

УДК 616.831-008.811.1-0.53.31-07

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ЛИКВОРЕ ДЕТЕЙ С ГИДРОЦЕФАЛИЕЙ

**И.А. АРЕФЬЕВА, М.Л. ДЕМЧУК, А.А. АРТАРЯН*, Д.А. МИРСАДЫКОВ*,
М.Ш. ПРОМЫСЛОВ '**

Институт нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко РАМН, 125047 Москва,
ул. Фадеева д.5. Факс: 975-22-28

*Медицинская академия последипломного образования, 123836 Москва Баррикадная д.2.
Факс: 254-98-05

В вентрикулярном ликворе детей, страдающих гидроцефалией (ГЦ), оценивали уровень радикалообразования методом хемилюминесценции (ХЛ), содержание малонового диальдегида (МДА) и суммарную антиоксидантную активность. Показано, что даже при неосложненной ГЦ происходят существенные нарушения метаболизма мозга, выражающиеся в снижении антиоксидантной активности и стимуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ). У детей с ГЦ, осложненной воспалительными или геморрагическими процессами, наблюдалось достоверное повышение содержания МДА и параметров ХЛ, по сравнению с больными чистой водянкой, причем наиболее выраженные нарушения отмечены у больных с геморрагическими осложнениями. Полученные данные свидетельствуют о необходимости определения состояния ПОЛ в ликворе детей с ГЦ и позволяют выработать показания для включения антиоксидантной терапии в их комплексное лечение.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, гидроцефалия, свободные радикалы, хемилюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ. Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мозге происходит при различных церебральных патологиях, таких как, ишемия, черепно-мозговая травма, субарахноидальные кровоизлияния, деменция и эндогенные психозы и др. [1]. Однако, в литературе отсутствуют данные о состоянии этих процессов у больных с гидроцефалией (ГЦ), которая является одним из распространенных заболеваний мозга, особенно в детском возрасте. Этиологическими факторами ГЦ у детей являются инфекционно-воспалительные заболевания головного мозга, перенесенные внутриутробно, трансплацентарные инфекции (цитомегалия, токсоплазмоз, герпес), наследственный характер сужения силвиева водопровода (по рецессивному типу X-хромосомы) внутрижелудочковые кровоизлияния, а также ГЦ на фоне сочетанного порока развития ЦНС (spina bifida, черепно-мозговые грыжи, киста Денди-Уокера и др.) [2].

Сопутствующие ГЦ осложнения воспалительного и геморрагического характера представляют собой комплекс факторов, оказывающих дестабилизирующее влияние на метаболизм мозга ребенка.

Поскольку одним из пусковых механизмов нарушения энергетического обмена мозга является активация свободнорадикального окисления и рост содержания перекисных соединений липидов, что сопровождается подавлением одной из важнейших защитных реакций мозга - его антиоксидантной активности [3], целью настоящего исследования было выяснение роли этих процессов в патогенезе гидроцефалии у детей.

МАТОДИКА. Материалом для исследования служил вентрикулярный ликвор детей в возрасте до одного года, больных ГЦ, лечившихся в отделениях детской нейрохирургии и реанимации новорожденных Тушинской детской больницы в период с 1995 по 1996 год. Все исследования проводились в дооперационном периоде. По результатам комплексного обследования (клинико-неврологического, офтальмоневрологического, ликворологического и нейросонографии), больные были разделены на три группы.

1 группа - больные с неосложненной водянкой головного мозга (24 ребенка), характеризующейся отсутствием воспалительных изменений в клинике, нормальными показателями общего анализа периферической крови, люмбального и вентрикулярного ликвора.

2 группа - больные с воспалительными осложнениями ГЦ (9 детей). В клинической картине - воспалительное течение с повторяющимися обострениями и высокими температурными колебаниями. Содержание белка в ликворе у этих больных составляет 0,36 - 2,16 мг-%, а цитоз от 12/3 до 405/3 с преобладанием нейтрофилов.

3 группа - больные с геморрагическими осложнениями ГЦ (7 детей). На фоне воспалительного течения и температурных реакций в ликворе у этих больных определялись измененные и неизмененные эритроциты в пределах от 200 до 140000 в поле зрения.

Забор ликвора производили с помощью вентрикулярной пункции через родничок под местной анестезией с премедикацией оксibuтиратом натрия или реланиумом в возрастной дозе.

Собственную антиоксидантную активность (АОА) ликвора оценивали по ингибированию окисления линоленовой кислоты кислородом воздуха в присутствии ионов Fe^{2+} [4]. Малоновый диальдегид (МДА) определяли спектрофотометрически по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [5].

Уровень радикалообразования оценивали хемилюминисцентным (ХЛ) методом: в кювету хемилюминометра помещали 0,5 мл 2 мМ раствора сульфата железа, подкисленного соляной кислотой (2 мл 1М раствора на литр), регистрировали фон в течение 6 сек и вводили смесь, состоящую из 200 мкл исследуемого ликвора, 25 мкл однопроцентного водного раствора гидроперекиси трет-бутила и 300 мкл фосфатно-солевого буфера (20 мМ фосфата калия, 105 мМ KCl pH 7,15). Общее время регистрации сигнала - 1 минута. При этом определяли максимум ХЛ (макс.) и интегральную интенсивность сигнала, равную площади под кривой (S).

В работе были использованы следующие реактивы: линоленовая и 2-тиобарбитуровая кислоты фирмы "Sigma" (США), додецилсульфат натрия фирмы "Serva" (Германия), сульфат железа (II) "Реахим" (Россия) марки хч и гидроперекись трет-бутила, синтезированная в Институте органической химии им.Н.Д.Зелинского РАН. В работе также использовали спектрофотометр СФ-46 и хемилюминометр ХЛМ-3. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ Excel-5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В большинстве работ, посвященных исследованию процессов ПОЛ в биологических жидкостях больных, определяется содержание наиболее стабильного продукта ПОЛ - МДА по реакции с ТБК [6, 7]. Однако, ТБК-тест имеет ряд недостатков. Во-первых, метод недостаточно специфичен по отношению к МДА [8], во-вторых, методика не отличается быстротой и простотой

выполнения. Кроме того, наличие в ликворе гемолизированной крови (в случае геморрагических осложнений) приводит к искажению результатов определения МДА по двум основным причинам: содержание МДА в крови, существенно больше, чем в ликворе [9] ($0,70 \pm 0,10$ нмоль/мл в плазме против $0,03 \pm 0,01$ нмоль/мл в ликворе); ксантохромия ликвора мешает спектрофотометрическому определению продукта взаимодействия МДА с ТБК. В связи с этим, адекватная оценка уровня вторичных продуктов ПОЛ в ксантохромных ликворах затруднена.

В отличие от методики определения МДА, на ХЛ не оказывает влияние наличие в ликворе гемолизированной крови, так как она не связана с определением интенсивности окраски, кроме того, наличие в реакционной среде избытка Fe^{2+} позволяет избежать ошибок, связанных с наличием ионов железа в крови. Это делает метод ХЛ пригодным для анализа в том числе ксантохромных ликворов. Исследование ликвора больных 1 и 2 групп выявил наличие взаимосвязи между количеством МДА и параметрами ХЛ (рис. 1). Коэффициенты корреляции МДА с макс. ХЛ и МДА с

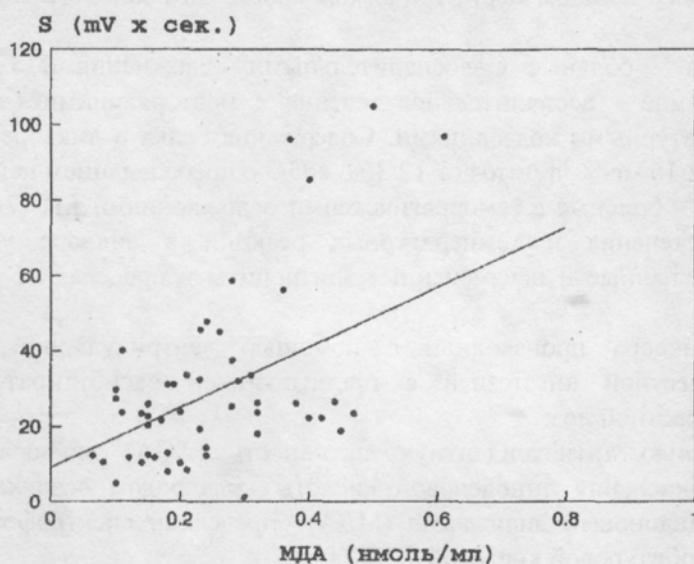


Рисунок 1.
Взаимосвязь между МДА и параметрами ХЛ.

площадью под кривой ХЛ составили 0,58 и 0,68 соответственно ($p < 0,001$). Таким образом, удобство, простота и воспроизводимость хемилюминесцентного метода и наличие достоверной корреляции между параметрами ХЛ и концентрацией вторичных продуктов ПОЛ позволяет рекомендовать этот метод для суждения об активности процессов ПОЛ в ликворе. На рисунке 2 представлены характерные кривые ХЛ ликвора больных детей с неосложненной ГЦ (кривая 1), ГЦ, сопровождающейся воспалительными (кривая 2) и геморрагическими (кривая 3) осложнениями. Из рисунка видно, что все три кривые имеют сходную форму, но существенно отличаются по высоте и площади, при этом наибольшая интенсивность ХЛ наблюдается в случае геморрагически осложненной ГЦ (кривая 3).

При исследовании вентрикулярного ликвора детей с неосложненной и осложненной воспалительными и геморрагическими процессами ГЦ, обнаружено достоверное снижение собственной АОА ликвора до 20-30% при норме $41,0 \pm 4,0\%$ ($p < 0,001$), а также существенное повышение уровня МДА, нормальное содержание которого в ликворе детей составляет $0,03 \pm 0,01$ нмоль/мл [10] (табл. 1). Таким образом, даже при неосложненной ГЦ наблюдаются существенные нарушения метаболизма мозга, которые усиливаются при возникновении различного рода осложнений.

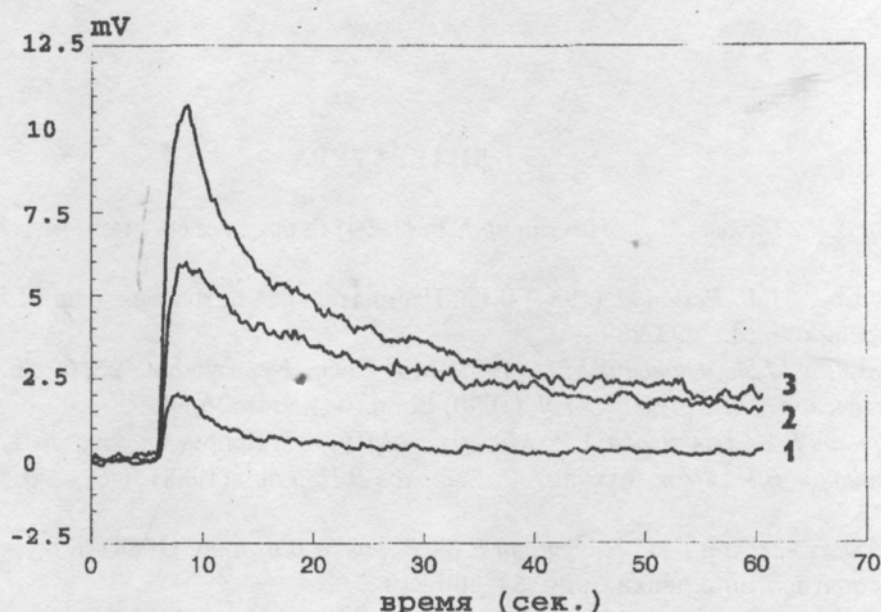


Рисунок 2.

Хемилюминесценция ликвора больных детей с неосложненной ГЦ (кривая 1), ГЦ, сопровождающейся воспалительными (кривая 2) и геморрагическими (кривая 3) осложнениями.

Таблица. Результаты анализа вентрикулярного ликвора детей с ГЦ ($M \pm m$)

Диагноз	макс. ХЛ(мВ)	S под кривой ХЛ (мВ x сек.)	МДА(нмоль/мл)	АОА (%)
1. Неосложненная гидроцефалия (n=38)	$3,0 \pm 0,2$	$28,2 \pm 2,8$	$0,24 \pm 0,02$	$25,3 \pm 1,6$
2. Гидроцефалия с воспалительными осложнениями (n=14)	$5,90 \pm 0,7$	$68,4 \pm 9,0$	$0,36 \pm 0,03$	$23,6 \pm 2,4$
3. Гидроцефалия с геморрагическими осложнениями (n=27)	$9,2 \pm 1,0$	$141,3 \pm 15,0$	$0,95 \pm 0,18$ (ликвор с примесью гемолизированной крови)	$24,9 \pm 1,2$
Достоверность различий между группами	$p_{12} < 0,005$ $p_{23} < 0,01$	$p_{12} < 0,005$ $p_{23} < 0,01$	$p_{12} < 0,005$	

При сравнительном анализе параметров ПОЛ в группах получены достоверные различия в величинах макс. ХЛ, S ХЛ и МДА (табл. 1). Наиболее выраженная интенсификация ПОЛ наблюдалась у больных с геморрагическими осложнениями. Это свидетельствует о том, что попадание крови в ликворную систему приводит к резкой активации свободнорадикальных процессов.

Вместе с тем, не было обнаружено достоверных различий в величинах АОА между группами, так как даже при неосложненной форме ГЦ эта важная защитная функция организма оказывается существенно подавленной.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости определения состояния ПОЛ в ликворе детей с водянкой головного мозга, причем для суждения о нем можно использовать быстрый и удобный хемилюминесцентный метод. Эти исследования позволяют выработать показания для включения антиоксидантной терапии в комплексное лечение гидроцефалии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерин А.Н., Гуляева Н.В., Никушкин Е.В. (1994) Бюлл. exper. биол. мед. № 10. 243-245.
2. Морозова Н.А., Реман Э. (1984) В кн. Перинатальная патология ред. М.Я. Студеникин, М., 223-239.
3. Promyslov M.Sh., Demchuk M.L. (1995) Mol. Chem. Neuropathol. 25, 69-80.
4. Промыслов М.Ш., Демчук М.Л. (1990) Вопр. мед. хим. 36, 90-92.
5. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. (1987) Вопр. мед. хим. № 1, 118-122.
6. Скорняков В.И., Кожемякин Л.А., Смирнов В.П. и др. (1988) Лаб. дело. № 8, 14-16.
7. Кржыжжановский Г.Н., Никушкин Е.В., Воронко В.А. и др. (1984) Ж. невропатологии и психиатрии. 84, 806-810.
8. Левченко Л.И., Демчук М.Л. (1991) Вопр. нейрохирургии 4, 23-25.
9. Артарян А.А., Королев А.Г., Гаевый О. и др. (1991) Вопр. нейрохирургии. 6, 12-14.

STUDY OF FREE RADICAL AND LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN LIQUOR OF INFANTS WITH HYDROCEPHALUS

I. A. AREFYEVA, M. L. DEMCHUK., ARTARYAN A.A.*, MIRSADYKOV D.A.*
AND PROMYSLOV M. SH.

Burdenko Neurosurgery Institute, Fadeev str. 5. 125047 Moscow, Russia. FAX: 7 (095)975-22-28 and

*Medical Academy of Postgraduate Education, Barrikadnaya str. 123836 Moscow, Russia.
FAX: 7 (095)254-98-05

The levels of free radical production, malone dialdehyde concentration and antioxidant activity were estimated in ventricular liquor of the infants with primary hydrocephalus. It was shown that even in the case of uncomplicated hydrocephalus significant disorders in brain metabolism took place. In the patients with inflammatory or hemorrhagic complications the levels of malone dialdehyde and free radicals were markedly increased as compared to the infants with "pure" hydrocephalus. The most significant disorders were revealed in the case of hemorrhagic complications. These data indicate the necessity of lipid peroxidation evaluation in liquor of the patients with hydrocephalus and help to workout indications for antioxidants including into the common therapy of this decease.

Key words: lipid peroxidation, hydrocephalus, free radicals, chemiluminescence.