УДК 616.8-053.36-07:616.45-001.1/.3

ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ФОРМИРОВАНИИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ ПЕРИНАТАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

Романова М.М., Балакирева Е.А., Красноруцкая О.Н., Бугримов Д.Ю., Котова Ю.А., Страхова Н.В., Ануфриева Е.И.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Воронеж, e-mail: mmromanova@mail.ru

Данная статья посвящена роли окислительного стресса в формировании клинической картины перинатального поражения центральной нервной системы у детей первого года жизни. К сожалению, клиническая картина и лабораторно-инструментальные данные, полученные при обследовании новорожденных не всегда достоверно коррелируют с тяжестью перинатального поражения центральной нервной системы, что в свою очередь, ведет к неблагоприятным последствиям в будущем в связи с отсутствием своевременной и адекватной терапии. В исследовании показана зависимость уровней маркеров окислительного стресса супероксиддисмутазы, малонового диальдегида, окисленных модифицированных белков от степени тяжести неврологического дефицита у детей первого года жизни. Полученные результаты позволяют рекомендовать перечисленные маркеры окислительного стресса в качестве маркеров выбора адекватной патогенетически обоснованной медикаментозной терапии и оценки ее эффективности при лечении перинатального поражения центральной нервной системы у детей первого года жизни.

Ключевые слова: окислительный стресс, неврологический дефицит, последствия перинатального повреждения ЦНС, дети.

EVALUATION OF THE PROGNOSTIC VALUE OF MARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN THE FORMATION OF THE CLINICAL PICTURE OF PERINATAL LESIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN CHILDREN THE FIRST YEAR OF LIFE

Romanova M.M., Balakireva E.A., Krasnorutskaia O.N., Bugrimov D.Yu., Kotova Ju.A., Strahova N.V., Anufrieva E.I.

Voronezh State Medical University n.a. N.N. Burdenko, Voronezh, e-mail: mmromanova@mail.ru

This article focuses on the role of oxidative stress in the formation of the clinical picture of perinatal CNS lesions in children in the first year of life. Unfortunately, the clinical picture and laboratory and instrumental data obtained during newborn screening are not always significantly correlated with the severity of perinatal lesions of the Central nervous system, which in turn leads to adverse consequences in the future in the absence of timely and adequate therapy. The study shows the levels of superoxide dismutase, malondialdehyde, oxidized modified proteins to the severity of neurological deficit in children the first year of life. The obtained results allow these markers of oxidative stress as a marker of the choice of adequate pathogenetically substantiated drug therapy and evaluating its effectiveness.

Keywords: oxidative stress, neurological deficit, the effects of perinatal CNS damage, children.

Многовекторные изменения процессов «окислительной напряженности» играют существенную роль в реализации адаптации и являются одним из условий нормального роста и развития новорожденного [5,7]. Изначально в организме плода преобладает анаэробная направленность процессов, что является одной из метаболических предпосылок генерации активных форм кислорода после рождения [6]. Но для новорожденных в течение первых 5 суток характерен относительно высокий уровень окислительных процессов, прежде всего, в органах, которые имеют непосредственный контакт с кислородом: мозг, сетчатка,

почки. У младенцев с гипоксически-ишемическим поражением центральной нервной системы (ЦНС) уровень адаптации клеток снижается [7].

Таким образом, функциональная стабильность и динамическое равновесие системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» определяют нормальные структурно-функциональные свойства мембран, в том числе нейронов головного мозга. Поэтому ослабление любого «защитного звена» приводит к развитию окислительного стресса, переходящего в патологический процесс [2,3].

Стоит подчеркнуть, что в последнее время привлекает к себе внимание не только перекисное окисление липидов (ПОЛ), но и процесс образования окисленных модифицированных белков (ОМБ) [4]. Кроме того, индукторами ОМБ являются продукты ПОЛ, в первую очередь малоновой диальдегид (МДА), а также смещение баланса антиоксидантов прооксидантов в пользу последних.

Считается, что ОМБ является более информативным маркером формирования окислительного стресса, так как свидетельствует о глубине и давности развития дисбаланса в антиоксидантной системе [8,9].

Цель исследования: изучить клинические особенности патологии ЦНС детей раннего возраста на основании маркеров окислительного стресса (СОД, ОМБ, SH-группы и МДА) с последующей разработкой прогностических критериев течения и патогенетически обоснованных схем терапии.

Материалы и методы

Было проведено комплексное обследование 419 детей от рождения до 6 месяцев. На основе полученных физикально-инструметальных данных были сформированы 2 основные исследовательские группы: группа сравнения – контрольная (n=83) и группа пациентов с перинатальным поражением ЦНС (n=336), в свою очередь, разделенных на 3 подгруппы по степени тяжести суммарного неврологического дефицита (легкая, средняя и тяжелая), каждая из которых также формировала 2 возрастные подгруппы – обследованные 1–3 месяцев и 4–6 месяцев.

Всем детям, независимо от группы, проводился анализ паспортов новорожденных, архивных материалов, подробный опрос родителей и родственников пациентов, что позволило изучить наследственный, семейный, социальный анамнез, наличие экологических, производственных вредностей и привычек.

Большое внимание при сборе анамнеза уделялось оценке здоровья матери во время беременности, особенностям течения родов, гестационному возрасту, динамике показателей по шкале Апгар, весовым показателям при рождении.

Критериями исключения являлись наследственная и хромосомная патология, врожденные пороки развития головного мозга, а также аутоиммунные и септические заболевания. Данные факторы потенцируют диффузную ишемию с каскадом биохимических реакций, в том числе и окислительного стресса.

Степень тяжести неврологического дефицита оценивался по 10 балльной шкале: симптомы внутричерепной гипертензии (симптом Грефе, симптом заходящего солнца, запрокидывание головы, расхождение швов, нарастание окружности головы в динамике), мышечный тонус, сухожильные рефлексы, снижение силы, пирамидные знаки, рефлексы новорожденных, симптомы поражения шейного отдела позвоночника, асимметрия положения, головы, тонуса, рефлексов; отклонение от нормы моторного, психического и речевого развития.

Аналогично оценивалось наличие жалоб на отклонение поведения, нарушение сна, пароксизмальные состояния, снижение двигательной активности, срыгивание, необоснованное беспокойство, возбуждение, метеозависимость. Балльная оценка клинической, анамнестической и анатомо-физиологической картины проводилась в соответствии с возрастными нормами.

Забор венозной крови (3–5 мл) в исследовании осуществляли в условиях процедурного кабинета в пробирки Vacuette и Greinerbio-one (пр-во Австрия). Затем проводилась стандартная процедура центрифугирования (аппарат Himac CT 6E/CT 6EL) для получения сыворотки (определение биохимических параметров и оценка антиоксидантного статуса) и цитратной плазмы (определение общего анализа крови и тиоловых групп). Оценка антиоксидантного статуса осуществлялась на полуавтоматическом биохимическом анализаторе ClimaMC-15 («RAL», пр-во Испания).

Для оценки окислительной модификации белков использовалась реакция с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидазонов альдегидов и кетонов основного и нейтрального характера в модификации Дубининой [1]: к 100 мкл сыворотки крови добавляли 1 мл 2,4-ДНФГ, растворенного предварительно в 2 М HCl. Инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Затем в пробы вносили 1 мл 20 % $HClO_4$ для осаждения белков. Центрифугировали 15–20 минут. Отбирали надосадочную жидкость. Осадок 3 раза промывали раствором этанол: этилацетат (1 : 1) для удаления липидов, а также 2,4 – ДНФГ, не прореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков. Осадок оставляли подсохнуть. К полученному осадку добавляли 3 мл 8М мочевины, размешивали и ставили на водяную баню до полного растворения осадка. Оптическую плотность 2,4 – динитрофенилгидразонов регистрировали на приборе спектрофотометр СФ – 36 на длине волн: 356 нм, 370 нм, 430 нм и 530 нм.

Активность антиоксидантной системы оценивали по активности супероксиддисмутазы (СОД). Определяли ее следующим методом: к 2,7 мл буфера добавляли 70 мкл люминола, 70 мкл метионина, 80 мкл рибофлавина 3 мкл сыворотки крови. В контроле вместо сыворотки крови добавляли 3 мкл дистиллированной воды. Оптическую плотность определяли на приборе SpekolCarlZeissEna с хемилюминисцентной приставкой.

Расчет производился по формуле: % гашения = 100 – опыт*100/контроль.

Для каждого выбранного фактора: супероксиддисмутазы (СОД), окисленно-модифицированных белков (ОМБ), тиоловых групп (SH-группы) и малонового диальдегида (МДА) определялись показатели информативности и прогностичности по общепринятой методике: информативность вычислялась по формуле Кульбаха, прогностичность выбранных факторов определялась по формуле коэффициента ПФР.

Статистическая обработка информации проводилась с использованием стандартного пакета статистических программ «Statistica 6.0».

Результаты исследования

Анализируя частоту клинических неврологических проявлений в основной группе, можно отметить, что у детей доминантными неврологическими синдромами были: синдром внутричерепной гипертензии (91 %), двусторонняя пирамидная недостаточность (89 %), вегето-висцеральная дизрегуляция (54 %), синдром двигательных расстройств (43 %), различные пароксизмальные состояния (17 %), ликвородинамические нарушения (28 %), органическое поражение ЦНС (21 %).

Анализ паспорта новорожденного основной группы выявил, что гипоксическое поражение нервной системы доминирует в структуре последствий перинатального поражения нервной системы и составило 59,8 %. В удовлетворительном состоянии родилось в основной группе – 211 пациентов и все дети контрольной группы. Среднетяжелое состояние при рождении имели 85 человек, тяжелое – 40 детей.

Реанимационным мероприятиям с последующим пребыванием на ИВЛ от 2 до 7 суток были в анамнезе у 6 детей. Доношенными родилось 285 детей основной группы и 59 контрольной, недоношенность I степени составила 35 и 24 ребенка соответственно, недоношенность II степени – 12 детей и недоношенность III степени – 4 человека были установлены только в контрольной группе.

Структура тяжести неврологического дефицита детей основной группы была представлена следующим образом:

- возраст 1–3 месяца (n=163/49 %): первая (легкая) степень тяжести клинических проявлений была установлена у 60 (18,6 %) пациентов; средняя (вторая) степень тяжести

зафиксирована у 58 (17,2 %) обследуемых; третья (тяжелая) степень клинических проявлений выявлена у 45 (13,4 %) детей;

- возраст 4–6 месяцев (n=173/51 %): первая (легкая) степень тяжести клинических проявлений была установлена у 62 (19 %) пациентов; средняя (вторая) степень тяжести – 60 (18,6 %) обследуемых; третья (тяжелая) степень клинических проявлений выявлена у 51 (15,2 %) детей;
- контрольная группа (n=83): в каждой возрастной выборке методом аккумулированных средних определялись свои контрольные значения исследуемых показателей, но их значения достоверно совпадали между собой, поэтому исходные показатели для сравнения были выбраны едиными для всех групп объектов изучения.

Анализ величины информативности Кульбаха показал, что в основной исследовательской группе пациентов (подгруппа 1–3 месяцев) при легкой и средней степени тяжести СОД и SH-группы имели высокую позицию ранжирования – 3 и 4 соответственно, в сравнении с иными «не окислительными маркерами», а сама величина информативности составляла 7,6 и 6,2 единицы соответственно (контрольный уровень максимальной выборки составлял 10≤p≤5).

При этом коэффициент информативности МДА и ОМБ у пациентов в лёгкой степени тяжести (подгруппа 1-3 месяцев) составлял 5,4 и 5,1 единицы соответственно (10≤p≤5) с позицией ранжирования – 6 и 7 соответственно.

Но при средней степени тяжести поражения ЦНС показатели уровня МДА и ОМБ снижались по ранговой позиции до 8–9 места, при этом они продолжали находиться в пределах достоверности величины информативности Кульбаха – 5,2 и 5,1 единицы соответственно (10≤p≤5).

Наиболее выраженный разброс коэффициента ранжирования показателей был выявлен в группе пациентов тяжелой формы (подгруппа 1–3 месяцев) поражения ЦНС. Малоновый диальдегид и ОМБ повышали свой ранг достоверности до 3 и 4 позиции соответственно – что сопровождалось ростом величины информативности Кульбаха до 7,8 единицы у МДА (10≤p≤5).

При этом уровень СОД и SH-группы у пациентов этой же группы был вне границ достоверности (10≤p≤5) и составил 4,4 единицы с ранговой позицией 7 и 8 соответственно.

Анализ второй подгруппы пациентов (4–6 месяцев) у пациентов с легкой степенью поражения ЦНС все показатели окислительного стресса имели низкий ранг позиции: СОД – 4, ОМБ – 6, SH-группы – 8 и МДА – 9, а величина Кульбаха была вне границ достоверности (10≤p≤5).

Но уже при усилении тяжести поражения до средней (подгруппа 4–6 месяцев) наибольшую информативность приобретали SH-группы и МДА – 8,2 и 7,6 единицы соответственно (10≤p≤5) с ранжированием 2 и 3 соответственно.

В этой же группе степени поражения ЦНС супероксиддисмутаза и ОМБ были на более низких уровнях достоверности, но находились в пределах допустимых значений (10≤p≤5).

При тяжелой форме поражения ЦНС в возрастной подгруппе 4–6 месяцев высокую степень информативности по Кульбаху достигали значения SH-группы – 8,9 единицы (10≤p≤5) при 1 ранговой позиции.

Все остальные исследуемые нами показатели окислительного стресса (МДА, СОД и ОМБ) были в пределах достоверности (10≤p≤5), но с гораздо более низкой ранговой позицией.

Таким образом, проведенное исследование, полученные результаты и их анализ позволяют сделать следующие **выводы:**

1. Анализ величины информативности Кульбаха показал, что выбранные в исследовании маркеры окислительного стресса – СОД, SH-группы, ОМБ и МДА – имеют высокую позицию достоверности, которая наиболее выражена: для СОД и МДА – у пациентов при легкой и средней степени тяжести перинатального поражения ЦНС вне зависимости от возрастных подгрупп; ОМБ – при тяжелой степени поражения возрастной подгруппы 1–3 месяцев; SH-группы – для пациентов тяжелой формы поражения ЦНС в возрастной подгруппе 4–6 месяцев.

2. Довольно высокая степень (от 2 до 5 ранга) позиции МДА и СОД в ранжировании во всех группах исследования показывает то, что данные маркеры полноценно и достоверно отражают общую картину состояния пациентов в исследовании и могут в полной мере отражать прогноз исходов состояния пациентов при выборе профильной схемы терапии.

3. Также следует отметить, – позиция ранжирования ОМБ в группе детей с тяжелым поражением центральной нервной системы может свидетельствовать о том, что на данном этапе клинического состояния пациентов на первый план выходят критерии неврологического состояния ЦНС у пациентов.

4. Определение показателей окислительного стресса у детей первого года жизни с перинатальным поражением ЦНС может быть интегральным показателем при данной патологии.

Список литературы

1. Боев К.В. Свободно-радикальное окисление белков: методологические аспекты количественной оценки окислительной модификации по реакции с 2,4-динитрофинигидразином / К.В. Боев, Д.В. Василенко, А.И. Маслов // Universum: химия и биология. – 2014. – № 1(2). – С. 4.

2. Добрынина И.С. Особенности психологического статуса больных бронхиальной астмы пожилого возраста с нарушениями сна на фоне терапии мелатонином / И.С. Добрынина, А.В. Будневский, А.А. Зуйкова // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 925-928.

3. Козовый Р.В.,ЭрстенюкГ.М. Показатели окислительной модификации белков сыворотки крови и активности глутатионовой системы у долгожителей Прикарпатья // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 2. – С. 77-81.

4. Котова Ю.А. Изменение концентрации катионов цинка в сыворотке крови у пациентов с дислипидемией на фоне гипертонической болезни / Ю.А. Котова, А.А. Зуйкова, А.Н. Пашков // Врач-аспирант. – 2015. – Т. 72, № 5.1. – С. 184-188.

5. Красноруцкая О.Н. Оценка степени участия биохимических маркеров перинатального поражения центральной нервной системы у детей. / О.Н. Красноруцкая, Е.А. Балакирева, А.А. Зуйкова, И.С. Добрынина // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – Т. 21, № 2. – С. 26-29.

6. Красноруцкая О.Н. Прогностическая модель степени участия маркеров перинатального поражения центральной нервной системы у детей первого года жизни / О.Н. Красноруцкая, Е.А. Балакирева, А.А. Зуйкова // Современный взгляд на будущее науки. Сборник статей Международной научно-практической конференции. НЦ «Аэтерна». – 2014. – С.84-88.

7. Нерешенные вопросы детской неврологии / Е.А. Балакирева [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2014. – Т. 28, № 24-1(195). – С. 5-7.

8. Погодина М.В. Устойчивость к окислительному стрессу мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, культивируемых при разном содержании кислорода / М.В. Погодина, Л.Б. Буравкова // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2014. – Т. 48, № 6. – С. 34-38.

9. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе / Н.В. Рязанцева [и др.] // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 4. – С. 329-334.