

Механизмы формирования нестабильности генома у детей с перивентрикулярной лейкомаляцией с исходом в детский церебральный паралич

Д.Д. ГАЙНЕТДИНОВА¹, Д.В. АЙЗАТУЛИНА¹, И.Х. ВАЛЕЕВА¹, Э.Ф. ЮСУПОВА²

Mechanisms of genome instability in children with periventricular leucomalacia that resulted in cerebral palsy

D.D. GAINETDINOVA, D.V. AIZATULINA, I.KH. VALEEVA, E.F. YUSUPOVA

¹Казанский государственный медицинский университет, ²Детская республиканская клиническая больница, Казань

Исследованы активность свободнорадикального окисления и уровень нестабильности генома у детей с перивентрикулярной лейкомаляцией с исходом в детский церебральный паралич. Доказано, что у детей с перивентрикулярной лейкомаляцией происходит дестабилизация генома — увеличивается количество эритроцитов с микроядрами в периферической крови. Выявлена корреляция числа клеток с цитогенетическими перестройками и активности ферментов антиоксидантной защиты и уровня малонового диальдегида. Установлено, что у детей с перивентрикулярной лейкомаляцией с исходом в детский церебральный паралич нестабильность клеточного генома протекает на фоне активации процессов эндомутагенеза и снижения антирадикальной и антимутагенной защиты. Кортиксин обладает способностью подавлять выраженные процессы свободнорадикального окисления и эндомутагенеза, проявляя наряду с нейротропным действием антирадикальные и антимутагенные свойства.

Ключевые слова: перивентрикулярная лейкомаляция, детский церебральный паралич, окислительный стресс, нестабильность генома, кортиксин.

The activity of free-radical oxidation and the level of genome instability in children with periventricular leucomalacia that resulted in cerebral palsy have been studied. Genome destabilization, i.e., the elevation of erythrocyte micronuclei in the peripheral blood, has been reported. There was a correlation of a number of cells with cytogenetic rearrangements with the activity of antioxidant defense enzymes and the malonaldehyde level. It has been shown that genome instability occurs during the activation of endogenous mutagenesis and reduction of antiradical and antimutagenic defense. Having, along with the neurotrophic effect, antiradical and antimutagenic effects, cortixin is capable to inhibit the pronounced processes of free-radical oxidation and endogenous mutagenesis in patients with periventricular leucomalacia that resulted in spastic dyplasia exerting.

Key words: periventricular leucomalacia, children cerebral palsy, oxidative stress, genome instability, cortixin.

Перивентрикулярная лейкомаляция (ПВЛ) лежит в основе большинства двигательных нарушений у больных с перинатальной патологией нервной системы, в том числе и детского церебрального паралича (ДЦП) [1, 15, 17, 18]. Как показывают исследования последних лет [12, 13, 21], не у каждого ребенка, развивающегося в неблагоприятных внутриутробных условиях, формируется ПВЛ. Очевидно, решающую роль в реализации потенциально патогенного воздействия играет генетически детерминированная индивидуальная реактивность организма ребенка, определяющая повышенную «восприимчивость» структур перивентрикулярной области и других отделов головного мозга плода и новорожденного к гипоксии. В литературе [5, 6] имеются доказательства того, что одним из провоцирующих моментов стойкости двигательного дефицита при ДЦП является нестабильность генома, проявляющаяся повышением уровня эритроцитов с микроядрами (ЭМ) и лимфоцитов с перестройками хромосом. Предполагает-

ся, что в основе этого явления лежит интенсификация в организме больных ДЦП процессов мутагенеза за счет усиленной генерации эндомутагенов и ослабления антимутагенных систем защиты генома. В то же время как сами механизмы дестабилизации генома, так и процессы, их поддерживающие, остаются неясными.

Наиболее вероятными эндомутагенами в условиях хронического ишемического процесса в головном мозге могут являться продукты свободнорадикального окисления. При избыточном образовании свободные радикалы воздействуют на клетку, приводя к различным цитогенетическим повреждениям и впоследствии — к ее гибели [6, 10, 14, 16, 20]. Роль активных форм кислорода и других свободных радикалов проявляется прежде всего в окислительном повреждении ДНК — носителя наследственной информации и исходной матрицы для синтеза белков организма в целом, что может явиться причиной ряда хромосомных aberrаций и мутаций некоторых генов в клет-

ках человека [10]. Контроль над избыточной выработкой активных форм кислорода осуществляет антиоксидантная система, к которой относятся: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), пероксидаза, церулоплазмин, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза и др. [2, 8].

В последние годы в литературе [5] появились сообщения о наличии у больных ДЦП высокого уровня цитогенетических нарушений в клетках периферической крови. Механизмы формирования нестабильности генома при ДЦП остаются малоизученными. Известно, что нестабильность генома может поддерживать стойкость двигательного дефицита у детей со спастическими формами заболевания, препятствуя успешной реабилитационной терапии. Дальнейшие исследования патогенетических звеньев формирования ДЦП у детей с ПВЛ должны уточнить механизмы, поддерживающие тяжесть заболевания и препятствующие эффективности лечебных мероприятий. Это позволит целенаправленно воздействовать на выявленные процессы, участвующие в формировании грубых двигательных нарушений, обоснованно назначать медикаментозную терапию и улучшать качество жизни пациентов.

Цель настоящего исследования — изучение взаимосвязи уровня ЭМ и интенсивности процессов свободнорадикального окисления, активности ферментов антиоксидантной защиты у детей с ранней резидуальной стадией ДЦП.

Материал и методы

Обследован 51 ребенок (24 мальчика и 27 девочек в возрасте 1—5 лет) со спастической диплегией. Дети находились на стационарном лечении в неврологическом отделении Детской республиканской клинической больницы Министерства здравоохранения Республики Татарстан.

Критерием включения больных в исследование явилось выявление при нейровизуализации — с использованием нейросонографии, магнитно-резонансной томографии (МРТ) и рентгеновской компьютерной томографии (КТ) только ПВЛ, без другой патологии, и отсутствие медикаментозного лечения и инфекционного процесса в течение 30 дней.

Группу контроля составили 20 здоровых детей. Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Цитогенетическое исследование эритроцитов периферической крови проводили с использованием микроядерного теста [19]. Забор крови для исследования производился в 1-й день поступления больного в стационар до начала лечения. Мазки периферической крови окрашивались по Романовскому—Гимзе при рН 6,8 в течение 20 мин, затем хорошо промывались. У каждого пациента просматривалось 20 000 эритроцитов, среди которых под-

считывались ЭМ. Количество ЭМ выражалось в процентах от общего числа просмотренных эритроцитов.

Биохимическим методом в центральной научно-исследовательской лаборатории Казанского государственного медицинского университета по стандартным методикам исследовались активность СОД [7], КАТ [9] и пероксидазы [11] в гемолизате крови; гидрокперекиси липидов [3] и малонового диальдегида (МДА) в плазме [4].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента, непараметрического *t*-критерия Манна—Уитни и корреляционного анализа с помощью программы Origin 6.1.

Результаты и обсуждение

При цитогенетическом исследовании было выявлено повышенное количество ЭМ у каждого обследованного ребенка с ДЦП, которое достоверно ($p < 0,001$) превышало показатель спонтанного мутагенеза (табл. 1). Выявленные цитогенетические нарушения свидетельствуют о дестабилизации генома. Нестабильность генома может возникнуть в условиях повышенной генерации эндомутагенов, приводящей к повреждению метаболических циклов ангиогенеза и, как следствие, к увеличению числа клеток с цитогенетическими перестройками. Наиболее вероятными генераторами эндомутагенеза у детей с ПВЛ с исходом в ДЦП могут быть активные свободнорадикальные процессы.

Исследование активности ферментов антирадикальной защиты (СОД, КАТ, пероксидаза) в крови у больных ПВЛ с исходом в ДЦП обнаружило их высокий уровень в сравнении с группой контроля, свидетельствующий об активации свободнорадикальных процессов. У детей с ПВЛ отмечена значительная активность СОД — ключевого фермента антиоксидантной защиты. Обнаружены достоверные различия показателей активности СОД ($p < 0,05$) и КАТ ($p < 0,05$) у детей со спастической диплегией по сравнению со здоровыми (см. табл. 1). Выявлена тенденция преобладания активности пероксидазы в эритроцитах крови у обследованных детей с ДЦП по сравнению с контролем, но достоверных различий не получено ($p > 0,05$).

Изучение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) выявило у больных ДЦП повышение как первичного — гидрокперекиси липидов, так и вторичного — МДА продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой в сыворотке крови. В группе детей с ПВЛ выявлено достоверно более высокое ($p < 0,002$) содержание МДА по сравнению с контролем (см. табл. 1). Уровень гидрокперекиси липидов оказался повышенным, но достоверных различий с группой здоровых не обнаружено. Возможно, это связано с тем, что гидрокперекись липидов является неустойчивым продуктом и быстро переходит в более устойчивый и токсичный продукт — МДА.

Таблица 1. Показатели уровня цитогенетических нарушений и активности окислительного стресса в крови обследованных детей с ПВА

Группа обследованных	ЭМ, %	Ферменты антиоксидантной защиты			Продукты ПОЛ	
		СОД, усл.ед.	КАТ, мккатал/л	пероксидаза (тыс. доли интернац. ед.)	гидрокперекись липидов, отн.ед.	МДА, мкМ/л
Больные ДЦП (n=51)	0,64***	1,0±0,1*	757±10,8*	38,4±20,0	9,4±3,8	1,36±0,3**
Контроль (n=20)	0,22	0,6±0,2	659±93	33,0±16,3	8,3±2,9	0,57±0,2

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,002$; *** — $p < 0,001$ достоверные различия с контролем на уровне.

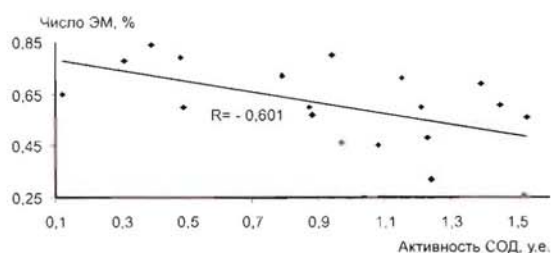


Рис. 1. Корреляционная кривая зависимости количества ЭМ и активности СОД у детей с ПВЛ.

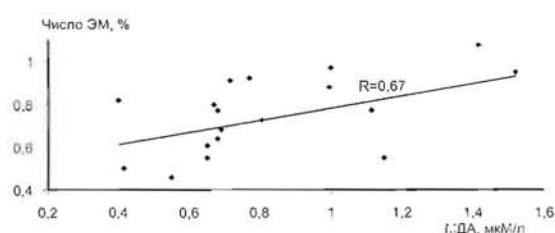


Рис. 2. Корреляционная кривая зависимости количества ЭМ и уровня МДА у детей с ПВЛ.

На основании выявленного повышения активности ферментов антирадикальной защиты и продуктов ПОЛ (МДА) можно судить о течении выраженного окислительного стресса у детей с ПВЛ, больных ДЦП.

Полученные результаты биохимического и цитогенетического исследования свидетельствуют о наличии у детей с ПВЛ двух одновременно протекающих патологических процессов. С одной стороны, это — повышение интенсивности процессов свободнорадикального окисления, с другой — нестабильность генома с большим количеством цитогенетических перестроек.

Для оценки взаимосвязи цитогенетического статуса и активности процессов свободнорадикального окисления проведен корреляционный анализ этих показателей у больных ПВЛ с исходом в ДЦП. Оказалось, что оба процесса взаимосвязаны друг с другом: активность СОД обратно коррелирует с числом ЭМ ($r = -0,601$), а по содержанию МДА и активности КАТ выявлена прямая корреляция с числом эритроцитов с перестройками ($r = 0,67$ и $r = 0,605$ соответственно) (рис. 1, 2). Отрицательная корреляция активности СОД с уровнем цитогенетических нарушений у детей с ПВЛ, больных ДЦП, может быть связа-

на с недостаточной активностью антирадикальных ферментов для антимуtagenной защиты на фоне усиления процессов свободнорадикального окисления. В этих условиях повышенное содержание МДА проявляет свое выраженное цитотоксичное действие, вызывая дестабилизацию генома.

Результаты анализа проведенных исследований свидетельствуют о том, что у больных ПВЛ с исходом в ДЦП нестабильность генома формируется на фоне активации свободнорадикальных процессов. Выраженные процессы свободнорадикального окисления провоцируют эндомутагенез, приводят к анеугенному эффекту в клетках организма больных ДЦП. Не исключено, что патологические изменения в перивентрикулярной области могут поддерживать и, возможно, даже инициировать эндомутагенез в организме детей с ПВЛ. Полученные результаты позволяют предположить, что окислительный стресс приводит к дестабилизации клеточного генома у детей с ПВЛ с исходом в ДЦП и поддерживает процессы, протекающие (а может и исходящие) в перивентрикулярной области. Эти процессы способствуют утяжелению имеющихся и появлению новых патологических звеньев метаболизма у больного. Вышеизложенное диктует необходимость поиска дополнительных путей фармакологической коррекции окислительного стресса и цитогенетических нарушений у детей с ПВЛ.

Учитывая активно протекающие процессы свободнорадикального окисления и эндомутагенеза в организме больных ПВЛ с исходом в ДЦП, дальнейшей тактикой нашего исследования была попытка коррекции этих нарушений. Для этого был выбран препарат, обладающий и нейротропным, и антиоксидантным действием, — кортексин. В результате рандомизации были выделены 20 больных ПВЛ с исходом в спастическую диплегию, которым была проведена монотерапия кортексином в течение 20 дней в дозе 0,5 мг/кг в сутки. Забор крови для исследования оксидантного статуса и уровня ЭМ осуществлялся в день начала терапии (до лечения) и через 20 дней проведенного лечения.

Исследование антиоксидантного статуса на фоне терапии кортексином показало достоверное снижение активности ферментов антирадикальной защиты по сравнению с показателями до лечения: СОД — на 33,3% ($p < 0,05$) и КАТ — на 10% ($p < 0,05$) (табл. 2). Активность пероксидазы также снизилась на 10% ($p > 0,05$). Выявлено достоверное снижение продуктов ПОЛ после лечения кортексином: активности МДА — на 36,7% ($p < 0,05$), гидроперекиси липидов — на 10,5% ($p > 0,05$). Уровень цитогенетических нарушений на фоне терапии кортексином достоверно ($p < 0,05$) снизился на 40% по сравнению с показателями, полученными до начала лечения, но все же остался выше, чем у здоровых детей.

Таблица 2. Показатели уровня цитогенетических нарушений и активности окислительного стресса в крови у обследованных детей с ПВЛ до и после терапии кортексином

Обследованные дети	ЭМ, %	Ферменты антиоксидантной защиты			Продукты ПОЛ	
		СОД, усл. ед.	КАТ, мккатал/л	пероксидаза (тыс. доли интернац. ед.)	гидроперекись липидов, отн. ед.	МДА, мкМ/л
До лечения	0,64	1,0±0,1	757±10,8	38,4±20,0	9,4±3,8	1,36±0,3
После лечения	0,39*	0,7±0,1*	681±80*	34,5±9,9	8,4±4,1	0,86±0,2*

Примечание. Различия показателей до и после лечения достоверны: * — $p < 0,05$.

КОРТЕКСИН® ДЛЯ ДЕТЕЙ

*Восстановление
природных
возможностей!*



Удобрение № 3190/09 от 27.04.2009

Показания к применению:

сниженная способность
к обучению

когнитивные нарушения
(расстройства памяти
и мышления)

задержка психомоторного
и речевого развития у детей

астенические состояния

энцефалопатии различного
генеза

эпилепсия

черепно-мозговая травма
и ее последствия

детский церебральный паралич

нарушения мозгового
кровообращения

острые и хронические
энцефалиты
и энцефаломиелиты




ГЕРОФАРМ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ

Телефон горячей линии: 8-800-333-4376
(звонок по России бесплатный)

www.geropharm.ru

Проведенное исследование продемонстрировало антирадикальное и антимуtagenное действие кортексина, проявляющееся в уменьшении активности процессов свободнорадикального окисления и эндомутагенеза у больных.

Таким образом, окислительный стресс у детей с ПВЛ с исходом в ДЦП имеет важное значение как в инициации патологического процесса, так и в его прогрессировании. ПВЛ формируется на фоне гипоксического процесса в перинатальном периоде, который и запускает свободнорадикальное окисление. Не исключено, что окислительный стресс способствует развитию некроза белого вещества перивентрикулярных зон головного мозга. В дальнейшем, при отсутствии адекватной терапии, ингибирующей окислительный стресс, присоединяется дегенерация астроцитов с пролиферацией микроглии и скоплением

липидсодержащих макрофагов в некротизированной ткани. Так как перивентрикулярная область является матричной областью для нервных клеток, ее некротические изменения приводят к нарушению дифференциации нервных клеток и, следовательно, к грубым неврологическим последствиям. Положительная динамика процессов свободнорадикального окисления на фоне терапии кортексином свидетельствует о том, что препарат снижает активность ПОЛ и замедляет процессы оксидантного эндомутагенеза в организме детей с ПВЛ. Антирадикальные и антимуtagenные свойства кортексина уменьшают цитотоксическое действие свободных радикалов на теном клетки, снижая нестабильность генома у больных ПВЛ с исходом в ДЦП и соответственно препятствуя прогрессированию заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова Е.Д., Никанорова М.Ю., Кешичия Е.С., Малиновская О.Н. Роль перивентрикулярной лейкомаляции в развитии детского церебрального паралича. Рос вестн перинатол и педиатр 2001;5:26—32.
2. Болтырев А.А. Окислительный стресс и мозг. Соросовский образовательный журнал 2001;7:4:21—28.
3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. Лаб дело 1983;3:33—35.
4. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. Вопр мед химии 1987;1:118—122.
5. Гайнетдинова Д.Д. Состояние генетического аппарата у больных детским церебральным параличом. Казан мед журн 2005;86:47—48 (приложение).
6. Гайнетдинова Д.Д., Зиятдинова Г.К., Семенов В.В. и др. Кластогенез и анеугенез у больных детским церебральным параличом. Бюл экспер биол 2005;5:557—561.
7. Дубитина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии. Лаб дело 1983;8:16—19.
8. Зенков Н.К., Ланкин В.Э., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. М: МАИК 2001;343.
9. Коралюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. Лаб дело 1988;1:16—19.
10. Лескин А.В. Взаимодействие активного кислорода с ДНК. Биохимия 1997;62:12:1571—1578.
11. Попов Т., Нейковская Л. Метод определения пероксидазной активности крови. Тиг и спн 1971;10:89—91.
12. Семенова К.А. Восстановительное лечение детей с перинатальным поражением нервной системы и детским церебральным параличом. М: Закон и порядок 2007;616.
13. Скворцов И.А., Ермоленко Н.А. Развитие нервной системы у детей в норме и патологии. М: МЕДпресс-информ 2003;368.
14. Шанин Ю.Н., Шанин В.Ю., Зиновьев Е.В. Антиоксидантная терапия в клинической практике. Ст-Петербург: ЭЛБИ 2003;121.
15. Haynes R.L., Folkerth R.D., Keete R.J. et al. Nitrosative and oxidant injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. Neuropathol Exp Neurol 2003;62:5:441—450.
16. Kulak W., Sobaniec W., Solowej E., Sobaniec H. Antioxidant enzymes and lipid peroxides in children with cerebral palsy. Life Sci 2005;77:24:3031—3036.
17. Maurer U. Etiologies of cerebral palsy and classical treatment possibilities. Wien Med Wochensh 2002;152:1—2:14—18.
18. Resi B., Tomasovi M., Kurmani-Samija R. et al. Neurodevelopmental outcome in children with periventricular leukomalacia. Coll Antropol 2008;32:1:143—147.
19. Schmid W. The micronucleus test. Mutat Res 1975;31:1:9—15.
20. Stark S., Schuller A., Sifrienger M. et al. Suramin induces and enhances apoptosis in a model of hyperoxia-induced oligodendrocyte injury. Neurotox Res 2008;13:3—4:197—207.
21. Volpe J.J. Neurology of the newborn. Philadelphia: WB Saunders 2008;860.