

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.112.3

©Коллектив авторов

СОСТОЯНИЕ ОБМЕНА КАТЕХОЛАМИНОВ У ДЕТЕЙ С СИНДРОМАМИ АСПЕРГЕРА И КАННЕРА

А.С. Горина¹, Л.С. Колесниченко^{2}, В.И. Михнович³*

¹Sick Children Hospital, Research Institute, Toronto

²Иркутский государственный медицинский университет, кафедра химии,
664003 Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 1; тел.: 8 (3952) 24-42-61;
эл. почта: kolesnichenkols@mail.ru, annagor98@mail.ru

³НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, Иркутск

Общим изменением в плазме крови у детей с синдромами Аспергера и Каннера в стабильном состоянии является снижение концентрации норадреналина. При ухудшении состояния изменения становятся более выраженными и характеризуются снижением концентрации тирозина, норадреналина, норметанефрина и повышением концентрации дофамина и гомованилиновой кислоты в плазме крови и снижением экскреции норадреналина и увеличением экскреции гомованилиновой кислоты, адреналина и 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля (МГФГ). При этом у детей с синдромом Каннера при ухудшении состояния в плазме повышается МГФГ и снижается экскреция тирозина и повышается экскреция норметанефрина. Обнаруженный дисбаланс дофаминовой и адреналин/норадреналиновой систем обосновывает необходимость комбинированного анализа изменений катехоламинов и их метаболитов как наиболее информативный подход при изучении эффектов аутистических заболеваний.

Ключевые слова: синдром Аспергера, синдром Каннера, катехоламины, дофамин, норадреналин, тирозин.

ВВЕДЕНИЕ. Аутизм (синдром Каннера) – гетерогенный первазивный синдром развития, при котором имеет место триада нарушений поведения: социальный дефицит, нарушение языка и коммуникации и повторяющиеся стереотипные движения [1]. С начала 1980-х годов наблюдается 10-кратное увеличение заболеваемости аутизмом, и его встречаемость в настоящее время составляет 0,3% [2], что составляет около 50% общей встречаемости заболеваний аутистического спектра [3].

Синдром Аспергера характеризуется таким же типом качественных аномалий социального воздействия, что и аутизм, и, кроме того, ограниченным, стереотипным, навязчивым и повторяющимся репертуаром интересов и деятельности. От аутизма он отличается прежде всего отсутствием общей задержки или замедления языка или когнитивного развития. Уровень интеллекта, как правило, нормальный и даже может казаться выше нормального (поведение “маленьких профессоров”).

Исследования обмена катехоламинов при заболеваниях аутистического спектра многочисленны, но противоречивы – вероятно из-за, отсутствия чёткого подхода к подбору обследуемых групп [4-7]. Данные об уровне в крови тирозина и его метаболитов (источника синтеза катехоламинов) также трудно согласуемы друг с другом. Возможны как параллельные, так и разнонаправленные изменения дофаминовой и норадреналиновой/адреналиновой систем, а в случае параллельных изменений возможны различные реакции на лечение [4, 8, 9].

* - адресат для переписки

В настоящей работе исследовались уровни тирозина и его метаболитов (дофамина, гомованилиновой кислоты, норадреналина, адреналина, норметанефрина, метанефрина, ванилилминдальной кислоты и 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля) в плазме крови и моче у детей с синдромами Аспергера и Каннера при ухудшении состояния и в стабильном состоянии.

МЕТОДИКА. Обследовали 33 ребенка с синдромом Аспергера и 35 детей с синдромом Каннера (в возрасте от трёх до семи лет) из детского областного реабилитационного центра и клиники нервных болезней института педиатрии и репродукции человека ВС НЦ СО РАМН и клиники медицинского факультета университета Генриха Гейне (Дюссельдорф, Германия). При диагностировании раннего детского аутизма (РДА) в исследуемой группе использовались критерии международной классификации психических заболеваний МКБ-10 для диагностики аутичного расстройства у детей. Контрольная группа состояла из 150 детей.

Для обеспечения качества анализов и воспроизводимости результатов применялся перекрёстный анализ проб крови и мочи, собранных у пациентов в России и Германии (с помощью двойного слепого метода). Замороженные при низкой температуре пробы из России отправлялись в Германию и анализировались в клинике медицинского факультета университета Генриха Гейне (Дюссельдорф). Пробы из Германии аналогичным образом, отправлялись для анализа в Россию. Исследования проводились в течение 5 лет и были завершены в конце 2002 г. При проведении исследований были соблюдены необходимые международные стандарты и биоэтические нормы, в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека”. Протокол исследований был одобрен на заседаниях комитетов по биоэтике Восточно-Сибирского научного центра РАМН и медицинского факультета университета Генриха Гейне (Дюссельдорф, Германия).

Для получения плазмы венозную кровь собирали утром натощак, в 10-мл пробирки, содержащие ЭДТА. Пробы крови центрифугировали (не позже, чем через 30 мин после взятия крови) при 1500 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Полученную плазму отделяли и смешивали с 50 мкл 5 mM метабисульфита натрия (для предотвращения окисления катехоламинов). Мочу собирали в течение суток в стерильные контейнеры из тёмного стекла, содержащие 6 M HCl, 0,5 мл на каждый час сбора мочи (pH=2-3; для предотвращения деградации свободных катехоламинов и метанефринов. По данным литературы, закисление образцов мочи до pH=2,0-3,0 обеспечивало сохранность 85% катехоламинов и свободных метанефринов в течение до 10 недель (при температуре хранения не выше 4°C) при их последующем определении с помощью ВЭЖХ [10]. Аликвоты объемом 1 мл смешивали с 10 мкл 5 mM метабисульфита натрия.

Образцы плазмы и мочи немедленно после взятия замораживали при -20°C в пластиковых пробирках и хранили при -70°C. Экстракцию катехоламинов (адреналина, норадреналина, дофамина) и их метаболитов (МГФГ, ванилилминдальной кислоты и гомованилиновой кислоты) проводили сходным образом. Образцы центрифугировали, и супернатант депротеинизировали трихлоруксусной кислотой. После повторного центрифугирования при тех же условиях и добавления внутреннего стандарта аналиты адсорбировали в экстракционных картриджах Waters Oasis HLB (“Milford”, США) с последующей промывкой, элюированием метанолом и центрифугированием. Элюат удаляли испарением в потоке азота, и сухой остаток растворяли в подвижной фазе. Растворы хранили при температуре 4°C до проведения хроматографии.

В работе использовали систему высокопроизводительной жидкостной хроматографии с переключением колонок (HPLC-725 CAII; “Tosoh Corp”, Япония) и селективной флуорометрической детекцией (флуорометр Shimadzu RF-10AXL), колонки обратной фазы Nucleosil C-18, 250-4,6 мм (“Macherey-Nagel AG”). Хроматография катехоламинов проводилась в подвижной фазе на основе

цитрат-фосфатного буфера (pH=3,0), содержащего 2 мМ Na₂ЭДТА и 1,5 мМ гептансульфоната натрия в качестве ион-парного реагента. Хроматографию метанефринов (метанефрина и норметанефрина) проводили в подвижной фазе на основе 160 мМ монохлоруксусной кислоты, 2 мМ ЭДТА, 0,24 мМ Na-октилсульфата и 33 мл/л ацетонитрила (pH=2,8). 3-метокси-4-гидроксифенилгликоль, гомованилиновую и ванилилминдальную кислоты анализировали с помощью колонки Ultrasphere IP 150×4,6 мм (“Beckman”) в подвижной фазе, состоявшей из смеси метанола и водного раствора 5 мМ лимонной кислоты, 20 мг/л октансульфоновой кислоты и 20 мг/л ЭДТА (pH=2,9). Температура элюента во всех случаях была 35°C, скорость потока элюента 1 мл/мин, объём нанесённых образцов 70 мкл. В работе использованы реактивы и контрольные материалы фирм “Beckman” и “Sigma”. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка, и статистическая значимость различий средних определялась с помощью критерия Стьюдента при критическом уровне значимости для проверки гипотез $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В плазме крови детей с синдромом Аспергера (табл. 1) при ухудшении состояния снижено содержание тирозина (на 17%) и компонентов норадреналин/адреналиновой системы – норадреналина (НА) (на 35%), норметанефрина (НМН) (на 20%), тогда как уровни остальных компонентов: адреналина (АДР), метанефрина (МН), 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля (МГФГ), ванилилминдальной кислоты (ВМК) не изменяются. Кроме того, повышен дофамин (ДА) (на 26%) и его главный конечный метаболит – гомованилиновая кислота (ГВК) (на 52%). В моче детей при ухудшении состояния (табл. 2) увеличена экскреция АДР (на 46%) и МГФГ (на 20%), снижена экскреция НА (на 38%), а также повышена ГВК (на 23%).

В стабильном состоянии у этих детей в плазме крови сохраняются сниженная концентрация НА (на 60%) и повышенный уровень ГВК (на 17%). Сохраняется также сниженная экскреция в моче НА (на 26%), но для остальных метаболитов экскреция остается на контрольном уровне.

Ухудшение состояния при синдроме Каннера сопровождается снижением в плазме концентрации тирозина (на 28%), НА (на 35%), НМН (на 26%), а также повышение МГФГ (на 24%), ДА (на 27%) и ГВК (на 61%). Уровни АДР, МН и ВМК не отличаются от значений в контрольной группе (табл. 1). При этом снижена экскреция в моче НА (на 43%) и увеличены экскреция АДР (на 42%), НМН (на 16%), МГФГ (на 79%) и ГВК (на 29%) (табл. 2). В стабильном состоянии в плазме крови у этих детей сохранялось снижение концентрации НА (на 23%), а в моче сохранялось повышение АДР (на 13%) и, кроме того, были повышены МН (на 18%) и ВМК (на 54%).

Как при синдроме Аспергера, так и при синдроме Каннера изменения в состоянии ухудшения включают снижение тирозина и компонентов норадреналин/адреналиновой системы (НА и НМН для обоих синдромов и МГФГ при синдроме Каннера) и повышение как дофамина, так и его конечного метаболита, ГВК. Понижение НА, НМН и повышение МГФГ в плазме крови можно интерпретировать как **подавление норадреналинового пути**, тогда как повышение ДА и ВМК на фоне сниженной концентрации тирозина можно интерпретировать как **усиление дофаминального пути**. Экскреция в моче изменялась параллельно изменениям в плазме только для НА и ГВК, а при синдроме Каннера также тирозина и МГФГ. В целом на фоне сниженной экскреции НА происходит увеличение экскреции метаболитов, как норадреналинового (АДР, НМН, МГФГ), так и дофаминального пути (ГВК). В стабильном состоянии сохраняются лишь немногие изменения, характерные для состояния ухудшения (пониженный НА и повышенная ГВК), и лишь понижение НА было параллельно соответствующему понижению его в плазме.

В литературе описаны изменения тирозина, катехоламинов и всех метаболитов катехоламинов при аутизме самой различной направленности – как повышение, так и снижение, а также отсутствие изменений [5, 8, 11-13].

Таблица 1. Изменения в уровне катехоламинов и их метаболитов в плазме крови (нМ) при раннем детском аутизме при ухудшении состояния и в стабильном состоянии.

	Контроль n = 150	Синдром Аспергера		Синдром Каннера	
		Ухудшение состояния n = 33	Стабильное состояние n = 33	Ухудшение состояния n = 35	Стабильное состояние n = 35
Тирозин	80232 ± 1451	66625 ± 4387**	84375 ± 6101	58062 ± 3669***	80311 ± 5745
Дофамин	0,46 ± 0,01	0,58 ± 0,03***	0,47 ± 0,04	0,58 ± 0,03***	0,45 ± 0,03
Гомованилиновая кислота (ГВК)	29,46 ± 0,71	44,74 ± 2,37***	34,38 ± 1,82*	47,52 ± 2,39***	31,97 ± 1,98
Норадреналин	0,82 ± 0,02	0,53 ± 0,03***	0,49 ± 0,03***	0,53 ± 0,03***	0,63 ± 0,05***
Адреналин	0,39 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,41 ± 0,03
Норметанефрин	2,87 ± 0,06	2,30 ± 0,16***	2,75 ± 0,15	2,11 ± 0,11***	2,74 ± 0,20
Метанефрин	1,16 ± 0,03	1,15 ± 0,07	1,15 ± 0,05	1,10 ± 0,04	1,24 ± 0,82
3-метокси-4-гидроксифенил- глюкоз (МГФГ)	17,67 ± 0,44	18,63 ± 1,23	17,60 ± 0,66	21,84 ± 1,51**	18,01 ± 1,17
Ванилилиндиамная кислота (ВМК)	64,32 ± 5,43	61,56 ± 7,2	57,40 ± 3,62	69,04 ± 7,22	65,89 ± 3,48

Примечание: Значимость отличий от контроля: * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001.

Таблица 2. Изменения в уровне катехоламинов и их метаболитов в моче (нМ) при раннем детском аутизме при ухудшении состоянии и в стабильном состоянии.

	Контроль	Синдром Аспергера		Синдром Каннера	
		Ухудшение состояния	Стабильное состояние	Ухудшение состояния	Стабильное состояние
	n = 150	n = 33	n = 33	n = 35	n = 35
Тирозин	73650 ± 1305	70750 ± 5290	72625 ± 3920	66625 ± 2887*	79711 ± 5729
Дофамин	740,27 ± 15,25	678,43 ± 32,32	733,94 ± 57,66	665,62 ± 36,03	695,29 ± 39,18
Гомованилиновая кислота (ГВК)	16936 ± 315	20881 ± 1073***	18793 ± 1451	21843 ± 2385*	16623 ± 1340
Норадреналин	116,17 ± 2,57	71,69 ± 4,38***	85,65 ± 4,08***	66,56 ± 4,77***	106,47 ± 5,78
Адреналин	51,66 ± 0,85	75,25 ± 3,65***	54,01 ± 3,81	73,50 ± 4,11***	62,35 ± 3,89**
Норметганфрин	457,14 ± 12,6	470,93 ± 27,35	465,81 ± 28,87	531,75 ± 32,67*	466,35 ± 24,19
Метганфрин	182,26 ± 4,58	193,43 ± 14,88	190,37 ± 10,19	190,18 ± 7,99	215,70 ± 15,61*
3-метокси-4-гидроксифенил-гликоль (МГФГ)	9334 ± 235	11237 ± 827*	8331 ± 490	16718 ± 1357***	10147 ± 1065
Ванилилиндиаминная кислота (ВМК)	21077 ± 474	20100 ± 925	19725 ± 881	20225 ± 1421	32435 ± 2271***

Примечание: Значимость отличий от контроля: * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001.

Таблица 3. Изменения в отношениях уровней катехоламинов и их метаболитов в плазме крови (нМ) при раннем детском аутизме при ухудшении состояния и в стабильном состоянии.

	Контроль	Синдром Аспергера		Синдром Каннера	
		Ухудшение состояния n = 33	Стабильное состояние n = 33	Ухудшение состояния n = 35	Стабильное состояние n = 35
(НА+ НМН) / (НА+НМН+МГФГ+ВМК)	0,045±0,001	0,037 ± 0,003**	0,042 ± 0,001	0,031 ± 0,003***	0,041 ± 0,002
ДА / ГВК	0,017 ± 0,0005	0,014 ± 0,001*	0,014 ± 0,0008**	0,013 ± 0,001*	0,015 ± 0,001
ГВК / ВМК	0,478 ± 0,023	0,894 ± 0,124**	0,604 ± 0,023***	0,854 ± 0,149*	0,528 ± 0,060
ГВК / МГФГ	1,734 ± 0,052	2,680 ± 0,304**	2,020 ± 0,123***	2,367 ± 0,224*	1,815 ± 0,152
ГВК / (ВМК+МГФГ)	0,368 ± 0,016	0,613 ± 0,060**	0,458 ± 0,015	0,584 ± 0,072**	0,404 ± 0,042
НА / ВМК	0,014 ± 0,0007	0,011 ± 0,001*	0,009 ± 0,0004***	0,009 ± 0,001**	0,010 ± 0,0007**

Примечание: Значимость отличий от контроля: * - p< 0,05; ** - p< 0,01; *** - p< 0,001.

НА - Норадrenalин; НМН - Норметанефрин; МГФГ - 3-метокси-4-гидроксифенил-гликоль; ВМК - Ванлилминдальная кислота; ДА - Дофамин; ГВК - Гомованилиновая кислота.

Таблица 4. Изменения в отношениях уровней катехоламинов и их метаболитов в моче (нМ) при раннем детском аутизме при ухудшении состояния и в стабильном состоянии.

	Контроль	Синдром Аспергера		Синдром Каннера	
		Ухудшение состояния n = 33	Стабильное состояние n = 33	Ухудшение состояния n = 35	Стабильное состояние n = 35
(НА+НМН) (НА+НМН+МГФГ+ВМК)	n = 150 0,019 ± 0,0004	0,017 ± 0,0009	0,020 ± 0,001	0,017 ± 0,001*	0,014 ± 0,0008***
ДА / ГВК	0,047 ± 0,002	0,035 ± 0,002***	0,041 ± 0,002*	0,035 ± 0,003*	0,045 ± 0,003
ГВК / ВМК	0,869 ± 0,027	1,099 ± 0,106**	1,000 ± 0,073	1,153 ± 0,131*	0,547 ± 0,053***
ГВК / МГФГ	2,013 ± 0,067	2,108 ± 0,255	2,447 ± 0,214*	1,391 ± 0,164**	1,902 ± 0,231
ГВК / (ВМК+МГФГ)	0,581 ± 0,015	0,690 ± 0,062*	0,697 ± 0,047*	0,613 ± 0,064	0,413 ± 0,037***
НА / ВМК	0,006 ± 0,0002	0,004 ± 0,0002***	0,005 ± 0,0003**	0,004 ± 0,0002***	0,004 ± 0,0003***

Примечание: Значимость отличий от контроля: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

НА - Норадrenalин; НМН - Норметанефрин; МГФГ - 3-метокси-4-гидроксифенил-гликоль; ВМК - Ванилилминдальная кислота; ДА - Дофамин; ГВК - Гомованилиновая кислота.

Однако изменения отдельных метаболитов менее информативны, чем комбинированный анализ уровней НА, АДР, ДА и их метаболитов в крови и моче [14]. При ухудшении состояния при обоих синдромах (табл. 3, 4) в плазме крови снижаются отношение $(НА + НМН) / (НА + НМН + МГФГ + ВМК)$ и НА/ВМК (при синдроме Каннера – также и в моче), что вместе с понижением НА свидетельствует о снижении интенсивности метаболизма НА и НМН. Вместе с тем, понижение отношения ДА/ГВК, при повышении как ДА, так и ГВК можно интерпретировать как усиление метаболизма ДА. Повышение отношений ГВК/ВМК, ГВК/МГФГ и ГВК/(ВМК+МГФГ) подкрепляет предположение об интенсификации дофаминавого пути относительно норадреналин/адреналинового и, таким образом, о дисбалансе дофаминэргической и норадренэргической систем.

Признаки этого дисбаланса (снижения метаболизма норадреналинового/адреналинового пути при обоих синдромах и усиления метаболизма дофаминавого пути при синдроме Аспергера) сохраняются и в стабильном состоянии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Как аутизм (синдром Каннера), так и синдром Аспергера характеризуются изменением концентрации катехоламинов и их метаболитов как в плазме крови, так и в моче. Эти изменения при ухудшении состояния могут быть интерпретированы как подавление норадреналинового и усиление дофаминавого пути метаболизма катехоламинов. Стабильное состояние приводит к нормализации уровней большинства метаболитов. Комбинированный анализ уровней катехоламинов и их метаболитов в плазме крови и моче является информативным подходом и подкрепляет предположение о снижении интенсивности метаболизма норадреналин/адреналинового пути метаболизма и усилении дофаминавого пути метаболизма. В целом это свидетельствует о дисбалансе норадреналинового/адреналинового и дофаминавого путей метаболизма, который сохраняется и в стабильном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Robel L. (2010) *Rev. Prat.*, **60**, 376-378.
2. Robel L. (2009) *Arch. Pediatr.*, **16**, 1507-1512.
3. Levy S.E., Mandell D.S., Schultz R.T. (2009) *Lancet*, **374**(9701), 1627-1638.
4. Martineau J., Barthélémy C., Jouve J., Muh J.P., Lelord G. (1992) *Dev. Med. Child. Neurol.*, **34**, 593-603.
5. Minderaa R.B., Anderson G.M., Volkmar F.R., Akkerhuis G.W., Cohen D.J. (1994) *Biol. Psychiatry*, **36**, 237-241.
6. Nagy O., Kelemen O., Benedek G., Myers C.E., Shohamy D., Gluck M.A., Kéri S. (2007) *J. Neural. Transm.*, **114**, 607-612.
7. Previc F.H. (2007) *Med. Hypotheses*, **68**, 46-60.
8. Stern L.M., Walker M.K., Sawyer M.G., Oades R.D., Badcock N.R., Spence J.G. (1990) *J. Child. Psychol. Psychiatry*, **31**, 569-585.
9. Gillberg C. (1993) *Biol. Psychiatry*, **33**, 630-635.
10. Roberts N.B., Higgins G., Sargazi M. (2010) *Clin. Chem. Lab. Med.*, **48**, 81-87.
11. Barthelemy C., Bruneau N., Cottet-Eymard J.M., Domenech-Jouve J., Garreau B., Lelord G., Muh J.P., Peyrin L. (1988) *J. Autism Dev. Disord.*, **18**, 583-591.
12. Cook E.H. (1990) *Sinapse*, **6**, 292-308.
13. Croonenberghs J., Delmeire L., Verkerk R., Lin A., Meskal A., Neels H., Planken M., Scharpe S., Deboutte D., Pison G., Maes M. (2000) *Neuropsychopharmacology*, **136**, 275-283.
14. Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S. (2004) *Pharmacol. Rev.*, **38**, 331-349.

Поступила: 29. 12. 2010.

CATECHOLAMINES AND THEIR METABOLITES IN CHILDREN WITH ASPERGER
AND KANNER SYNDROMES

A.S. Gorina¹, L.S. Kolesnichenko², V.I. Mikhnovich³

¹Sick Children Hospital, Research Institute, Toronto, Canada

²Irkutsk State Medical University, Chair of Chemistry, ul. Krasnogo Vosstaniya, 1, Irkutsk,
664003 Russia; tel.: 8 (3952) 24-42-61; e-mail: kolesnichenkols@mail.ru

³Russian Research Institute for Health Family Problems and Human Reproduction SB RAMS, Russia

Children with Asperger and Kanner syndromes in the stable state demonstrate similar decrease in plasma norepinephrine. In the aggravated state, these changes become more expressed and are characterized by a decrease in plasma tyrosine, norepinephrine, normetanephrine and by an increase in dopamine and homovanylic acid and a decrease in excretion of norepinephrine and an increase in excretion of homovanylic acid, epinephrine and MHPG. Only in children with Kanner syndrome in the aggravated state plasma MHPG increases, excretion of tyrosine decreases and excretion of normetanephrine increases. The observed imbalance in dopamine and epinephrine/norepinephrine systems justifies combined analysis of changes in catecholamines and their metabolites levels as the most informative approach in the study of the effect of autistic disorders.

Key words: Asperger syndrome, Kanner syndrome, catecholamines, norepinephrine, dopamine.