

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА У БОЛЬНЫХ ДЕТСКИМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ

Д.Д. Гайнетдинова, В.В. Семенов, М.Ф. Исмагилов, И.А. Пахалина, Е.В. Колочкова

*Кафедра неврологии с курсом медицинской генетики (зав. – проф. М.Ф. Исмагилов),
кафедра медицинской биологии и генетики (зав. – проф. В.В. Семенов) Казанского
государственного медицинского университета*

Содержание понятия детского церебрального паралича (ДЦП) объединяет крайне гетерогенную группу заболеваний непрогредиентного характера, имеющих совершенно различные этиологию и патогенез и сходных зачастую лишь по клиническим феноменам двигательных нарушений центрального происхождения, сопровождающихся речевыми расстройствами, эпилептическими приступами, интеллектуальной недостаточностью [1]. Большинство исследователей считают ДЦП дизонтогенетическим заболеванием, развивающимся вследствие различных неблагоприятных факторов в антенатальном, перинатальном и интранатальном периодах (соматические и инфекционные заболевания, профессиональные вредности матери во время беременности, асфиксия, нарушения мозгового кровообращения различного генеза и другие патологические состояния у новорожденного) [1, 9].

До настоящего времени остается неясным, почему в одних случаях наличие целого комплекса вредных факторов не приводит к каким-либо нарушениям деятельности мозга, а в других даже легкая асфиксия может повлечь за собой развитие грубой церебральной патологии. Как правило, необычные ответные реакции проявляются у индивидуумов, которые по своему генетическому статусу значительно отличаются от моды распределения в популяции [10]. Исходя из этого, одним из моментов, провоцирующих возникновение заболевания, может стать появление у зародыша или плода нестабильности генома (НГ). Регистрация этого феномена после рождения ребенка и у детей разных возрастных групп может служить косвенным доказательством стойкости этой патологии при ДЦП и, следовательно, рассматриваться как постоянно действующий фактор, интегрированный в общую систему патогенеза заболевания. Не исключен и обратный механизм, когда в условиях развивающейся патологии определенные патогенетические звенья могут стать причиной повреждения генетического аппарата. В любом случае установ-

ление феномена НГ у больных ДЦП может внести существенный вклад в представление об этиологии и патогенезе этого заболевания, наметить более радикальные пути восстановительного лечения.

В специальной литературе широко дискутируется вопрос об участии различных генетических механизмов в этиологии и патогенезе ДЦП [14]. Однако мы не обнаружили публикаций, посвященных анализу уровня хромосомных аберраций в лимфоцитах и микроядер в эритроцитах (ЭМ) периферической крови у больных ДЦП.

Цель исследования: оценка методами цитогенетики состояния генома у больных ДЦП.

Обследовано 98 детей и подростков (59 мальчиков и 39 девочек) с различными формами ДЦП и 40 здоровых школьников (10 мальчиков и 30 девочек). Диагноз ДЦП устанавливался на основании клинико-anamnestических данных и инструментальных методов исследования. Все больные были разделены на 6 групп согласно принятой в нашей стране классификации [1]. У 23 (23,5%) больных была спастическая диплегия (СД), у 23 (23,5%) – двойная гемиплегия (ДГ), у 17 (17,7%) – гиперкинетическая форма (ГК), у 15 (15,3%) – левосторонняя гемипаретическая форма (ЛГ), у 12 (12,2%) – правосторонняя гемипаретическая (ПГ), у 8 (8,2%) – атонически-астатическая форма (АА). В трех первых группах и в группе с ПГ преобладали мальчики (примерно 60%), в группе ЛГ – девочки, а в группе АА число мальчиков и девочек было одинаковым.

Для регистрации микроядер [15] просматривали мазки периферической крови больных при поступлении их в стационар до лечения. В контрольной группе (30 детей) использовалась кровь, взятая при плановых диспансерных обследованиях. Свежие высушенные мазки фиксировали 90–70% этиловым спиртом 3 минуты. Сухие препараты окрашивали в растворе азур-эозинового красителя Романовского–Гимзы в соотношении 1:5 на дистиллированной воде с pH 6,8 в тече-

ние 20 минут и хорошо промывали. Просматривали 1-2 мазка, полученных от каждого обследованного. В каждом мазке подсчитывали не менее 20 тысяч эритроцитов, что позволяло проводить исследования в группах с малой выборкой.

Аберрации хромосом (АХ) были изучены у 49 больных, распределенных в соответствии с формой заболевания по 5 группам. В каждой группе было в основном по 10 человек. Из-за малочисленности из обследования были исключены больные с АА. В группе детей с ДГ было обследовано 9 человек, так как по техническим причинам (гемолиз крови) уровень АХ у одного из них определить не удалось. Культивирование крови осуществляли согласно методу Н.П. Бочкова и соавт. [2]. Культуру фиксировали на 48 часов. За 3 часа до фиксации добавляли колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. На каждого обследованного готовили 2 мазка, в каждом мазке изучали по 150 метафаз, полученные данные суммировали. Использованные реактивы (фитогемагглютинин, колхицин и красители) производились фирмой "Sigma". Учитывались все хромосомные и хроматидные аберрации [3].

При отборе детей в группы, в которых производился учет АХ, возник вопрос о величине выборки. С одной стороны, чем меньше детей в группе, тем меньшее их число будет подвергаться различным исследовательским манипуляциям (хотя последние и совмещены с плановыми лабораторными анализами), что с этической точки зрения является благоприятным моментом. С другой стороны, малая репрезентативная выборка повышает вероятность ошибки 1 и 2-го рода (вероятность ложноположительного или ложноотрицательного заключения) [3]. Согласно данным литературы, при цитогенетическом анализе, подобно запланированному нами, достаточно пользоваться выборками при величине ошибок, равной 0,05 и анализировать от каждого индивидуума 200—700 клеток. Эти сведения, а также рекомендации Н.П. Бочкова и соавт. [3] позволили остановиться на величине выборки для каждой формы ДЦП, равной 10, и на 300 просматриваемых клетках от каждого обследованного.

Статистический анализ полученных данных проводился с помощью пакета программ "STATISTIKA" (Stat. Soft. I nc. 1993, USA). Вариационный анализ использовали только при обработке результатов, полученных методом регистрации в крови ЭМ. При расчетах использовали формулу:

$$i = \frac{X_{\max} - X_{\min}}{K}$$

где i – величина классового интервала, X_{\max} и X_{\min} – максимальные и минимальные варианты совокупности, K – число классов, которое определяли по формуле Стерджеса: $K=1+\lg n$. [6].

Уровень эритроцитов с микроядрами.

При анализе результатов исследования прежде всего следует отметить факт более существенного повышения уровня ЭМ в крови больных ДЦП, чем у здоровых детей. Это хорошо видно по данным табл. 1: уровень ЭМ у больных детей во всех случаях достоверно превышает контрольные значения ($p < 0,001$). Оценка количества ЭМ в соответствии с формой заболевания, возрастом и полом привела к неоднозначным выводам. У больных с различной формой заболевания средний уровень ЭМ был примерно одинаков – во всех случаях $p > 0,05$ (табл.1). Этот неожиданный факт мы объясним позже, в разделе, посвященном влиянию видуральных реакций больных ДЦП на факторы, повреждающие их геном.

Более сложной была зависимость уровня ЭМ от пола ребенка. Если сравнение показателей ЭМ между группами мальчиков и девочек с одинаковыми формами заболевания практически не выявило существенных отклонений (во всех случаях $p > 0,05$), то зависимость величин ЭМ и форм ДЦП внутри групп оказалась неоднозначной. У мальчиков уровень ЭМ не зависел от формы заболевания, у девочек же с гиперкинетической формой заболевания он был достоверно выше, чем при спастической диплегии ($p < 0,05$) и гемипаретической формах болезни ($p < 0,05$). Мы затрудняемся дать оценку данному явлению, однако не исключено, что эти различия могут быть связаны с малой выборкой в исследуемых группах.

В заключение необходимо отметить значительную вариабильность числа ЭМ у обследованных больных. Этот факт неоднократно подчеркивали и другие исследователи [5]. Для иллюстрации данного феномена мы построили вариационные кривые распределения числа обследованных детей по кратности превышения у них уровня ЭМ по сравнению с контролем (рис. 1) Выявлено несколько закономерностей: во-первых, у большинства детей кратность превыше-



Рис. 1. Вариационная кривая распределения количества эритроцитов с микроядрами у больных ДЦП.

Таблица 1

Число эритроцитов с микроядрами у больных ДЦП в зависимости от формы заболевания и пола детей

Формы ДЦП	Всего обследовано	Число эритроцитов с микроядрами, в %				
		в группе (M±m)	у мальчиков		у девочек	
			n	(M±m)	n	(M±m)
СД	23	0,209±0,006*	16	0,212±0,009*	7	0,201±0,008**
ДГ	23	0,213±0,007*	15	0,210±0,008*	8	0,219±0,017*
ГК	17	0,215±0,011*	11	0,201±0,014*	6	0,244±0,015*
ЛГ	15	0,193±0,007*	6	0,187±0,011*	9	0,198±0,009*
ПГ	12	0,194±0,005*	7	0,188±0,007*	5	0,201±0,006**
АА	8	0,210±0,009*	4	0,216±0,016*	4	0,204±0,012**
Контроль	40	0,087±0,008*	10	0,088±0,014*	30	0,075±0,006*

Различия с контролем достоверны (p<0,001). * p>0,05 — различия между мальчиками и девочками с одинаковыми формами заболевания, ** p>0,05 — по сравнению с ГК.

ния уровней ЭМ по сравнению с контролем укладывалась в диапазоне 2,1–2,9. Во-вторых, ни при одной форме заболевания не выявлен пик превышения кратности, выходящий за пределы этого диапазона. Кроме того, достаточно большой размах варьирования уровня ЭМ у больных ДЦП (X_{max} у некоторых больных почти в 4 раза превышал контроль) является свидетельством значительного влияния индивидуальной компоненты (например, наследственности) на формирование клинико-патогенетического состояния больных ДЦП. И, наконец, при большом размахе индивидуальных показателей достоверную разницу между разными формами заболевания (по средним значениям уровней ЭМ) можно выявить только оперируя с большой выборкой больных (по крайней мере, более 30 индивидуумов). С этих позиций становятся понятными приведенные выше данные об отсутствии в наших исследованиях достоверных различий в уровнях ЭМ при разных формах заболевания (табл. 1).

Средняя величина кратности превышения уровня ЭМ над контролем у всех обследованных детей независимо от формы заболевания составляла примерно 2,5. У больных с разными формами заболевания она незначительно отличалась от этой величины и при СД, ДГ и ГК составляла 2,7, при АА – 2,3, ПГ – 2,2, ЛГ – 2,1. Таким образом, наиболее тяжелые поражения генома наблюдались при СД, ДГ и ГК. Закономерно возникает вопрос о состоянии больных, у которых уровень превышения числа ЭМ над контролем был существенно выше диапазона колебаний, характерного для больных ДЦП (т.е. более чем в 2,9 раза). Таких больных оказалось 13 человек, и у всех отмечалось тяжелое течение заболевания: у 2 грубые двигательные нарушения сопровождались резистентным к антиконвульсантной терапии эпилептическим синдромом, 12 – не могли себя обслужить.

Уровень aberrаций хромосом. В предварительных исследованиях было выяснено, что уровень АХ у здоровых детей

Таблица 2

Уровень aberrаций хромосом у больных ДЦП в зависимости от формы заболевания						
Формы ДЦП	n	Больные с ДВУ АХ		Средний уровень АХ, %		P
		абс.	%	у всех обследованных	у больных с ДВУ АХ	
СД	10	7	70	5,70±0,41	6,38±0,53	<0,001*
ДГ	9	7	78	7,63±0,51	8,24±0,59	<0,001**
ГК	10	7	70	5,80±0,43	6,19±0,51	<0,001*
ЛГ	10	6	60	6,00±0,43	6,39±0,58	<0,001*
ПГ	10	6	60	5,53±0,42	6,39±0,58	<0,001*
Контроль	10	—	—	2,63±0,93	2,63±0,93	<0,001*

Примечание: ДВУ — достоверно высокий уровень. * По сравнению с контролем, ** по сравнению с контролем и другими формами заболевания.

Таблица 3

Число детей с достоверно высоким уровнем повреждения генома и степень его повреждения при различных формах заболевания ДЦП в зависимости от используемых методов						
Формы ДЦП	Метод определения ЭМ			Метод определения АХ		
	всего обследовано детей	выявлено детей с НГ		всего обследовано детей	выявлено детей с НГ	
		абс.	%		абс.	%
СД	23	23	100	10	7	70
ДГ	23	23	100	9	7	78
ГК	17	17	100	10	7	70
ЛГ	15	15	100	10	6	60
ПГ	12	12	100	10	6	60
АА	8	8	100	10	—	—
Контроль	40	40	100	10	—	—

колеблется в пределах от 2,00±0,81 до 2,67±0,93 (клетки с двумя и более структурными перестройками не встречались). Эти цифры согласуются с данными других исследователей и подтверждают факт повышения в конце XIX и начале XX столетия уровня спонтанных перестроек в популяции человека.

Оценка уровня АХ у детей в различных группах ДЦП показала, что у всех обследованных регистрируется повышенное (по сравнению с контролем) количество перестроек хромосом в лимфоцитах крови. Однако при статистической обработке результатов исследования выявлено, что такое превышение над контролем было достоверным не у всех обследованных детей, а только у 60 – 78% (табл. 2).

Сравнительный анализ числа перестроек хромосом у детей с различными формами заболевания выявил наиболее высокий уровень повреждений хромосом при ДГ. У детей этой группы уровень АХ достигал в среднем 8,24%, что было достоверно выше аналогичных показателей в других группах и более чем в 3 раза выше спонтанного уровня. Известно, что ДГ – самая тяжелая форма ДЦП, при которой двигательные нарушения, психические и речевые расстройства сопро-

вождаются изменениями функционирования и других (экстрацеребральных) систем организма. Количество выявленных повреждений хромосом при других формах заболеваний было существенно ниже, находилось в диапазоне от 6,19±0,42 до 6,39±0,51 и достоверно не зависело от формы заболевания.

Сравнительная оценка результатов исследования, полученных разными методами, показала, что достоверно высокий уровень ЭМ регистрировался практически у каждого больного независимо от формы заболевания. В противоположность этому достоверно высокий уровень АХ отмечен не у всех обследованных больных. С указанных позиций микроядерный метод оценки НГ у больных ДЦП оказался более чувствительным (табл. 3). Это не распространяется на оценку степени повреждения генома. Чувствительность обоих методов в данном случае была примерно одинаковой, хотя повышение численности обследуемых выборок может внести определенные коррективы.

Изучение состояния генома у больных ДЦП, проведенное двумя цитогенетическими методами, однозначно показало, что у большинства детей происходит дестабилизация генома – повышаются уро-

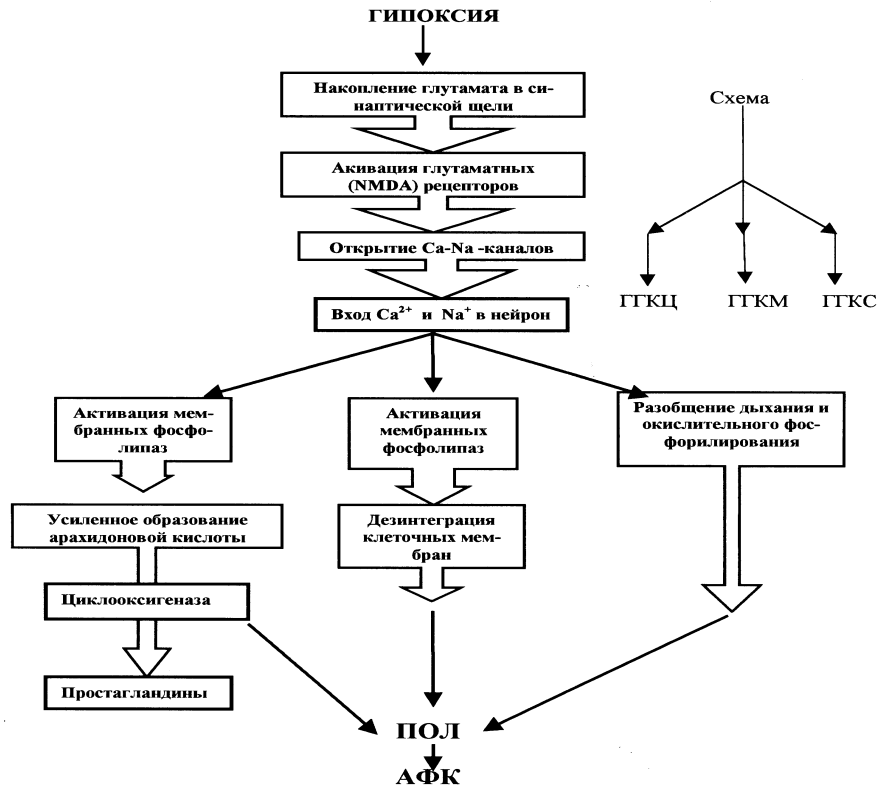


Рис. 2. Специфические для больных ДЦП метаболические циклы генерации эндомутагенов: гипоксия — глутамат — кальций — циклооксигеназа (ГГКЦ), гипоксия — глутамат — кальций — мембраны клетки (ГГКМ), гипоксия — глутамат — кальций — сопряженное фосфорилирование (ГГКС).

вень АХ в лимфоцитах и количество ЭМ в периферической крови. Выявленный нами феномен не является характерным только для больных ДЦП, регистрируется он и при других ненаследственных заболеваниях — хроническом остеомиелите, бронхиальной астме, анемии Фанкони и др. [8, 11]. Предполагается, что в основе этого явления лежит интенсификация в организме больных процессов мутагенеза за счет усиленной генерации эндомутагенов и (или) ослабления антимутагенных систем защиты генома [8].

Известные к настоящему времени механизмы патогенеза ДЦП свидетельствуют, что в дестабилизации генома, скорее всего, принимают участие оба процесса. Так, первичным звеном патогенеза ДЦП в подавляющем большинстве случаев принято считать гипоксию нервной системы [12,13]. Дефицит O_2 инициирует в клетках целый ряд метаболических сдвигов, прежде всего окислительное фосфорилирование в митохондриях, синтез липидов и нуклеиновых кислот, внутриклеточное содержание Ca^{2+} , баланс аминокислот, pH и других

процессов, обязательными участниками которых являются свободные радикалы (например, активные формы кислорода) или другие интермедиаты (например, глутамат, малоновый диальдегид и другие продукты перекисного окисления липидов), мутагенная активность которых неоднократно подтверждалась [4]. Образующиеся в результате нарушения деятельности кластогенсодержащих биохимических циклов эндомутагены могут накапливаться в организме до уровня, представляющего серьезную опасность для его генома. Высокое содержание некоторых перечисленных выше эндомутагенов в организме больных ДЦП в настоящее время доказано (например, для малонового диальдегида, глутамата и др.).

В качестве примера метаболических циклов, являющихся местами образования эндомутагенов (кластогенов), приведем характерную для ДЦП патогенетическую цепочку, отметив на ней места образования активных форм кислорода (АФК) и продуктов перекисного окисления липидов. Это не единственные метаболические циклы кластогенеза

(МЦК) в организме больных ДЦП. Заслуживает внимания и нарушение аминокислотного обмена у больных ДЦП. Среди аминокислот, накапливающихся в мозге при гипоксии, особо выделяют глутамат. На долю глутаматных рецепторов (NMDA-рецепторов) приходится около 80% синапсов и нейронов в коре и гиппокампе. Наши исследования на мышцах (анализ микроядер в эритроцитах периферической крови) показали бифазный характер действия глутамата на геном клетки. В физиологических концентрациях (10^{-6} – 10^{-8} М) он защищает геном от повреждения мутагенами, но в концентрациях выше 10^{-6} М становится опасным мутагеном. С учетом значительного выделения глутамата в интерстиций при гипоксии вероятность повреждения этой аминокислотой генома клеток мозга и других тканей очень высока.

Вместе с тем обращает на себя внимание несостоятельность антиоксидантной защиты при поражениях ЦНС гипоксического генеза [7]. Поскольку антиоксидантная система принимает активное участие в защите генома человека, то можно предположить, что ослабление систем защиты также может провоцировать появление дестабилизации генома у больных ДЦП (рис. 2).

В целом, по какому бы пути не развивалась дестабилизация генома, она приводит к однозначному результату – нарушению экспрессии генов. Следствием этого является расстройство метаболизма в самых различных звеньях. С одной стороны, это усугубляет имеющиеся патологические процессы у больного и ведет к новым нарушениям, а с другой – снижает эффективность терапии ДЦП. Необходима фармакологическая коррекция генома у больных ДЦП, которая должна сочетаться с комплексом специфических терапевтических воздействий.

ВЫВОДЫ

1. У больных ДЦП повышен уровень эритроцитов с микроядрами и перестроек хромосом в лимфоцитах периферической крови.

2. Уровень кластогенеза и анеугенеза у больных зависит от формы ДЦП.

3. Регистрация микроядер в эритроцитах периферической крови более чувствительна при выявлении нестабильности генома, чем определение пере-

строек хромосом в лимфоцитах периферической крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадалян Л.О., Журба Л.Т., Тимонина О.Б. Детские церебральные параличи. – Киев, 1988.
2. Бочков Н.П., Филиппова Т.В., Яковенко К.Н. // Цитол. и генет. – 1984. – № 6. – С. 422–428.
3. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М., 1989.
4. Дурнев А.Д., Середенин С.В. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. – М., 1998.
5. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. – Томск, 1992.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М., 1980.
7. Петрушина А.А., Левитина Е.В. и др. // Росс. вестн. перинатол. и педиатр. – 2000. – № 1. – С. 22–23.
8. Семенов А.В., Пигалов А.П. и др. // Пульмонология. – 2003. – № 4. – С. 34 – 36.
9. Семенова К.А., Мастюкова Е.М., Смугляня М.Я. Клиника и реабилитационная терапия детских церебральных параличей. – М., 1972.
10. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. – М., 1990.
11. Черепнёв Г.В., Малышев К.В. и др. // Экспер. и клин. фармакол. – 2000. – № 6. – С. 43 – 48.
12. Finer N.N., Robertson C.M. et al. // J. Pediatr. – 1981. – Vol. 98. – P. 112 – 117.
13. Hill A. // Pediatr. Neurol. – 1999. – Vol. 7(5). – P. 317 – 325.
14. Monreal F.J. // Dev. Med. Child. Neurol. – 1985. – Vol. 27. – P. 325 – 330.
15. Schmid W. // Mutat. Res. – 1975. – Vol. 31. – P. 9–15.

Поступила 12.01.04.

INSTABILITY OF GENOME IN PATIENTS WITH INFANTILE CEREBRAL PALSY

D.D. Gainetdinova, V.V. Semenov, M.F. Ismagilov,
I.A. Pakhalina, E.V. Kolochkova

S u m m a r y

State of the genetic apparatus in patients with infantile cerebral palsy is studied. The high level of chromosomal aberrations and micronuclei is found in peripheral blood cells. Clastogenic effect was not correlated with age and sex and was reliably higher in a group of children with double hemiplegia. Aneugenic effect was similar in children with different forms of the disease and in different age groups. The authors connect the high intensity of clastogenesis and aneugenesis in patients with breaking of metabolic cycles of clastogenesis accompanied by the increased generation of endomutagens and weakening of antimutagenous protective system of genome.