

УДК 616.853-053.2-07

РОЛЬ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА Bcl-2 В РАЗВИТИИ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ДЕТЕЙ С ЛОКАЛЬНО ОБУСЛОВЛЕННОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

М. Г. Соколова¹, С. В. Лобзин¹, Л. А. Полякова¹, М. В. Резванцев²¹ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия²ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

THE ROLE OF ANTI-APOPTIC PROTEIN Bcl-2 IN DEVELOPMENT OF DRUG RESISTANCE IN CHILDREN WITH LOCALIZATION-RELATED EPILEPSY

M. G. Sokolova¹, S. V. Lobzin¹, L. A. Polyakova¹, M. V. Rezvantsev²¹North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia²Military Medical Academy named after S. M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia.

© Коллектив авторов, 2015 г.

То, что основная роль белка Bcl-2 и членов его семейства состоит в регулировании апоптоза, стало известно почти 10 лет назад, однако появляются новые данные, свидетельствующие об участии этого белка в разнообразных клеточных процессах, а также обсуждается роль белков Bcl-2 в патогенезе различных заболеваний нервной системы и их возможное использование в диагностических целях. Изучение антиапоптотического белка Bcl-2 у детей с локально обусловленной эпилепсией может раскрыть механизм развития фармакорезистентности и позволит добиться контроля над припадками. Проведено клинико-лабораторное и инструментальное обследование 31 ребенка с локально обусловленной эпилепсией. Выявлено, что у детей с фармакорезистентными формами локально обусловленной эпилепсии уровень антиапоптотического белка Bcl-2 был статистически значимо выше, чем в контрольной группе.

Ключевые слова: локально обусловленная эпилепсия, фармакорезистентность, белок Bcl-2, иммуноферментный метод.

The main role of Bcl-2 protein and other proteins of its family is apoptosis regulation became known about 10 years ago, however we still receive new information about participation of this protein in various cellular processes, there is also a discussion about the role of Bcl-2 proteins in pathogenesis of various nervous system diseases and its possible use for diagnostic purposes. Studies of anti-apoptic protein Bcl-2 in children with localization-related epilepsy could help to find out the drug resistance mechanism and will help to take control over the attacks. Clinical-laboratory and instrumental examination of 31 children with localization-related epilepsy was carried out. It was revealed that the level of Bcl-2 anti-apoptic protein in children with drug resistance forms of localization-related epilepsy was statistically significantly higher, than in children of control group.

Keywords: localization-related epilepsy, drug-resistance form, protein Bcl-2, immunoenzyme method.

Эпилепсия — заболевание, имеющее прогрессирующее течение с высоким уровнем инвалидизации, требующее длительной терапии, что имеет принципиальное значение для здоровья и качества жизни больного [1]. Эпилепсия является распространенным неврологическим заболеванием у детей. Частота эпилептических пароксизмов в популяции составляет 20–30 случаев на 1000 детей. В соответствии с консенсусом Международной противозепилептической лиги и Международного бюро по эпилепсии (ILAE, IBE 2005), эпилепсия — заболевание головного мозга, характеризующееся стойкой предрасположенностью к генерации эпилептических припадков, а также нейробиологическими, когни-

тивными, психологическими и социальными последствиями этого состояния. В 30% случаев эпилепсия у детей имеет резистентный характер. Трудноизлечимыми, резистентными, неконтролируемыми (intractable — англ.) или медикаментозно-резистентными (drug-resistant) формами эпилепсии называют эпилептические заболевания, при которых тяжесть и частота припадков, неврологические и психиатрические сопутствующие симптомы не поддаются адекватной коррекции [2]. Термин «фармакорезистентность», используемый в литературе и клинической практике, не является объективным определением нечувствительности эпилепсии к лекарственной терапии вообще, а представляет собой относи-

тельное и переменное понятие, характеризующее определенную клиническую ситуацию [2]. По определению P. Wolf, понятие «резистентность» следует относить к конкретному препарату или конкретной стратегии лечения [3]. Резистентность подразделяют на относительную, условную и абсолютную. Относительная резистентность связана с неправильным выбором препаратов, нарушением режима лечения и неблагоприятными социально-психологическими факторами. Термином «условная резистентность» пользуются при апробации новейших препаратов, таким образом характеризуя случаи, когда применение двух основных препаратов первого выбора для данной формы эпилепсии в моно- или дуотерапии не оказывает заметного влияния на частоту и тяжесть припадков. Абсолютная резистентность отражает ситуацию, когда любые комбинации препаратов в дозировках, обеспечивающих максимальную терапевтическую концентрацию, оказываются неэффективными [2]. Известно, что эпилептогенез связан с нарушением процессов поляризации и деполяризации мембраны нейрона вследствие влияния афферентной импульсации или из-за спонтанной активности нейрона при наклонности мембраны нейрона к избыточной деполяризации. Процесс поляризации определяется разностями концентрации ионов (K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^-) внутри нейрона и во внеклеточном пространстве [4]. Нарушения в процессах поляризации и деполяризации мембраны нейрона зависят от ряда факторов: состояния мембранных ионных каналов, концентрации ионов, нейрхимических процессов на мембранном уровне, взаимодействия возбуждательных и тормозных рецепторов [5]. Эти процессы регулируются генными механизмами через синтез различных белков, список которых постоянно пополняется. Одним из таких пептидов является белок Bcl-2 [6]. Изучены молекулярные механизмы, с помощью которых белки семейства Bcl-2 регулируют апоптоз: это митохондриальный путь и процесс активации каспаз [7, 8, 9]. Известно, что белок Bcl-2 участвует в поддержании клеточного гомеостаза ионов кальция, регулируя поток кальция через эндоплазматический ретикулум [10, 11]. Несмотря на то, что ключевая роль в регуляции апоптоза для онкогена Bcl-2 установлена давно и не вызывает сомнения [12], молекулярный механизм действия этого антиапоптотического белка при эпилепсии не выяснен. Проапоптотические и антиапоптотические белки, участвующие в регуляции клеточного цикла (пролиферация, апоптоз), могли бы быть использованы в качестве прогностических и диагностических маркеров. Возможными кандидатами на эту роль является белок Bcl-2.

Целью исследования явилось изучение роли антиапоптотического белка-Bcl-2 в развитии

фармакорезистентности у детей с локально обусловленной эпилепсией.

Материалы и методы. На базе стационарного отделения «Хоспис (детский)» в Санкт-Петербурге были обследованы дети с локально обусловленной эпилепсией ($n = 31$ чел.) в возрасте 5–10 лет (13 мальчиков и 18 девочек). Критериями отбора в исследуемую группу являлись следующие факторы: диагноз синдрома локально обусловленной эпилепсии, подтвержденный электроэнцефалографическим (ЭЭГ) исследованием в течение 6 месяцев, длительность противоэпилептической терапии более 1 года, постоянный прием противоэпилептических препаратов в терапевтических дозах. Контрольную группу составляли 30 здоровых детей. Анамнестические сведения обследуемых детей подтверждались данными соответствующих документов (выписные эпикризы из родильного дома, из стационаров и т. д.). Всем детям основной и контрольной группы проводилось клинико-неврологическое и лабораторное обследование. Определение уровня белка Bcl-2 проводили иммуноферментным методом в образцах сыворотки крови с использованием коммерческого иммуноферментного набора фирмы RayBiotech, Inc в соответствии с инструкциями производителя. Пороговые величины определения Bcl-2 были 0,5 нг/мл. В ходе исследования применяли следующие процедуры и методы статистического анализа: определение числовых характеристик переменных; оценка соответствия эмпирического закона распределения количественных переменных теоретическому закону нормального распределения по критерию Шапиро—Уилка; оценка статистической значимости различия количественного показателя в двух группах с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни (Mann—Whitney U Test). Описание количественных признаков выполнено с использованием медианы, 25 и 75% перцентилей. Нулевая статистическая гипотеза отвергалась при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft®, Inc., USA).

Результаты и их обсуждение. Анализ анамнестических данных выявил у детей с локально обусловленной эпилепсией патологию головного мозга пренатального и перинатального периода (75%): гипоксически-ишемическое поражение (44%) и сочетанное гипоксически-ишемическое и инфекционное поражение ЦНС (31%). В акушерском анамнезе отмечено, что 59% матерей рожали в возрасте старше 30 лет, а у 55% имелись различные соматические заболевания, в том числе урогенитальные инфекции (37%). Период беременности протекал с осложнениями в виде угрозы прерывания беременности (79%), преждевременных родов (46%), операции кесарево сечение

(33%). Состояние новорожденных по шкале Апгар расценивалось как тяжелое в 2 балла у 50% новорожденных, в 3–4 балла — у 21, в 5 баллов — у 29%. Искусственная вентиляция легких до 7 суток проводилась у 9% новорожденных. Клинико-неврологические исследования 31 ребенка с локально обусловленной эпилепсией выявили двигательные нарушения в виде спастического тетрапареза (78%), гемипареза (12%) и атаксически-атонического синдрома (10%). Таким образом, у 27 детей были выявлены клинические проявления спастического паралича. Двигательные нарушения сочетались у 21% детей с псевдобульбарным синдромом, у 26% с гиперкинетическим синдромом и у 33% с гипертензионно-гидроцефальным синдромом. Синдром локально обусловленной эпилепсии развился у 17 детей с диагнозом «детский церебральный паралич» (ДЦП) и у 14 детей с диагнозом «перинатальная энцефалопатия». Все дети имели задержку психомоторного и речевого развития. Диагноз эпилепсии был подтвержден ЭЭГ-исследованием. На ЭЭГ у 23 (73%) детей были выявлены фокальные эпилептические нарушения с локализацией в височной (52%), лобной (15%), и затылочной (6%) областях мозга. У 9 (27%) детей припадки носили характер генерализованных эпилептических судорог. Лечение противоэпилептическими препаратами у 20 больных проводилось в виде монотерапии (вальпроат, карбамазепин, ламотриджин)

и у 12 больных — дуотерапии (вальпроат + карбамазепин, вальпроат + топамакс и др.). У 16 (52%) детей наблюдалась фармакорезистентность: судорожные приступы возникали на фоне противосудорожной терапии с частотой от 1 раза в 3 месяца и чаще. Дети с локально обусловленной эпилепсией были разделены на 2 группы: первую группу (n = 15) составили дети без фармакорезистентности, вторую группу (n = 16) дети с фармакорезистентным течением заболевания.

При проведении статистического анализа результатов иммуноферментного анализа (ИФА) сыворотки крови было выявлено, что уровень белка Vcl-2 у детей с локально обусловленной эпилепсией имеет статистически значимые различия при сравнении с контрольной группой ($p < 0,001$). Уровень белка Vcl-2 у детей с локально обусловленной эпилепсией составлял — 60,4 (13,8–1110,3) нг/мл, в контрольной группе белок не выявлялся. Также выявлены статистически значимые различия ($p < 0,001$) при сопоставлении данных уровня белка Vcl-2 у детей с фармакорезистентной формой локально обусловленной эпилепсии — 847,6 (361,9–1465,8) нг/мл и без фармакорезистентности — 13,9 (0,0–24,5) нг/мл (см. рис.). Не выявлено достоверных различий по полу ($p = 0,50$) при сопоставлении данных уровня белка Vcl-2 у детей с фармакорезистентной формой локально обусловленной эпилепсии и без фармакорезистентности.

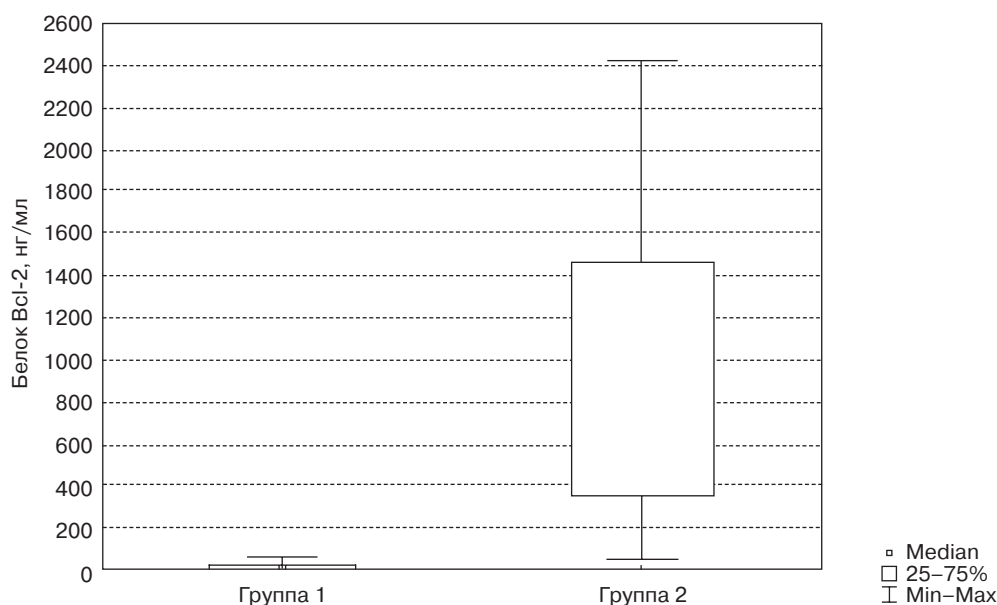


Рис. Концентрация белка Vcl-2 (нг/мл) в исследуемых группах

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что белок Vcl-2 участвует в процессе фармакорезистентности у больных с локально обусловленной эпилепсией, замедляя процессы созревания мозга у детей. Существует мнение, что повышенная экспрессия белка Vcl-2 у больных с локально обусловленной эпилепсией

связана с участием белка в процессах свободно-радикального окисления [13]. Считается, что белок Vcl-2 предотвращает запрограммированную гибель клеток в организме путем подавления перекисного окисления липидов [14, 15]. Имеются данные, что у больных спастическими формами ДЦП выявлена высокая активность окислитель-

ных процессов [16]. Так, у детей с ДЦП от 1 года до 5 лет в сыворотке крови был выявлен высокий уровень церулоплазмينا и ферментов антирадикальной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза) [16]. Авторы допустили, что существуют патогенетические механизмы, поддерживающие и, возможно, провоцирующие процессы окисления у больных ДЦП. Следовательно, увеличение концентрации Bcl-2 может быть связано с функцией подавления оксидантного стресса у больных ДЦП, что подтверждается и нашими данными [17, 18]. Важно отметить, что гиперпродукция белка Bcl-2 у детей с локально обусловленной эпилепсией направлена на стабилизацию кальциевого гомеостаза. Было показано, что увеличение концентрации белка Bcl-2 предотвращает выход внутриклеточного кальция из эндоплазматического ретикулула, усиливая его обратный захват, а также потенцирует увеличение пассивного транспорта кальция в митохондрии и ингибирует вход ионов кальция в ядро [10, 19]. Следовательно, высокая активность окислительных процессов у больных ДЦП и существующая кальций-зависимая гипервозбудимость при эпилепсии создают условия для повышенного синтеза белка Bcl-2. Вместе с тем, белок Bcl-2, как известно, оказывает на нервную ткань антиапоптотическое действие, замедляя процессы дифференцировки нейронов [20], что, возможно, является одним из факторов, способствующих снижению темпов созревания ЦНС у детей с локально обусловленной эпилепсией. Фактически все больные ДЦП дети имеют задержку психомоторного и речевого развития, и не всегда мы можем объяснить выраженную задержку развития только наличием органического дефекта в головном мозге. Скорее, здесь задействованы более тонкие биомолекулярные процессы на клеточном уровне, которые, возможно, и запускает белок Bcl-2. Вследствие задержки развития ЦНС у больных локально обусловленной эпилепсией остаются факторы, способ-

ствующие развитию фармакорезистенции: это преобладание возбуждающих синапсов над тормозными, большая популяция нередуцированных нейронов и наличие незрелых структур нигрального контроля, что способствует эпилептогенезу [21, 22]. Среди обследуемых больных локально обусловленной эпилепсией дети со спастическими формами паралича имели наиболее выраженную задержку психомоторного и речевого развития, чаще находились на комбинированной противосудорожной терапии и имели более высокие показатели в сыворотке крови белка Bcl-2. Это обстоятельство также может играть роль в развитии фармакорезистентности. Известно, что по мере взросления ребенка биопотенциалы головного мозга меняют основные ритмы с медленноволновой активности на доминирующее влияние альфа-ритма. При более длительном периоде сохранения медленноволновой активности у детей старшего возраста происходит избыточная синхронизация активности нейронов [23]. При этом мозговые системы реагируют на приток афферентной стимуляции синхронным ответом гораздо больших популяций нейронов и генерируют в более массивные и синхронные залпы потенциалов действия, обуславливая более массивные ответы нейронов последующих каскадов.

Заключение. Белок Bcl-2, участвует в процессах, связанных с апоптозом и клеточной пролиферацией нервной ткани. Повышенное содержание белка Bcl-2 в сыворотке крови у больных локально обусловленной эпилепсией детей способствует развитию фармакорезистентности, замедляя темпы созревания у них ЦНС вследствие антиапоптотического действия на нервную ткань. Возможно, стабилизация дисбаланса кальция и снижение активности процессов перекисного окисления у больных локально обусловленной эпилепсией может снизить гиперпродукцию белка Bcl-2 и тем самым уменьшить влияние этого белка на нервную ткань.

Литература

1. *Неврология: национальное руководство* / Под ред. акад. РАМН Е. И. Гусева. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 936 с.
2. *Зенков Л. Р., Притыко А. Г.* Фармакорезистентные эпилепсии. — Москва: МЕДпресс информ, 2003. — 208 с.
3. *Wolf P.* Therapeutic strategies for drugs resistant epilepsies // *Epileptologia*. — 1994. — V. 2. — P. 119–125.
4. *Фаллер Д. М., Шилдс Д.* Молекулярная биология клетки. — Москва: БИНОМ, 2006. — 256 с.
5. *Finardi A., Colciaghi F., Castana L. et al.* Long-duration epilepsy affects cell morphology and glutamatergic synapses in type IIB focal cortical dysplasia // *Acta Neuropathol*. — 2013. — Vol. 126. — № 2. — P. 19–35.
6. *Frenzel A., Grespi F., Chmielewski W., Villunger A.* Bcl-2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer // *Apoptosis*. — 2009. — Vol. 14. — № 4. — P. 84–96.
7. *Ahad A.* The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update // *J. Arch. Toxicol*. — 2015. — Vol. 89. — № 3. — P. 289–317.
8. *Орлова Е. В., Костанян И. А., Панов В. П.* Роль регуляторных белков апоптоза // *Химико-фармацевтический журнал*. — 2005. — Т. 39. — № 12. — С. 3–8.

9. *Bedner E. X.* Translocation of Bax and Bcl-2 to mitochondria during apoptosis measured by laser scanning cytometry // *Cytometry*. — 2008. — № 41. — P. 83–88.
10. *D'Orsi B.* Bax and Bcl2 regulates neuronal Ca²⁺ homeostasis // *J. Neurosci.* — 2015. — Vol. 35. — № 4. — P. 18–22.
11. *Райхлин Н. Т., Рахлин Н. А.* Регуляция апоптоза в физиологических условиях и в опухолях // *Вопросы онкологии*. — 2002. — Т. 48. — № 2. — С. 159–171.
12. *La Casse E. C.* The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer // *J. Oncogene*. — 2004. — V. 17. — P. 3247–3259.
13. *Меньщикова Е. Б., Данкин В. З., Зенков Н. К.* Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Фирма «Слово», 2006. — 556 с.
14. *Abdullah A. S.* Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract // *BMC Complement Altern. Med.* — 2015. — Vol. 15. — № 1. — P. 568–575.
15. *Quincozes-Santos A., Bobermin L. D., Tramontina A. C.* Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol // *J. Toxicol In Vitro*. — 2014. — Vol. 28. — № 4. — P. 44–51.
16. *Айзатулина Д. В., Гайнетдинова Д. Д.* Активность процессов свободнорадикального окисления у детей больных детским церебральным параличом // *Сб. матер. IV Балтийский Конгресс по детской неврологии*. — СПб.: Человек и его здоровье, 2013. — С. 6–7.
17. *Соколова М. Г.* Исследование активности антиапоптотического белка Bcl-2 у детей, больных детским церебральным параличом [Электронный ресурс] // *Universum: Медицина и фармакология: электрон. науч. журн.* — 2015. — № 9(10). — <http://7universum.com/en/med/archive/item/1587>. — Последнее посещение сайта 01.02.2015 г.
18. *Sokolova M. G.* Hyperexpression of Bcl-2 protein in children with cerebral palsy and localization related epilepsy // «The priorities of the world science: experiments and scientific debate»: Proceeding of the V International scientific conference 2014. — North Charleston, SC, USA: CreateSpace. — 2014. — P. 36–40.
19. *Pacico N., Mingorance-Le M.* New in vitro phenotypic assay for epilepsy: fluorescent measurement of synchronized neuronal calcium oscillations // *J. PLoS One*. — 2014. — № 8. — P. 55–58.
20. *Fickova M.* A comparison of the effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride on cell proliferation, proapoptotic p53, Bax, and antiapoptotic Bcl-2 protein levels in human breast cancer MCF-7 cell line // *J. Toxicol In Vitro*. — 2015. — № 29. — P. 727–731.
21. *Battaglia G., Battaglia G., Colciagh F., Finardi A.* Intrinsic epileptogenicity of dysplastic cortex: converging data from experimental models and human patients // *Review Epilepsia*. — 2013. — № 54. — P. 33–36.
22. *Prox J.* Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions // *J. Neurosci.* — 2013. — № 7. — P. 28–33.
23. *Eyo U. B.* Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y12 receptors after status epilepticus // *J. Neurosci.* — 2014. — № 6. — P. 34–40.

Информация об авторах:

Соколова Мария Георгиевна — к. м. н., доцент кафедры неврологии им. акад. С. Н. Давиденкова ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России

Лобзин Сергей Владимирович — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой неврологии им. акад. С. Н. Давиденкова ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России

Полякова Любовь Александровна — к. м. н., доцент кафедры неврологии им. акад. С. Н. Давиденкова ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России

Резванцев Михаил Владимирович — к. м. н., доцент, заместитель начальника учебно-методического отдела ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Адрес для контактов: sokolova.m08@mail.ru