

# КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА СПАСТИЧЕСКИХ ФОРМ ДЕТСКОГО ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ПАРАЛИЧА

Гайнетдинова Д.Д., Гайсина Л.З., Хакимова Р.Ф.

Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, г. Казань

**Резюме.** В последние годы в генезе детского церебрального паралича большое значение придается изменениям в перивентрикулярной области (в частности, перивентрикулярной лейкомаляции). Важным патогенетическим механизмом, определяющим внутриутробное повреждение мозга, вероятно, является иммунопатологический процесс. Проведенный анализ клинико-цитогенетических и иммунологических (содержание популяций и субпопуляций лимфоцитов, функциональная активность фагоцитов, количественное содержание фактора некроза опухоли- $\alpha$  в сыворотке крови и слюнной жидкости) параметров у детей с перивентрикулярной лейкомалией с исходом в спастические формы ДЦП в возрасте от 1 до 4-х лет показал угнетение клеточного иммунитета, увеличение окислительно-восстановительной активности нейтрофилов и повышение содержания фактора некроза опухоли- $\alpha$  в сыворотке периферической крови и слюнной жидкости. Установлена взаимосвязь уровня нестабильности генома с содержанием цитокина фактора некроза опухоли- $\alpha$ , что свидетельствует о существовании активных иммунопатологических процессов в организме больных ДЦП в исходе перивентрикулярной лейкомаляции.

**Ключевые слова:** детский церебральный паралич, перивентрикулярная лейкомаляция, нестабильность генома, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , иммунный статус.

Gaynetdinova D.D., Gaysina L.Z., Khakimova R.F.

## CLINICO-IMMUNOLOGIC AND CYTOGENETIC ASPECTS OF PATHOGENESIS IN SPASTIC INFANTILE CEREBRAL PARALYSIS

**Abstract.** Over recent years of studies in infantile cerebral paralysis (ICP), the changes in periventricular area are given great importance, especially, periventricular leukomalacia. An immunopathological process may define the prenatal brain damage. We performed a clinical-cytogenetic and immunological evaluation, including subpopulation analysis of lymphocytes, functional activity of phagocytes, quantitative content of TNF $\alpha$  in blood serum and saliva in thirty-five ICP patients (1 to 4 years old). This study has shown suppression of cellular immunity, increase in oxidation/reduction activity of neutrophils, and increased TNF $\alpha$  levels in peripheral blood serum and salivary fluid in cases of periventricular leukomalacia that resulted into ICP. An interrelation was revealed between the levels of genome instability and TNF $\alpha$  content, thus suggesting involvement of active immunopathological processes in those patients with ICP who develops periventricular leukomalacia. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 6, pp 507-512)

**Keywords:** infantile cerebral paralysis, periventricular leukomalacia, genome instability, TNF, immune state.

### Адрес для переписки:

Гайсина Лейсан Закиевна, аспирантка кафедры неврологии, нейрохирургии, медицинской генетики, КГМУФА по здравоохранению и социальному развитию, г. Казань  
425570, Республика Марий Эл, Параньга, ул. Хасанова, д. 6а  
E-mail: lisenok\_af@list.ru

### Введение

Проблема изучения перинатальной патологии нервной системы у детей раннего возраста остается в настоящее время наиболее актуальной. Среди детей, впервые признанных инвалидами, 57% составляют больные детским церебральным

параличом (ДЦП) [1, 9]. Данные литературы свидетельствуют о том, что в патогенезе ДЦП основную роль играют гипоксические и ишемические изменения головного мозга, в особенности перивентрикулярной области (ПВО), приводящие к деструктивным процессам мозгового вещества и лейкомаляции с необратимыми последствиями [13, 15, 17]. В литературе имеется предположение о том, что среди множества патогенетических аспектов стойкости двигательного дефицита при ДЦП нестабильность клеточного генома играет немаловажное значение [4, 5, 14, 19]. Предполагается, что в основе этого явления лежит интенсификация в организме больных ДЦП процессов мутагенеза, за счёт усиленной генерации эндомутагенов (например, активных форм кислорода, цитокинов). В то же время, как сами механизмы дестабилизации генома, так и процессы их поддерживающие, остаются малоизученными [2, 7, 11, 12]. Среди маркеров нейродеструктивных и репаративных механизмов, исследуемых в последнее время у больных с гипоксически-ишемическими поражениями ЦНС, особое внимание уделяется цитокинам, основную роль из которых многие исследователи отводят фактору некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), повреждающее действие которого проявляется в индукции запрограммированной гибели клеток с включением процессов дестабилизации клеточного генома [5, 6, 9]. Важным патогенетическим механизмом, определяющим внутриутробное повреждение мозга является, вероятно, и иммунопатологический процесс.

**Цель исследования:** изучить особенности иммунного статуса и уровня TNF $\alpha$  при нестабильности клеточного генома у детей с ПВЛ в неонатальном возрасте, в исходе которой сформировались спастические формы ДЦП.

## Материалы и методы

Объектом исследования явились 55 детей от 1 до 4-х лет: 35 детей с ранней резидуальной стадией ДЦП (основная группа) и 20 практически здоровых детей аналогичного возраста (контрольная группа). В исследование включались дети, у которых отсутствовали клинические и лабораторные данные о перенесенной в неонатальном периоде ВУИ и инфекционного процесса за 30 дней до и в момент исследования. Патология ПВО устанавливалась на основании нейросонографии в возрасте до одного года (по имеющимся протоколам в амбулаторной карте) и после установления диагноза ДЦП (в возрасте старше 1 года) по результатам компьютерной или магнитно-резонансной томографии. Основная группа включала 25 детей со спастической диплегией и 10 — с гемипаретической формой ДЦП. При нейровизуализации у 20 детей (36%) основной группы выявлены при-

знаки перенесенной ПВЛ. У 15 детей (27%) нейровизуализация не выявила каких-либо находок в головном мозге, в том числе и в ПВО.

Степень неврологического дефицита у больных ДЦП оценивалась по шкалам: спастичности Ashworth (1964); Клуба Моторики (по А. Ashburn, 1982; D. Wade, 2000); моторики Ривермид (по F. Collen и соавт., 1990), адаптированным к детскому возрасту. Степень тяжести ДЦП оценивалась по сумме баллов каждой шкалы.

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).

Исследование иммунного статуса проводилось с использованием иммунологических методов. Фенотипирование лимфоцитов проводилось методом проточной цитофлуориметрии; содержание иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови изучалось методом радиальной иммунодиффузии в геле по Manchini D. (1965) с использованием тест-систем в соответствии с прилагаемыми инструкциями; фагоцитарная и окислительно-восстановительная активность нейтрофилов определялась в тесте фагоцитоза и НСТ-тесте; количественное определение TNF $\alpha$  в сыворотке крови и слюне изучалось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов « $\alpha$ -ФНО-ИФА-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc, США): производился подсчет среднего арифметического значения, стандартного отклонения, параметрического t-критерия Стьюдента, непараметрического U-критерия Манна-Уитни и коэффициента корреляции (R) по Пирсону. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Цитогенетическое исследование выявило достоверное повышение среднего числа ЭМ в группе детей с ДЦП по сравнению с показателями спонтанного мутагенеза ( $0,79 \pm 0,21\%$  и  $0,29 \pm 0,18\%$  соответственно;  $p < 0,05$ ). Показатель цитогенетических нарушений в эритроцитах колеблется от минимальных ( $0,56 \pm 0,19\%$ ) при гемипаретической форме до максимальных ( $0,98 \pm 0,25\%$ ) при спастической диплегии ( $p < 0,05$ ). Изучение уровня нестабильности генома в зависимости от нейровизуализационных находок в ПВО обна-

ружило достоверное преобладание активности эндомутагенеза у детей, перенесших ПВЛ в неонатальном возрасте, по сравнению с детьми без каких-либо изменений в головном мозге, в т.ч. и в ПВО ( $0,94 \pm 0,15\%$  и  $0,59 \pm 0,06\%$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ). При этом у больных со спастической диплегией число ЭМ достоверно выше в группе детей, перенесших ПВЛ ( $0,89 \pm 0,17\%$ ) по сравнению с детьми, не имевшими изменения в ПВО ( $0,76 \pm 0,12\%$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Более выраженный феномен нестабильности клеточного генома у детей со спастической диплегией, сформировавшейся в исходе ПВЛ, позволяет предположить существование активных процессов эндомутагенеза у этих больных.

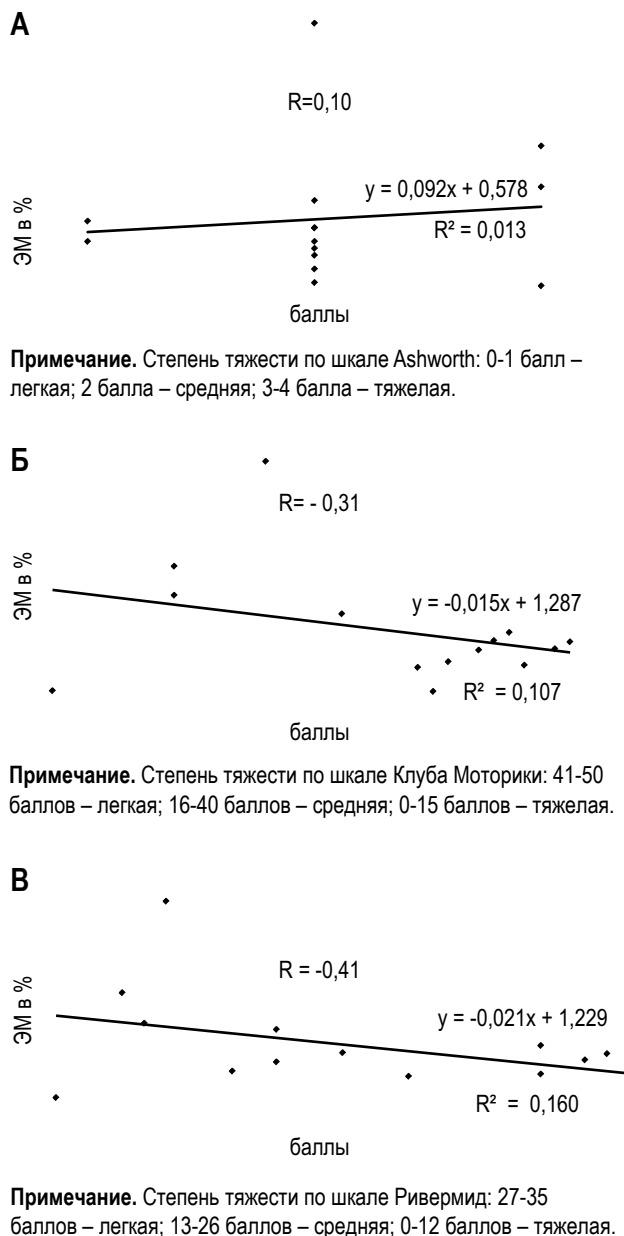
Между степенью тяжести двигательных нарушений, установленной различными, адаптированными к детскому возрасту, шкалами и уровнем нестабильности клеточного генома, оцененного микроядерным тестом, выявлена корреляционная зависимость (рис. 1).

Анализ показал, что наиболее чувствительной оказалась шкала Ривермид ( $R = -0,41$ ), продемонстрировавшая изучаемую взаимосвязь: чем тяжелее неврологический дефицит, тем более выраженные процессы эндомутагенеза протекают у больных ДЦП.

В связи с этим проведено изучение показателей иммунного статуса и содержание цитокина TNF $\alpha$  в сыворотке крови и слюне у обследованных детей. Результаты проведенного фенотипирования лимфоцитов свидетельствуют о выраженном дефиците основных популяций лимфоцитов в целом, и субпопуляций Т-лимфоцитов. Так, абсолютное содержание CD3<sup>+</sup> лимфоцитов у детей, больных ДЦП, составило  $1,67 \times 10^9$ /л, тогда как у здоровых –  $2,74 \times 10^9$ /л ( $p < 0,05$ ). При этом отмечался достоверно более низкий уровень CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов у детей основной группы по сравнению с контрольной (соответственно,  $0,77 \times 10^9$ /л и  $1,77 \times 10^9$ /л,  $p \leq 0,01$ ;  $0,74 \times 10^9$ /л и  $0,97 \times 10^9$ /л,  $p < 0,05$ ). Наряду с этим выявлено снижение количества циркулирующих CD19<sup>+</sup> лимфоцитов в группе детей с ДЦП в отличие от контрольной ( $0,67 \times 10^9$ /л и  $1,18 \times 10^9$ /л,  $p \leq 0,01$ ).

Сравнительный анализ показателей клеточного звена иммунитета у детей с ДЦП в зависимости от нейровизуализационных находок в ПВО выявил наиболее низкие показатели CD19<sup>+</sup> лимфоцитов и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов ( $0,87 \times 10^9$ /л и  $0,66 \times 10^9$ /л соответственно;  $p < 0,05$ ) у детей, перенесших ПВЛ, по сравнению с контрольной группой ( $1,18 \times 10^9$ /л и  $1,77 \times 10^9$ /л соответственно;  $p < 0,05$ ).

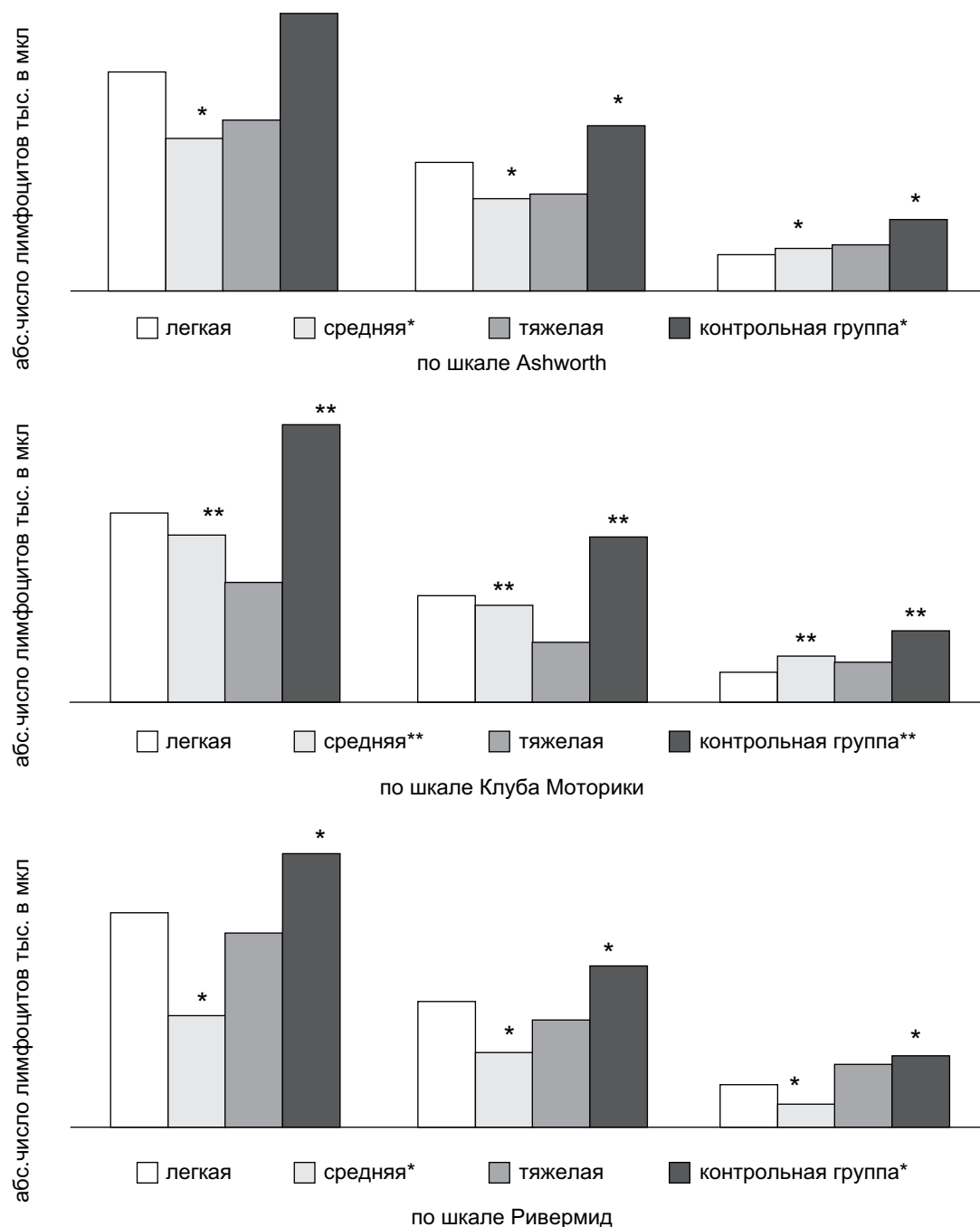
Результаты исследования иммунного статуса анализированы в зависимости от клинической



**Рисунок 1. Корреляционные кривые зависимости уровня нестабильности клеточного генома (ЭМ) и тяжести клинических проявлений (баллы) по шкалам Ashworth (А), Клуба Моторики (Б), Ривермид (В)**

формы ДЦП. Выявлены достоверные различия между содержанием лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>; CD19<sup>+</sup>; CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) у детей со спастической диплегией и таковыми у детей с гемипаретической формой: в первой группе показатели значительно ниже, чем во второй ( $1,43 \times 10^9$ /л,  $0,63 \times 10^9$ /л,  $0,56 \times 10^9$ /л и  $2,08 \times 10^9$ /л,  $0,69 \times 10^9$ /л,  $1,06 \times 10^9$ /л соответственно;  $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$ ), при этом все показатели оказались достоверно ниже по сравнению с показателями контрольной группы ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$ ).

Кроме того, установлено, что при средне-тяжелой и тяжелой степени ДЦП (по шкалам



**Рисунок 2. Уровни абсолютного числа лимфоцитов (тыс. в мкл) в зависимости от тяжести клинических проявлений (баллы), оцененной по шкалам Ashworth (А), Клуба Моторики (Б) и Ривермид (В)**

Ashworth, Клуба Моторики, Ривермид) также отмечались достоверно более низкие уровни содержания лимфоцитов (рис. 2) по сравнению с контрольной группой.

Изучение уровня сывороточных Ig A, M, G у детей с ДЦП не выявило достоверных отличий между показателями здоровых детей.

Изучение окислительно-восстановительной активности нейтрофилов обнаружило превышение показателей НСТ-спонт. и ИАН-спонт. более, чем в 2 раза, у детей с ДЦП ( $27,7 \pm 19,9\%$

и  $0,34 \pm 0,28$  усл. ед.) по сравнению со здоровыми ( $11,0 \pm 12,5\%$  и  $0,12 \pm 0,08$  усл. ед. соответственно;  $p < 0,05$ ). В то же время установлено, что у больных ДЦП с верифицированной ПВЛ показатели достоверно превышали уровень здоровых ( $p \leq 0,01$ ).

Изучаемые показатели достоверно выше у детей со спастической диплегией по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Установлено, что наиболее выраженные достоверные отличия ( $p \leq 0,05$ ) окислительно-вос-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФОРМ ДЦП

Формы ДЦП	Показатели окислительно-восстановительной активности нейтрофилов		
	НСТ спон. (%)	ИАН спон. (усл. ед.)	ИАН стим. (усл. ед.)
Спастическая диплегия (n = 25)	36,8±16,4**	0,42±0,2*	0,75±0,1
Гемипаретическая (n = 10)	25,6±26,2	0,31±0,3	0,78±0,2
Контроль (n = 20)	11,0±12,5**	0,12±0,08*	0,70±0,2

Примечание. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ .

становительной активности нейтрофилов отмечались у детей со средне-тяжелой и тяжелой степенью заболевания.

Анализ результатов, полученных при изучении содержания TNF $\alpha$ , выявил некоторые различия: у детей с ДЦП уровень TNF $\alpha$  в сыворотке крови составил 8,17±6,99 пг/мл, в слюнной жидкости – 27,54±17,44 пг/мл, что достоверно выше, чем у здоровых (соответственно, 0,74±0,87 пг/мл и 1,99±1,11 пг/мл;  $p \leq 0,05$ ).

У детей со спастической диплегией и гемипаретической формой содержание TNF $\alpha$  в сыворотке крови и в слюнной жидкости достоверно преобладало над контролем ( $p \leq 0,01$ ) (табл. 2).

Анализ содержания TNF $\alpha$  в сыворотке крови у детей с ДЦП в зависимости от наличия ПВЛ выявил достоверное повышение показателя у детей с ПВЛ по сравнению с группой детей без признаков перенесенной ПВЛ (13,2±4,85 пг/мл и 7,04±6,08 пг/мл соответственно;  $p < 0,05$ ).

Установлена сильная положительная корреляционная зависимость между уровнем TNF $\alpha$  в сыворотке крови и слюнной жидкости и абсолютным содержанием лимфоцитов в периферической крови (соответственно,  $R = 0,71$  и  $R = 0,67$ ) у детей, перенесших ПВЛ. У больных ДЦП без изменений в ПВО имела место отрицательная корреляционная связь между аналогичными показателями ( $R = -0,83$  и  $R = -0,38$  соответственно), как и у детей контрольной группы ( $R = -0,45$ ).

Анализ взаимосвязи содержания TNF $\alpha$  в сыворотке крови и слюнной жидкости у детей с ДЦП в исходе ПВЛ показал сильную положительную корреляционную связь ( $R = 0,82$  и  $R = 0,64$  соответственно) с показателем цитоге-

нетических нарушений в эритроцитах, в то время, как в контрольной группе выявлена сильная отрицательная корреляционная связь ( $R = -0,99$ ) между этими показателями.

## Обсуждение

Анализ результатов проведенного исследования показал, что у больных ДЦП, сформированного в исходе ПВЛ, существуют неизвестные механизмы, усиливающие спонтанный эндомутагенез и провоцирующие цитогенетические нарушения в клетках периферической крови. Выявленная положительная корреляционная зависимость цитогенетических нарушений и уровня TNF $\alpha$  позволяет предположить высокую вероятность иммунопатологического процесса, как генератора эндомутагенеза у этих детей. У детей с перенесенной ПВЛ и тяжелым течением ДЦП снижение содержания популяций и субпопуляций лимфоцитов сопровождается достоверным повышением функциональной активности фагоцитарного звена иммунной системы. Принимая во внимание то, что показатели НСТ-теста являются отражением окислительно-восстановительной активности нейтрофилов, полученные высокие показатели НСТ-спон. могут свидетельствовать о наличии у детей с ДЦП факторов, способствующих активации нейтрофилов, например, наличие поврежденных астроцитов в ПВО. Установленная взаимосвязь между уровнем лимфоцитов и выработкой TNF $\alpha$  у детей с патологическими изменениями в ПВО не исключает, что процессы в ПВО стимулируют активацию клеток-продуцентов к синтезу TNF $\alpha$ .

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ TNF $\alpha$  СЫВОРОТКИ КРОВИ И СЛЮННОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ ДЦП

Форма ДЦП	TNF $\alpha$ сыворотки (пг/мл)	TNF $\alpha$ слюны (пг/мл)
Спастическая диплегия (n = 25)	11,7±7,79*	27,4±19,64*
Гемипаретическая (n = 10)	2,57±4,28*	23,9±10,05*
Контроль (n = 20)	0,74±0,87*	1,99±1,11*

Примечание. \* –  $p \leq 0,01$ .

Таким образом, у детей с ДЦП в исходе ПВЛ выявлены два значимых звена патогенеза: с одной стороны нестабильность клеточного генома, выражающаяся в увеличении числа клеток с цитогенетическими нарушениями, с другой стороны — иммунные нарушения, характеризующиеся снижением абсолютного количества лимфоцитов, высокой окислительно-восстановительной активностью нейтрофилов и увеличением содержания цитокина TNF $\alpha$  в сыворотке крови и слюнной жидкости. Возможно, эти звенья взаимосвязаны и свидетельствуют об активных процессах, протекающих в организме детей с ДЦП. Не исключено, что у детей со спастической диплегией, сформированной в исходе ПВЛ, иммунопатологический процесс, инициированный внутриутробной гипоксией, возможно, имеет место и в начальной резидуальной стадии ДЦП. Безусловно, эти предположения диктуют необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

## Выводы

1. Выявлена взаимосвязь тяжести клинических проявлений ДЦП в исходе ПВЛ с уровнем цитогенетических нарушений в эритроцитах периферической крови.
2. У детей с ДЦП обнаружены иммунные нарушения, характеризующиеся снижением абсолютного содержания лимфоцитов, высокой окислительной активностью нейтрофилов и увеличением содержания цитокина TNF $\alpha$  в сыворотке периферической крови и слюнной жидкости.
3. Установлена взаимосвязь уровня нестабильности генома с содержанием цитокина TNF $\alpha$ .

## Список литературы

1. Барашнёв Ю. И. Клинико-морфологическая характеристика и исходы церебральных расстройств при гипоксически-ишемических энцефалопатиях // Акуш. и гинек. — 2009. — № 5. — С. 39-42.
2. Болдырев А.А. Роль АФК в жизнедеятельности нейрона // Успехи физиологии — 2009. — Т. 34, № 3. — С. 21-23.
3. Власюк В.В. Перивентрикулярная лейкомаляция у детей. — СПб.: Геликон Плюс, 2009. — 172 с.
4. Гайнетдинова Д.Д. Состояние генетического аппарата у больных детским церебральным параличом // Казанский медицинский журнал. — 2005. — Т. 86, приложение. — С. 47-48.
5. Громада Н.Е. Иммунологические и структурно-метаболические нарушения у доношенных детей с гипоксическим перинатальным поражением центральной нервной системы, про-

гнозирование исходов и оптимизация лечения: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — 2009. — 56 с.

6. Ключник Т.П., Лидеман Р.Р. Аутоиммунные механизмы в генезе нарушений развития нервной системы // Вестн. Рос. АМН. — 2010. — № 7. — С. 32-34.
7. Коган А.Х. Фагоцитоззависимые кислородные свободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней // Вестник Росс. мед. наук. — 2009. — № 2. — С. 3-10.
8. Семенов А.С., Скальный А.В. Иммунопатологические и патобиохимические аспекты патогенеза перинатального поражения мозга. — СПб.: Наука. — 2009. — 368 с.
9. Amato M., Donati F. Update on perinatal hypoxic insult: mechanism, diagnosis and interventions // Paediatr. Neurol. — 2010. — Vol. 4, N 5. — P. 203-209.
10. Blumenthal I. Periventricular leucomalacia: a review // Pediatr. — 2009. — Vol. 163, N 8. — P. 435-442.
11. Christos P. Cerebral palsy. — New York, 2009. — P. 267.
12. Crawford C.L. Can periventricular leucomalacia cause spastic diplegia in premature infants // J. Pediatr. — 2010. — Vol. 164, N 2. — P. 121-122.
13. Day R. E. Genetic aspects of cerebral palsy // Dev. Med. Child Neurol. — 2010. — Vol. 34. — P. 834.
14. Folkerth R.D. Periventricular leukomalacia: overview and recent findings // Pediatr. Dev. Pathol. — 2009. — N 1. — P. 3-13.
15. Hashimoto K. Correlation between neuroimaging and neurological outcome in periventricular leukomalacia: diagnostic criteria // Pediatr. Int. — 2011. — Vol. 43, N 3. — P. 240-245.
16. Haynes R.L., Folkerth R.D., Keete R.J. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia // Neuropathol. Exp. Neurol. — 2010. — Vol. 62, N 5. — P. 441-450.
17. Jacobsson B., Hagberg G. Antenatal risk factors for cerebral palsy // Obstet. Gynaecol. — 2010. — N 3. — P. 25-36.
18. Nelson K.B., Dambrosia J.M. Genetic polymorphisms and cerebral palsy in very preterm infants // Pediatr. Res. — 2008. — N 4. — P. 494-499.
19. Schmid W. The micronucleus test // Mutat. Res. — 1975. — Vol. 31, N 1. — P. 9-15.
20. Schmitz T., Chew L.J. Cytokines and myelination in the central nervous system // Scientific World J. — 2008. — N 8. — P. 39-47.

поступила в редакцию 25.04.2012

отправлена на доработку 10.05.2012

принята к печати 21.05.2012