

Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатуллина

Нестабильность генома и пути его фармакологической коррекции у больных детским церебральным параличом

Казанский государственный медицинский университет, Казань

Резюме. Оценена антимутагенная и антиоксидантная активность кортексина. Установлено, что кортексин показал высокую степень антимутагенной и антиоксидантной активности и способность подавлять интенсивность анеугенеза на уровне целого организма. Изучены aberrации хромосом в лимфоцитах периферической крови и уровень эритроцитов с микроядрами в полихроматофильных эритроцитах больных детским церебральным параличом и здоровых детей. Доказано, что у больных детским церебральным параличом происходит дестабилизация генома – повышается уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах и количество эритроцитов с микроядрами в периферической крови. В результате лечения кортексином отмечена положительная клиническая динамика у 9 из 10 детей. Наибольшей чувствительностью к модифицирующему действию кортексина обладал процесс образования продуктов перекисного окисления липидов. Кортексин обнаружил способность подавлять интенсивность химически-индуцированного мутагенеза, и повышая эффективность аэробного метаболизма, нормализует скорость эритропоэза, увеличивая тем самым время восстановления потенциальных повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Ключевые слова: кортексин, анеугенез, хромосомы, эритроциты, детский церебральный паралич, мутагенез, эритропоэз.

Введение. Частота детского церебрального паралича (ДЦП) относительно постоянна за последние десятилетия (от 1,7 до 3,1 на тыс. детского населения) и практически не зависит от качества родовспоможения, ухода за новорожденным и недоношенным ребенком и частоты перинатальной асфиксии [7, 8, 10]. На современном этапе развития медицины не представляется возможным внутриутробное прогнозирование ДЦП и какие-либо лечебные мероприятия. До сих пор не существует и достаточно эффективных методов восстановительного лечения при этом заболевании, особенно в тех случаях, когда терапия начата несвоевременно и/или имеются диффузные и грубые поражения головного мозга. Изложенное делает актуальным изучение этиологических и патогенетических механизмов реализации патогенных воздействий на нервную систему ребенка.

До настоящего времени неясно, почему в одних случаях наличие целого комплекса вредных факторов не приводит к нарушениям деятельности мозга, а в других – даже легкая асфиксия может повлечь за собой развитие грубой церебральной патологии [13, 14, 15]. Как правило, необычные ответные реакции проявляются у индивидуумов, которые по своему генетическому статусу значительно отличаются от моды распределения в конкретной популяции [3]. Исходя из этого, одним из моментов, провоцирующим возникновение заболевания, может стать появление у плода нестабильности генома. Регистрация этого феномена после рождения ребёнка и у детей разных возрастных групп может служить косвенным доказательством стойкости ДЦП, и, следовательно, рассматриваться как постоянно действующий фактор,

интегрированный в общую систему патогенеза при ДЦП. С другой стороны, не исключён и обратный механизм, когда в условиях развивающейся патологии определённые патогенетические звенья могут стать причиной повреждения генетического аппарата [6]. В любом случае установление феномена нестабильности генома у больных ДЦП может внести существенный вклад в представление об этиологии и патогенезе этого заболевания, наметить более радикальные пути терапии. Вышесказанное и определило направленность исследований.

Цель исследования. Оценить методами цитогенетики состояние генома и найти его фармакологическую защиту у больных ДЦП.

Материалы и методы. Для выявления цитогенетических аномалий в клетках периферической крови микроядерным тестом обследовано 98 больных (59 мальчиков и 39 девочек) с различными формами ДЦП. Критерием включения в исследование явилось наличие у каждого ребенка перивентрикулярной лейкомаляции. Больные разделены на группы в зависимости от клинической формы: спастическая диплегия (23 человек – 23,5%), двойная гемиплегия (23 человек – 23,5%), гиперкинетическая форма (17 человек – 17,7%), левосторонняя гемипаретическая форма (15 человек – 15,3%), правосторонняя гемипаретическая (12 человек – 12,2%) и атонически-астатическая формы (8 человек – 8,2%). Группа контроля – 40 условно здоровых детей и подростков (10 мальчиков и 30 девочек).

Забор крови для мазков производился у больных при поступлении в стационар. Для регистрации мик-

роядер просматривали мазки периферической крови больных при поступлении их в стационар до лечения. В контроле использовалась кровь здоровых детей, взятая у них при плановых диспансерных обследованиях. Свежие высушенные мазки фиксировались 90–70% этиловым спиртом 3 мин. Сухие препараты окрашивались в растворе азур-эозинового красителя Романовского – Гимза 1:5 на дистиллированной воде рН 6,8 20 минут и хорошо промывались. От каждого человека просматривалось 1–2 мазка, в каждой мазке подсчитывалось не менее 20000 эритроцитов, что позволило производить исследования в группах с малой выборкой.

Аберрации хромосом (АХ) изучены у 49 больных, разбитых в соответствии с формой заболевания на 5 групп. В каждой группе подобрано в основном по 10 человек. В связи с малочисленностью больных с атонически-астатической формой, эта группа больных была исключена из анализа. В группе детей с двойной гемиплегией было 9 человек, т.к. из-за гемолиза крови уровень АХ у одного больного определить было невозможно. Культуру фиксировали на 48 часов. За 3 часа до фиксации добавляли колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. На каждого пациента готовили 2 мазка, в каждом мазке изучалось по 150 метафаз, полученные данные суммировались. Учитывались все АХ и хроматидные аберрации. Использованные реактивы – фитогемагглютинин, колхицин и красители (Sigma).

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических критериев: t-критерий Манна-Уитни и критериев Краскала-Уоллиса. Оценку среднего уровня клеток с микроядрами и перестройками хромосом проводили с использованием медианы (Me). Нижний и верхний пороговые уровни клеток с цитогенетическими нарушениями определяли как 2,5-й и 97,5 перцентили соответственно.

Результаты и их обсуждение. *Результаты исследования уровня эритроцитов с микроядрами в полихроматофильных эритроцитах больных ДЦП и здоровых детей.* В контрольной группе средний уровень (Me) эритроцитов с микроядрами (ЭМ) составил 0,07%. Оценка уровня ЭМ в периферической крови больных ДЦП показала, что он был достоверно ($p < 0,001$) выше контрольного. Причём показатель варьировал в пределах от минимальных 0,19%, характерных для гемипаретической формы, до максимальных 0,21% – при гиперкинетической форме. При гемипаретической форме уровень ЭМ был одинаков как при левостороннем, так и правостороннем вариантах (по 0,19%). Однотипные по клиническим проявлениям (спастический тетрапарез) спастическая диплегия и двойная гемиплегия по значениям ЭМ также не различались. Статистически достоверные различия получены при сравнении значений уровня ЭМ при гиперкинетической и гемипаретической формах ($p < 0,05$), что наводит на мысль о существовании более активных процессов кластогенеза у больных гиперкинетической формой.

Количество ЭМ у мальчиков и девочек в каждой группе оказалось разным. При спастической диплегии и атонически-астатической форме показатель ЭМ был выше у мальчиков ($p > 0,05$), а при двойной гемиплегии, гиперкинетической и гемипаретической формах – у девочек. У мальчиков при разных формах средние значения ЭМ между собой достоверно не различались, хотя различия с контролем значимы ($p < 0,001$). У девочек с гиперкинетической формой получена достоверная разница этого показателя при сравнении с гемипаретической формой и спастической диплегией ($p < 0,05$).

В исследованной выборке больных ДЦП выявлена значительная вариабельность числа ЭМ. У всех обследованных детей, независимо от формы заболевания, средняя величина кратности превышения уровня ЭМ над контролем составила примерно 2,5 число раз. У больных с разными формами заболевания средние величины кратности превышения незначительно отличались от этой величины и составляли: в группе детей со спастической диплегией, двойной гемиплегией и гиперкинетической формой в 2,7 раз, атонически-астатической формой – 2,3 раза, правосторонней гемиплегией – 2,2 раза, левосторонней гемиплегией – 2,1 раза.

Полагаем, что у всех обследованных больных ДЦП выявленных высокий уровень микроядер в эритроцитах периферической крови свидетельствует о дестабилизации генетического аппарата (генома). Анеугенный эффект отмечается достоверно выше в группе детей с гиперкинетической формой. Представляется, что в основе высокого уровня ЭМ при гиперкинетической форме лежат более интенсивные процессы кластогенеза, по сравнению с другими формами ДЦП. Кроме того, дефекты «веретена» деления, возникающие в процессе созревания эритроцитов в костном мозге, проявляются интенсивнее у девочек с гиперкинезами, чем у мальчиков с гиперкинезами и у девочек с другими двигательными нарушениями. Не исключено, что в этиопатогенезе гиперкинетической формы именно у девочек наследственно-конституциональные особенности играют немаловажное значение. Эти предположения требуют дальнейшего изучения вклада генетической составляющей в генез ДЦП, и особенно, гиперкинетической формы.

Результаты исследования аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови больных. Хромосомные перестройки в лимфоцитах периферической крови изучены у 10 здоровых детей и 49 больных ДЦП: со спастической диплегией, гиперкинетической формой, гемипаретической правосторонней и левосторонней формой – по 10 человек, двойной гемиплегией – 9 человек.

Индивидуальные значения количества клеток с перестройками хромосом в периферической крови больных различными формами ДЦП варьировали от 3,33 до 10,0%. Распределение уровня клеток с АХ в лимфоцитах периферической крови носило асимметричный характер. Пороговый уровень АХ в периферической

крови детей с ДЦП был в пределах 3,33–8,93 со средним значением 6,09%. У здоровых спонтанный уровень АХ составил 2,33%. Уровень перестроек хромосом у мальчиков ($n = 28$) и девочек ($n = 21$), больных ДЦП оказался неодинаков. Пороговое значение АХ у мальчиков (3,78–9,32%, медиана 6,5%) достоверно преобладало над этим же показателем у девочек (3,33–7,84%, медиана 5,5%) ($p < 0,05$). Наиболее высокий уровень поврежденных хромосом наблюдался при двойной гемиплегии (рис. 1). В среднем у детей этой группы уровень АХ достигал 7,67%, что было достоверно ($p < 0,05$) выше аналогичных показателей из других групп и более чем в 3 раза превышало спонтанный уровень.

Таким образом, в лимфоцитах периферической крови больных ДЦП обнаружен высокий уровень клеток с перестройками хромосом. Достоверное превышение числа хромосомных перестроек над спонтанным уровнем АХ наблюдалось примерно у 2/3 больных. Кластогенный эффект коррелирует с полом больного ДЦП – достоверно выше отмечен у мальчиков, по сравнению с девочками. Нестабильность генома высока у детей со всеми формами заболевания, но она достоверно выше в группе детей с самой тяжелой формой двигательных расстройств – двойной гемиплегией.

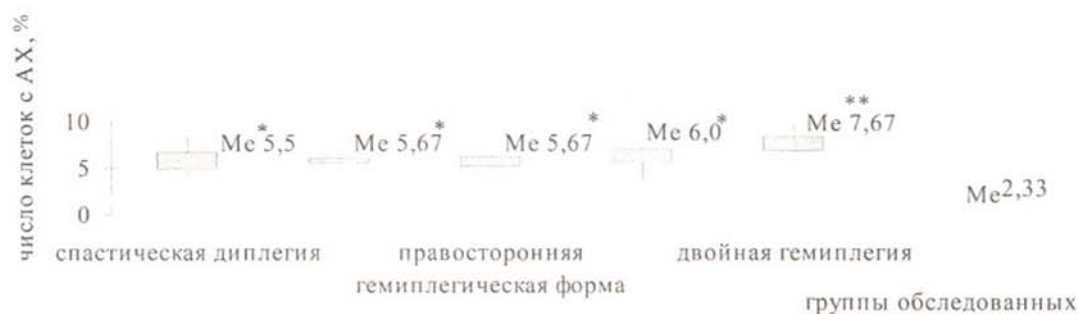
Цитогенетические нарушения в клетках периферической крови свидетельствуют о наличии в патогенезе ДЦП важного звена – неспецифического повреждения генома. Являясь типовым патологическим процессом, оно логически реализуется в нарушение нормальной экспрессии генов, что существенно осложняет течение заболевания, снижает эффективность лечения и делает прогноз крайне неблагоприятным. В то же время имеется разработанная и хорошо зарекомендовавшая себя на практике фармакологическая теория защиты генома, которая предполагает использование в коррекции повреждений генетического аппарата фармпрепараты, у которых, наряду со специфической фармакологической активностью, выражен и антимуtagenный компонент [4].

Антимуtagenная и антиоксидантная активность кортексина. В эксперименте оценены антимуtagenная и антиоксидантная активность нейропротектора кортексин Герофарм, широко применяемого в комплек-

сной терапии ДЦП. В исследование после информированного согласия включено 20 больных (9 девочек и 11 мальчиков) 1–4 лет с диагнозом ДЦП, спастическая диплегия средней степени тяжести. Выбор формы – спастическая диплегия – определен ее промежуточным положением по уровню цитогенетических нарушений, по сравнению с другими клиническими формами ДЦП. У всех пациентов было наличие перивентрикулярной лейкомаляции и отсутствие сопутствующих соматических заболеваний. Эффективность монотерапии кортексином оценивалась по клиническим показателям, уровню ЭМ и проценту снижения уровня ЭМ – антианеугенной активности. Уровень ЭМ определяли в трёх точках: в день начала монотерапии (до лечения), через 10 и 20 дней лечения. Кортексин использовался в/м 1 раз в день, по утрам, в стандартной суточной дозе из расчета 0,5 мг/кг/сут. Препарат не назначался детям с эпилепсией и некупированными пароксизмальными реакциями. В опытах на модельных системах кортексин ингибировал образование всех взятых в исследование активных форм кислорода (АФК) – супероксида, оксида азота и продуктов перекисного окисления липидов.

Это объясняется, скорее всего, аддитивным антиоксидантным эффектом компонентов, входящих в состав препарата. Учитывая это, вопрос о лекарственной форме препарата, используемого в качестве антиоксиданта, имеет принципиальное значение. Анализ полученных результатов показал, что наибольшей чувствительностью к модифицирующему действию кортексина обладал процесс образования продуктов ПОЛ, меньшей чувствительностью обладали процессы, генерирующие монооксид азота и формирующие супероксидный анион-радикал (табл. 1).

Разрабатывая проблему лекарственного антимуtagenеза ряд исследователей [3] выдвинули предположение, что у некоторых лекарственных препаратов специфическая активность может сочетаться с антимуtagenной. И действительно, кортексин обнаружил способность подавлять интенсивность химически индуцированного мутагенеза (на 33,0%) (см. табл. 1). Антикластогенная активность кортексина может быть связана с антиоксидантными свойствами компонентов, которые входят в его состав.



Примечание: * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$); ** – различия с контролем и значениями других форм ДЦП достоверны ($p < 0,05$).

Рис. 1. Уровень аберраций хромосом у больных с различными формами ДЦП

Таблица 1
Антимутагенный и антирадикальный эффект кортексина

Препарат	АКА, %	Концентрация препарата (C ₅₀ ¹ , мкл/мл), снижающая образование АФК на 50%		
		ПОЛ	SOD-активность	Монооксид азота
Кортексин	33,0	71	54	3,2

Примечание: АКА – антикластогенная активность.

В результате лечения кортексином отмечена положительная клиническая динамика у 9 из 10 детей. У больных снижался спастический гипертонус в пораженных конечностях, расширялся объем активных движений и уменьшались глазодвигаемые нарушения. Родители отмечали, что на фоне терапии кортексином у детей возрастает интерес к окружающему миру, улучшаются речевые навыки и навыки запоминания, характеристики поведения, повышается общий жизненный тонус, отмечаются положительные сдвиги в эмоциональной сфере.

На 10-й и 20-й день исследования кортексин существенно снизил высокий уровень ЭМ у больных в общей группе и подгруппе мальчиков и девочек (табл. 2). Это однозначно свидетельствует о наличии у препарата способности подавлять интенсивность анеугенеза на уровне целого организма. При этом важно подчеркнуть, что и у мальчиков, и у девочек на 10-й и 20-й день терапии уровень ЭМ плавно снижался и уменьшился почти в 2 раза (рис. 2).

Таблица 2
Антианеугенная активность у больных ДЦП при монотерапии кортексином, %

День исследования	Общая группа	Мальчики	Девочки
10-й	35,6	42,6	29,4
20-й	37,0	35,7	38,0

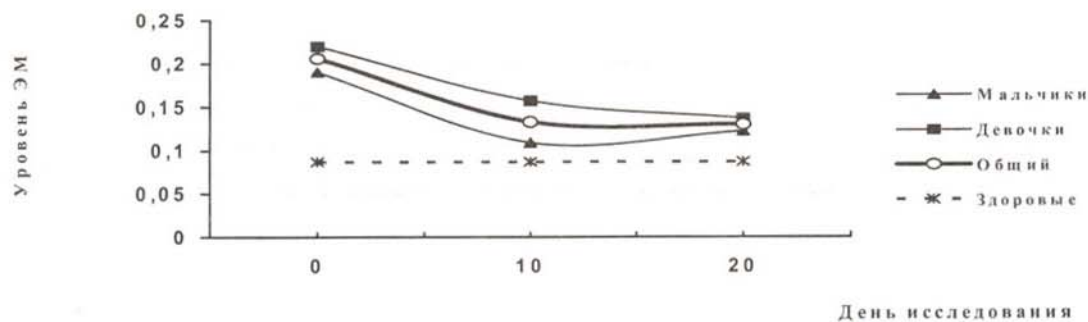


Рис. 2. Динамика уровней эритроцитов с микроядрами у больных ДЦП при монотерапии кортексином

Таким образом, при ДЦП развитие типового патологического процесса – ацидоза приводит к нарушению целого ряда метаболических звеньев: снижается активность адренорецепторов сердца, сосудов и кишечника, повышается содержание в крови катехоламинов, усиливаются парасимпатические эффекты, между клеткой и плазмой крови перераспределяются протоны, ионы калия, хлора и др. ионы, существенно нарушается метаболизм некоторых аминокислот (например, глутамата, аспартата и др.) и т.д. [6]. Это, в свою очередь, нарушает нормальное течение биохимических процессов, содержащих в качестве промежуточных продуктов эндомутагены (например, АФК, глутамат, гистамин и др.). Последствия предсказуемы – пул эндомутагенов в организме повышается и, как следствие, нарушается нормальная структура генома [1, 11, 12]. С этих позиций антианеугенный эффект кортексина является непрямым, а осуществляется косвенно через нормализацию кислотно-основного баланса. Кроме того, установлено, что в клетках, лишённых нейротрофической регуляции (что типично для ДЦП), повышена интенсивность кластогенеза. Восстанавливая нейротрофический контроль, кортексин параллельно защищает генетический аппарат клетки от дальнейшего повреждения. И, наконец, одной из причин появления в периферической крови эритроцитов с микроядрами может быть повреждение генома эритробластов свободными радикалами и другими мутагенными продуктами в результате активации «дыхательного взрыва» в макрофагах эритробластных островков костного мозга в результате гипоксии [8]. Одновременно при гипоксии любого генеза в организме повышается уровень стимуляторов эритропоэза – эритропоэтина и андрогенов, что уменьшает время восстановления первичных повреждений ДНК.

Кортексин, повышая эффективность аэробного метаболизма, нормализует скорость эритропоэза, увеличивая тем самым время восстановления потенциальных повреждений ДНК. Это предположение находит косвенное подтверждение в постоянной реги-

страции более эффективного антианеугенеза у девочек, чем у мальчиков после 10-го дня назначения препаратов, так как эстрогены являются ингибиторами эритропоэза [9]. В этих условиях увеличивается репарация первичных повреждений ДНК и, соответственно, снижается их реализация в видимые перестройки. Не исключается и другой механизм антиоксидантного действия эстрогенов – ингибция НАДФН и аскорбатзависимых систем ПОЛ в микросомах, повышение уровня каталазы и т.д.

Вышесказанное свидетельствует о том, что антианеугенную и антикластогенную активность препарата кортексин на уровне целого организма в ряде случаев необходимо рассматривать в связи с метаболическими циклами кластогенеза, основываясь на плейотропном характере действия антимутогенов. Последний часто является результатом активации комплементарных к антимутогену рецепторов.

Выводы

1. У больных ДЦП происходит дестабилизация генома – повышается уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах и количество эритроцитов с микроядрами в периферической крови.

2. В экспериментальных и клинических исследованиях кортексин показал высокую степень антимутогенной и антиоксидантной активности и может быть использован для фармакологической коррекции неустойчивости генома у больных ДЦП.

Литература

1. Барашнёв, Ю.И. Перинатальная неврология / Ю.И. Барашнёв. – М.: Триада-Х, 2001. – 640 с.
2. Бочков, Н.П. Наследственность человека и мутагены внешней среды / Н.П. Бочков, А.Н. Чеботарев. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.
3. Бочков, Н.П. Клиническая генетика / Н.П. Бочков. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 448 с.
4. Дурнев, А.Д. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий / А.Д. Дурнев, С.В. Середин. – М.: Медицина, 1998. – 326 с.
5. Козинец, Г.И. Клетки крови – современные технологии их анализа. / Г.И. Козинец [и др.] – М.: Триада-Фарм, 2002. – 536 с.
6. Кржановский, Г.Н. Дизрегуляторная патология / под ред. Г.Н. Кржановский – М.: Медицина, 2001. – 632 с.
7. Hill, A. Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in term newborn / A. Hill // *Pediatr. Neurol.* – 1999. – № 7(5). – P. 317–325.
8. Maurer, U. Etiologies of cerebral palsy and classical treatment possibilities. / U. Maurer // *Wien. Med. Wochensch.* – 2002. – Vol. 152. – № 1–2. – P. 14–18.
9. Yin, R. Magnetic resonance imaging findings in cerebral palsy / R. Yin [et al.] // *J. Paediatr. Child Health.* – 2000. – Vol. 36. – № 2. – P. 139–144.
10. Christos, P. Cerebral palsy / P. Christos – New York, 2004. – P. 267.
11. Kulak, W. Antioxidant enzymes and lipid peroxides in children with cerebral palsy / W. Kulak [et al.] // *Life Sci.* – 2005. – Vol. 77. – № 24. – P. 3031–3036.
12. Haynes, R.L. Nitrosative and oxidantive injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia / R.L. Haynes [et al.] // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2003. – Vol. 62. – № 5. – P. 441–450.
13. Jaisle, F. Etiology of cerebral palsy / F. Jaisle // *Z. Geburtshilfe Neonatol.* – 1996. – Vol. 200. – № 5. – P. 169–175.
14. Resi, B. Neurodevelopmental outcome in children with periventricular leukomalacia / B. Resi [et al.] // *Coll. Antropol.* – 2008. – Vol. 32. – № 1. – P. 143–147.
15. Voseph, J. Volpe. Neurology of the newborn. / J. Voseph // Elsevier Health Sciences. – 2008. – P. 1094.

D.D. Gaynetdinova, D.V. Ayzatullina

Instability genomes and ways of its pharmacological correction at patients a children's cerebral paralysis

Abstract. It is estimated antimutagen and antioxidant activity cortexin. It is established that cortexin has shown high degree antimutagen and antioxidant to activity and ability to suppress intensity aneugenez at level of the whole organism. Aberrations of chromosomes in peripheral blood and level red blood cells with microkernel's in polychromatophilous red blood cells patient's children's cerebral paralysis and healthy children are studied. It is proved that patients a children's cerebral paralysis have a destabilization genom – level of chromosomal aberrations and quantity red blood cells with microkernel's in peripheral blood raises. As a result of treatment cortexin positive clinical dynamics at 9 of 10 children is noted. The greatest sensitivity to modifying action cortexin process of formation of products hydrogen oxidations lipids possessed. Cortexin has found out ability to suppress intensity chemically-induced mutagens, and raising efficiency of an aerobic metabolism, normalizes speed eritropoesis, increasing thereby time of restoration of potential damages of a deoxyribonucleic acid.

Key words: cortexin, aneugenez, chromosomes, red blood cells, a children's cerebral paralysis, mutagenesis, eritropoesis.

Контактный телефон: 8-917-269-58-39