

0-781423

На правах рукописи

АЙЗАТУЛИНА ДИНА ВАДИМОВНА

**ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ПРИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА
У БОЛЬНЫХ ДЕТСКИМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ
С ПЕРИВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЛЕЙКОМАЛЯЦИЕЙ**

14.00.13 – нервные болезни

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

К а з а н ь

2 0 0 9

65-100

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент
Д.Д.Гайнетдинова

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Ю.И.Кравцов
кандидат медицинских наук, доцент
В.Ф.Прусаков

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2009 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д.208.033.02 ГОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (420012, г. Казань, ул. Муштари, д. 11).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (420012, г. Казань, ул. Муштари, д. 11).

Автореферат разослан «___» _____ 2009

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. мед. наук, доцент

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000590922

Е.К.Ларюкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Детский церебральный паралич (ДЦП) – группа различных поражений мозга, возникающих в результате нарушения развития мозга в раннем онтогенезе, клинически проявляющихся нарушением двигательного, психического и речевого развития. ДЦП относится к тяжелым заболеваниям нервной системы у детей и подростков и занимает одно из ведущих мест в структуре детской инвалидности. В последние годы частота ДЦП существенно не изменяется и составляет от 1,7 до 3,1 на 1000 детей (Вельтищев Ю.Е., 1995; Семенова К.А., 2008; Grant A., 1992; Westbom L., Hagglund G., Nordmark E., 2007; Clark S.M., Ghulmiyah L.M., Hankins G.D., 2008; Smith L., Kelly K.D., Prkachin G. et al. 2008; Yokochi K., 2009).

По мнению большинства исследователей ДЦП перивентрикулярная лейкомаляция (ПВЛ) лежит в основе двигательных нарушений у больных, особенно родившихся недоношенными (Петрухин А.С., 2004; Малиновская О.Н., Белоусова Е.Д., Кешишян Е.С., 2005; Johnston M.V., Hoon A.H., 2006; Gressens P., Schwedimann L., Husson I. et al., 2008). Многочисленные исследования показали, что генетические программы и средовая регуляция формообразования нервной системы контролируются, прежде всего, матричной перивентрикулярной областью. Имеются доказательства того, что ПВЛ может возникать и у доношенного ребенка не только внутриутробно, но и после рождения (Левченкова В.Д., 2000; Скворцов И.А., Ермоленко Н.А., 2003; Cans C., McManus V., Crowley M. et al., 2004; Haynes R.L., 2005). При этом происходит нарушение ауторегуляции и селективной уязвимости сосудов перивентрикулярной области, что ведет к хроническому ишемическому процессу в головном мозге, биохимическим субстратом которого, как правило, является свободнорадикальное окисление (Johnston M.V., Hoon A.H., 2006; Khwaja O., Volpe J.J., 2008; Stark S., Schuller A., Sifrienger M. et al., 2008). Не исключено, что существует взаимосвязь активности процессов свободнорадикального окисления и степени поражения перивентрикулярной области. Однако, работ о значении свободнорадикального окисления при патологии перивентрикулярной области, а так же тяжести клинического течения ДЦП нам не встретилось.

Как показывают исследования последних лет, не у каждого ребенка, развивающегося в неблагоприятных внутриутробных условиях, формируется

ПВЛ (Скворцов И.А., Ермоленко Н.А, 2003; Blumenthal I., 2004). Очевидно, решающую роль в реализации потенциально патогенного воздействия на плод 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 имеются доказательства того, что одним из провоцирующих моментов стойкости двигательного дефицита при ДЦП, является нестабильность генома, проявляющаяся повышением уровня эритроцитов с микроядрами и лимфоцитов с перестройками хромосом в периферической крови (Гайнетдинова Д.Д., Семенов В.В., Семенов А.В. и др., 2004; Гайнетдинова Д.Д., 2005). Предполагается, что в основе этого явления лежит интенсификация в организме больных ДЦП процессов мутагенеза, за счёт 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. Изучение некоторых патогенетических звеньев заболевания поможет, уточнить механизмы, поддерживающие тяжесть заболевания и препятствующие эффективности лечебных мероприятий. Это позволит целенаправленно воздействовать на выявленные процессы, обоснованно назначать медикаментозную терапию и улучшать качество жизни пациента, больного ДЦП.

Все вышеизложенное определило цель и задачи исследования.

Цель работы: исследовать процессы свободнорадикального окисления при нестабильности генома у больных ДЦП с перивентрикулярной лейкомаляцией.

Задачи исследования:

1. Выявить зависимость цитогенетических нарушений от степени тяжести ДЦП.
2. Оценить активность процессов свободнорадикального окисления у детей с ДЦП и определить взаимосвязь показателей оксидантного стресса со степенями тяжести ПВЛ и клиническими проявлениями заболевания.
3. Установить связь выраженности нестабильности генома, активности ферментов антирадикальной защиты и процессов перекисидации у детей со спастическими формами ДЦП.
4. Изучить влияние нейротрофических препаратов (кортексин и церебролизин) на уровень эритроцитов с микроядрами и активность процессов окисления.

Научная новизна. Впервые обнаружена зависимость выраженности патологии перивентрикулярной области (ПВЛ) и тяжести клинической картины ДЦП от уровня цитогенетических нарушений в клетках периферической крови (число эритроцитов с микроядрами). У всех детей с ПВЛ, больных спастической диплегией и двойной гемиплегией, выявлен выраженный окислительный стресс, в отличие от детей без ПВЛ (гемипаретическая форма). Установлена взаимосвязь степени ПВЛ и активности окислительного стресса, и, прежде всего, реакций пероксидации. Показано, что у детей с ПВЛ, больных спастической диплегией и двойной гемиплегией с активацией окислительного стресса возрастает дестабилизация генома.

Впервые выдвинута гипотеза о механизмах формирования нестабильности генома у детей с ПВЛ, больных спастической диплегией и двойной гемиплегией. В основе дестабилизации генома в этой группе больных ДЦП лежит интенсификация процессов мутагенеза за счет усиленной генерации эндомутагенов (свободных радикалов) и ослабления антимуtagenной системы защиты генома. Выраженный окислительный стресс и дестабилизация генома могут рассматриваться как постоянно действующие и взаимозависимые факторы, интегрированные в общую систему патогенеза при ДЦП. Индуцирование оксидантного стресса и цитогенетических нарушений возможно в условиях развивающейся патологии, предположительно, в перивентрикулярной области (ПВЛ). С этих позиций ДЦП может рассматриваться не как стационарное, резидуальное состояние, а как прогрессирующее заболевание.

На основании полученных данных предложена новая методология фармакологической коррекции оксидантного стресса и нестабильности генома у детей, больных ДЦП, нейротрофическими препаратами, обладающими антиоксидантными и антимуtagenными свойствами. Определена разнонаправленность действия препаратов кортексин и церебролизин на процессы свободнорадикального окисления, что позволит обосновать выбор препарата в зависимости от клинической формы заболевания и оксидантного статуса больного ДЦП.

Практическая значимость исследования. Использование шкалы балльной оценки выраженности клинических проявлений облегчит распределение больных ДЦП на легкую (28-39 баллов), среднюю (40-51 балл) и тяжелую (52-63 балла) степени тяжести заболевания.

Выявление высокого уровня нестабильности клеточного генома у больного с ПВЛ является основанием отнесения ребенка к группе риска формирования тяжелой степени ДЦП и разработке ранних индивидуальных терапевтических мероприятий.

Повышение активности показателей ферментов антиоксидантной защиты, церулоплазмينا и продуктов ПОЛ у больного ДЦП позволит рассматривать окислительный стресс, как фактор, дестабилизирующий геном. У больных ДЦП повышение активности показателей процесса свободнорадикального окисления свидетельствует о напряжении антиоксидантной и антимуtagenной защиты и требует включения в терапию специфических препаратов с антиоксидантными свойствами.

Установление у больных ДЦП с ПВЛ высокого уровня пероксидации, а у больных ДЦП без патологии перивентрикулярной области высокой активности церулоплазмينا позволит обосновать дифференцированный подход ранней терапии и выбор тактики лечения в каждом конкретном случае.

Внедрение результатов работы. Результаты исследования внедрены в практику неврологических отделений Детской республиканской клинической больницы МЗ РТ, МУЗ Детской городской больницы № 8 г. Казани, а также используются в учебном процессе кафедры неврологии с курсом медицинской генетики ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Апробация работы. Основные результаты исследования были доложены на III-м и VII Российских конгрессах «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2004, 2008); X, XIII и XIV Всероссийских научно-практических конференциях «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2005, 2008, 2009); III Региональной научно-практической конференции приволжского федерального округа «Педиатрия и детская хирургия в приволжском федеральном округе» (Казань, 2006); XII-м Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2006); I и II Республиканских научно-практических конференциях врачей-неврологов Северо-Западного Федерального округа Российской Федерации «Актуальные проблемы неврологии» (Сыктывкар, 2006, 2009); Научном конгрессе «Бехтерев – основоположник нейронаук: творческое наследие, история и современность» (Казань, 2007); II Балтийском конгрессе по детской неврологии (Санкт-Петербург, 2009); Республикой научно-практической конференции с

всероссийским участием “Дегенеративные и сосудистые заболевания экстрапиримидной нервной системы, Высокие технологии в диагностике и лечении” (Казань, 2009), совместном заседании кафедры неврологии и рефлексотерапии, кафедры детской неврологии ГОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (Казань, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них – 3 работы опубликованы в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, библиографического указателя, включающего 104 отечественных и 100 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 20 рисунками и 29 таблицами в тексте.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Клинические проявления ДЦП взаимосвязаны со степенью поражения перивентрикулярной области, уровнем нестабильности клеточного генома периферической крови и выраженностью окислительных процессов.
2. У детей с ПВЛ оксидантный стресс является важным патогенетическим звеном формирования спастических форм ДЦП. Свободнорадикальное окисление поддерживает процессы, протекающие в перивентрикулярной области, и не исключено, что ПВЛ может инициировать окислительный стресс у детей со спастической диплегией и двойной гемиплегией.
3. Дестабилизация генома у детей с ПВЛ происходит на фоне активации свободнорадикальных процессов. В условиях повышения активности ферментов антирадикальной защиты и интенсификации процессов перекисного окисления липидов значительно возрастает мутагенное действие свободных радикалов на геном организма в целом и кроветворных клеток в частности. Оксидантный стресс является наиболее вероятным патогенетическим механизмом нестабильности генома у детей со спастической диплегией и

двойной гемиплегией.

4. Нейротропные препараты церебролизин и кортексин обладают выраженными антиоксидантными и антимуtagenными свойствами и могут использоваться как корректоры окислительных процессов и нестабильности генома у детей с ПВЛ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика больных и методов исследования

Материал исследования. Для решения поставленных задач нами обследовано 92 ребенка (40 мальчиков и 52 девочки) в возрасте от 1 до 5 лет. В основную группу включено 72 ребенка с ранней резидуальной стадией ДЦП. В исследование включались дети у которых не было данных ВУИ в неонатальном периоде и инфекционного процесса за 30 дней до и в момент исследования. Контрольная группа состояла из 20 практически здоровых детей. В соответствии с целью и задачами исследования основная группа была разделена на 2 подгруппы в зависимости от наличия патологии перивентрикулярной области при нейровизуализации: первая - 62 ребенка со спастической диплегией и двойной гемиплегией с ПВЛ, вторая - 10 детей с гемипаретической формой без ПВЛ. Патология перивентрикулярной области устанавливалась на основании НСГ исследования в возрасте до одного года (по имеющимся протоколам в амбулаторной карте) и после установления диагноза ДЦП (в возрасте старше 1 года) по результатам КТ исследований, подтверждающих наличие только ПВЛ без других нейровизуализационных находок в головном мозге.

Методы исследования. Клинико – анамнестический метод включал изучение анамнестических данных, сведений из наследственного и акушерского анамнеза, периода новорожденности, первого года жизни и всех этапов онтогенеза, данные клинических и инструментальных методов исследования. Неврологический статус и оценка психомоторного развития больных ДЦП изучались по шкале бальной оценки выраженности клинических симптомов ДЦП рекомендованной Миздравом СССР (1990), включающей 19 клинических признаков, отражающих способности в сфере самообслуживания, степень двигательного дефицита, показатели психоэмоциональной сферы, сенсорных функций и иммунной системы. Каждый показатель выражался в баллах (от 0 до 5), и по сумме баллов оценивалась степень тяжести ДЦП.

Для выявления цитогенетических аномалий в соматических клетках использовался метод учета микроядер в эритроцитах периферической крови. Забор крови для исследования производился в первый день поступления больного в стационар до начала лечения. Регистрация эритроцитов с микроядрами (ЭМ) в периферической крови осуществлялось согласно методике микроядерного теста (Shmid W., 1975).

Спектрофотометрическим методом в центральной научно-исследовательской лаборатории ГОУ ВПО «Казанского государственного медицинского университета» исследовались: активность СОД (Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф., 1983), каталазы (Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др., 1988) и пероксидазы (Попов Т., Нейловская Л., 1971) в гемолизате крови; содержание церулоплазмينا (Тэн Э.В., 1981), гидроперекиси липидов (Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И., 1983) и МДА (Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М., 1987) в плазме.

Статистическая обработка результатов проводилась параметрическим t – критерием Стьюдента, непараметрическим t – критерием Манна – Уитни и корреляционным анализом по программе Origin 6,1.

Результата исследования и их обсуждение

В результате ретроспективной оценки анамнеза состояния здоровья, особенностей течения беременности и родов у матерей 72 обследованных детей с ДЦП выявлено, что у большинства матерей как во время беременности, так и во время родов гипоксические факторы являлись ведущими факторами риска ДЦП. Число детей, родившихся в срок (30,6%), оказалось меньше, чем родившихся преждевременно (69,4%). Все дети, родившиеся на сроке гестации до 37 недели, страдали спастической диплегией и двойной гемиплегией. Дети с гемипаретической формой заболевания родились в срок и с нормальной и незначительно сниженной массой тела. При спастической диплегии и двойной гемиплегии число детей, родившихся с массой ниже 2500 гр. достоверно преобладало над числом пациентов, родившихся с массой выше 2500 гр ($p < 0,05$). Низкая масса тела при спастической диплегии и, особенно, при двойной гемиплегии доказывает, что дети, страдающие этими формами ДЦП, в основном, рождаются незрелыми, что в совокупности с внутриутробной гипоксией является высоким риском формирования ПВЛ.

Бальная оценка выраженности клинической картины ДЦП позволила

распределить обследованных больных на легкую (28-39 баллов), среднюю (40-51 балл) и тяжелую (52-63 балла) степени тяжести заболевания (табл.1). Оказалось, что легкая степень была представлена только спастической диплегией и гемипаретической формой ДЦП. При гемипаретической форме заболевания все дети страдали только легкой степенью поражения. Тяжелая степень заболевания, также как и средняя степень, представлена двумя формами – спастической диплегией и двойной гемиплегией.

Таблица 1

Распределение детей с ДЦП по тяжести заболевания

Формы ДЦП	Тяжесть клинической картины ДЦП					
	легкая (28-39 бал.)		средняя (40-51 бал.)		тяжелая (52-63 бал.)	
	абс.ч.	%	абс.ч.	%	абс.ч.	%
спастическая диплегия (n=34)	17	63,0	11	55,0	6	24,0
двойная гемиплегия (n=28)	0	0	9	45,0	19	76,0
гемипаретическая (n=10)	10	37,0	0	0	0	0
Итого (n=72)	27	100	20	100	25	100

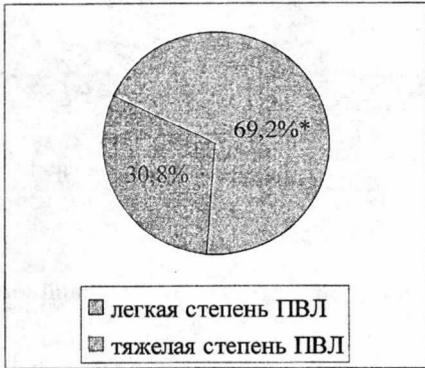
Однако, при тяжелом поражении детей с двойной гемиплегией было существенно больше больных со спастической диплегией. Кроме того, большая доля детей с двойной гемиплегией, страдали тяжелой степенью. Дети, больные спастической диплегией чаще страдали легкой и средней тяжестью ДЦП.

У всех детей со спастической диплегией и двойной гемиплегией имела место патология перивентрикулярной области (ПВЛ). Изучение степени выраженности клинических симптомов ДЦП у детей с различной степенью тяжести ПВЛ показало, что дети с I степенью ПВЛ достоверно чаще страдают легкой степенью, по сравнению со средней степенью тяжести заболевания (83,3% и 16,7%, соответственно; $p < 0,05$). Ни один пациент с I степенью ПВЛ не страдал тяжелой степенью ДЦП. Обратная картина отмечается при IV степени ПВЛ, при которой все дети страдают тяжело. При определении суммы баллов по группе, оказалось, что у детей с I степенью ПВЛ число баллов минимальное (39,0 баллов), а у больных с IV степенью – максимальное (57,3 баллов).

Согласно данным некоторых исследователей группой риска развития ДЦП является III и IV степени ПВЛ, а I и II степени рассматриваются как менее

опасные для формирования заболевания (Малиновская О.Н., Белоусова Е.Д., Кешишян Е.С., 2005). В нашей работе детей с легкой (I и II) и тяжелой (III и IV) степенью ПВЛ оказалось примерно равное количество (29 чел. - 46,8 % и 33 чел. - 53,2%).

Исследование показало, что при спастической диплегии число детей с легкой степенью ПВЛ достоверно преобладало по сравнению с тяжелой ПВЛ ($p < 0,05$), тогда как среди детей с двойной гемиплегией достоверно преобладало число больных с тяжелой степенью лейкомаляции ($p < 0,02$) (рис. 1 и 2).



Примечание: * - достоверность, $p < 0,05$

Рис.1 Распределение детей на степени ПВЛ при спастической диплегии



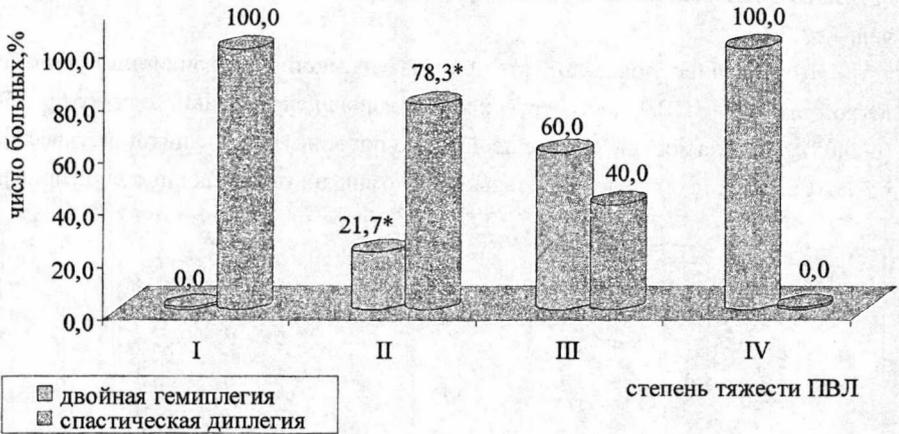
Примечание: * - достоверность, $p < 0,02$

Рис.2 Распределение детей на степени ПВЛ при двойной гемиплегии

Следовательно, степень тяжести ПВЛ у обследованных нами пациентов существенно влияет на формирование спастических форм ДЦП.

В результате проведенной работы выявлена зависимость степени тяжести ПВЛ от клинической формы ДЦП (рис. 3). Оказалось, что доля детей со спастической диплегией уменьшается с ростом степени тяжести ПВЛ: все дети с I степенью страдали спастической диплегией, тогда как среди детей с IV степенью - не встретился ни один ребенок с этой формой ДЦП. Противоположная тенденция наблюдалась у больных двойной гемиплегией: в нашем исследовании не оказалось ни одного ребенка с I степенью тяжести ПВЛ, тогда как группа детей с IV степенью ПВЛ была представлена только больными двойной гемиплегией. Цитогенетическое исследование выявило повышение числа ЭМ у каждого обследованного ребенка с ДЦП, и составило 0,64%, что достоверно превышало показатель спонтанного мутагенеза 0,22%

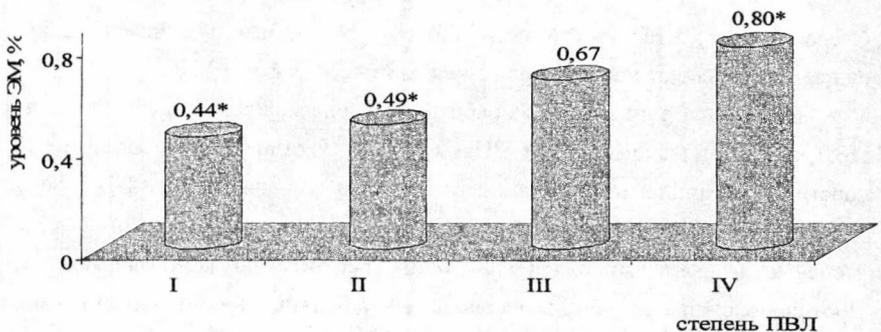
($p < 0,001$). Выявленные цитогенетические нарушения свидетельствуют о дестабилизации генома обследованных больных.



Примечание: * - различия достоверны, $p < 0,05$

Рис.3 Распределение больных спастической диплегией и двойной гемиплегией по степени тяжести ПВЛ

Нестабильность генома может возникнуть в условиях повышенной генерации эндомутагенов, приводящих к повреждению метаболических циклов анеугенеза и, как следствие увеличение числа клеток с цитогенетическими перестройками.



Примечание: * - различия данных IV степени с I и II степеням ПВЛ, $p < 0,05$

Рис. 4 Распределение больных ДЦП по числу ЭМ и степени тяжести ПВЛ

У обследованных детей нестабильность генома усугублялась с утяжелением степени ПВЛ: число ЭМ было максимальным при IV степени –

0,80%, минимальным – при I степени - 0,44% ($p < 0,05$) (рис. 4).

Обнаружена прямая корреляция числа ЭМ и тяжести клинической картины заболевания ($R=0,784$): чем выше дестабилизация генома, тем тяжелее клинические проявления ДЦП.

Таким образом, у детей с ПВЛ имеет место дестабилизация генома, коррелирующая с тяжестью клинических проявлений ДЦП. Следовательно, существуют неизвестные механизмы, провоцирующие цитогенетические нарушения в клетках периферической крови и усиливающие спонтанный эндомутагенез. Наиболее вероятными генераторами эндомутагенеза у детей с ПВЛ могут быть активные свободнорадикальные процессы.

Исследование активности ферментов антирадикальной защиты (СОД, каталазы, пероксидазы) и содержание церулоплазмينا в крови у детей с ДЦП обнаружило их высокий уровень, свидетельствующий об активации свободнорадикальных процессов (табл. 2). Выявлена активация процессов окисления при всех исследуемых формах ДЦП. При спастической диплегии и двойной гемиплегии отмечается высокая активность СОД и каталазы, превышающие показатели в группе контроля ($p < 0,05$).

Таблица 2

Показатели активности ферментов антиоксидантной защиты и церулоплазмينا у больных ДЦП и здоровых детей

Формы ДЦП	Ферменты антиоксидантной защиты			Белок плазмы
	СОД, (у.е.)	каталаза, (млкатал/л)	пероксидаза, (тыс.долях интерна.ед.)	церулоплаз- мин (мг%)
спастическая диплегия	1,0±0,3 ^{0,1}	757±108 ³	38,4±20,0	55,0±12,0 ⁴
двойная гемиплегия	1,0±0,4 ^{0,1}	798±198 ³	44,4±23,3	62,9±8,0
гемипаретическая	1,5±0,4 ⁰	503±30 ^{2,3}	36,2±13,2	77,6±2,7 ⁴
контроль	0,6±0,2 ⁰	659±93 ^{2,3}	33,0±16,3	51,5±15,5 ⁴

Примечание: 1) ⁰ - различия активности СОД при всех формах ДЦП с контролем, $p < 0,05$; 2) ¹ - различия активности СОД у лиц со спастической диплегией и двойной гемиплегией с активностью СОД при гемипаретической форме, $p < 0,05$; 3) ² - различия активности каталазы у лиц с гемипаретической формой и в контроле, $p < 0,05$; 4) ³ - различия активности каталазы у лиц с тетрапарезами и у детей с гемипаретической формой и контролем, $p < 0,05$; 5) ⁴ -

различия уровня церулоплазмينا при спастической диплегии и в контроле, с показателями при гемипаретической форме, $p < 0,05$.

Активность пероксидазы и уровень церулоплазмينا также повышены при этих формах заболевания ($p > 0,05$). По этим данным можно судить об активных процессах окисления у детей со спастической диплегией и двойной гемиплегией. У больных гемипаретической формой ДЦП обнаружено повышение активности СОД и церулоплазмينا по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Уровень МДА у детей со спастической диплегией и двойной гемиплегией достоверно превышает значения у детей с гемипаретической формой и группы контроля ($p < 0,05$) (табл. 3). Содержание МДА у лиц с гемипаретической формой приближается к показателям здоровых лиц.

Таблица 3

Показатели активности ПОЛ у больных различными формами ДЦП и здоровых детей

Формы ДЦП	Продукты ПОЛ	
	гидроперекись липидов, (отн.ед)	МДА, (мкМ/л)
спастическая диплегия	9,4±3,8	1,36±0,5*
двойная гемиплегия	13,1±4,3	1,58±0,7*
гемипаретическая	8,0±1,3	0,7±0,3*
контроль	8,3±2,9	0,57±0,2*

Примечание: * - различия содержания МДА у лиц со спастической диплегией и двойной гемиплегией со значениями при гемипаретической форме и в контроле достоверны, $p < 0,002$.

На основании выявленного повышения ферментов антирадикальной защиты и значений продуктов ПОЛ (МДА) можно судить о течении выраженного окислительного стресса у детей с ПВЛ, больных спастической диплегией и двойной гемиплегией.

Следует заметить, что при двойной гемиплегии все исследуемые показатели оказались выше, чем при спастической диплегии, что совпадает с тяжестью клинических проявлений самой тяжелой формы ДЦП.

При гемипаретической форме активность процессов пероксидации ниже, о чем свидетельствует невысокий уровень МДА. Высокая активность СОД и уровня церулоплазмينا при гемипаретической форме свидетельствует о повышенной, по сравнению с контролем, продукции супероксид анион-

радикала, с которого и начинается вся цепочка свободнорадикального окисления, как в клетках, так и в плазме. Однако, у больных гемипаретической формой активность СОД и церулоплазмينا оказывается вполне достаточной для инактивации свободных радикалов и торможению процессов ПОЛ.

Анализ процессов свободнорадикального окисления у детей с различной степенью тяжести ПВЛ показал, что активность СОД увеличивается с утяжелением степени ПВЛ (табл. 4). Однако, при IV-ой степени ПВЛ выявлено резкое снижение СОД по сравнению с показателями в группе детей с I, II и III степенью тяжести ПВЛ ($p < 0,05$).

Таблица 4

Показатели активности ферментов антиоксидантной защиты и церулоплазмينا у больных ДЦП с различными степенями тяжести ПВЛ

Степень ПВЛ	Ферменты антиоксидантной защиты			Белок плазмы
	СОД, (y.e.)	каталаза, (млкатал/л)	пероксидаза, (тыс.долях интернац.ед.)	церулоплазмин (мг%)
I (n=6)	0,87±0,2	545±81**	30,3±6,7	50,4±10,6
II (n=23)	0,95±0,3	767±97	31,7±5,6	54,9±12,0
III (n=25)	1,66±0,2*	869±216	74,9±19,9***	55,2±12,9
IV (n=8)	0,47±0,2*	927±143	29,1±12,6	54,2±13,2
контроль (n=20)	0,6±0,2*	659±93**	33,0±16,3	51,5±15,5

Примечание: 1) * - различия активности СОД при III степени ПВЛ с показателями при IV степени и контролем, $p < 0,002$; 2) ** - различия активности каталазы при II, III, IV степени ПВЛ с показателями при I степени ПВЛ и в контроле, $p < 0,05$; 3) *** - различия активности пероксидазы при III степени ПВЛ с I, II, IV степенью и контролем, $p < 0,05$.

Содержание каталазы также повышается с увеличением тяжести ПВЛ: при I степени значение минимальное (545 млкатал/л), а при IV – максимальное (927 млкатал/л) ($p < 0,05$).

Анализ процессов пероксидации у детей со спастической диплегией и двойной гемиплегией выявил взаимосвязь содержания продуктов ПОЛ от степени тяжести ПВЛ (табл. 5). Оказалось, что уровень гидроперекиси липидов у детей с I степенью ПВЛ - максимальный (11,8 отн.ед.), а с IV степенью - минимальный (9,6 отн.ед.). По значениям уровня МДА отметилась обратная тенденция: максимальное значение показателя обнаружено у больных с IV

степенью ПВЛ (2,1 мкМ/л), а минимальное – с I степенью (0,8 мкМ/л).

Таблица 5

Показатели продуктов ПОЛ у больных ДЦП с различной степенью тяжести ПВЛ и здоровых лиц

Степень ПВЛ	Продукты ПОЛ	
	Гидроперекись липидов, (отн.ед.)	МДА, (мкМ/л)
I (n=6)	11,8±3,6	0,8±0,5
II (n=23)	12,6±4,0	1,46±0,6*
III (n=25)	10,6±2,3	1,64±0,7*
IV (n=8)	9,6±2,7	2,1±0,5*
контроль (n=20)	8,3±2,9	0,57±0,2

Примечание: * - различие уровня МДА у детей с II, III, IV степенями ПВЛ с показателем группы с I степенью ПВЛ и контролем, $p < 0,02$

Вероятно, эти “ножницы“ возникают вследствие выраженной нестойкости гидроперекиси липидов, содержание которой в условиях напряжения антирадикальной защиты резко снижается. В противовес этому, содержание МДА по мере утяжеления ПВЛ, и следовательно, тяжести ДЦП, увеличивается, что свидетельствует о высокой активации процессов ПОЛ у детей с грубым повреждением перивентрикулярной области. Особенно отчетливо это прослеживается у больных ДЦП с IV степенью тяжести ПВЛ, при которой выявлен окислительный стресс высочайшей активности. В этих условиях повышенное содержание МДА проявляет своё выраженное цитотоксичное действие, вызывая дестабилизацию генома.

Полученные результаты биохимического и цитогенетического исследования свидетельствуют о наличии у детей с ПВЛ двух одновременно протекающих патологических процесса. С одной стороны – повышение интенсивности процессов свободнорадикального окисления, с другой – нестабильность генома с высоким числом цитогенетических перестроек. Оба эти процесса взаимосвязаны друг с другом: активность СОД обратно коррелируют с числом ЭМ ($R = -0,601$), а по содержанию МДА и активности каталазы выявлена прямая корреляция с числом эритроцитов с перестройками ($R = 0,67$ и $R = 0,605$). Поэтому можно предположить, что окислительный стресс дестабилизирует клеточный геном у детей с ДЦП и поддерживает процессы, протекающие (а может и исходящие) в перивентрикулярной области.

Таким образом, у детей с ПВЛ отмечается более значимое страдание, чем

у детей без ПВЛ, как по тяжести клинического течения заболевания, так и по уровню цитогенетических нарушений. Окислительный стресс у детей с ПВЛ имеет важное патогенетическое значение в инициации патологического процесса и в его прогрессировании. Это диктует необходимость дополнительных путей фармакологической коррекции окислительного стресса и цитогенетических нарушений у детей с ПВЛ. Динамика активности процессов свободнорадикального окисления и уровня цитогенетических нарушений у больных с ПВЛ под воздействием нейротрофических препаратов церебролизин и кортексин исследована у 20 больных 1-5 лет с диагнозом ДЦП, спастическая диплегия. Все больные были распределены на две группы: первая группа (10 чел.) принимала церебролизин в дозе 0,1мл/кг/сут в/м 20 дней, вторая (10 чел.) – кортексин в дозе 0,5 мг/кг/сут в/м 20 дней. Выбор формы – спастическая диплегия – определен её промежуточным положением по уровню цитогенетических нарушений и показателей свободнорадикального окисления. У всех пациентов обязательным условием на момент эксперимента было отсутствие сопутствующих соматических заболеваний, эпилепсии и некупированных пароксизмальных реакций. За 30 дней до монотерапии дети не получали медикаментозного и физиотерапевтического лечения, не проводилось инструментального обследования. Исследование антиоксидантного статуса, продуктов ПОЛ и числа ЭМ осуществлялось в день начала терапии (до лечения) и через 20 дней монотерапии (табл. 6).

Таблица 6

**Сравнительная характеристика антиоксидантного эффекта
церебролизина и кортексина**

Препараты	Антиоксидантный эффект, %					
	ферменты антиоксидантной защиты			церуло-плазмин	продукты ПОЛ	
	СОД	каталаза	пероксидаза		гидроперекись липидов	МДА
церебролизин	46,2	25,5	39,8*	-	19,6	42,1
котрксин	33,3	8,0	8,2*	33,8	10,5	36,7

Примечание: 1) антиоксидантный эффект – процент снижения показателя после монотерапии от исходного уровня (до лечения); 2) * - различия антиоксиданного эффекта препаратов, в снижении активности пероксидазы, достоверно, $p < 0,05$.

Изучение новых свойств нейротрофических препаратов продемонстрировало способность и церебролизина, и кортексина снижать активность ферментов антиоксидантной защиты и процессов ПОЛ, однако динамика на фоне терапии препаратами несколько отличалась. По антиоксидантному эффекту на гидроперекись липидов и МДА оба препарата оказались схожими, особенно по снижению МДА: церебролизин - на 42,1%, а кортексин - на 36,6 %. Кроме выраженного антиоксидантного свойства, оба препарата обладают антимуtagenными свойствами (табл. 7). Сравнительная характеристика церебролизина и кортексина по активности антимуtagenного эффекта выявила отчетливый анеугенный эффект препаратов: число ЭМ при монотерапии церебролизином снизилось на 45,4%, а кортексином - на 40,0%. Таким образом, оба препарата могут быть предложены в качестве патогенетической антимуtagenной и антиоксидантной терапии при ПВЛ.

Таблица 7

Сравнительная характеристика антимуtagenного эффекта церебролизина и кортексина

Препарат	Число ЭМ до лечения (%)	Число ЭМ после лечения (%)	Антимуtagenный эффект (%)
церебролизин	0,86*	0,47*	45,4
кортексин	0,7**	0,42**	40,0

Примечание: * - различия числа ЭМ до и после лечения церебролизином, $p < 0,05$; ** - различия числа ЭМ до и после лечения кортексином, $p < 0,05$ /

Кортексин особенно активно понижает уровень церулоплазмина, который оказался максимально повышенным у детей с гемипаретической формой ДЦП, поэтому терапия кортексином может быть рекомендована прежде всего детям с гемипарезами. Церебролизин может быть назначен детям с ПВЛ. Поскольку на монотерапии ни кортексином, ни церебролизином не было достигнуто снижения продуктов ПОЛ и уровня нестабильности генома до показателей здоровых лиц, необходимы дальнейшие исследования в области фармакологической коррекции оксидантного стресса и цитогенетических нарушений в целях оптимизации терапии ПВЛ и профилактики формирования спастической диплегии.

ВЫВОДЫ

1. Тяжесть клинических проявлений ДЦП взаимосвязана с уровнем цитогенетических нарушений в клетках периферической крови больных с ПВЛ. Нестабильность генома ярко выражена у детей с тяжелой степенью поражения перивентрикулярной области: чем тяжелее степень ПВЛ, тем выше число ЭМ и грубее клиническая картина ДЦП.
2. У детей с ДЦП, спастическая диплегия и двойная гемиплегия протекают на фоне повышенной активности ферментов антирадикальной защиты (СОД, каталаза, пероксидаза) и интенсификации процессов ПОЛ (МДА). Окислительный стресс утяжеляет клиническое течение спастических форм ДЦП и более выражен у детей с тяжелой патологией перивентрикулярной области.
3. Выраженность дестабилизации генома находится в зависимости от активности процессов свободнорадикального окисления у детей с ПВЛ, больных спастическими формами ДЦП. С повышением активности процессов пероксидации увеличивается число ЭМ в клетках периферической крови. Свободнорадикальные процессы могут рассматриваться, как наиболее вероятные патогенетические механизмы дестабилизации клеточного генома при ПВЛ.
4. Нейротрофические препараты церебролизин и кортексин понижают активность процессов свободнорадикального окисления, что подтверждает их выраженный антиоксидантный эффект. Кортексин особенно активно снижает уровень церулоплазмينا, а церебролизин понижает активность СОД. Способность препаратов снижать активность процессов эндомутагенеза в крови детей, больных спастической диплегией, свидетельствует о антимуtagenом свойстве обоих препаратов с отчетливым анеугенным эффектом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Детям с ПВЛ рекомендовано исследование показателей свободнорадикального статуса. Повышение содержания МДА выше 0,7 мкМ/л и активности СОД более 0,6 у.е. свидетельствует о выраженном окислительном стрессе.
2. Для коррекции окислительного стресса в организме больных спастической

диплегией и двойной гемиплегией с ПВЛ рекомендован церебролизин в дозе 0,1 мл/кг/сут в/м в течении 20 дней курсами 2-3 раза в год.

3. При повышении содержания церулоплазмينا у больных ДЦП без патологии перивентрикулярной выше 51,5 мг% целесообразно назначение препарата кортексин в дозе 0,5 мг/кг/сут в/м в течение 20 дней.
4. Нейротропные препараты церебролизин и кортексин, обладающие антиоксидантными и антикластогенными свойствами могут быть использованы как препараты с антиоксидантным и антимутагенным действием детям со спастическими формами ДЦП.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гайнетдинова Д.Д. Исследование микроядер эритроцитов для оценки цитогенетических нарушений у больных ДЦП / Д.Д. Гайнетдинова, И.А. Пахалина, Д.В. Абдуллатыпова // Тез. докл. II Росс. конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». – М., 2004. – С.142-143.
2. Абдуллатыпова Д.В. Использование бальной оценки степени выраженности клинических показателей у больных с ДЦП / Д.В. Абдуллатыпова // Тезисы докладов Всероссийской научно- практической конференции молодых учёных КГМУ. - Казань, 2005. - С.87.
3. Гайнетдинова Д.Д. Цитогенетические нарушения в эритроцитах периферической крови у больных ДЦП и их коррекция энцефалом и церебролизином / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Абдуллатыпова // Тезисы докладов III региональной научн.-практ. конф. “Педиатрия и детская хирургия в приволжском федеральном округе“, Казанский медицинский журнал. – Казань, 2006. - С.131.
4. Гайнетдинова Д.Д. Динамика уровня цитогенетических нарушений в эритроцитах периферической крови у больных с ДЦП на фоне терапии церебролизином и энцефалом / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Абдуллатыпова // Тезисы докладов XII конгресса “Человек и лекарство”. – Москва, 2006. С.99.
5. Гайнетдинова Д.Д. Фармакологическая коррекция цитогенетических нарушений в эритроцитах периферической крови у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Абдуллатыпова // Тезисы докладов научно-практической конференции неврологов Северо-западного Федерального округа – Сыктывкар, 2006. - С.29-30.
6. Гайнетдинова Д.Д. Взаимосвязь клинических и цитогенетических нарушений

при ДЦП / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Абдуллатыпова // Тезисы докладов научного конгресса "Бехтерев-основоположник нейронаук: творческое наследие, история и современность". Неврологический вестник – Казань, 2007. - С.34.

7.Гайнетдинова Д.Д. Выраженность клинических симптомов и уровня цитогенетических нарушений в клетках периферической крови у больных ДЦП / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатулина, В.А. Аюпова, В.А. Якупова // Тезисы докладов Российского конгресса "Современные технологии в педиатрии и детской хирургии". – Москва, 2008. - С.150.

8.Гайнетдинова Д.Д. Клинико-цитогенетическое сопоставление выраженности клинических проявлений и уровня нестабильности генома у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатулина // Неврологический вестник. - 2008. - Т.XL, Вып. 3. - С.29-32.

9.Айзатулина Д.В. Цитогенетическое и клиническое сопоставление при ДЦП / Д.В. Айзатулина // Тезисы докладов XIII Всероссийской научно-практической конференции "Молодые ученые в медицине". - Казань, 2008. - С.85.

10.Гайнетдинова Д.Д. Некоторые аспекты патогенеза двигательных нарушений при ДЦП / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатулина // Тезисы докладов научн.-практ. конф. неврологов Северо-западного Федерал. округа. - Сыктывкар, 2009. - С.12.

11.Айзатулина Д.В. Клинические особенности неврологических нарушений у детей с детским церебральным параличом / Д.В. Айзатулина // Тезисы докладов Всеросс. научн.-практ. конф. молодых ученых КГМУ. - Казань, 2009. - С.87.

12.Гайнетдинова Д.Д. Исследование взаимосвязи выраженности клинических проявлений и цитогенетических нарушений у детей с различными формами ДЦП / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатулина // Сб. научн трудов конгресса "Актуальные проблемы управления здоровьем населения". - Нижний Новгород, 2009. - С.24-29.

13.Гайнетдинова Д.Д. Антимутагенные, антикластогенные и антирадикальные свойства нейротропных средств, используемых в комплексной терапии ДЦП / Д.Д. Гайнетдинова, В.В. Семенов, Д.В. Айзатулина, М.Ф. Исмагилов // Неврологический вестник. – 2009. - Т.XLI, Вып. 1. - С.30-35.

14.Гайнетдинова Д.Д. Антимутагенные свойства кортексина при нестабильности генома у детей с перивентрикулярной лейкомаляцией / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатулина // Тезисы докладов II Балтийского конгресса по

детской неврологии посвященный 80-летию клиники нервных болезней СПб ГПМА. -СПб,2009.- С.22.

15.Гайнетдинова Д.Д. Неврологический дефицит у больных с высоким уровнем эндомутагенеза при ДЦП / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатулина В.А. Аюпова // Тезисы докладов Республиканской научн.-практ. конф. с всероссийским участием "Дегенеративные и сосудистые заболевания экстрапирамидной нервной системы. Высокие технологии в диагностике и лечении". - Казань, 2009. - С.4.

16.Гайнетдинова Д.Д. Нестабильность генома и пути его фармакологической коррекции у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, Д.В. Айзатулина // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2009. - №3 (27). – С. 43-47.

Список сокращений

ДЦП – детский церебральный паралич

ВУИ – внутриутробная инфекция

КТ – компьютерная томография

МДА – малоновый диальдегид

ПВЛ – перивентрикулярная лейкомаляция

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД - супероксиддисмутаза

ЭМ – эритроциты с микроядрами

Подписано в печать 16.11.2009. Тираж 100 экз. Заказ О-131

Отдел оперативной полиграфии ГУ «РМБИЦ»
420059 Казань, ул. Хади Такташа, 125

