

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА НА ФОНЕ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

БЕРДОВСКАЯ А.Н., МАКСИМОВИЧ Н.А.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Резюме. У 38 здоровых и 55 детей и подростков с врожденными пороками сердца выполнен тест с реактивной гиперемией, определены уровни стабильных метаболитов оксида азота, циркулирующих эндотелиальных клеток, состояние окислительных процессов и антиоксидантной защиты. Больные с сердечной недостаточностью имели в крови высокие уровни стабильных метаболитов оксида азота, циркулирующих эндотелиальных клеток, продуктов окислительных процессов и факторов антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: дети и подростки, врожденные пороки сердца, тест с реактивной гиперемией, оксид азота.

Abstract. 38 healthy and 55 children and adolescents with congenital heart diseases, have been tested with reactive hyperemia. The levels of stable metabolites of nitric oxide and of circulating endothelial cells, the condition of oxidation processes and antioxidant protection have been determined as well. Patients with heart failure had high levels of stable nitric oxide metabolites and of circulating endothelial cells; disorders of oxidation processes and antioxidant protection.

Key words: children, adolescents, nitric oxide

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 230009, г.Гродно, ул. Горького, 80, УО «Гродненский государственный медицинский университет», кафедра педиатрии №2 - тел. +375-152-72-25-04. – Бердовская А.Н.

Хроническая сердечная недостаточность (СН) – одна из основных причин инвалидизации и смертности у детей с врожденными пороками сердца (ВПС) в любом возрасте.

Характер и скорость прогрессирования СН во многом зависит от развития компенсаторной гипертрофии миокарда и состояния коллатерального кровообращения тканей. Многие исследователи генез СН связывают с повреждением сосудистой стенки и развитием эндотелиальной дисфункции [1].

Учитывая последнее, патологическим изменениям вазоактивных свойств эндотелия в последние годы придается особое значение, как в формировании, так и в прогрессировании сердечной недостаточности. Структурная перестройка и дилатация отделов сердца, системная вазоконстрикция, сосудистое ремоделирование, повышающее постнагрузку на левый желудочек все чаще расценивают в качестве ключевых звеньев цепи патогенеза СН [6].

Считают, что при хронической СН происходит цитокиновая активация, тесно связанная с нарушением функции эндотелия, тканевой гипоксией, повреждением кардиомиоцитов и эндотоксемией [8].

По некоторым данным и, в частности, согласно гипотезе экстрамиокардиальной продукции цитокинов, дисфункцию эндотелия (ДЭ) со снижением эндотелий зависимой вазодилатации (ЭЗВД) считают пусковым механизмом повышения выработки цитокинов, что приводит к усугублению тканевой гипоксии, увеличению уровня свободных радикалов, повреждению миокарда и снижению сердечного выброса [1].

Полагают, что причинами развития ДЭ являются гемодинамическая перегрузка проводящих артерий, гиперактивация ренин-ангиотензин-альдостероновой и симпатoadреналовой систем, нарушения в рецепторном аппарате эндотелия и снижения продукции в эндотелиоцитах главного вазодилататорного агента – оксида азота.

Принять считать, что наиболее клинически доступными признаками ДЭ являются снижение ЭЗВД и увеличение десквамированных эндотелиоцитов [1].

Вышеизложенные сведения о роли ДЭ в патогенезе развития СН базируются преимущественно на данных, полученных в условиях экспериментов или у взрослых больных с ВПС [8]. У детей с ВПС не изучена роль процессов десквамации эндотелиоцитов, продуктов перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной защиты в развитии ДЭ.

В связи с этим цель работы – выяснение механизмов развития ДЭ у детей с врожденными пороками сердца, сопровождающихся сердечной недостаточностью, путем исследования продукции NO, окислительных, антиоксидантных процессов в организме и степени десквамации эндотелия.

Методы

Под нашим наблюдением находилось 55 детей с естественным течением ВПС (общая группа) и 38 практически здоровых детей (группа сравнения). Из исследования были исключены дети, имеющие легочную гипертензию.

Общая группа больных состояла из 16 детей с ВПС с СН (1-ая подгруппа) и 39 детей с ВПС без СН (2-я подгруппа). Первую подгруппу составили больные с ВПС с обогащением (50%) и с обеднением (6%) малого круга кровообращения, 19% – с обеднением большого круга кровообращения и 25% с более редкими ВПС. Вторую подгруппу составили 56,5% больных с обогащением малого круга кровообращения, 5% – с обеднением малого круга, 15,5% – с обеднением большого круга кровообращения, 23% с более редкими ВПС.

Различий в структуре ВПС между подгруппами установлено не было ($p < 0,005$). В 1-й подгруппе 14 пациентов имели проявления сердечной недостаточности 1 степени и 6 – 2 степени (одышка, увеличение размеров печени и селезенки, отеки). Средний возраст детей основной группы составил $11,7 \pm 3,68$ года (минимальный – 3,8 года и максимальный – 17 лет). Мальчики составили 47%, девочки – 53%.

Подгруппы детей не отличались по возрасту, росту и массе тела ($p > 0,05$).

Исследования проводились на базе клиники педиатрии Гродненского государственного медицинского университета в 5-ом соматическом отделении Гродненской областной детской клинической больницы.

Диагноз ВПС устанавливался путем комплексного клинического обследования больных детей и подростков. На проведение всех исследований было получено информированное согласие от родителей. Верификация диагноза ВПС осуществлялась путем использования ультразвуковых доплеровских аппаратов “Philips” (США) и “Hitachi” (Япония), функциональные свойства эндотелия изучались с помощью реовазографического компьютерного комплекса «Интекард-3 Сигма» (Республики Беларусь), а нарушение процессов проведения и возбуждения на электрокардиографическом трехканальном компьютерном комплексе «Shiller AT-104 PC» (Швейцария).

Степень сердечной недостаточности оценивали клинически согласно классификации Н. Д. Стражеско и В.Х. Василенко в модификации Института сердечно-сосудистой хирургии им А.Н. Бакулева АМН СССР, 1980 г.

Функциональное состояние эндотелия сосудов определяли неинвазивным методом с использованием пробы с реактивной гиперемией по общепринятой методике в модификации [2]. Проба с реактивной гиперемией у всех детей выполнена в условиях реовазографического исследования пульсового кровотока (ПК) по следующей методике.

Оценку ЭЗВД или продукции оксида азота эндотелием осуществляли по максимальному приросту ПК ($\Delta\text{ПК}_{\text{макс}}$) в предплечье в течение первых 1,5 минут периода реактивной гиперемии после восстановления кровотока в плечевой артерии. Длительность окклюзии плечевой артерии в тесте с реактивной гиперемией составляла четыре минуты при уровне систолического артериального давления выше, чем у больного на 50 мм рт. ст.

Суммарная продукция NO в организме оценивалась по концентрации стабильных метаболитов оксида азота [NO]х в плазме крови с использованием реактива Грисса (растворы сульфаниловой кислоты и α -нафтиламина) [7].

Состояние окислительных процессов оценивали по концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ). Состояние антиоксидантной защиты (АОЗ) оценивали по концентрации α -токоферола (α -Т).

Данные показатели изучали в плазме крови и эритроцитах с использованием классических методов. Содержание диеновых конъюгатов оценивали по интенсивности УФ-поглощения конъюгированными диеновыми структурами гидроперекисей липидов спектрофотометрически [5, 9].

Концентрацию оснований Шиффа определяли по интенсивности флуоресценции пектрофлуориметрически [10]. Содержание α -токоферола оценивали по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта [3]. Изменение максимального прироста пульсового кровотока у больных с врожденными пороками сердца показано на рис.1.

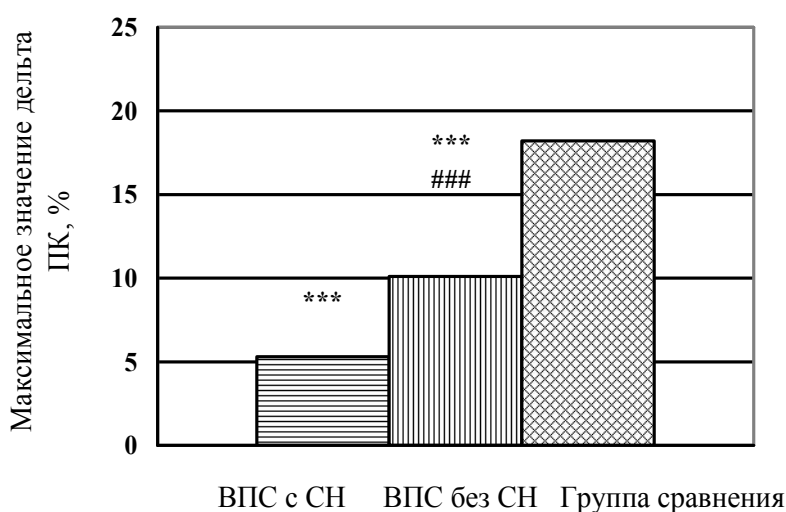


Рис.1. Изменение максимального прироста пульсового кровотока у больных с врожденными пороками сердца.

Условные обозначения: ВПС с СН - 1-я подгруппа больных с ВПС с сердечной недостаточностью; ВПС без СН - 2-я подгруппа больных с ВПС без сердечной недостаточности. *, **, *** - статистически значимые различия показателей с вероятностью ошибки – $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$ для критерия Манна-Уитни, соответственно между 1-й и 2-ой подгруппами и группой сравнения. #, # #, # # # - статистически значимые различия показателей 1 и 2 подгрупп больных с вероятностью ошибки – $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$ для критерия Манна-Уитни

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6,0 с использованием непараметрических методов. Для сравнения независимых выборок применяли тест Манна-Уитни.

Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что у детей с врожденными пороками сердца, имеющих сердечную недостаточность, $\Delta\text{ПК}_{\text{макс}}$ оказался достоверно ниже ($5,31 \pm 2,41\%$) и свидетельствовал о ДЭ, чем у детей с ВПС без СН ($10,1 \pm 3,76\%$ $p < 0,001$) (рисунок 1).

У практически здоровых детей уровень $\Delta\text{ПК}_{\text{макс}}$ составил $18,22 \pm 4,7\%$, что оказалось выше, чем в 1-й ($p < 0,001$) и во 2-й ($p < 0,001$) подгруппах.

В 1 – подгруппе 94% детей имели ДЭ, в то время как во 2-й подгруппе ДЭ обнаружена у 53,8% детей ($p < 0,001$).

Уровень $\Delta\text{ПК}_{\text{макс}}$ у практически здоровых детей оказался в 4 раза выше, чем у детей с ВПС, имеющих СН и в 1,5 раза выше в сравнении с детьми без СН.

Морфологические признаки повышенной десквамации эндотелия оценивали по количеству циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в плазме крови [4]. Метод основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами и последующим осаждением тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата и их микроскопирования

Найденная в общей группе больных отрицательная ассоциация между уровнем $\Delta\text{ПК}_{\text{макс}}$ и степенью СН ($r = -0,58$, $p < 0,001$) подтверждает выявленную закономерность.

Для оценки суммарной продукции NO в организме эндотелия исследован уровень стабильных метаболитов NO в плазме крови больных.

У детей 1-й подгруппы $[NO]_x$ в плазме крови оказалась выше ($59,3 \pm 3,16$ мкмоль/л), чем во 2-й группе ($39,4 \pm 6,25$ мкмоль/л, $p < 0,001$) и группе сравнения ($27,5 \pm 5,88$ мкмоль/л, $p < 0,001$) (рисунок 2).

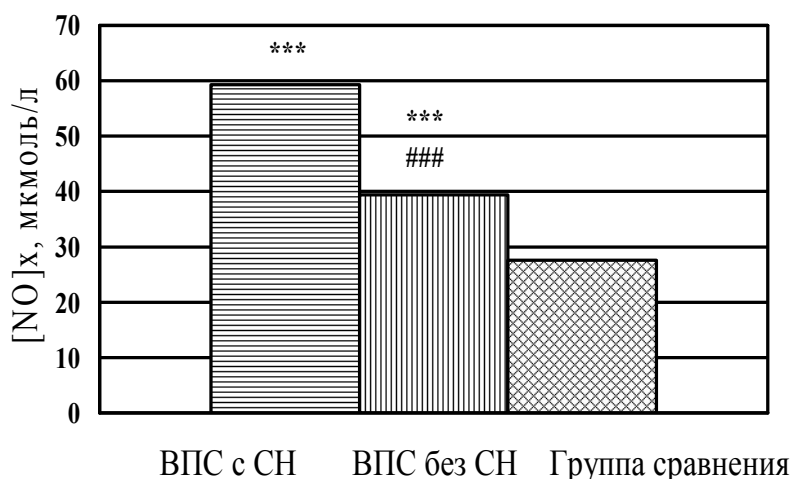


Рис. 2. Уровень стабильных метаболитов оксида азота $[NO]_x$ у детей с врожденными пороками сердца.

Условные обозначения: ВПС с СН – 1-я подгруппа больных с ВПС с сердечной недостаточностью; ВПС без СН – 2-я подгруппа больных с ВПС без сердечной недостаточности. *, **, *** - статистически значимые различия показателей с вероятностью ошибки – $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$ для критерия Манна-Уитни, соответственно между 1-й и 2-ой подгруппами и группой сравнения. #, ##, ### - статистически значимые различия показателей 1 и 2 подгрупп больных с вероятностью ошибки – $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$ для критерия Манна-Уитни.

Полученные данные подтверждают участие оксида азота в формировании СН у данной категории детей, а резкое повышение его уровня в плазме крови у больных с СН может быть связано с повышением активности индуцибельной NO-синтетазы макрофагов, повышением уровня пероксинитрита и угрозой оксидативного стресса [8].

Определение содержания количества ЦЭК в крови больных с ВПС показало, что более значительное их повышение наблюдается в подгруппе детей с СН ($16,9 \pm 1,84 \times 10^4$ /л), по сравнению с практически здоровыми детьми,

($5,0 \pm 1,87 \times 10^4/\text{л}$, $p < 0,001$) и больными 2-й подгруппы ($11,7 \pm 2,20 \times 10^4/\text{л}$, $p < 0,05$) (рисунок 3).

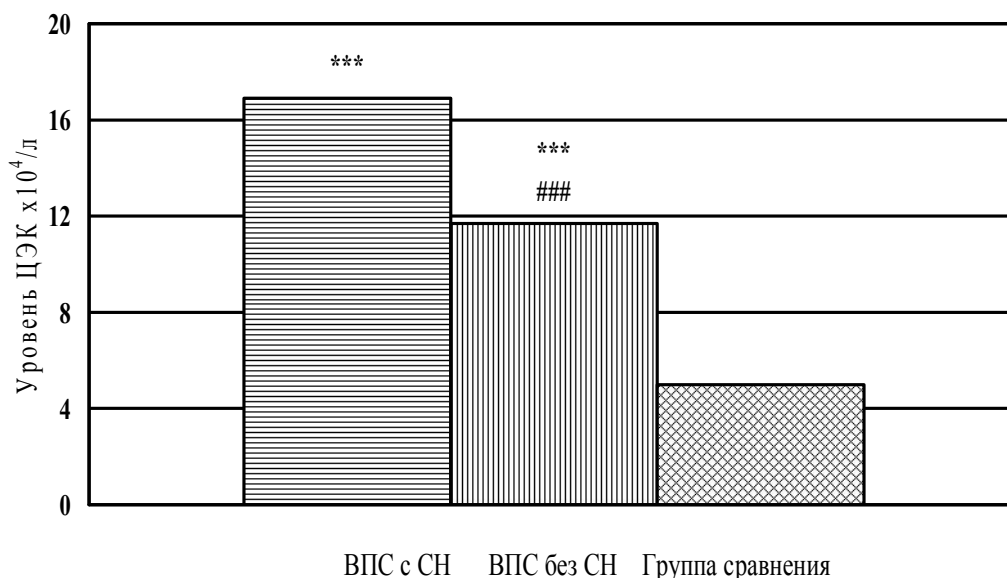


Рис. 3. Концентрация циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) у детей с врожденными пороками сердца.

Условные обозначения: ВПС с СН – 1-я подгруппа больных с ВПС с сердечной недостаточностью; ВПС без СН – 2-я подгруппа больных с ВПС без сердечной недостаточности. *, **, *** – статистически значимые различия показателей с вероятностью ошибки – $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$ для критерия Манна-Уитни, соответственно между 1-й и 2-ой подгруппами и группой сравнения. #, ##, ### – статистически значимые различия показателей 1 и 2 подгрупп больных с вероятностью ошибки – $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$ для критерия Манна-Уитни

В подтверждение вышеизложенному, выявлены отрицательные корреляционные зависимости между степенью $\Delta\text{ПК}_{\text{макс}}$ и уровнем NOx в подгруппах больных с СН ($r = -0,70$; $p < 0,001$) и без СН ($r = -0,49$; $p < 0,001$). Аналогичная закономерность установлена между степенью $\Delta\text{ПК}_{\text{макс}}$ с уровнем ЦЭК в 1-й ($r = -0,79$; $p < 0,001$) и во 2-й ($r = -0,64$; $p < 0,001$), подгруппах больных с ВПС.

Установлено, что у детей с ВПС 1-й подгруппы уровень ДК в плазме крови оказался выше ($4,4 \pm 1,01$ ЕД/мл), чем в подгруппе без СН ($2,2 \pm 0,6$ ЕД/мл, $p < 0,001$). (рисунок 4).

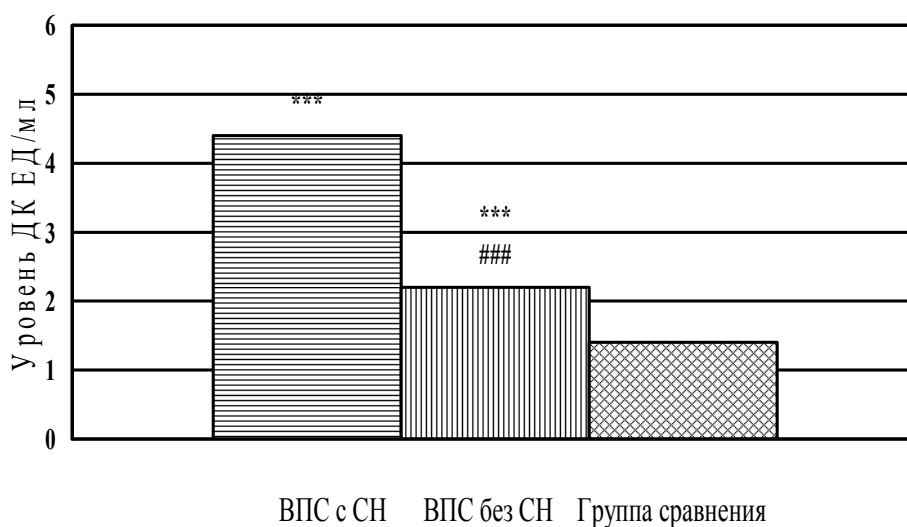


Рис. 4. Уровень диеновых конъюгатов в плазме крови у детей с врожденными пороками сердца.

Условные обозначения: ВПС с СН – 1-я подгруппа больных с ВПС с сердечной недостаточностью; ВПС без СН – 2-я подгруппа больных с ВПС без сердечной недостаточности. *, **, *** – статистически значимые различия показателей с вероятностью ошибки – $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$ для критерия Манна-Уитни, соответственно между 1-й и 2-ой подгруппами и группой сравнения. #, ##, ### – статистически значимые различия показателей 1 и 2 подгрупп больных с вероятностью ошибки – $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$ для критерия Манна-Уитни.

По сравнению со здоровыми детьми ($1,4 \pm 0,41$ ЕД/мл), уровень ДК в плазме крови оказался в 3 раза выше ($p < 0,001$) в 1-й и в 1,5 раза выше во 2-й подгруппах ($p < 0,001$).

Подобная закономерность выявлена при определении ДК в эритроцитах крови между 1-й ($16,8 \pm 1,77$ ЕД/мл) и 2-й ($12,2 \pm 2,80$ ЕД/мл, ($p < 0,05$)) подгруппами, а также между группой сравнения ($5,2 \pm 1,39$ ЕД/мл,) с 1-й ($p < 0,001$) и 2-й ($p < 0,001$) подгруппами.

Уровень оснований Шиффа в плазме крови у детей 1-й подгруппы ($228,5 \pm 63,56$ ЕД/мл) был выше, чем во 2-й подгруппе ($161,2 \pm 65,38$ ЕД/мл, $p < 0,01$). Содержание оснований Шиффа в плазме крови в группе сравнения оказалось ниже ($136,1 \pm 18,70$ ЕД/мл), чем 1-й ($p < 0,001$) и 2-й ($p < 0,001$) подгруппах.

Анализ динамики оснований Шиффа в эритроцитах крови (1-я подгруппа – $430,3 \pm 121,60$ ЕД/мл и 2-я подгруппа – $244,0 \pm 79,34$ ЕД/мл, $p < 0,05$) подтвердил вышеизложенные закономерности. Вследствие чего, уровень ОШ в 1-й подгруппе оказался выше, чем в группе сравнения ($120,07 \pm 15,68$ ЕД/мл, $p < 0,001$) и во 2-й подгруппе ($p < 0,001$).

Содержание α -токоферола в плазме крови составило в 1-й подгруппе – $12,5 \pm 4,11$ мкМ/л и во 2-й – $16,5 \pm 3,44$ мкМ/л, ($p < 0,001$). Уровень α -токоферола в группе сравнения оказался выше ($22,00 \pm 4,09$ мкМ/л), чем в 1-й ($p < 0,001$) и во 2-й ($p < 0,001$) подгруппах. Содержание α -токоферола в эритроцитах крови у больных во 2-й подгруппе было также более высоким ($83,5 \pm 25,33$ мкМ/л), чем в 1-й подгруппе ($65,8 \pm 10,48$ мкМ/л, $p < 0,001$), а в группе сравнения ($110,55 \pm 17,76$ мкМ/л).

Таким образом, показано, что СН при ВПС сопровождается выраженным повышением продукции NO в организме, активацией окислительных процессов, снижением АОЗ, повышением процессов десквамации эндотелия, что приводит к снижению зависимых от эндотелия дилатационных свойств сосудов с формированием патологически сниженной ЭЗВД или ДЭ.

Заключение

У больных с ВПС с СН и без СН по сравнению со здоровыми детьми выявлены патологически высокие уровни продуктов ПОЛ ($p < 0,001$), [NOx] ($p < 0,001$), ЦЭК ($p < 0,001$) и низкие значения показателей АОЗ ($p < 0,001$), ЭЗВД ($p < 0,001$). Наиболее выраженные изменения данных показателей выявлены у больных с СН. В итоге, в подгруппе больных с ВПС с СН выраженное повышение продукции NO, уровня ЦЭК на фоне активации системы ПОЛ и снижения АОЗ сопровождалось развитием ДЭ.

Таким образом, установлено, что на фоне гипоксического состояния у больных с СН наблюдается патологическая депрессия ЭЗВД сосудов. Это приводит к усугублению тканевой гипоксии, повреждению кардиомиоцитов, хронической эндотоксемии, в результате чего в сосудистом русле накапливаются продукты активации NO (пероксинитрит и др.) которые

оказывают дополнительное повреждающее действие на сосудистый эндотелий, приводя к повышению его десквамации и обуславливая формирование порочного круга. Предполагается, что терапевтическими воздействиями на систему «L-аргинин-NO» можно существенно улучшить кровоснабжение органов и тканей, а так же качество предоперационной подготовки и послеоперационной реабилитации больных.

Литература

1. Леонтьева, И. В. Современные представления о лечении сердечной недостаточности у детей / И. В. Леонтьева // Лечащий врач. – 2004. – № 6. – С.40-46.
2. Вильчук, К. У. Методические рекомендации МЗ РБ / К. У. Вильчук, Н. А. Максимович, Н. Е. Максимович. – Гродно, 2001. – 19 с.
3. Одновременное флюорометрическое определение концентрации витаминов Е и А в сыворотке крови / Р. Ч. Черняускене [и др.] // Лабораторное дело. – 1984. – Т. 6. – С. 362-365.
4. Современные экспериментальные методы оценки состояния морфо-функциональных свойств эндотелия / Н. Е. Максимович [и др.] // Журнал ГрГМУ. – 2004. – № 2. – С. 26-30.
5. Костюк, В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Е. Ф. Лунец // Вопросы мед. химии. – 1984. – № 4. – С.125-127.
6. Хоффман, Дж. Детская кардиология / Дж. Хоффман. – М.: Практика, 2006. – С. 114-296.
7. An assay method for nitric oxide-related compounds in whole blood / M. Sonoda [et al.] // Anal. Biochim. – 1997. – Vol. 247, N 2. – P. 417-427.
8. Beynon, J. H. An open, parallel group comparison of quinapril and captopril, when added to diuretic therapy, in the treatment of elderly patients with heart failure / J. H. Beynon, M. S. Pathy // J. Curr. Med. Res. – 1997. – P. 583-592.

9. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research-Elsevier / C. A.Rice-Evans [et al.]. – Amsterdam-London-New York-Tokio: Elsevier, 1991. – 291 p.

10. Fletcher, B. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues / B. L. Fletcher, C. J. Dillard, A. L. Tappel // Anal. Biochem. – 1973. – Vol.52.-N 1. – P. 1-9.