

О.П. Волосовець, член-кореспондент НАМН України, д.м.н., професор, С.П. Кривоустов, д.м.н., професор, Т.С. Мороз, к.м.н., Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця; В.Є. Досенко, д.м.н., Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ

# Ендотеліальна дисфункція як системна патологія у дітей

**Захворювання серцево-судинної системи у дітей залишаються однією з найбільш складних проблем сучасності. Зацікавленість клініцистів проблемою кардіальної патології постійно підтримується незадоволеним недостатньою ефективністю наявних схем лікування на тлі неухильного зростання питомої ваги захворювань серця в дитячій популяції. Доведено, що одним з ланцюгів патогенезу захворювань різних систем організму, у тому числі серцево-судинної системи, є дисфункція ендотелію (Л.Т. Малая, 2002; А. Schiez, M. Kittel, 2003).**

У сучасному розумінні ендотелій судин – це єдиний ендокринний і паракринний орган, який складається в середньому з  $6 \times 10^{23}$  клітин загальною площею до  $1000 \text{ м}^2$  і вагою близько 1,5 кг. Регуляторні функції ендотелію численні, серед них підтримання тону і структури стінки судин, регуляція росту лейоміоцитів, ремоделювання судин, регуляція тромбоутворення і фібринолітичних функцій, участь у запальних та імунних реакціях, регуляція адгезії лейкоцитів і тромбоцитів до його поверхні, регуляція проникності судинної стінки, модуляція окислення ліпідів. Стратегічна анатомічна позиція ендотелію між циркулюючою кров'ю і лейоміоцитами судин зумовлює його здатність сприймати гемодинамічні й гуморальні сигнали з крові. У відповідь на зміни гемодинаміки й гормональні зсуви в ендотелії синтезуються та виділяються біологічно активні речовини, які впливають на його функціональний стан.

Отже, дисфункція ендотелію – це дисбаланс між продукцією вазодилаторів, ангіопротекторів та антипроліферативних факторів (NO, брадикініну, простагліну, натрійуретичного пептиду типу С) і вазоконстрикторів, протромботичних, проліферативних факторів (ендотеліну, супероксид-аніону, тромбоксану А, інгібітора тканинного плазміногену, ангіотензину II). Порушення вазодилатації зумовлює зміну вазомоторного тону, міграцію й інфільтрацію лейкоцитів у стінку судини, ріст і проліферацію лейоміоцитів, посилення впливу прокоагулянтних факторів, збільшення утворення киснезалежних вільних радикалів. Унаслідок цього можуть розвиватися тромбоз, запалення, вазоконстрикція, ремоделювання судин, розрив атеросклеротичної бляшки, що призводить до маніфестації захворювань, у тому числі серцево-судинних.

## Патогенетичні механізми порушення функції ендотелію

Сучасні наукові дослідження доводять патогенетичний зв'язок між дисфункцією ендотелію і розвитком атеросклерозу, артеріальної гіпертензії (АГ), ішемічної хвороби серця, порушеннями серцевого ритму та провідності тощо. Одним з основних факторів розвитку дисфункції ендотелію є оксидативний стрес – надмірна продукція, накопичення у стінці судин і переважання вільних радикалів над антиоксидантами.

Ендотеліальна дисфункція простежується при таких серйозних захворюваннях, як цукровий діабет (ЦД) I типу й АГ, які сьогодні дедалі частіше зустрічаються у дітей і особливо у підлітків.

Наприклад, одним з найпоширеніших ускладнень ЦД є діабетична периферична полінейропатія (ДППН) – дистальна симетрична ураження нервових волокон, переважно в нижніх кінцівках, яке характеризується розвитком атрофії, дегенерації і демієлінізації аксонів.

Патогенез ДППН – мультифакторіальний, і до теперішнього часу він вивчений недостатньо. Відомо, що в основі формування полінейропатії лежать прогресивна демієлінізація й ендоневральна

мікроангіопатія. Сьогодні розглядають дві основні теорії, які пояснюють механізм розвитку ДППН: метаболічну теорію, пов'язану з пошкоджувальною дією хронічної гіперглікемії на нервову тканину, і судинну теорію, яка ґрунтується на ішемії периферичних нервів. Згідно із судинною теорією розвиток ДППН пов'язаний з первинним ураженням інтраневральних судин, що призводить до послаблення кровообігу в нерві і порушення капілярної проникності. Прогресуюче зниження гемодинаміки в периферичних нервах у свою чергу посилює наявні при ДППН метаболічні порушення. У той самий час механізми, за допомогою яких гіперглікемія призводить до зміни судинної стінки, до кінця не вивчені. Вірогідно, що патогенез ДППН пов'язаний з пошкоджувальним впливом гіперглікемії на основну клітинну-мішень – ендотелій судин, який піддається дії високої концентрації глюкози у крові з перших днів розвитку ЦД I типу. Висока сприйнятливості судин до дії гіперглікемії при ЦД зумовлена тим, що ендотеліальні клітини як великих, так і дрібних судин інсулінезалежні, тобто не вимагають присутності інсуліну для транспорту в них глюкози. Тому за наявності гіперглікемії глюкоза може безперешкодно проникати до ендотелію, викликаючи дисфункцію цих клітин, що характеризується дисбалансом між релаксацією і констрикцією, анти- і протромбогенезом, антипроліферацією і проліферацією.

Дані досліджень переконливо свідчать про те, що ендотеліальна дисфункція, яка розвивається у дітей і підлітків із ЦД I типу і характеризується зниженням продукції метаболітів оксиду азоту (NOx) та підвищенням концентрації ендотеліну-1 у сироватці крові, прогресує у міру формування ДППН, супроводжуючись послабленням основного чинника зростання фібробластів (bFGF), що викликає ішемію периферичних нервів, зниження проліферативної і нейропротективної активності ендотеліальних і нервових клітин. У хворих з важким перебігом ДППН відзначають надмірну продукцію метаболітів NOx при одночасному зниженні рівня ET-1 і низькому вмісті bFGF, який зберігається. Це свідчить про виснаження резервних можливостей ендотелію і призводить до структурних дегенеративних змін у периферичних нервах, що може бути критерієм несприятливого перебігу діабетичної полінейропатії. Таким чином, у центрі запуску патологічних реакцій, які призводять до розвитку ДППН, знаходиться пошкоджена клітина ендотелію судин. Безперешкодне проникнення глюкози до ендотеліальних клітин порушує збалансованість продукування ендотелієм вазоактивних чинників і чинників зростання, а також проліферації. Унаслідок цього порушується внутрішньоорганна і тканинна гемодинаміка, активуються процеси проліферації судин і гладком'язових клітин. Отже, ендотеліальна дисфункція відіграє важливу роль у виникненні, розвитку і прогнозі характеру перебігу ДППН у дітей і підлітків.

Відомо, що у клітинах людини метаболізується в середньому близько  $10^{12}$  молекул кисню за добу, при цьому утворюється близько  $3 \cdot 10^9$  молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  за годину. Серед багатьох вільних радикалів найбільше клінічне значення має супероксид-аніон, який утворюється як в ендотелії, так і в адвенції та міоцитах судин і хімічно інактивує NO, що сприяє утворенню потужного оксиданта пероксинітриду й підвищенню тону судин. Вважають, що молекула пероксинітриду здатна сама пошкоджувати клітини та брати участь в окисленні ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ). Крім того, продукти метаболізму пероксинітриду й  $\text{HNO}_2$  ( $\text{NO}^2$ , радикала гідроксилу (OHo) активують фактор В, що викликає експресію молекул адгезії (VCAM-1) і притягування циркулюючих моноцитів до ендотеліальних клітин. Поява на поверхні ендотеліоцитів молекул адгезії призводить до втрати судинною стінкою своїх антиагрегаційних властивостей. При накопиченні вільних радикалів підвищується пероксидація ліпідів, особливо ЛПНЩ, які захоплюються клітинами ендотелію й інгібують NO-залежну релаксацію. Окислені ЛПНЩ сприяють появі ендотеліну-1 і пригнічують активацію NOS. У присутності окислених ЛПНЩ посилюється агрегація й адгезія тромбоцитів, адгезія та міграція лейкоцитів, активується вивільнення цитокінів, молекул адгезії і факторів росту. Ці процеси сприяють розвитку вазоконстрикції, тромбоутворення та проліферації лейоміоцитів, а також їх міграції у внутрішню оболонку.

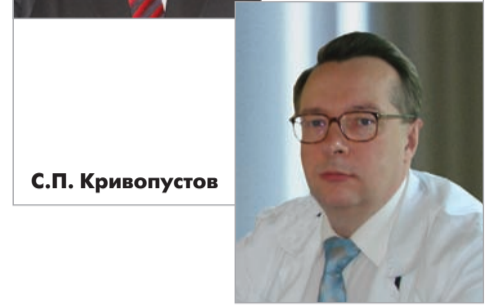
## Методи оцінки стану ендотелію

Функціональний стан ендотелію судин можна оцінити за допомогою кількох методик. Лабораторними маркерами дисфункції ендотелію є метаболіти оксиду азоту ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ), донатори NO (L-аргінін), фракції ферменту NOS та інгібітори NOS, комплекси NO з гемоглобіном, гуанілатциклаза тромбоцитів, тканинний фактор плазміногену та його інгібітор, тромбомодулін, фактор Віллебранда тощо. За допомогою ультразвукового дослідження периферичних судин можна вивчати ендотеліозалежну вазодилатацію (розслаблення судин, пов'язане з виділенням ендотеліальних факторів релаксації) й ендотелінезалежну вазодилатацію (розслаблення судин у відповідь на введення вазоактивних речовин – ацетилхоліну, нітропрусиду натрію).

Поширеним способом визначення ендотеліозалежної вазодилатації є проба з реактивною гіперемією, яку проводять за методикою Целермаєра-Соренсена під час доплерографічного сканування плечової артерії. При цьому вимірюють діаметр і швидкість кровообігу у плечовій артерії під дією механічного стимулу, яким у цьому дослідженні є тимчасова оклюзія артерії з наступним вимірюванням її реакції на гіперемію. Ендотеліозалежну вазодилатацію судини визначають залежно від зміни діаметра плечової артерії до і після оклюзії у відсотках. За даними літератури, існує кореляційний зв'язок між ураженням плечової



О.П. Волосовець



С.П. Кривоустов

артерії та коронарних артерій (К.Е. Sorensen, Т. Neunteufel, 1996). Таким чином, аналізуючи стан плечової артерії, можна опосередковано судити про функціональний стан ендотелію в коронарних артеріях, що відображає метаболічні процеси в міокарді. Отже, проба з реактивною гіперемією дає змогу підвищити ефективність діагностики наявних захворювань серцево-судинної системи у дітей і виявляти ранні ознаки серцево-судинної патології з метою проведення своєчасного лікування і профілактики.

## Механізми впливу оксиду азоту на функцію ендотелію

Відображенням функціонального стану ендотелію вважають молекулу NO. Синтезований в ендотелії NO може діяти як у самій клітині, так і досягати клітин-мішеней за допомогою простої дифузії, легко проходячи крізь водну й ліпідну фази, взаємодіючи з нервовими, гліальними та судинними клітинами. Ефективний радіус дії NO становить 300-1000 мкм.

За нормальних умов молекула оксиду азоту є потужним вазодилатором. Механізм дії NO зумовлений стимуляцією розчинної гуанілатциклази, що призводить до підвищення у клітині цГМФ та активації цГМФ-залежних G-кіназ, кальцієвих АТФаз, інозитол-1,4,5-трифосфату й кальційзалежних калієвих каналів. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах непосмугованої мускулатури при цьому знижується, у результаті чого відбувається розслаблення м'язів судин – вазодилатація. Поряд з цим NO зменшує надходження кальцію до клітин через L-тип кальцієвих каналів. Також можливий інший, цГМФ-незалежний механізм розслаблення лейоміоцитів, пов'язаний з прямим впливом оксиду азоту на білки міоцитів. Було встановлено, що NO шляхом активації внутрішньоклітинних фосфатаз (які відповідають за дефосфорилювання легких ланцюгів міозину) знижує чутливість до кальцію скоротливих білків (рис.).

Крім вазодилаторного ефекту, доведено зв'язок NO з регуляцією синтезу інсуліну й розвитком ЦД внаслідок пошкодження клітин підшлункової залози при вірусній інфекції (К. Fehsel, 1994), роль у регуляції ниркової фільтрації (Р. Aim, В. Carlsson, 1992), а також репаративних процесів у кістковій тканині. У шлунково-кишковому тракті NO впливає на моторику і кровообіг у шлунку, є фактором гастроцитопротекції (С.А. Поленов, 1998), стимулює слизоутворення в кишковому епітелії (J.A. Corbet, 1992). У нервовій системі оксид азоту бере участь у нервово-м'язовій передачі (S.H. Snyder, 1992), формуванні пам'яті, сприйнятті болю, зоровому аналізі, має нейромодуючу активність. В імунній системі NO забезпечує протипухлинний захист, антипатогенні

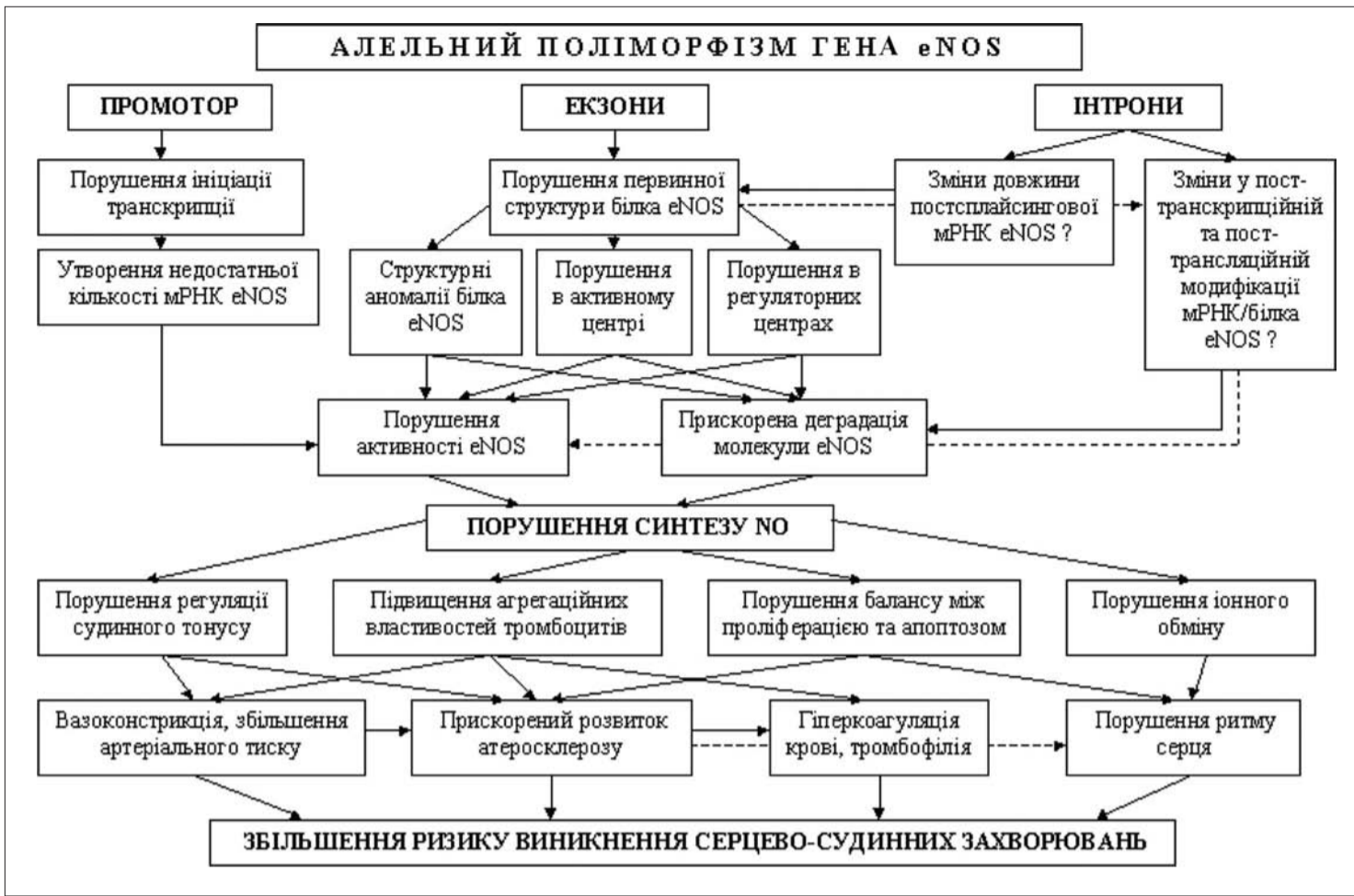


Рис. Патогенетичні механізми, які можуть зумовлювати збільшення ризику виникнення серцево-судинної патології за наявності деяких алельних варіантів ендотеліальної NO-синтази (В.Є. Досенко, 2006)

реакції, реакції відторгнення трансплантата. У респіраторному тракті оксид азоту має бронходилатуючу і бронхопротекторну дію, виражений бактерицидний, противірусний, протигрибковий вплив, покращує мукоциліарний кліренс (О.Є. Абатуров, 2009).

Синтез NO в організмі відбувається з L-аргініну у присутності низки кофакторів і кисню. Для продукції NO необхідні рекордна кількість різноманітних кофакторів – FMN, FAD, BH<sub>4</sub>, кальцій-кальмодуліну та щонайменше три субстрати – аргінін, кисень та NADPH (В.П. Реутов, О.Г. Сорочина, 1998):



Ця реакція каталізується за допомогою трьох основних ізоформ NO-синтази: двох конститутивних – нейрональної та ендотеліальної й однієї індукційної. Усі ізоформи належать до класу гемвісних цитохрому. Конститутивні ізоформи є Ca<sup>2+</sup>-залежними й синтезують NO у невеликій кількості протягом декількох секунд у відповідь на стимул (виділення ацетилхоліну, брадикініну, норадреналіну, ангіотензину II, субстанції P, тромбіну, АТФ, серотоніну). Зміна концентрації внутрішньоклітинного кальцію й кисню та напруження зсуву також активують конститутивну NO-синтазу.

На відміну від конститутивних ізоформ eNOS і nNOS активність iNOS не залежить від рівня кальцію. Вважають, що iNOS утворюється лише при патологічних станах і зумовлює продукцію NO у значно більшій кількості та протягом більш тривалого часу. Сьогодні відомо близько 20 видів клітин, у яких відбувається експресія iNOS, серед них макрофаги, ендотелій і неспецифічні м'язи судин, кардіоміоцити. Встановлено, що iNOS може брати участь у регуляції функції нирок й артеріального тиску. Активність iNOS спостерігається при захворюваннях імунної системи, серцево-судинній патології, злоскісних новоутвореннях, гострих і хронічних запаленнях.

У нормі основна роль у регуляції судинного тону належить eNOS, яку вперше було виявлено в ендотелії судин,

а потім у міокарді, ендокарді, непосмугованій мускулатурі, надниркових залозах, тромбоцитах, нейронах центральної нервової системи, периферичних нервах і деяких інших тканинах. Ендотеліальну фракцію синтази оксиду азоту (eNOS) по праву вважають одним з найважливіших факторів ендогенної кардіопротекції. Зважаючи на те, що саме зміни в системі eNOS-NO розглядають як один з основних маркерів функціонального стану ендотелію, дослідження eNOS є одним із сучасних напрямів, на яких базується профілактична кардіологія. Поряд з методами лабораторної оцінки рівня й активності ферменту eNOS велику увагу приділяють генетичним аспектам.

#### Генетичний вплив на порушення функції ендотелію

Під час досліджень останніх років було встановлено, що ймовірність розвитку й перебіг захворювань, у тому числі серцево-судинних, значною мірою залежать від генотипу хворого, що визначає функціональну спроможність ферментативних систем. Індивідуалізація універсальних механізмів захисту й самопошкодження визначається переважно генетичними варіаціями певних генів – алельним поліморфізмом. Певний набір алельних варіантів генів у деяких випадках зумовлює стійкість індивідуума до певного захворювання, а в інших – схильність до виникнення патології, у тому числі серцево-судинної. Сучасні методи імуногістохімії за допомогою моноклональних антитіл, а також методи гібридизації *in situ* нуклеїнових кислот дали змогу виділити і проклонувати відповідні гени, визначити первинні структури білків і нуклеотидні послідовності ДНК, що сприяло детальному вивченню будови й розподілу eNOS у тканинах і клітинах організму.

Нового поштовху в дослідженнях ролі ендотеліальної NO-синтази в патогенезі серцево-судинної патології надав генетичний аналіз, а саме з'ясування послідовності нуклеотидів у гені eNOS і встановлення декількох варіантів генетичного поліморфізму цього гена. Найважливішими факторами, які визначають ефективність дії ферменту NO-синтази в клітині, є рівень транскрипції

гена, інтенсивність посттрансляційної модифікації і швидкість руйнування протеїну. Усі ці чинники впливають на перебіг серцево-судинних захворювань, у тому числі АГ й ішемічної хвороби серця, а також на розвиток порушень серцевого ритму і провідності. З'ясувати послідовність нуклеотидів у гені eNOS людини вперше вдалося P. Marsden et al. Ці та інші дослідники показали, що ген eNOS розташований на довгому плечі 7-ї хромосоми (7q35-36) і складається з 26 екзонів і 25 інтронів. Загальна кількість пар нуклеотидів – близько 21 тис.

Алельні варіанти гена ендотеліальної фракції оксиду азоту описано як у його промоторі, так і в екзонах та інтронах. Серед 15 алельних варіантів гена eNOS виділено три варіанти поліморфізму, які найчастіше зустрічаються у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями, а отже, є найбільш вагомими факторами ризику розвитку цих хвороб. Це трансверсія T<sup>-786</sup>→C у промоторі гена eNOS, що спричиняє зниження активності eNOS майже на 50% (Nakayama et al., 2000), трансверсія G<sup>894</sup>→T у 7-му екзоні, що призводить до заміни глутаміну на аспарагін у 298-му положенні білка eNOS, яка спричиняє зменшення базальної продукції NO, і тандемі повтори варіабельної кількості 4-го інтрона (4a/4b), що впливає на рівень NO, нітратів і нітритів у плазмі.

Популяційні генетичні дослідження, проведені в різних регіонах світу, вказують на певний взаємозв'язок між наявністю тих чи інших алелів у геномі і схильністю до ішемічної хвороби серця, АГ, порушень мозкового кровообігу й інших серцево-судинних захворювань. Так, за даними S. Erbs, Y. Baither et al., T<sup>-786</sup>→C поліморфізм можна вважати незалежним предиктором розвитку спазму коронарних артерій, тоді як G<sup>894</sup>→T поліморфізм асоціюється з розвитком коронарнопозитивного інфаркту міокарда, гіпертонічної хвороби й дисфункції ендотелію в осіб молодого віку, особливо у тих, хто палить. Більше того, поліморфізм у 7-му екзоні є встановленим маркером виникнення інфаркту міокарда в молодому віці. В.Є. Досенко, М.В. Хайтович у своїх дослідженнях довели зв'язок зазначеного поліморфізму з розвитком АГ у дітей. Сучасні

дослідження вказують на значне зниження ендотеліальної вазодилатації у відповідь на введення ацетилхоліну, гомозигот за G<sup>894</sup>→T алелем порівняно з гетерозиготами. Існують дані щодо впливу eNOS G<sup>894</sup>→T поліморфізму у матері, яка палить, на розвиток уроджених вад серця у дітей (I.M. van Beynum et al., 2002).

Стосовно розвитку порушень серцевого ритму і провідності відомо, що eNOS регулює кальцеві канали L-типу, які забезпечують підтримання нормального синусового ритму, і модулює скоротливість кардіоміоцитів. Експериментальні дані доводять, що оксид азоту, діючи як нейротрансмітер, збільшує активність n. vagus і пригнічує активність симпатичного відділу вегетативної нервової системи (C. Fatini et al., 2006). eNOS виявляють у нервових волокнах, які іннервують синоатриальний і атріовентрикулярний вузли. Таким чином, зменшення активності eNOS може спричинити виникнення нотопних порушень серцевого ритму. Кардіопротекторний і антиаритмічний ефект NO зумовлений модуляцією цАМФ-ефектів. Зменшення рівня NO призводить до виникнення серцевих дизритмій унаслідок збільшення кальцевого потоку. Не виключено, що вплив NO на ритм серця зумовлений центральними ефектами цієї молекули. У роботах C. Fatini et al. (2006) продемонстровано зв'язок мутацій у гені eNOS з розвитком гетеротопних порушень серцевого ритму, а саме неклапанної фібриляції передсердь.

A. Rakhit et al. (2001) провели електрофізіологічні дослідження на мишах з нокаутним геном eNOS і виявили, що частота виникнення аритмій (порушень провідності, тахікардії, фібриляції передсердь, підвищення ектопічної активності вентрикулярних кардіоміоцитів) у цих тварин значно підвищується. Кардіоміоцити, ізольовані від тварин, дефіцитних за геном eNOS, проявляють підвищену здатність до тригерної активності. У мишей, дефіцитних за геном eNOS, також спостерігається АГ, але до неї приєднуються інсулінова резистентність і гіперліпемія. Гіперекспресія eNOS у клітинах центральної нервової системи спричиняє виражену брадикардію, яка пов'язана з виділенням гамма-амінобутирату. У будь-якому разі порушення продукції NO призводить до аритмій.

Доведено, що поліморфізм у промоторі eNOS призводить до зменшення транскрипції цього гена і, як наслідок, утворення недостатньої кількості молекул eNOS, яких не вистачає для синтезу додаткової кількості оксиду азоту в умовах оксидативного стресу. У результаті цього судини розширюються менше, адгезія й агрегація тромбоцитів не вдається попередити, а інші механізми ангіо- й кардіопротекторної дії монооксиду азоту виявляються недостатніми. Отже, дефіцит оксиду азоту призводить до порушення судинного тону з розвитком вазоконстрикції, збільшення агрегації тромбоцитів, проліферативних змін у судинній стінці, активації прозапальних цитокінів.

#### Висновки

Таким чином, ендотеліальна дисфункція у сучасному розумінні – це не лише патологія стінки судин, а й глибока та складно організована система порушень, яка бере початок на молекулярно-генетичному рівні. Подальші дослідження ендотеліальної дисфункції мають стимулювати пошук нових напрямів у лікуванні та профілактиці серцево-судинних захворювань.