

**АНТИМУТАГЕННЫЕ, АНТИКЛАСТОГЕННЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ  
СВОЙСТВА НЕЙРОТРОПНЫХ СРЕДСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КОМПЛЕКСНОЙ  
ТЕРАПИИ ДЕТСКОГО ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ПАРАЛИЧА**

**Дина Дамировна Гайнетдинова<sup>1</sup>, Валерий Васильевич Семенов<sup>2</sup>,  
Дина Вадимовна Айзатуллина<sup>1</sup>, Максум Фасахович Исмагилов<sup>1</sup>**

**ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», <sup>1</sup>кафедра неврологии,  
нейрохирургии и медицинской генетики, <sup>2</sup>кафедра медицинской биологии и генетики,  
420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49, e-mail: nevrol@kgmu.kz**

**Реферат.** В экспериментальных и клинических исследованиях оценивалась мутагенная, антимутагенная, про- и антирадикальная активность некоторых нейротропных препаратов — церебролизина, энцефабола, ноотропила, пирацетама, актовегина и кавинтона. Установлено, что наибольшей антикластогенной активностью в опытах на C. capillaries обладал церебролизин, тогда как энцефабол проявлял наибольший прооксидантный эффект и низкую антикластогенную активность. Модифицирующий эффект препаратов был также неоднозначен.

**Ключевые слова:** супероксид, оксид азота, перекисное окисление липидов, антирадикальная активность, анеугенез, антимутагенез, нейротропные средства, эритроциты с микронуклеями, детский церебральный паралич.

**БАЛАЛАРДАГЫ ЦЕРЕБРАЛЬ ПАРАЛИЧНЫ  
КОМПЛЕКСЛЫ Д•ВАЛАГАНДА КУЛЛАНЫЛА  
ТОРГАН НЕЙРОТРОПЛЫ Д•ВАЛАУ ЧАРАЛАРЫНЫ•  
АНТИМУТАГЕН, АНТИКЛАСТОГЕН •М  
АНТИРАДИКАЛЬ УЗЕНЧ•ЛЕКЛ•РЕ**

**Дин• Дамир кызы Гайнетдинова<sup>1</sup>, Валерий Васильевич  
Семенов<sup>2</sup>, Дина Вадимовна Айзатуллина<sup>1</sup>,  
М•гъсум Ф•ссах улы Исм•гыйлев<sub>1</sub>**

**Казан д•үл•т медицина университеты, <sup>1</sup>неврология,  
нейрохирургия h•м медицина генетикасы кафедрасы,  
<sup>2</sup>медицина биологиясе h•м генетикасы кафедрасы, 420012,  
Казан ш•h•ре, Бутлеров урамы, 49,  
e-mail: nevrol@kgmu.kz**

**Эксперименталь h•м клиник тикшеренүл•рг•  
нигэлз•неп, церебролизин, энцефабол, ноотропил, пирацетам,  
актовегин h•м кавинтон кебек нейротроплы препараттарны•  
мутаген, антимутаген, про- h•м антирадикаль активлык-  
ларына б•я бирелг•н. C. Capillaries-тагы т••риб•л•рд• и•  
югары активлыкка церебролизинн• ия булуы ачыкланган,  
энцефабол ис• и• көчле прооксидант т•эсир ясаучы h•м туб•н  
антикластоген активлыкка ия ик•нлеген күрс•тк•н.  
Тикшерелг•н препараттарны• модификациял•у т•эсире д•  
төрлеч• булып чыккан.**

**Төп төшөнчл•р: супероксид, азот оксиды, липидларны•  
пероксидлы оксидлашуы, антирадикаль активлык, анеугенез,  
антимутагенез, нейротроплы чараплар.**

**ANTIMUTAGENIC, ANTICLASTOGENIC AND  
ANTIRADICAL PROPERTIES OF NEUROTROPIC  
MEDICATIONS, USED IN COMPLEX THERAPY OF  
INFANT'S CEREBRAL PARALYSSES**

**Dina Damirovna Gainetdinova<sup>1</sup>, Valery Vasiljevich Semenov<sup>2</sup>,  
Dina Vadimovna Aizatullina, Maksum Fasakhovich Ismagilov<sup>1</sup>**

**Kazan state medical university, <sup>1</sup>chair of neurology,  
neurosurgery and medical genetics, <sup>2</sup>chair of medical biology  
and genetics, 420012, Kazan, Butlerov street, 49,  
e-mail: nevrol@kgmu.kz**

**In experimental and clinical investigations there was evaluated mutagenic, antimutagenic, pro-and antiradical activity of some neurotropic medications — Cerebrolysin, Encephabol, Nootropil, Piracetam, Actovegin and Cavinton. It was established that, the largest anticlastogenic activity in tests on C. capillaries had Cerebrolysin, while Encephabol showed the greatest pro-oxidant effect and low anticlastogenic activity. Modifying effect of the medications does not have a single meaning too.**

**Key words:** superoxide, nitrogen oxide, peroxidative oxidation of lipids, antiradical activity, aneugenesis, antimutagenesis, neurotropic medications, erythrocytes with micronuclei, children's cerebral paralysis

**В** последнее время появились данные о наличии в патогенезе детского церебрального паралича (ДЦП) важного звена — неспецифического повреждения генома [1]. Являясь типовым патологическим процессом, оно логически реализуется в нарушение нормальной экспрессии генов, что существенно осложняет течение заболевания, снижает эффективность лечения и делает прогноз крайне неблагоприятным. В то же время имеется разработанная и хорошо зарекомендовавшая себя на практике фармакологическая теория защиты генома, которая предполагает использовать в коррекции повреждений генетического аппарата лекарства,

## АНТИМУТАГЕННЫЕ, АНТИКЛАСТОГЕННЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙРОТРОПНЫХ СРЕДСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ДЕТСКОГО ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ПАРАЛИЧА

у которых наряду со специфической фармакологической активностью выражен и антимутагенный компонент (способность препарата снижать процессы мутагенеза) [2]. Мутагенное действие любого ксенобиотика может проявляться в анеугенном (нарушении процессов митоза — веретена деления) и кластогенном эффекте (повреждении структуры хромосом).

Цель исследования — в эксперименте оценка антимутагенной и антиоксидантной активности некоторых нейротропных средств, применяемых в комплексной терапии начальной резидуальной стадии ДЦП.

Для экспериментальных и клинических исследований использовались нейротропные средства, применяемые при лечении начальной резидуальной стадии ДЦП: церебролизин, энцефабол, ноотропил и его отечественный аналог пирацетам, кавинтон, актовегин [4].

*Антикластогенная активность (АКА)* — способность препятствовать поломкам хромосом в мутагенных условиях препаратов — оценивалась цитогенетическим методом на клетках *Crepis capillaries* в соответствии с рекомендацией [8]. В качестве индуктора мутаций использовался этилметансульфонат. Обработка клеток препаратами и мутагеном производилась в фазе предсинтеза ДНК в профилактическом режиме.

*Антирадикальную активность* препаратов оценивали по их антиоксидантной активности (АОА), способности взаимодействовать с супероксидным анион-радикалом ( $O_2^-$ ) и монооксидом азота ( $NO^*$ ) [11]. Методы исследования: спектрофотометрический, хемилюминесцентный, ЭПР-спектроскопический.

**1. Определение антиоксидантной активности (АОА).** Перекисное окисление желточных липопротеинов во всех пробирках инициировали добавлением  $FeSO_4$ . После инкубации добавляли 500 мкл 20% тетрахлоруксусной кислоты и 100 мкл  $10^{-2}M$  ионола. Образцы центрифугировали и добавляли 0,5% 2-тиобарбитуровой кислоты. Оценивали светопоглощение (A) при 532 нм. Результаты рассчитывали по формуле:

$$AOA\% = \left( \frac{A_k - A_{оп}}{A_k} \right) \times 100\%,$$

где  $A_k - A_{532}$  в контрольном образце,  $A_{оп} - A_{532}$  в опытном (содержащем исследуемый препарат) образце.

Об активности препаратов судили по его концентрации ( $C_{50}$ , мкл/мл), добавление которой

к смеси снижало интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) на 50%.

**2. Супероксиддисмутазную (SOD) активность препаратов** — способность взаимодействовать с супероксидным анион-радикалом — оценивали методом люцигенин-активированной хемилюминесценции в реакции ксантина с ксантиноксидазой. Реакцию запускали добавлением 25 мкМ ксантина и измеряли уровень хемилюминесценции в контрольной пробе. В опытные пробы вносили известные концентрации препаратов. Измерения проводили в режиме слежения при перемешивании. SOD-активность препаратов определяли по его концентрации ( $C_{50}$ , мкл/мл), добавление которой к смеси снижало интенсивность образования супероксидного анион-радикала на 50%.

**3. Взаимодействие препаратов с монооксидом азота** оценивали методом, основанным на специфическом взаимодействии монооксида азота и спиновой метки PTIO, обладающей известным ЭПР-спектром. Источником монооксида азота служит соединение SIN-1, генерирующее его с постоянной скоростью. Продуктом взаимодействия является PTI. Это приводит к появлению дополнительных пиков в ЭПР-спектре. Количественное определение монооксида азота производится путем вычисления относительной высоты образовавшихся пиков. Активность препаратов определяли по его концентрации ( $C_{50}$ , мкл/мл), добавление которой к смеси снижало интенсивность образования оксида азота на 50%. Регистрацию спектров ЭПР производили на спектрометре LFR-30 Free Radical Analyzer (JEOL, Tokyo, Japan).

Клинические исследования проводились на двух препаратах — церебролизине и энцефаболе. Были обследованы после информированного согласия 20 больных (9 девочек и 11 мальчиков) от 2 до 10 лет с диагнозом ДЦП, спастической диплегией средней степени. Выбор формы — спастической диплегии — определен ее промежуточным положением по уровню цитогенетических нарушений по сравнению с другими клиническими формами ДЦП [1]. У всех пациентов обязательным условием на время эксперимента было отсутствие сопутствующих соматических заболеваний. Эффективность монотерапии церебролизином и энцефаболом оценивали по клиническим показателям, уровню эритроцитов с микроядрами (ЭМ) и проценту снижения уровня ЭМ — антианеугенной

активности (ААА). Уровень ЭМ определяли в трёх точках: в день начала монотерапии (до лечения), через 10 и 20 дней лечения.

*Микроядерный тест.* Для регистрации ЭМ просматривали мазки периферической крови больных до лечения. Свежие высушенные мазки фиксировали 90—70%-ным этиловым спиртом 3 минуты. Сухие препараты окрашивали в растворе азур-эозинового красителя Романовского—Гимзы в соотношении 1:5 на дистиллированной воде рН 6,8 20 минут и хорошо промывали. Просматривали 1-2 мазка каждого больного и в них подсчитывали не менее 20 тысяч эритроцитов, что позволило производить исследования в группах с малой выборкой.

Церебролизин использовался в/м один раз в день по утрам в стандартной суточной дозе из расчета 1 мл препарата на 10 кг массы ребенка. Энцефабол назначали внутрь по 50 мг детям от 2 до 5 лет и по 100 мг детям от 6 до 10 лет 3 раза в день спустя 30 минут после еды. Препараты не предписывали детям с эпилепсией и некупироваными пароксизмальными реакциями.

Статистическую обработку данных осуществляли стандартными методами с использованием параметрических критериев значимости: для сравнения средних величин — t-критерий Стьюдента, для сравнения дисперсий — F-критерий Фишера.

В опытах на модельных системах только церебролизин и в меньшей степени актовегин ингибировали образование всех взятых в исследование активных форм кислорода (АФК) — супероксида, оксида азота и продуктов ПОЛ. Это подтверждает данные других исследователей [12] и объясняется, скорее всего, аддитивным антиоксидантным эффектом компонентов, которые входят в лекарственную форму препаратов (например, селен, некоторые аминокислоты и т.д.). В тех же случаях, когда активное начало лекарства было представлено одним химическим веществом (ноотропил-пирацетам, кавинтон-винпоцетин, энцефабол-пиритинол), препарат ингибиравал одни формы свободных радикалов, стимулировал другие (прооксидантный эффект) или оставался нейтральным. С данных позиций идентифицировать потенциальный оксидантный статус некоторых фармакологических препаратов практически невозможно. Это осуществимо только в конкретных условиях по отношению к конкретной форме свободного радикала. Поэтому

вопрос о лекарственной форме препарата, используемого в качестве антиоксиданта, имеет принципиальное значение. В связи с разнонаправленным характером действия исследованных препаратов была проведена оценка чувствительности АФК-образующих процессов к лекарственным препаратам. Анализ полученных результатов показал, что наибольшей чувствительностью к модифицирующему действию нейротропных средств обладает процесс образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — его ингибировали все препараты, кроме энцефабола. Менее чувствителен процесс, генерирующий монооксид азота (его ингибировали три препарата из шести) и, наконец, процесс, формирующий супероксидный анион-радикал, оказался наиболее резистентным — его ингибировал только один препарат — церебролизин (табл. 1).

Таблица 1  
Антимуватагенный и антирадикальный эффекты исследованных препаратов

Препаратор	АКА, %	Концентрации препаратов ( $C_{50}$ , в мкл/мл) снижающие образование АФК на 50%		
		ПОЛ	SOD-активность	монооксид азота
Ноотропил	14,5***	40*	Прооксидант	Эффект отсутствует
Актовегин	6,9***	43*	Более 100, эффект	24,00*
Пирацетам	14,7***	65*	слабый Прооксидант	Эффект отсутствует
Церебролизин	43,0*	82*	60*	4,25**
Кавинтон	24,6**	Более 100	Прооксидант	Эффект отсутствует
Энцефабол	18,2***	Прооксидант	Прооксидант	33,70*

\* p<0,001, \*\* p<0,01, \*\*\* p> 0,05; АКА — антикластогенная (антимуватагенная) активность

Разрабатывая проблему лекарственного антимуватагеза, ряд исследователей [3] выдвинули предположение, что у некоторых лекарственных препаратов специфическая активность может сочетаться с антимуватагенной. И действительно, церебролизин и в меньшей степени кавинтон обнаружили способность подавлять интенсивность химически-индукционного мутагенеза на 43,0% и 24,6% соответственно (табл. 1). Другие лекарственные препараты такими свойствами не обладали. Антикластогенная (антимуватагенная) активность церебролизина может быть связана с

антиоксидантными свойствами компонентов, которые входят в его лекарственную форму. В отличие от церебролизина и других препаратов, лишь энцефабол показал не только отсутствие антикластогенного эффекта, но и проявил значимую прооксидантную активность в отношении индукции ПОЛ и супероксидного анион-радикала. Поэтому по результатам наших экспериментов и литературным данным для клинических исследований мы избрали два препарата из группы ноотропов — церебролизин и энцефабол.

В результате лечения больных церебролизином и энцефаболом прослежена положительная клиническая динамика: у 9 из 10 детей, принимавших церебролизин, и у 8 из 10 больных, принимавших энцефабол. У больных снижался спастический гипертонус в пораженных конечностях, расширялся объем активных движений и уменьшалась частота глазодвигательных нарушений. Родители отмечали, что на фоне терапии церебролизином у детей возрастает интерес к окружающему миру, улучшаются речевые навыки и процесс запоминания. При приеме энцефабола улучшаются характеристики поведения, повышается общий жизненный тонус.

В то же время в группе детей, принимавших энцефабол (рис. 2), выявлены половые различия регресса числа ЭМ: у мальчиков антианеугенная активность к 20-му дню терапии оказалась существенно ниже, чем у девочек. Можно предположить, что это в некоторой степени отражает различия в механизмах антианеугенеза, индуцированного этими препаратами, а также наличие (по крайней мере, у энцефабола) двух этапов в реализации этих механизмов.

При сопоставлении антимутагенного, про- и антиоксидантного эффекта препаратов в модельных системах и анеугенного эффекта в клинике каких-либо общих закономерностей не выявлено. Это может свидетельствовать прежде всего о том, что не все повреждения генома являются результатом действия свободных радикалов. Кроме того, при переходе на более высокий уровень организации может существенно измениться и механизм действия препарата. Его прямая (*in vitro*) антирадикальная реакция перестает быть решающей (*in vivo*), начинают доминировать механизмы, способные нормализовать работу метаболических циклов кластогенеза путем воздействия на их разные метаболические звенья [7]. Так, при ДЦП развитие

Таблица 2

Антианеугенная активность препаратов у больных ДЦП при монотерапии церебролизином и энцефаболом

Дни приема	AAA, %					
	церебролизин			энцефабол		
	общая группа	мальчики	девочки	общая группа	мальчики	девочки
10-й	35,6	42,6	29,4	32,7	41,2	21,2
20-й	37,0	35,7	38,0	33,7	17,5	50,0

Во всех случаях  $p < 0,001$ .

На 10 и 20-й день приема церебролизин и энцефабол существенно снизили высокий уровень ЭМ у больных в общей группе и в подгруппе мальчиков и девочек (табл. 2.). Это однозначно свидетельствует о наличии у препаратов способности подавлять интенсивность анеугенеза на уровне целого организма. При этом важно подчеркнуть два момента. Во-первых, лекарства снижали интенсивность анеугенеза не до физиологической нормы, а в лучшем случае от 17,5 до 50,0%. Во-вторых, в группе и мальчиков, и девочек, принимавших церебролизин, на 10 и 20-й день терапии уровень ЭМ плавно снижался и уменьшился почти 50% (рис.1).

типового патологического процесса — ацидоза приводит к нарушению целого ряда метаболических звеньев: снижается активность адренорецепторов сердца, сосудов и кишечника, повышается содержание в крови катехоламинов, усиливаются парасимпатические эффекты; между клеткой и плазмой крови перераспределяются протоны, ионы калия, хлора и другие ионы; существенно нарушается метаболизм некоторых аминокислот (например, глутамата, аспартата и др.) [6, 13]. Это, в свою очередь, нарушает нормальное течение биохимических процессов, содержащих в качестве промежуточных продуктов эндомутагены (например, АФК, глутамат,

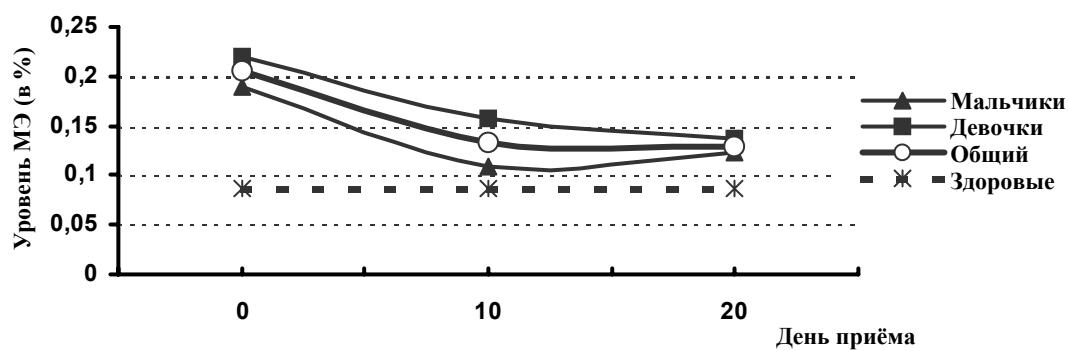


Рис. 1. Динамика уровней ЭМ у больных ДЦП при монотерапии церебролизином.

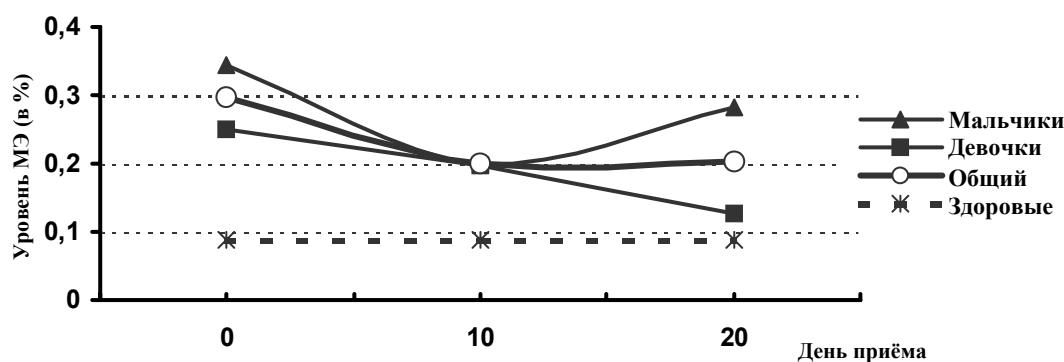


Рис. 2. Динамика уровней ЭМ у больных ДЦП при монотерапии энцефаболом.

гистамин и др.). Последствия предсказуемы – пул эндомутагенов в организме повышается и, как следствие, нарушается нормальная структура генома [1]. С этих позиций антианеугенный эффект церебролизина и энцефабола является непрямым, а осуществляется косвенно через нормализацию кислотно-основного баланса. Кроме того, установлено, что в клетках, лишённых нейротрофической регуляции, повышена интенсивность кластогенеза. Восстанавливая нейротрофический контроль, церебролизин параллельно защищает генетический аппарат клетки от дальнейшего повреждения. И, наконец, одной из причин появления в периферической крови ЭМ может быть повреждение генома эритробластов свободными радикалами и другими мутагенными продуктами в результате активации «дыхательного взрыва» в макрофагах эритробластных островков костного мозга в результате гипоксии [14]. Одновременно при гипоксии любого генеза в организме повышается уровень стимуляторов эритропоэза – эритропоэтин и андрогены, что уменьшает время восстановления первичных повреждений ДНК.

Церебролизин, повышая эффективность аэробного метаболизма, нормализует скорость эритропоэза, увеличивая тем самым время восстановления потенциальных повреждений ДНК. Это предположение находит косвенное подтверждение в постоянной регистрации более эффективного антианеугенеза у девочек, чем у мальчиков, после 10-го дня назначения препарата. Как известно, эстрогены являются ингибиторами эритропоэза [10]. В таких условиях увеличивается репарация первичных повреждений ДНК и соответственно снижается их реализация в видимые перестройки. Не исключается и другой механизм антиоксидантного действия эстрогенов – ингибция НАДФН и аскорбатзависимых систем ПОЛ в микросомах, повышение уровня каталазы и т.д. Отсюда антианеугенную и антикластогенную активность препаратов на уровне целого организма в ряде случаев необходимо рассматривать в связи с метаболическими циклами кластогенеза [5, 9], исходя из плейотропного характера действия антимутагенов. Последний часто является результатом активации комплементарных к антимутагену рецепторов.

АНТИМУТАГЕННЫЕ, АНТИКЛАСТОГЕННЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙРОТРОПНЫХ СРЕДСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ДЕТСКОГО ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ПАРАЛИЧА

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гайнэтдинова, Д.Д. Нестабильность генома у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнэтдинова, В.В. Семёнов, М.Ф. Исмагилов, И.А. Пахалина, Е.В. Колочкива // Казанский мед. ж. — 2004. — №4. — С. 263—268.

2. Дурнев, А.Д. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий / А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин. — М.: Медицина, 1998. — 326 с.

3. Дурнев, А.Д. Модификация мутационного процесса в клетках человека // Вестник РАМН. — 2001. — № 10. — С. 70—76.

4. Заваденко, Н.Н. Ноотропные препараты в практике педиатра и детского невролога. — М., 2003. — 23 с.

5. Зайцев, В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И. Закревский // Экспер. и клин. фармакология. — 2003. — Т. 66, № 4. — С. 66—70.

6. Зайчик, А.Ш. Общая патофизиология / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. — СПб: ЭЛБИ-СПб. — 2001. — 622 с.

7. Семёнов, В.В. Хромосомная изменчивость при патологических состояниях ненаследственного генеза / В.В. Семёнов, Д.Д. Гайнэтдинова, А.В. Семёнов, И.Э. Кравченко // Тез. докл. III Российского конгресса по патофизиологии. — М., 2004. — С. 112—113.

8. Семёнов, В.В. Оценка антимутагенной активности веществ на семенах *Crepis capillaries* в скрининговых исследованиях / В.В. Семёнов, Е.С. Кошпаева, А.В. Семёнов // Метод. реком. — Казань: КГМУ, 2000. — 30 с.

9. Харитонов, В.С. Агонисты пуриновых рецепторов предохраняют геном растительных и животных клеток от № 7. — С. 66—70.

10. Шиффман, Д.Ф. Патофизиология крови. — М.: Бином. — СПб: Невский Диалект, 2001. — 448 с.

11. Buhimschi, I.A. Beneficial impact of term labor: Nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus / I.A. Buhimschi, C.S. Buhimschi, M. Pupkin, C.P. Weiner // Am. J. Obstet Gynecol. — 2003. — Vol. 189, № 1. — P.181—188.

12. Deviatkina, T.A. Characteristics of lipid peroxidation in various tissues during acute stress and its correction by pyracetam and cerebrolysin / T.A. Deviatkina, E.M. Vazhnichaya, R.V. Lyt-senko // Eksp. Klin. Farmakol. — 2000. — Vol. 63, № 4. — P. 38—41.

13. Maurer, U. Etiologies of cerebral palsy and classical treatment possibilities // Wien. Med. Wochensch. — 2002. — Vol. 152, № 1-2. — P.14—18.

14. Plaisant, F. Recombinant peroxiredoxin 5 protects against excitotoxic brain lesions in newborn mice / F. Plaisant, A. Clippe, D. Vander Stricht, B. Knoops, P. Gressens // Free Radic. Biol. Med. — 2003. — Vol. 34, №7. — P. 862—872.

Поступила 30.01.09.