

## СОПОСТАВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МАРКЕРОВ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ И ПЕРЕКИСНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ОСТРОМ И РАННЕМ ПЕРИОДАХ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИННОГО МОЗГА

Конюченко Е.А.<sup>1</sup>, Ульянов В.Ю.<sup>1</sup>, Норкин И.А.<sup>1</sup>, Карякина Е.В.<sup>1</sup>, Щуковский В.В.<sup>1</sup>, Дроздова Г.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, Саратов, Россия (410002, Саратов, ул. Чернышевского, 148), e-mail: [koniuchienko1983@mail.ru](mailto:koniuchienko1983@mail.ru)

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия (117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6), e-mail: [g-drozdova@yandex.ru](mailto:g-drozdova@yandex.ru)

Методом иммуноферментного анализа в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга изучено содержание в сыворотке крови нейроспецифических белков (фосфорилированного нейрофиламента-Н, антител к миелинированному гликопротеину, нейротрофина-3), а также малонового диальдегида (МДА) как показателя процессов липопероксидации, супероксиддисмутазы (СОД) – одного из важнейших клеточных антиоксидантных ферментов и церулоплазмينا (ЦП) – основного не клеточного антиоксидантного фермента у 40 пациентов с осложненными травматическими повреждениями шейного отдела позвоночника. Установлены значимые корреляционные взаимосвязи разного характера и силы, а именно отрицательные между маркерами клеточной альтерации и перекисного окисления липидов и положительные - между маркером внутриклеточной регенерации и показателями ферментного звена антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: спинной мозг, травматическая болезнь, патогенез, саногенез, цитоплазматические нейроспецифические белки, перекисно-антиоксидантный баланс, иммуноферментный анализ.

## CONTRASTIVE ANALYSIS OF NERVOUS TISSUE TURNOVER MARKERS OF PEROXIDATION-ANTIOXIDANT BALANCE DURING ACUTE AND EARLY PERIOD OF SPINAL CORD TRAUMATIC DISEASE

Konyuchenko E.A.<sup>1</sup>, Ulyanov V.Y.<sup>1</sup>, Norkin I.A.<sup>1</sup>, Karyakina E.V.<sup>1</sup>, Shchukovsky V.V.<sup>1</sup>, Drozdova G.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FBSI "SarNIITO" of Ministry of Health of Russian Federation, Saratov, Russia (148, Chernyshevskogost., Saratov, 410002), e-mail: [v.u.ulyanov@gmail.com](mailto:v.u.ulyanov@gmail.com)

<sup>2</sup> FSBI HPE People's Friendship University of Russia (6, Miklukho-Maklayst., Moscow, Russia, 117198), e-mail: [g-drozdova@yandex.ru](mailto:g-drozdova@yandex.ru)

The aim of this study was to detect neurospecific proteins (phosphorylated neurofilament-H, myelinated glycoprotein antibodies, neurotrophin-3) in blood serum during acute and early period of spinal cord traumatic disease using enzyme immunodetection method. The most important protein under detection was malondialdehyde (MDA) being the indicator of lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD), one of essential cellular antioxidant enzyme, and ceruloplazmin (CP) being basic non-cellular antioxidant enzyme in 40 patients with complicated traumatic injuries of cervical spine. Some important correlations of various character and power were found, namely negative between cellular alteration and lipid peroxidation markers and positive between intercellular regeneration marker and indicators of enzymatic element of antioxidant protection.

Keywords: spinal cord, traumatic disease, pathogenesis, sanogenesis, cytoplasmic neurospecific proteins, peroxidation-antioxidant balance, enzyme immunodetection.

Первичное повреждение вещества спинного мозга инициирует долгосрочные вторичные патофизиологические изменения на клеточном и молекулярном уровнях, характеризующихся активацией патогенетических - (аксональный и нейрональный некроз, метаболические расстройства, оксидативный стресс, эксайтотоксичность, нейровоспаление) и саногенетических (внутриклеточная регенерация, активация антиоксидантной системы, ремиелинизация, нейропластичность) механизмов травматической болезни [2, 4, 5, 10]. Совокупность этих па-

тофизиологических механизмов в остром и раннем периодах травматической болезни определяет развитие синдрома смешанного антагонистического ответа[3].

Патогенетические механизмы синдрома смешанного антагонистического ответа при травматической болезни характеризуются массивным повреждением клеточных мембран нейронов и глиальных клеток спинного мозга, что сопровождается активацией процессов липопероксидации и относительной функциональной недостаточностью антиоксидантных ферментных систем, ведущих к повреждению внутриклеточных структур. Это, в свою очередь, приводит к массивному высвобождению цитоплазматических нейроспецифических белков в системный кровоток и является одним из инициирующих факторов вторичного иммуно-воспалительного повреждения вещества спинного мозга [1, 8].

Наряду с патогенетическими, синдром смешанного антагонистического ответа сопровождается активацией саногенетических механизмов, характеризующихся активацией клеточных и неклеточных антиоксидантных ферментных систем (СОД и ЦП), лимитирующих процессы перекисного окисления липидов, а также усилением экспрессии генов, ответственных за синтез факторов роста нервной ткани. Последние определяют выживаемость нейронов в зоне вторичного повреждения («пенумбры») и неонейрогенез[6, 7, 9].

Взаимодействие патогенетических и саногенетических механизмов синдрома смешанного антагонистического ответа определяет конечный объем повреждения спинного мозга в посттравматическом периоде и совокупный функциональный результат, определяющий исход травматической болезни спинного мозга. В этой связи, определение корреляционных взаимосвязей содержания нейроспецифических белков в сыворотке крови и маркеров перекисно-антиоксидантного баланса у больных с осложненными повреждениями позвоночника позволяет выявить новые значимые механизмы патогенеза и саногенеза травматической болезни спинного мозга.

**Цель исследования:** выявить новые корреляционные взаимосвязи, характеризующие патогенетические и саногенетические механизмы травматической болезни спинного мозга на основании сопоставительного анализа содержания в сыворотке крови маркеров ремоделирования нервной ткани и состояния перекисно-антиоксидантного баланса.

#### **Материал и методы исследования**

Основную группу составили 40 пациентов обоего пола (средний возраст  $29 \pm 7,5$  лет) с осложненными травматическими повреждениями шейного отдела позвоночника, которые находились на лечении в клинике нейрохирургии ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России в период с 2011 по 2013 гг. В контрольную группу вошли 40 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой.

Критериями включения в исследование больных основной группы были: степень повреждения спинного мозга, соответствующая классам А, В, С (по шкале Frankel, 1970); сроки наблюдения, соответствующие острому (1-4-е сутки) и раннему (до 30-х суток) посттравматическим периодам (по классификации А.В. Лившица, 1990).

Материалом исследования явилась периферическая кровь, полученная натощак в утренние часы при пункции локтевой вены в объеме 5 мл. Образцы крови экспонировали при комнатной температуре, центрифугировали при 2000 оборотах/мин в течение 10 минут для получения сыворотки. Анализ вышеперечисленных показателей проводили в день забора крови не позже, чем через 2 часа после ее взятия.

Количественное содержание нейроспецифических белков в сыворотке крови изучали методом иммуноферментного анализа с помощью наборов для определения маркеров альтерации нервной ткани – pNF-H, anti-MAG (Buhlmann, Switzerland), а также маркеров регенерации нервной ткани – NT-3 (RayBioHuman). Состояние процессов липопероксидации в сыворотке крови оценивали по содержанию промежуточного продукта оксидативного стресса МДА (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Т., 1977). Концентрацию внутриклеточной СОД в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (BenderMedSystems, Austria), ЦП – методом турбодиметрической специфической реакции (Sentinel diagnostics, Italy).

Исследования нейроспецифических белков и маркеров перекисно-антиоксидантного баланса в сыворотке крови в основной группе осуществляли на 1-4-е, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки с момента получения травмы, в контрольной группе - однократно.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ IBMSPSS 20 Statistics. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро-Уилкса). Большинство наших данных не соответствовало закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовали непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни). Сопоставительный анализ статистически значимых показателей проводили с помощью определения коэффициента корреляции рангов Спирмена (R), причем значения  $R < 0,3$  свидетельствовало о слабой связи изученных признаков, значения  $R > 0,3 < 0,7$  – о средней связи и  $> 0,7$  - о высокой связи. Рассчитывали показатель достоверности (p), который считали статистически значимым при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и обсуждение**

Сопоставительный анализ содержания pNF-H на 1-4-е сутки с момента травмы свидетельствовал о наличии положительной высокой корреляционной взаимосвязи с концентрацией МДА ( $p < 0,05$ ), слабой отрицательной - с ЦП и СОД ( $p < 0,05$ ). На 7-е сутки уровень pNF-H слабо положительно коррелировал с МДА ( $p < 0,05$ ) и слабо отрицательно - с ЦП ( $p < 0,05$ ), статистически значимой достоверной корреляции с СОД обнаружено не было ( $p > 0,05$ ). На

14-е сутки исследования положительная связь с МДА усиливалась до средней ( $p < 0,05$ ), а уровень ЦП и СОД характеризовался средней отрицательной связью с рNF-H ( $p < 0,05$ ). На 21-е сутки зафиксирована отрицательная слабая связь с СОД ( $p < 0,05$ ), при этом корреляционных связей с МДА и ЦП не обнаружено. На 30-е сутки исследования уровень рNF-H со средней силой отрицательно коррелировал с уровнем ЦП и СОД ( $p < 0,05$ ), статистически достоверной корреляции с МДА выявлено не было.

Изучение взаимосвязи между титром анти-MAG и содержанием маркеров перекисно-антиоксидантного баланса (МДА, СОД и ЦП) в сыворотке крови не выявило статистически достоверных корреляций на 1-4-е и 7-е сутки исследования. На 14-е сутки исследования корреляционный анализ показал положительную взаимосвязь слабой силы с МДА и ЦП ( $p < 0,05$ ) и средней - с СОД ( $p < 0,05$ ). На 21-е сутки обнаруживали положительную корреляцию слабой силы с МДА ( $p < 0,05$ ) и ЦП ( $p < 0,05$ ) и средней силы - с СОД ( $p < 0,05$ ). На 30-е сутки статистически значимых корреляций с уровнем МДА зафиксировано не было, но обнаружена положительная слабой силы корреляция с ЦП и СОД ( $p < 0,05$ ).

Анализ корреляций содержания NT-3 показал наличие на 1-4-е сутки положительных связей: сильной - с СОД ( $p < 0,05$ ), средней с МДА ( $p < 0,05$ ), слабой с ЦП ( $p < 0,05$ ). На 7-е сутки исследования была обнаружена средняя положительная взаимосвязь с уровнем МДА, которая несколько ослабевала, но оставалась при этом статистически значимой ( $p < 0,05$ ), слабая положительная - с уровнем ЦП ( $p < 0,05$ ) и средняя положительная - с уровнем СОД ( $p < 0,05$ ). На 14-е сутки были зафиксированы положительные: средней силы с МДА ( $p < 0,05$ ) и с СОД ( $p < 0,05$ ) и слабая с ЦП ( $p < 0,05$ ). На 21-е сутки исследования фиксировали сохранение положительных: слабой связи с МДА ( $p < 0,05$ ) и средней с ЦП ( $p < 0,05$ ) и СОД ( $p < 0,05$ ). На 30-е сутки с момента травмы зафиксирована слабая положительная связь с ЦП ( $p < 0,05$ ), достоверных корреляций с МДА и СОД не зафиксировано.

В условиях альтерации нервной ткани в 1-4-е сутки с момента получения травмы нами была обнаружена сильная связь рNF-H с МДА и слабые отрицательные связи с СОД и ЦП, что по данным литературы свидетельствует об активации процессов оксидативного стресса на фоне относительной недостаточности ферментного звена антиоксидантной системы, а также о массовой гибели нейронов и их аксонов, возникающей непосредственно в момент первичного повреждения вещества спинного мозга [1,6, 8]. На 14-е сутки с момента получения травмы обнаружена положительная корреляционная связь средней силы рNF-H с МДА, отрицательные средней силы - с ЦП и СОД, что соответствует данным [9,10] и свидетельствует о снижении интенсивности процессов перекисного окисления липидов, несмотря на продолжающееся поступление свободных радикалов в кровотоки в период манифестации инфекционно-воспалительных осложнений, а сохранение высоких концентраций рNF-H, до-

стоверно превышающих контрольное значение на 14-е сутки исследования, по нашему мнению, было обусловлено активацией в посттравматическом периоде механизмов клеточного и гуморального иммунного ответа организма пострадавшего на циркулирующие в кровотоке антигены поврежденного спинного мозга.

Обнаруженное нами появление положительной связи слабой силы анти-MAG с МДА и ЦП и средней силы с СОД на 14-е и 21-е сутки исследования свидетельствует об аутоиммунном воспалительном процессе, реализующемся в проводящих путях (аксонах) [2, 3].

Выявленные на 1-4-е положительные корреляции средней силы NT-3 с МДА, высокой силы с СОД и слабой с - ЦП свидетельствуют об активации трофических влияний факторов роста нервной ткани, происходящей на фоне интенсификации процессов перекисного окисления липидов и направленной на повышение выживаемости нейронов в зоне, окружающей первичный травматический очаг [5,7]. Однотипные корреляции, выявленные на 14-е сутки посттравматического периода отражают диффузное распространение фактора роста нервной ткани в сохранившихся нейронах и усиленную его экспрессию, что дает возможность реализовывать саногенетические механизмы внутриклеточной регенерации вещества спинного мозга и антиоксидантной защиты (нейроцитопротекторный эффект) [4].

#### **Выводы:**

1. Функциональное состояние клеточных мембран поврежденных нейронов вещества спинного мозга при его травматической болезни зависит от соотношения как механизмов ремоделирования нервной ткани, реализующихся на локальном уровне, так и системного перекисно-антиоксидантного баланса.
2. Процессы ремоделирования нервной ткани и перекисно-антиоксидантного баланса характеризуются разнонаправленными корреляциями, а именно отрицательными между маркерами альтерации и состояния перекисного окисления липидов, положительными - между маркером регенерации и показателями ферментного антиоксидантной защиты.

Корреляции маркеров ремоделирования нервной ткани и перекисно-антиоксидантного баланса  
при травматической болезни спинного мозга (n=40)

	1-4-е сутки		7-е сутки		14-е сутки		21-е сутки		30-е сутки	
pNF-H, пг/мл	МДА, мкмоль/л	R=0,748 p=0,008	МДА	R=0,255 p=0,035	МДА	R=0,343 p=0,028	МДА	R=0,041 p>0,05	МДА	R=0,015 p>0,05
	ЦП, мг/дл	R= - 0,120 p=0,031	ЦП	R=-0,211 p=0,035	ЦП	R=-0,321 p=0,033	ЦП	R=-0,006 p>0,05	ЦП	R=-0,432 p=0,038
	СОД, нг/мл	R=-0,179 p=0,043	СОД	R=-0,131 p>0,05	СОД	R=-0,573 p=0,011	СОД	R=-0,275 p=0,049	СОД	R=-0,458 p=0,029
анти- MAG, титр анти- тел	МДА	R=-0,071 p>0,05	МДА	R=-0,021 p>0,05	МДА	R=0,243 p=0,015	МДА	R=0,275 p=0,019	МДА	R=0,015 p>0,05
	ЦП	R=-0,035 p>0,05	ЦП	R=-0,055 p>0,05	ЦП	R=0,257 p=0,044	ЦП	R=0,214 p=0,008	ЦП	R=0,213 p=0,049
	СОД	R=-0,021 p>0,05	СОД	R=-0,041 p>0,05	СОД	R=0,432 p=0,035	СОД	R=0,326 p=0,040	СОД	R=0,217 p=0,045
NT-3, пг/мл	МДА	R=0,575 p=0,003	МДА	R=0,355 p<0,05	МДА	R=0,423 p<0,05	МДА	R=0,288 p<0,05	МДА	R=0,211 p>0,05
	ЦП	R=0,127 p=0,318	ЦП	R=0,132 p=0,027	ЦП	R=0,221 p=0,015	ЦП	R=0,511 p=0,009	ЦП	R=0,387 p=0,015
	СОД	R=0,731 p=0,045	СОД	R=0,611 p=0,065	СОД	R=0,455 p=0,005	СОД	R=0,375 p=0,025	СОД	R=0,233 p>0,05

Примечание:

- R - коэффициент корреляции рангов Спирмена,
- p - показатель достоверности

## Список литературы

1. Агаджанян В.В. Септические осложнения при политравме // Политравма. – 2006. - №1. – С. 9-17.
2. Белашкин И.И., Кочетков А.В. Клинико-патоморфологические особенности современного течения позвоночно-спинальной травмы // Вестник восстановительной медицины. - 2011. - №4. - С. 27-30.
3. Белоцкий С.М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты./ С.М. Белоцкий, Р.Р. Авталион.- М.: БИНОМ, 2008. - 240 с.
4. Бублик Л.А., Бублик Н.Л. Современные представления о травматической болезни спинного мозга и нейропротекция вторичного повреждения спинного мозга // Международный неврологический журнал. - 2007. - №6. - С. 19-22.
5. Бэр М. Нейропротекция: модели, механизмы. Пер. с англ. Под ред. М. Бэра- М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 420 с.
6. Карякина Е.В. Состояние процессов липопероксидации и антиоксидантной защиты в остром и раннем периоде осложненной травмы шейного отдела позвоночника // Материалы научно-практической конференции с международным участием. Министерство здравоохранения и социального развития РФ: тезисы докл. Научно-практич. конф. (Курган, 11-12 сент. 2014 г.). – Курган, 2014. - С. 126.
7. Конюченко Е.А., Ульянов В.Ю., Бажанов С.П., Карякина Е.В., Теплый Д.Л. Особенности перекисно-антиоксидантного баланса в условиях физиологической нормы и его изменения при развитии травматической болезни спинного мозга // Фундаментальные исследования. - 2012. - № 4-2. - С. 291-294.
8. Крюк Ю.А., Махнева А.В., Золотухин С.Е., Баешко А.А. Изменение показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крови и мозга при тяжелой механической травме и сопутствующем гипотиреозе // Экспериментальная и клиническая медицина. - 2010. - Т. 49, № 4. - С. 14-20.
9. Ульянов В.Ю., Бажанов С.П., Конюченко Е.А., Щуковский В.В. Динамика показателей процессов свободно-радикального перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при развитии инфекционно-воспалительных осложнений в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2012.- Т. 8, № 3. - С. 734-737.
10. Kumamaru H., Saiwai H., Ohkawa Y. Age related difference in cellular and molecular profiles of inflammatory responses after spinal cord injury // J. Cell. Physiol. - 2012. - № 227 (4). - P. 1335-1346.

**Рецензенты:**

Тахтамыш М.А., д.м.н., заведующий 5 хирургическим отделением МУЗ «Городская клиническая больница №2 им. В.И. Разумовского», г. Саратов.

Слободской А.Б., д.м.н., заведующий отделением ортопедии ГУЗ «ОКБ», г. Саратов.