

*Eugenia Murawska, Zofia Szychowska, Barbara Trębusiewicz**

TLENEK AZOTU (NO) W ZAPALENIU OPON MÓZGOWO-RDZENIOWYCH U DZIECI

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Wiekii Dziecięcego
Akademii Medycznej we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. med. Z. Rudkowski

* Zakład Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. J. Molenda

U dzieci w przebiegu bakteryjnego zapalenia opon m.-rdz., w przeciwieństwie do wirusowego, stwierdzono podwyższone poziomy tlenku azotu w płynie m.-rdz., (PMR) oznaczając stężenia azotynów i azotanów (stabilnych metabolitów NO). Tlenek azotu uczestniczy w procesie zapalnym w ośrodkowym układzie nerwowym i być może w wywołaniu uszkodzeń tkanki nerwowej. Wspomagające leczenie deksametazonem normalizuje poziomy tlenku azotu w płynie m.-rdz.

Tlenek azotu (NO) syntetyzowany jest w trakcie przemiany L-argininy w L-cytrulinę, w szlaku zwanym szlakiem L-arginina – tlenek azotu (3, 8, 9, 16). Przemiana L-argininy do NO odbywa się poprzez oksydację terminalnego atomu azotu w ugrupowaniu guaninowym i jest katalizowana przez rodzinę enzymów – syntazy tlenku azotu przy współdziałaniu kofaktorów: NADPH, FAD, tetrahydrobiopteryny i kalmoduliny (8,11,16). NO powstaje zarówno w stanach fizjologicznych działając na układ naczyniowo-sercowy i nerwowy oraz w stanach patologicznych, jak stany zapalne czy wstrząs septyczny (8). W trakcie procesów zapalnych produkcja NO zachodzi w fagocytach. Komórki te produkują m.in. toksyczne rodniki tlenowe, jak i azotowe, które reagując ze sobą umożliwiają powstawanie innych rodników (np. nadtlendioazotanu- ONOO^-), blokujących enzymy cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego (wg 1,4). Z nadtlendioazotanu powstają stabilne metabolity – azotyny i azotany (1, 8). W sytuacji blokady enzymów oddechowych w komórce zmniejsza się zużycie tlenu i wzrasta beztlenowy metabolizm mający miejsce na przykład w ropnym zapaleniu opon m.-rdz. (6, 14). Ponadto badania in vitro wykazały, że NO wywiera działanie toksyczne wobec komórek śródbłonkowych i neuronów, zatem może uczestniczyć w wywołaniu neurologicznych powikłań ropnego zapalenia opon m.-rdz. Celem obecnej pracy jest zbadanie zachowania się NO w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) podczas bakteryjnego i wirusowego zapalenia opon m.-rdz. u dzieci, a także ocena wpływu przeciwzapalnego leczenia deksametazonem na produkcję NO w płynie m.-rdz. dzieci chorych na ropne zapalenie opon m.-rdz.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto łącznie 151 dzieci. Przebadano 27 dzieci chorych na bakteryjne (ropne) zapalenie opon m.-rdz. (r.z.o.) w wieku od 1 miesiąca do 4 lat. W 15 przypadkach, co stanowiło 55,6% ogólnej liczby pacjentów z r.z.o., ustalono czynnik etiologiczny: *Neisseria meningitidis* stwierdzono u 8 dzieci (53,3%), *Haemophilus influenzae* u 4 (26,7%), *Streptococcus pneumoniae* u 2 (13,3%), *Escherichia coli* u 1 dziecka (6,7%). Wśród surowicznych zapaleń opon wyróżniono grupę świnkowego i enterowirusowego (ECHO-30) zapalenia opon m.-rdz. Do grupy świnkowego zapalenia opon zakwalifikowano 50 pacjentów w wieku od 11 miesięcy do 13 lat. Do grupy enterowirusowego zapalenia opon m.-rdz. zakwalifikowano 23 dzieci w wieku od 1 miesiąca do 7 lat. Grupę kontrolną stanowiło 51 pacjentów w wieku od 1 miesiąca do 13 lat. Były to dzieci chore na różne choroby gorączkowe, u których wykluczono zapalenie opon m.-rdz. na podstawie badania płynu m.-rdz. PMR do badań pobierano przez nakłucie lędźwiowe przy okazji badań diagnostycznych (w momencie przyjęcia dziecka do kliniki) i kontrolnych. W przypadkach r.z.o. wykonywano zwykle 2 nakłucia kontrolne: po 24–48 godzinach leczenia oraz przed zakończeniem leczenia (około 10 dnia choroby). U dzieci z wirusowym z.o. wykonywano tylko jedno kontrolne nakłucie lędźwiowe w okresie zdrowienia. Dzieci zakwalifikowane do badań przy przyjęciu do kliniki nie były leczone antybiotykami dożylnymi ani sterydami kory nadnerczy. U 10 dzieci zastosowano leczenie deksametazonem w sposób zalecany w Europie przez Schaada i wsp. (12) w dawce 0,4 mg/kg m.c./dawkę, 2 razy dziennie przez 2 dni, przy czym pierwszą dawkę sterydu podawano co najmniej 10 min. przed pierwszą dawką antybiotyku. Stężenie azotynów oznaczano zmodyfikowaną metodą Griessa (7), natomiast azotanów metodą opisaną przez Tyszkiewicz (15). W pracy użyto sformułowań: całkowite stężenie azotynów, tj. suma azotynów i azotanów w przeliczeniu na azotyn sodu (NaNO_2) w próbce po redukcji kadmem; aktualne stężenie azotynów – stężenie azotynów w próbce bez redukcji kadmem; oraz stężenie azotanów – różnica stężeń azotynów całkowitych i aktualnych w przeliczeniu na azotan sodu (NaNO_3). Płyn m.-rdz. (pleocytozę, stężenie białka i glukozy) badano rutynowymi metodami laboratoryjnymi.

WYNIKI

Wyniki przedstawiono w tabelach I–IV. Średnie stężenia azotynów aktualnych, całkowitych oraz azotanów w PMR były istotnie wyższe we wszystkich okresach r.z.o. w porównaniu z grupą kontrolną. Najwyższe wartości ww. parametrów obserwowano na początku r.z.o. (tab. I). Średnie stężenia azotynów aktualnych, całkowitych oraz azotanów na początku i w okresie zdrowienia świnkowego i enterowirusowego z.o. nie różniły się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną (tab. II i III). Stężenia azotynów aktualnych, całkowitych i azotanów były istotnie wyższe w PMR na początku r.z.o. w porównaniu z początkiem wirusowego-świnkowego i enterowirusowego zapalenia opon m.-rdz. łącznie ($p < 0,01$, test Wilcoxon). Na początku ropnych z.o. u 10/21 (48%) pacjentów całkowite stężenie azotynów przekraczało górną granicę przyjętej normy dla grupy kontrolnej ($4,15 \mu\text{mol/l}$), określonej jako wartość

Tabela I. Wyniki oznaczeń całkowitych i aktualnych stężeń azotynów oraz azotanów w PMR pacjentów z ropnym z.o. na początku choroby (R1), po 24–48 godzinach leczenia (R2) i w okresie zdrowienia (R3) oraz w grupie kontrolnej.

Parametr	R1	R2	R3	Kontrola	Istotność statystyczna
NO₂- całkowite					
x	7,72	2,15	2,43	1,39	R1: K - p < 0,01*
SD	6,78	1,45	1,19	1,38	R2: K - p < 0,01*
M	3,67	1,88	2,17	1,25	R3: K - p < 0,01*
n	21	21	22	29	R1: R2 - p = 0,031*
(μmol/L) zakres	0,83–18,21	0,00–6,79	1,25–6,30	0,00–5,25	R1: R3 - p < 0,01*
					R2: R3 - n.i.s.
NO₂- aktualne					
x	1,24	0,72	1,15	0,16	R1: K - p < 0,01*
SD	1,33	0,61	0,75	0,38	R2: K - p < 0,01*
M	0,83	0,86	1,29	–	R3: K - p < 0,01*
n	21	21	22	29	R1: R2 - n.i.s.
(μmol/L) zakres	0,00–4,09	0,00–1,44	0,00–2,86	0,00–1,47	R1: R3 - n.i.s.
					R2: R3 - p = 0,055*
NO₃-					
x	6,73	1,47	1,27	1,22	R1: K - p < 0,01*
SD	6,28	1,55	0,93	1,40	R2: K - n.i.s.
M	4,68	0,99	1,12	1,11	R3: K - n.i.s.
n	21	21	22	29	R1: R2 - p = 0,023*
(μmol/L) zakres	0,00–15,74	0,00–6,78	0,00–4,07	0,00–5,24	R1: R3 - p = 0,025*
					R2: R3 - n.i.s.

x – średnia, SD – odchylenie standardowe, M – mediana, n – liczebność grupy,
n.i.s. – różnice nieistotne statystycznie, * test Wilcozona

Tabela II. Wyniki oznaczeń całkowitych i aktualnych stężeń azotynów oraz azotanów w PMR pacjentów ze świnkowym z.o. na początku choroby (Ś1) i w okresie zdrowienia (Ś2).

Parametr	Ś1	Ś2	Kontrola	Istotność statystyczna
NO₂- całkowite				
x	1,74	1,66	1,39	Ś1: K - n.i.s.
SD	1,53	1,96	1,38	Ś2: K - n.i.s.
M	1,55	1,44	1,25	Ś1: Ś2 - n.i.s.
n	42	30	29	
(μmol/L) zakres	0,00–7,61	0,00–10,60	0,00–5,25	
NO₂- aktualne				
x	0,29	0,19	0,16	Ś1: K - n.i.s.
SD	0,35	0,34	0,38	Ś2: K - n.i.s.
M	–	–	–	Ś1: Ś2 - n.i.s.
n	42	30	29	
(μmol/L) zakres	0,00–0,92	0,00–1,11	0,00–1,47	
NO₃-				
x	1,48	1,47	1,22	Ś1: K - n.i.s.
SD	1,55	1,98	1,40	Ś2: K - n.i.s.
M	1,31	1,24	1,11	Ś1: Ś2 - n.i.s.
n	42	30	29	
(μmol/L) zakres	0,00–7,60	0,00–10,58	0,00–5,24	

x – średnia, SD – odchylenie standardowe, M – mediana, n – liczebność grupy

Tabela III. Wyniki oznaczeń całkowitych i aktualnych stężeń azotynów oraz azotanów w PMR chorych z enterowirusowym z.o. na początku choroby (W1) i w okresie zdrowienia (W2)

Parametr	W1	W2	Kontrola	Istotność statystyczna
NO ₂ - całkowite				
x	0,98	1,36	1,39	W1:K - n.i.s.
SD	0,63	0,66	1,38	W2:K - n.i.s.
M	1,25	1,40	1,25	W1:W2 - n.i.s.
n	21	10	29	
(μmol/L) zakres	0,00-1,74	0,00-2,72	0,00-5,25	
NO ₂ - aktualne				
x	0,37	0,47	0,16	W1:K - n.i.s.
SD	0,40	0,41	0,38	W2:K - n.i.s.
M	-	0,71	-	W1:W2=0,066*
n	21	10	29	
(μmol/L) zakres	0,00-0,83	0,00-0,89	0,00-1,47	
NO ₃ -				
x	0,60	0,89	1,22	W1:K - n.i.s.
SD	0,52	0,79	1,40	W2:K - n.i.s.
M	0,50	0,73	1,11	W1:W2 - n.i.s.
n	21	10	29	
(μmol/L) zakres	0,00-1,52	0,00-2,71	0,00-5,24	

x - wartość średnia parametru, SD - odchylenie standardowe, M - mediana, n - liczebność grupy
n.i.s. - różnice nieistotne statystycznie, * test Wilcoxona

Tabela IV. Wyniki oznaczeń aktualnych stężeń azotynów w PMR w 2 okresie r.z.o. u dzieci leczonych i nie leczonych deksametazonem

Parametr	Leczeni	Nie leczeni	Kontrola	Istotność różnic
NO ₂ - aktualne x	0,18	0,99	0,16	
SD	0,46	0,48	0,38	L:N - p < 0,01*
M	-	1,21	-	L:K - n.i.s.
n	7	14	29	N:K - p < 0,01*
(μmol/L) zakres	0,00-1,23	0,00-1,44	0,00-1,47	

x - średnia, SD - odchylenie standardowe, M - mediana, n - liczebność grupy, n.i.s. - różnice nieistotne statystycznie, * test Wilcoxona

średnia plus 2 SD; w grupie świnkowego z.o. 4/42 (9,5%), a w grupie enterowirusowego 0/23 (0%) pacjentów (p < 0,01, test Chi-kwadrat). Całkowite stężenia azotynów i azotanów w PMR w świnkowym z.o. były istotnie wyższe niż w enterowirusowym (p < 0,01, p = 0,01, test Wilcoxona). W 2 dniu choroby u pacjentów z r.z.o. leczonych deksametazonem średnie aktualne stężenie azotynów było istotnie niższe od jego stężenia w PMR dzieci nie leczonych (tab. IV). Ponadto zaobserwowano korelację między leczeniem deksametazonem a aktualnym stężeniem azo-

tynów ($r=0,54$, $p=0,026$). Całkowite stężenia azotynów w PMR na początku r.z.o. korelowały dodatnio z pleocytozą ($r=0,39$, $p<0,01$) i stężeniem białka w płynie m.-rdz. ($r=0,37$, $p<0,01$); stężeniem CRP w surowicy ($r=0,71$, $p=0,024$), odsetkiem α_1 -globulin ($r=0,66$, $p=0,037$) i α_2 -globulin ($r=0,80$, $p=0,011$). W całej grupie pacjentów z zapaleniem opon m.-rdz na początku choroby wykazano statystycznie istotną dodatnią korelację aktualnego stężenia azotynów z pleocytozą ($r=0,31$, $p<0,01$), odsetkiem granulocytów w rozmazie płynu m.-rdz. ($r=0,33$, $p<0,01$), stężeniem białka w PMR ($r=0,29$, $p<0,01$). Wykazano również ujemną korelację ($r=-0,39$, $p<0,01$) między aktualnym stężeniem azotynów a stężeniem glukozy w PMR na końcu zapalenia opon m.-rdz.

OMÓWIENIE

Przybývá danych, że NO odgrywa rolę w patofizjologii wielu zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego (5, 8, 9). Hamuje on procesy oddychania komórkowego i blokuje tlenowy metabolizm komórki. Z badań na zwierzęcych modelach r.z.o., wykorzystujących inhibitory wzbudzonej formy syntazy tlenku azotu (iNOS) (L-nitrozoargininę, ester metylowy N^G-nitro-L-argininy, N^G-monometylo-L-argininę) wynika, że inhibitory te zapobiegają obrzękowi mózgu, wzrostowi wewnątrzczaszkowego ciśnienia i zwiększają mózgowy przepływ krwi (5, 14), co wskazuje na rolę NO w wywołaniu tych niekorzystnych zjawisk patofizjologicznych w r.z.o. W obecnej pracy wykazano statystycznie istotnie wyższe stężenie azotynów i azotanów w PMR u dzieci na początku r.z.o. w porównaniu z zapaleniem surowiczym i grupą kontrolną. Obserwacja ta jest zgodna z nielicznymi danymi z piśmiennictwa (6, 9). Przyczyną wzrostu azotynów w PMR w r.z.o. jest miejscowe tworzenie się NO w przebiegu procesu zapalnego. W procesie tym uczestniczą cytokiny – najprawdopodobniej czynnik nekrotyzujący guzy (TNF α). Kornelisse i wsp. (6) wykazali dodatnią korelację azotynów w PMR z TNF α w PMR u dzieci z r.z.o. ($r=0,59$, $p<0,002$). Przypuszcza się, że NO odgrywa rolę w interakcji leukocyt – endotelium ułatwiając przyleganie i przechodzenie leukocytów przez śródbłónki. W badaniach eksperymentalnych udowodniono, że inhibitory iNOS modulują migrację leukocytów i osłabiają ich chemotaksję, a także w znacznym stopniu zmniejszają pleocytozę (5). W naszych badaniach na związek lokalnej produkcji NO z miejscowym procesem zapalnym wskazuje dodatnia korelacja azotynów całkowitych z pleocytozą, stężeniem białka i odsetkiem segmentów w PMR na początku wszystkich z.o., a także dodatnia korelacja azotynów w PMR na początku r.z.o. ze stężeniem CRP i α -globulinami we krwi. Wiadomo, że synteza CRP i innych białek ostrej fazy, które w elektroforezie wędrują z różnymi frakcjami globulin, zachodzi w wątrobie pod wpływem interleukiny-1 (IL-1), IL-6 i innych cytokin, których stężenie, szczególnie w płynie m.-rdz. wzrasta w r.z.o. Kornelisse i wsp. (6) wykazali ujemną korelację pomiędzy stężeniem azotynów a glukozy w PMR dzieci na początku r.z.o., sugerując związek NO tworzonego pod wpływem syntazy iNOS z betlenową glikolizą. Efektem beztlenowej glikolizy w stanie niedotlenienia mózgu jest spadek stężenia glukozy w PMR w r.z.o. i wzrost stężenia kwasu mlekowego. We własnych badaniach stwierdzono ujemną korelację stężenia azotynów ze stężeniem glukozy w PMR na końcu zapalenia opon m.-rdz.

W świnkowym z.o. stężenia glukozy bywają również obniżone (13), co wykazano także w obecnej pracy. Ponieważ całkowite stężenia azotynów w PMR w świnkowym z.o. były istotnie wyższe niż w enterowirusowym, przy niższym stężeniu glukozy, można wnioskować, że NO odgrywa rolę w obniżeniu glukozy w PMR w zapaleniach opon. *Baydoun* i wsp. (2) prowadząc badania na zaktywowanych przez LPS i IFN γ makrofagach wykazali, że deksametazon i hydrokortyzon hamują powstawanie azotynów w tych komórkach, nie zmieniając stężenia i transportu komórkowego L-argininy. Doświadczenie to potwierdziło, że glikokortykoidy są inhibitorami syntazy NO. Działają one prawdopodobnie na poziomie transkrypcji mRNA tego enzymu (11). W naszych badaniach wśród pacjentów z r.z.o. poddanych leczeniu deksametazonem obserwowaliśmy istotnie niższe aktualne stężenia azotynów w PMR po 24–48 godzinach leczenia w porównaniu do pacjentów nie leczonych deksametazonem. Stężenie aktualnych azotynów w PMR również wysoko korelowało z leczeniem deksametazonem, co wskazuje na hamowanie iNOS przez glikokortykosterydy. Leczenie deksametazonem w sposób zalecany przez *Schaada* i wsp. (12), wskazuje na jego pozytywną rolę w działaniu hamującym potencjalnie szkodliwy efekt nadmiernej aktywności prozapalnej tlenku azotu, a więc w łagodzeniu stanu zapalnego w ropnym z.o. U wszystkich badanych dzieci przebieg r.z.o. był łagodny i bez powikłań. Grupa r.z.o. była stosunkowo mało liczebna, zatem nie udało się nam potwierdzić niekorzystnej roli tlenku azotu w patogenezie następstw r.z.o., wynikających z uszkodzenia tkanki nerwowej w przebiegu nadmiernie nasilonego procesu zapalnego opon m.-rdz. Z własnych badań wynika, że oznaczanie azotynów może mieć znaczenie w różnicowaniu ropnego z.o. od surowiczego.

WNIOSKI

1. U dzieci w przebiegu bakteryjnego zapalenia opon m.-rdz., dochodzi do wzmożonej produkcji tlenku azotu w PMR (co wykazano badaniem stężeń stabilnych metabolitów NO – azotynów i azotanów). Tlenek azotu uczestniczy w procesie zapalnym w ośrodkowym układzie nerwowym i być może w wywołaniu uszkodzeń tkanki nerwowej.

2. Wspomagające leczenie deksametazonem według schematu europejskiego (zastosowane 10 min. przed pierwszą dawką dożylnego antybiotyku, w dawce 0,4 mg/kg co 12 godz. przez 2 dni) normalizuje stężenie NO w PMR po 24–48 godzinach leczenia. Wskazuje to na pozytywną rolę deksametazonu stosowanego wg powyższego schematu w działaniu hamującym potencjalnie szkodliwy efekt prozapalny NO w r.z.o.

3. W wirusowym zapaleniu opon nie dochodzi do wzrostu produkcji tlenku azotu w płynie m.-rdz.

4. Oznaczanie azotynów i azotanów w płynie m.-rdz. może być pomocne w różnicowaniu ropnych zapaleń opon m.-rdz. od wirusowych.

E. Murawska, Z. Szychowska, B. Trębasiewicz

NITRIC OXIDE (NO) LEVELS IN THE CEREBRO-SPINAL FLUID OF CHILDREN SUFFERING FROM BACTERIAL AND VIRAL MENINGITIS

SUMMARY

Twenty seven children with a documented bacterial (BM)-, 73 with viral (mumps and enteroviral) meningitis and 51 controls were included. CSF white blood cell counts, glucose and protein concentrations were determined routinely. CSF nitrite and nitrate levels (the stable degradation product of NO) were determined by a modified Griess reaction. The mean \pm SD levels of nitrite and nitrate in CSF on admission were higher in patients with BM in comparison with controls and in children with viral meningitis. In 10 patients dexamethasone therapy was started about 10 minutes before the first antibiotic dose and given every 12 hours of 0,4 mg/kg for 2 days. At 24 to 48 hours those who received dexamethasone therapy had a significantly lower mean \pm SD CSF nitrite concentration compared with that in non-steroid treated patients. In all patients with meningitis a significant positive correlation was found between CSF nitrite and CSF granulocyte counts and also CSF protein concentration. Increased production of NO in the CSF compartment during the acute phase of BM may contribute to the inflammatory process and tissue injury. Dexamethasone therapy administered before the first parenteral antibiotic dose reduces the production of NO in the CSF during BM.

PIŚMIENICTWO

1. *Austyn J.M., Wood K.J.*: Cellular cytotoxicity. W Principles of cellular and molecular immunology. Oxford University Press Inc., New York 1994, 608. – 2. *Baydoun A.R., Bogle G., Pearson J.D.*, i wsp.: Br. J. Pharmacol., 1993, 110, 1401. – 3. *Bidri M., Becherel P.A., Le Goff L.* i wsp.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 1995, 210, 507. – 4. *Geng Y.-J., Hansson G.K., Holme E.*: Circ. Res., 1992, 71, 1268. – 5. *Koedel U., Bernatowicz A., Paul R.* i wsp.: Ann. Neurol., 1995, 37, 313. – 6. *Kornelisse R.F., Hoekman K., Visser J.J.* i wsp.: Nitric oxide (NO) induces anaerobic glycolysis in bacterial meningitis in children. The 13th Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Birmingham April 19–21, 1995, Abstract nr S9. – 7. *Markiewicz Z., Śmigielska J.*: Oznaczanie zawartości azotynów w surowicy. Zesz. Nauk. ART Olszt. Weterynaria, 1975, nr 5, 169. – 8. *Moncada S., Higgs E.A.*: Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. FASEB J., 1995, 9, 1319. 9. *Pfister H.-W., Bernatowicz A., Ködel M.*: J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry., 1995, 58, 384. – 10. *Sakai N., Kaufman S., Milstien S.*: J. Neurol., 1995, 65, 895. 11. *Salvemini D., Misko P.T., Masferrer M.J.K.*, i wsp.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 7240. – 12. *Schaad U.B., Lips U., Gnehm H.E.*, i wsp.: Lancet, 1993, 342. – 13. *Szychowska Z.*: Obserwacja kliniczna zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych u dzieci ze szczególnym uwzględnieniem wybranych funkcji endokrynych, Praca habilitacyjna, Wrocław 1994. – 14. *Turren J.*: J. Clin. Invest., 1995, 95, 1086. – 15. *Tyszkiewicz I.*: Gosp. Mięsn., 1986, nr 1, 20. – 16. *Weinberg J.B., Misukonis M.A., Shami P.J.* i wsp.: Blood, 1995, 86, 1184.

Adres: Klinika Chorób Zakaźnych Dzieci AM, 50-345 Wrocław, ul. Bujwida 44