11,1 \pm 0,194$) пкмоль/мл.

У хворих на ССД спостерігається збільшення на 4,7% нітритів крові ($S = 2,60$, $P = 0,011$) та зменшення на 21,4% їхнього кліренсу ($S = 4,95$, $P < 0,001$). Спостерігається прямий кореляційний зв'язок параметрів метаболітів NO у крові і сечі ($r = +0,405$, $P = 0,023$). Порівняно зі здоровими людьми, при ССД реєструється зменшення у крові рівнів аргініну на 35,3% ($S = 7,75$, $P < 0,001$) і на 67,4% — цГМФ ($S = 15,0$, $P < 0,001$). З віком показники аргінінемії пригнічуються ще більше ($r = -0,295$, $P = 0,034$).

У хворих на ССД знижуються σ_1 , σ_2 , σ_3 і ϵ на тлі збільшення λ (таблиця). Ці дані свідчать про накопичення в сироватці крові таких пацієнтів низької високомолекулярних речовин білкового, ліпідного і вуглеводного складу, або зменшення поверхнево-інактивних речовин, наприклад, неорганічних електролітів.

На параметри нітритів у крові хворих на ССД впливають синдром Рейно ($KW = 6,31$, $P = 0,012$), ураження перикарда ($KW = 7,54$, $P = 0,006$), легень ($KW = 7,89$, $P = 0,005$) і нирок ($KW = 5,72$, $P = 0,017$), на нітритах в сечі — зміни міокарда ($KW = 8,81$, $P = 0,003$), стравоходу і/або шлунка ($KW = 4,00$, $P = 0,046$), на кліренс нітритів — пропасний синдром ($KW = 6,34$, $P = 0,012$), синдром

Таблиця. Фізико-хімічні показники крові у хворих на ССД та у здорових людей ($M \pm m$)

Показник	Група обстежених		Відмінності у хворих і здорових	
	хворі	здорові	S	P
σ_1 , мН/м	$71,4 \pm 0,21$	$71,9 \pm 0,10$	2,10	0,038
σ_2 , мН/м	$68,3 \pm 0,12$	$69,3 \pm 0,28$	3,33	0,002
σ_3 , мН/м	$56,0 \pm 0,60$	$58,2 \pm 0,25$	3,38	0,002
σ_4 , мН/м	$44,8 \pm 0,62$	$45,4 \pm 0,85$	0,62	0,543
λ , мНм ⁻¹ с ^{1/2}	$23,7 \pm 1,32$	$17,9 \pm 0,64$	3,92	0,001
μ , мНм ⁻¹ с ^{1/2}	$168 \pm 10,0$	$189 \pm 13,7$	1,21	0,231
ϵ , мН/м	$26,9 \pm 0,32$	$33,7 \pm 1,12$	5,87	< 0,001
τ , с	$133 \pm 7,6$	$128 \pm 3,5$	0,61	0,550

Рейно ($KW = 5,57$, $P = 0,018$), розвиток алопеції ($KW = 10,1$, $P = 0,001$), ураження перикарда ($KW = 7,95$, $P = 0,005$), ендокардит або вади клапанів серця ($KW = 17,9$, $P < 0,001$) і нирок ($KW = 4,55$, $P = 0,033$). Спостерігався обернений кореляційний зв'язок параметрів аргініну в крові з тяжкістю ураження периферичної нервової системи ($r = -0,295$, $P = 0,034$).

На нашу думку, вельми важливе практичне значення має факт прямої кореляції між λ і ступенем активності ССД ($r = +0,430$, $P = 0,004$). По-перше, зростання цього фізико-хімічного показника при ССД свідчить про активацію патологічного процесу і є одним із прогнознегативних критеріїв перебігу захворювання, а, по-друге, $\lambda > 28 \text{ мНм}^{-1}\text{с}^{1/2}$ ($> M + 3m$ хворих) вказує на збережену активність захворювання під час патогенетичної терапії, незважаючи на нормалізацію біохімічних й імунологічних тестів.

З показниками міжфазної активності сироватки крові в зоні коротких часів існування поверхні корелюють ступінь тяжкості ураження серця і стравоходу (відповідно $r = -0,513$, $P = 0,001$ і $r = -0,306$, $P = 0,044$). Своєю чергою саме σ_1 має обернений зв'язок з показниками фібриногенемії ($r = -0,635$, $r < 0,001$) та фібрoneктинемії ($r = -0,301$, $P = 0,047$), рівнями імуноглобуліну М ($r = -0,506$, $P = 0,001$) та циркулюючих імунних комплексів в крові ($r = -0,419$, $P = 0,006$).

Вміст нітритів у крові хворих на ССД впливає на фізико-хімічний стан сироватки ($W = 0,288$,

$R = 3,943$, $P < 0,001$). Встановлено високу залежність від метаболітів NO λ ($KW = 8,42$, $P = 0,016$) та ε ($KW = 6,78$, $P = 0,039$). Не виявлено будь-яких кореляційних зв'язків концентрації нітритів у крові з параметрами динамічного поверхневого натягу цієї біологічної рідини. Разом з тим показники метаболітів NO прямо пов'язані з λ ($r = +0,442$, $P = 0,003$), тобто з тим біофізичним показником, який відображає активність захворювання. Слід зазначити, що з рівнями аргініну та цГМФ взаємозалежності параметрів міжфазної тензиометрії немає.

ВИСНОВКИ

При ССД спостерігаються порушення метаболізму NO, які характеризуються підвищенням нітритемії при зниженні рівней аргініну та цГМФ в крові і зумовлені характером клінічного перебігу захворювання. Окрім того, реєструються зрушення фізико-хімічних властивостей крові (пригнічення динамічного поверхневого натягу та в'язкоеластичності), котрі визначаються концентрацією метаболітів NO і залежать від певних вісцеральних виявів ССД. Можна припустити, що корекція зсувів стану метаболізму NO у хворих на ССД сприятиме відновленню фізико-хімічних властивостей крові.

Роботу виконано за підтримки Фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки України.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ванін А.Ф. Оксид азота в біомедицинських дослідженнях // Вестн. Рос. АМН.— 2000.— № 4.— С. 3—5.
2. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга // Вестн. Рос. АМН.— 2000.— № 4.— С. 5—10.
3. Виноградов Н.А. Антимикробные свойства окиси азота и регуляция ее биосинтеза в макроорганизме // Антибиот. химиотер.— 1998.— Т. 43, № 2.— С. 24—29.
4. Виноградов Н.А. Изменение синтеза оксида азота, содержания адренокортикотропного гормона и кортизола в крови при вирусном гепатите В // Клин. мед.— 2001.— Т. 79, № 11.— С. 47—51.
5. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Бюл. exper. биол. мед.— 2000.— № 7.— С. 6—9.
6. Звягина Т.В. Изучение взаимосвязи иммунитета и метаболизма оксида азота при системной склеродермии // Укр. мед. альманах.— 2002.— № 6.— С. 51—53.
7. Звягина Т.В., Гамаюнов И.В., Губанова Е.А. и др. Изменения метаболизма оксида азота при ревматических заболеваниях // Укр. ревматол. журн.— 2002.— Т. 9, № 3.— С. 10—15.
8. Игнатенко Т.С., Белоконь А.М., Егудина Е.Д., Цыганок Т.В. Особенности динамических межфазных тензиограмм биологических жидкостей при системной склеродермии // Арх. клин. exper. мед.— 2000.— Т. 9, № 3.— С. 372—374.
9. Казаков В.Н., Сняченко О.В., Файнерман В.Б., Миллер Р. Динамическое поверхностное натяжение биологических жидкостей в медицине.— Донецк: Из-во медуниверситета, 1997.— 296 с.

10. Казаков В.Н., Сняченко О.В., Игнатенко Г.А. и др. Межфазная тензиометрия биологических жидкостей в терапии.— Донецк: Донеччина, 2003.— 586 с.
11. Ремизова М.И. Роль оксида азота в норме и при патологии // Вестн. службы крови России.— 2000.— № 2.— С. 53—57.
12. Сняченко О.В., Казаков В.М., Егудина Е.Д. и др. Зміни динамічних міжфазних тензиограм крові і сечі при ревматичних захворюваннях // Буковин. мед. вісн.— 2000.— Т. 4, № 1.— С. 126—130.
13. Сняченко О.В., Звягина Т.В. Оксид азота в терапевтической практике.— Донецк: Юго-Восток, 2001.— 257 с.
14. Сняченко О.В., Казаков В.Н., Игнатенко Г.А. и др. Физико-химические свойства биологических жидкостей в ревматологии.— Донецк: Донеччина, 2003.— 386 с.
15. Csernok E., Wang G., Tasts E. Th1 pattern predomance ia Wegener's granulomatosis // Arthr. Rheum.— 1996.— Vol. 39 (Suppl.)— P. 127.
16. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]Nitrate in biological fluids // Analyt. Biochem.— 1982.— Vol. 126.— P. 131—138.
17. Kazakov V.N., Sinyachenko O.V., Trukhin D.B., Pison U. Dynamic interfacial tensiometry of biologic liquids — does it have an impact on medicine // Coll. Surfac.— 1998.— Vol. 143, N 2—3.— P. 441—459.
18. Kazakov V.N., Sinyachenko O.V., Fainerman V.B. et al. Dynamic surface tensiometry in medicine.— Amsterdam: Elsevier, 2000.— 373 p.
19. Kazakov V.N., Vozianov A.F., Sinyachenko O.V. Studies on the application of dynamic surface tensiometry of se-

rum and cerebrospinal liquid for diagnostics and monitoring of treatment in patients who have rheumatic, neurological or oncological diseases // *Adv. Coll. Interf. Sci.*— 2000.— Vol. 86, N 1—2.— P. 1—38.

20. *Kelm M.* Nitric oxide metabolism and breakdown // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1999.— Vol. 1411.— P. 283—279.

21. *Miller R., Sinyachenko O.V., Fainerman V.B.* Dynamic of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at water/fluid interface // *Adv. Coll. Interf. Sci.*— 2000.— Vol. 86, N 1—2.— P. 39—82.

22. *Sinyachenko O.V., Trukhin D.V., Kazakov V.N.* Dynamic surface tension and surface rheology of biological liquids // *Coll. Surf. Biointerf.*— 2001.— Vol. 21.— P. 231—238.

ОКСИД АЗОТА КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

М.В. Ермолаева, Т.Б. Бевзенко, Т.В. Звягина, О.В. Синяченко

При системной склеродермии (ССД) наблюдаются нарушения метаболизма оксида азота, которые характеризуются повышением нитритемии при снижении уровней аргинина и циклического гуанозинмонофосфата в крови и обусловлены характером клинического течения заболевания. Регистрируются сдвиги физико-химических свойств крови (угнетение динамического поверхностного натяжения и вязкоэластичности), определяемые концентрацией метаболитов оксида азота и зависящие от определенных висцеральных проявлений заболевания.

NITRIC OXIDE AS A DETERMINANT OF PHYSICO-CHEMICAL STATE OF BLOOD IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMIA

M.V. Ermolaeva, T.B. Bevzenko, T.V. Zvyagina, O.V. Sinyachenko

Disturbances of nitric oxide metabolism are observed in patients with systemic sclerodermia (SSD). They are characterized by the increase in nitritemia while the decrease of blood arginine and cyclic guanosinmonophosphate levels and determined by the character of clinical course of the disease. Shifts in blood physicochemical properties (suppression of dynamic surface tension and viscosity and elasticity) have been registered. They are determined by nitric oxide metabolites concentration and depend on definite visceral disease manifestations.