

ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНА ФОСФОЛИПИДОВ У ПОДРОСТКОВ С ЗАДЕРЖКОЙ ПСИХИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ КОРТЕКСИНОМ

Зиньковский А.К., Кочегуров В.В., Зубарева Г.М.

ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России, г.Тверь, Россия, e-mail:info@tvergma.ru

Исследование посвящено изучению показателей метаболизма фосфолипидов сыворотки крови у подростков с задержкой психического развития методами тонкослойной хроматографии и инфракрасной спектроскопии. Установлены качественные и количественные изменения содержания фосфолипидов у подростков с задержкой психического развития. Обосновывается применение препарата кортексин как корректора выявленных нарушений метаболизма. Метод инфракрасной спектроскопии сыворотки крови рекомендуется для диагностики задержки психического развития и оценки эффективности лечения данной патологии.

Ключевые слова: метаболизм, фосфолипиды, подростки, задержка психического развития, инфракрасная спектроскопия, тонкослойная хроматография.

PHOSPHOLIPIDS METABOLISM RESEARCH OF ADOLESCENTS WITH MENTAL DELAY AT CORTEXIN TREATMENT

Zinkovsky A.K., Kochegurov V.V., Zubreva G.M.

Tver state medical academy, Tver, Russia, e-mail:info@tvergma.ru

Phospholipids metabolism of serum was studied by thin-layer chromatography and infrared spectrometry. Qualitative and quantitative differences of phospholipids contents of adolescents with mental delay were revealed. Cortexin prescription was proved for correction metabolic imbalance. Infrared spectrometry of serum is recommended as diagnostic method of mental delay and valuation method of treatment efficacy.

Key words: metabolism, phospholipids, adolescents, mental delay, thin-layer chromatography, infrared spectrometry.

В последние годы большое внимание в диагностике различных патологических процессов, в том числе психических заболеваний, уделяется липидному обмену [3, 4] Липидный обмен представляет собой сложную интегративную систему, отдельные звенья которой находятся в постоянном динамическом равновесии. Изменение функций организма сопровождается изменением липидного состава, что позволяет использовать некоторые показатели для характеристики состояния органов и систем [2, 6].

Особый интерес представляет изменение липидного обмена при стрессе. В условиях чрезмерно сильного и затянувшегося стрессорного воздействия на клеточном уровне происходит повреждение мембран избытком ионов кальция, запускаются липотропные реакции и свободнорадикальное окисление липидов. Повреждающими факторами становятся свободные жирные кислоты и лизофосфолипиды. Накопление ненасыщенных фосфолипидов приводит к образованию перекисных кластеров, между которыми образуются каналы ионной проводимости, способствующие повышению проницаемости и разрушению мембран [7, 10].

Изучение психоневрологической патологии с позиций медико-биологических концепций выявило, что одним из наиболее универсальных патогенетических механизмов при различных по этиологии патологических состояниях является повреждение биологических мембран [1, 3]. При органическом поражении головного мозга различного генеза обнаружены изменения содержания различных фракций фосфолипидов (ФЛ) и нарушение синтеза и распада таких фракций, как сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин. При изучении метаболизма ФЛ при эпилепсии доказана корреляция

между степенью его нарушения и проградентностью заболевания[4]. В тоже время показано, что ФЛ, являясь активной составной частью клеточных мембран, в свою очередь служат мощными антиоксидантами, предотвращая патологическое воздействие липидных перекисей на мембраны [1].

Вместе с тем практически отсутствуют сообщения о биохимических исследованиях при психических расстройствах у детей и подростков, в частности, при задержке психического развития (ЗПР). По данным медицинских, психологических и социальных исследований последних лет, около 70 % детей на разных этапах своего развития проявляют те или иные отклонения [8]. Количественно группа детей ЗПР является самой большой по сравнению с любой другой детской группой с дизонтогенезом и достигает 10 % [9]. Под термином ЗПР в настоящее время понимаются синдромы временного отставания психики в целом или ее отдельных функций (моторных, сенсорных, речевых, эмоционально-волевых), замедленного темпа реализации закодированных в генотипе свойств организма. ЗПР – следствие мягко и временно действующих факторов. В силу неоднородности группы детей с ЗПР с точки зрения этиопатогенеза указанной патологии, их неодинакового коррекционного потенциала и прогноза, становится актуальным решение вопроса о наиболее эффективных диагностических процедурах и выборе патогенетически обоснованной терапии данного контингента детей [9].

Изменениям организма на клеточном, а затем и на органном уровне предшествуют изменения химического состава биологических жидкостей. Метод инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии) позволяет регистрировать электромагнитные колебания в инфракрасных спектрах поглощения биологических жидкостей, а, следовательно, косвенно судить о концентрациях химических веществ в органах и тканях (в частности, в сыворотки крови) в норме и патологии [2, 5].

Так как среди детей с ЗПР большую часть составляют подростки с резидуальной органической патологией, а также в связи с тем, что их воспитание характеризуется наличием многочисленных стрессов из-за частой асоциальной направленности их родителей и проживания в условиях закрытого учебного заведения, актуальным является изучение изменений фосфолипидного спектра сыворотки крови у данного контингента детей с целью выявления метаболических критериев задержки развития. Можно предположить, что в терапии подростков с ЗПР преимущество должно отдаваться лекарственным препаратам с мембранотропными и антиоксидантными свойствами, а критериями их эффективности выступать данные метаболизма ФЛ.

Цель исследования: выявление особенностей метаболизма ФЛ у подростков с ЗПР по данным тонкослойной хроматографии (ТХ) и ИК-спектроскопии сыворотки крови с целью совершенствования медицинского обеспечения данного контингента детей.

Материалы и методы. Проведено обследование 91 подростка с задержкой психического развития в возрасте от 12 до 15 лет (средний возраст $14,1 \pm 0,8$ лет), из них 52 мальчика, 39 девочек. Исследование проводилось в г. Твери в 2008-2011 гг. на базе Специализированного коррекционного образовательного учреждения VII типа школы-интерната №2, где обучаются дети с задержкой психического развития. Диагноз «Задержка психического развития» был установлен Медико-педагогической психологической комиссией. Контрольную группу составили 63 подростка с нормативным психическим развитием аналогичного возраста ($13,9 \pm 0,6$ лет), учащиеся средней общеобразовательной школы №27 г. Твери. Критериями исключения детей из обследования стало наличие острой инфекционной патологии и обострение сопутствующих хронических заболеваний.

В работе использованы биохимический (ТХ и ИК-спектроскопия сыворотки крови) и статистические методы исследования. При проведении ТХ адсорбент (силикагель) наносился на пластины методом осаждения из водных суспензий. При хроматографии ФЛ в суспензию добавляли соль двууглекислого калия, присутствие которой обеспечивало более четкое и полное разделение ФЛ. Полученную взвесь выливали в кювету, туда же на

10 минут помещали две стеклянные пластины, после чего жидкость отсасывали. Пластины, не вынимая из кюветы, сушили до тех пор, пока нанесенный селикагель не становится матовым. Подготовленную пластину разделяли на дорожки шириной 5 мм и активировали в сушильном шкафу при 120 градусах в течении 15 минут. Экстракция липидов проводилась по BlighE.G. Сыворотка крови в объеме 0,8 мл вносилась в пробирку с 3-мя мл заранее приготовленного раствора хлороформа и метанола в соотношении 1:2. Полученная смесь фильтровалась, после чего осадок на фильтре трижды промывался хлороформ-метаноловым раствором по 1,5 мл. К фильтрату прибавляли 2 мл 0,02% раствора хлорида кальция. После четкого расслоения фаз верхняя фаза снималась, нижняя трижды промывалась раствором хлороформ : метанол : 0,02% раствор хлорида кальция в соотношении 3:48:47. Затем к нижней фазе по каплям приливался метанол до получения прозрачного раствора, 1/20 часть которого использовалась для определения количества общих липидов. Оставшаяся часть выпаривалась досуха, сухой остаток растворялся в 20-25 мкл смеси хлороформ : метанол 2:1 и в количестве 5 мкл наносился на предварительно активированную пластину.

Определение общих липидов проводилось по методу Марша. Отделенная от общего количества раствора 1/20 его часть упаривалась досуха при 120 градусах. После добавления 1,0 мл концентрированной серной кислоты пробирку сжигали в течение 20 мин при 200 градусах. Затем добавляли 1,5 мл дистиллированной воды и колориметрировали на фотоэлектроколориметре со светофильтром №4 при длине волны 400 нм в кювете с рабочей гранью 1 см. Фракционирование липидов осуществлялось в плоских стеклянных камерах. Хроматография общих липидов проводилась в системе гептан: этилацетат: эфир (12:3:0,6) в течение 40 минут. Хроматография ФЛ – в системе хлороформ: метанол: 7 N аммиак (13:7:1) в течение 1 часа 30 минут. Идентификация фракций липидов производилась с помощью стандартных растворов. Количественное содержание отдельных липидных фракций определялось с помощью денситометрии. В данной работе применялся денситометр CS-9000, "Shumadzu", Япония. Установлено, что ФЛ фракции на хроматограммах располагались в порядке возрастания следующим образом: лизофосфатидилхолины, фосфатидилсерины, лизофосфатидилэтанолламины, сфингомиелины, фосфатидилхолины, фосфатидилинзитолы, фосфатидилэтанолламины.

Для проведения ИК-спектрометрии использовался разработанный совместно с сотрудниками НИИ-2 МО РФ аппаратно-програмный комплекс, представляющий собой девятизональный спектроанализатор. Положение и число исследуемых диапазонов выбрано, исходя из особенностей спектров поглощения воды и фундаментальных органических компонентов крови. Цикл девяти измерений не превышал 1 секунды. Спектральная область действия прибора составляла от 3500см^{-1} до 960см^{-1} , объем исследуемого материала 0,02мл. С помощью интерференционных фильтров выделялись следующие диапазоны: 3500 - 3200, 3085 - 2832, 2120 - 1880, 1710 - 1610, 1600 - 1535, 1543 - 1425, 1430 - 1210, 1127 - 1057, 1067 - 930 см^{-1} . Спектрометр сертифицирован как новый тип измерителя (сертификат № 5745 от 20.11.98 г.), который позволяет регистрировать показатели пропускания ИК-излучения после их многократного определения в девяти широких диапазонах в слоях жидкости толщиной 15мк. Кюветы, в которых проводили анализы, изготовлены из сплава хлористо-бромистого и йодисто-бромистого талия (KRS). Для сравнения состояний исследуемых систем в качестве эталона были взяты предварительно определенные значения показателей пропускания (ПП) ИК-излучения сыворотки плазмы крови здоровых подростков. Первичную обработку сигнала с аппаратно-программного комплекса «ИКАР» и аппаратных данных проводили специализированным программным обеспечением, разработанным для этих целей на базе операционной системы WindowsXP в вычислительной среде системы MATLAB 6.5 фирмы MathWorksInc (лицензия №146229).

Для установления статистических различий использовались методы непараметрической статистики: U-критерий Манна-Уитни при использовании

специализированной компьютерной программы на базе «MicrosoftExcel» и «Statistica 6.1.478».

Результаты исследования. С помощью ТХ сыворотки крови были обнаружены качественные и количественные отличия в содержании общих липидов и отдельных фракций ФЛ у подростков с ЗПР от указанных показателей в группе контроля. Изучение относительных показателей содержания отдельных классов общих липидов показало, что в сыворотке крови у детей с ЗПР ФЛ было достоверно больше ($26,2 \pm 1,15\%$; $18,9 \pm 0,83\%$, $p < 0,05$), а диглициридов/триглицеридов достоверно меньше ($22,5 \pm 1,01\%$; $29,9 \pm 1,33\%$, $p < 0,05$). При анализе относительных показателей содержания различных фракций ФЛ у воспитанников интерната была зафиксирована большая доля сфингомиелина ($28,3 \pm 1,27\%$; $24,6 \pm 1,08\%$, $p < 0,05$) и меньшая фосфатидилинозитола ($3,9 \pm 1,15\%$; $5,2 \pm 0,22\%$, $p < 0,05$) и лизоформ ФЛ ($3,8 \pm 1,13\%$; $7,8 \pm 0,32\%$, $p < 0,05$). Выраженные количественные отличия в содержании общих липидов и ФЛ в сыворотке крови у подростков с ЗПР заключались в существенно меньшей их концентрации (в 2,1 раз), чем у подростков с нормативным развитием, как в целом (общие липиды: $394 \pm 13,97$ мг/%; $736,4 \pm 29,44$ мг/%; ФЛ: $73,1 \pm 2,92$ мг/%; $138,8 \pm 5,54$ мг/% соответственно, $p < 0,01$), так и по отдельным классам указанных веществ.

При анализе средних значений показателей пропускания (ПП) ИК-спектра сыворотки крови (рис. 1) установлено, что у подростков с ЗПР наблюдаются достоверные отличия от подростков без ретардации психического развития по всем изучаемым областям спектра ($p < 0,05$). Наиболее информативными диапазонами являлись 3-й и 5-й каналы девятиканального аппаратно-программного комплекса «ИКАР», которые соответствуют областям $2120-1880$ см^{-1} и $1600-1535$ см^{-1} . При этом ПП по 3-му каналу у подростков основной группы были в 1,9 раз выше ($88,0 \pm 3,51\%$), а по 5-му каналу в 2,1 раз ниже ($19,7 \pm 0,48\%$) по сравнению с детьми группы контроля ($46,3 \pm 1,84\%$; $41,5 \pm 1,65\%$ соответственно, $p < 0,01$). Тестируемые по 3-му каналу химические связи типа Р-ОН, -СН (-СН=СН₂, -СН=СН-), в наибольшем количестве встречаются в ФЛ, триглицеридах и эфирах холестерина. Высокие ПП в данной области ИК-спектра косвенно подтверждают обнаруженную с помощью тонкослойной хроматографии низкую концентрацию этих веществ в сыворотке подростков с ЗПР. В тоже время большая доля сфингомиелина в составе ФЛ у детей основной группы находит свое отражение в низких ПП ИК-спектра по 5-му каналу, так как существенное влияние на данный параметр оказывают химические связи, присущие сфингомиелину.

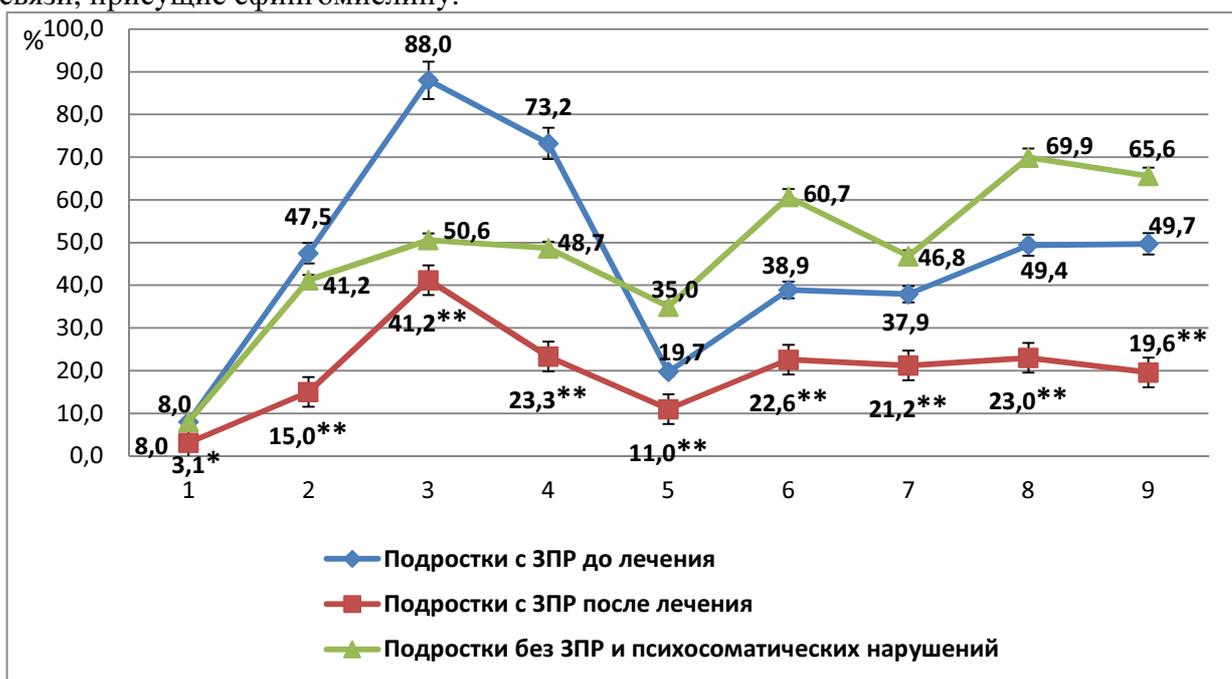


Рис. 1. Средние значения ПП ИК-спектра сыворотки крови подростков с ЗПР до и после лечения кортексином (%), * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Заключительным этапом исследования стало изучение возможности коррекции нарушений метаболизма фосфолипидов с помощью пептидного регулятора полимодального действия кортексина у подростков с ЗПР, страдающих психосоматическими заболеваниями. Кортексин вводился внутримышечно в дозе 10 мг 1 раз в 2 дня, курс лечения составил 10 инъекций. Изучение изменений метаболизма фосфолипидов после курса терапии, рассматриваемых в качестве критерия эффективности лечения, проводилось с помощью ИК-спектрометрии сыворотки крови на 5 день после последней инъекции препарата.

При оценке средних значений ПП ИК-спектра сыворотки крови подростков с ЗПР (рис. 1) обнаружены их достоверные отличия до и после лечения кортексином по всем изучаемым областям ($p < 0,05$). Следует отметить, что среди наиболее информативных диапазонов ИК-спектра были отмечены 4-й ($1750-1610 \text{ см}^{-1}$), характеризующий присутствие $-C=O$ связи, которая содержится во всех ФЛ, и 9-й ($1067-930 \text{ см}^{-1}$) каналы, тестирующий фосфатидные связи $-P-O-C$ и $-P-OH$, присущие фосфатидилинозитолу, фосфатидилэтаноламину и фосфатидилсерину. Снижение средних значений ПП в данных областях после курса лечения достигали 3,1 и 2,5 раза соответственно ($p < 0,01$).

Обсуждение результатов. Выявленные в основной группе нарушения метаболизма ФЛ, выражающиеся в более низком их содержании в сыворотке крови, изменении качественного и количественного состава, могут указывать на дестабилизацию клеточных мембран (в том числе нейронов), изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера [3, 4]. Низкий уровень общих липидов и ФЛ у подростков с ЗПР, наряду с действием алиментарного фактора, возможно, связан с активацией липаз и фосфолипаз, а также усилением перекисного окисления липидов, что отмечается при пребывании в условиях хронического стресса [1]. Более высокая доля сфингомиелина, наиболее важного структурного компонента мембраны нервной клетки, в крови у подростков с ЗПР может отражать структурно-метаболические изменения нейромембран при данной патологии и повреждение цитоскелета нейронов. Следовательно, метаболические изменения, обнаруженные у детей основной группы обследования, свидетельствуют о наличии биологических предпосылок ЗПР, о патогенетических механизмах данного заболевания, действующих на клеточном и субклеточном уровнях. Несмотря на принципиальную обратимость клинических проявлений ЗПР при благоприятных условиях воспитания и обучения [9], исходя из данных, полученных при исследовании сыворотки крови, правомочно утверждать, что высокая эффективность указанных мероприятий возможна только при добавлении к ним методов медикаментозной коррекции, способных действовать на биологический механизм формирования и поддержания данного психического расстройства.

Результаты лечения, свидетельствующие об активации метаболизма ФЛ, могут расцениваться как запуск адаптивных процессов в организме подростков с ЗПР в связи с выраженными антиоксидантными свойствами ФЛ [3, 5]. Поэтому кортексин является эффективным, патогенетически обоснованным средством коррекции нарушений метаболизма ФЛ у подростков с ЗПР, выступающих в качестве «патологической почвы». Учитывая полученные данные, метод ИК-спектрометрии сыворотки крови можно рекомендовать для диагностики ЗПР и оценки эффективности лечения данной патологии.

Таким образом, в сыворотке крови подростков с ЗПР обнаружены достоверные качественные и количественные отличия в содержании общих липидов и отдельных фракций ФЛ, заключающиеся в большей доли ФЛ и в меньшей доле диглициридов/триглицеридов. Концентрация общих липидов и ФЛ в сыворотке крови данной категории детей была в 2,1 раз ниже, чем у нормативно развивающихся подростков с той же патологией. Наиболее выраженное изменение показателей

пропускания ИК-спектра сыворотки крови подростков в диапазонах длин волн 3500-3100 см⁻¹, 1750-1610 см⁻¹, 1067-930 см⁻¹ отражает степень дестабилизации и повреждения клеточных мембран и может быть использовано для диагностики ЗПР. Для повышения эффективности лечения психосоматических расстройств обосновано назначение пептидного регулятора полимодального действия кортексин, обладающего способностью корригировать нарушения метаболизма ФЛ (по 10 мг внутримышечно 1 раз в 2 дня, 10 инъекций на курс с повторными курсами с интервалом в 3–6 месяцев).

Для диагностики ЗПР и оценки эффективности проводимой терапии больных рекомендуется использование метода ИК-спектроскопии сыворотки крови в качестве экспресс-метода.

Список литературы

1. Говорин, Н.В., Злова Т.П., Ахметова В.В. Нейроиммунные показатели как маркеры эффективности лечебно-реабилитационных мероприятий у детей с задержками психического развития органического генеза // Журн. неврол. и психиатр. им. С.С.Корсакова. – 2007. – Т. 107, №6. – С. 36-38.
2. Гордеев А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей // Современные технологии в медицине. – 2010. – №1. – С. 84-98.
3. Зиньковский А.К., Каргаполов А.В., Зиньковский К.А. Роль фосфолипидов при психических расстройствах // 3-я Междунар. конф. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». – Суздаль, 2001. – С. 65.
4. Зиньковский К.А. Клинико-патохимические, иммунологические изменения и их терапевтическая коррекция у больных эпилепсией: Дис... канд. мед. наук. – М., 2004. – 143 с.
5. Зубарева Г.М. Анализ состояния биологических систем с помощью инфракрасной спектроскопии: Автореф. дис... доктора биол. наук. – М., 2005. – 34 с.
6. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. – СПб.: Питер 1999. – 504 с.
7. Коррекция липидного метаболизма головного мозга при токсическом поражении/ И.В.Меркушкина [и др.] // Фармация. – 2009. – №1. – С. 42-44.
8. Менделевич Б.Д., Яковлева Т.В., Альбицкий В.Ю. Медико-социальные проблемы психического здоровья детей России. – М.: Союз педиатров России, 2010. – 224 с.
9. Седова А.К. Медико-социальные аспекты школьной дезадаптации у подростков с задержкой психического развития – воспитанников специализированных (коррекционных) образовательных учреждений: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Рязань, 2007. – 24 с.
10. Miyamoto O., Auer R.N. Hypoxia, hyperoxia, ischemia and brain necrosis // Neurology. – 2000. – Vol. 54. – N. 2. – P. 362.

Рецензенты:

Чичановская Л.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нервных болезней с курсом нейрохирургии ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздравсоцразвития России, г. Тверь.

Слюсарь Н.Н. д.м.н., профессор кафедры химии и биохимии ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздравсоцразвития России, г. Тверь.

Работа получена 26.09.2011.