

НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ С ЭКСТРЕМАЛЬНЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ОЦЕНКЕ ОСЛОЖНЕНИЙ НЕЙРОТРАВМЫ

Коханов А.В., Воронкова М.Ю., Бисалиева Р.А., Мяснянкин А.А., Огнев П.В.

ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия (414000, Астрахань, ул. Бакинская, 121), e-mail: kokhanov@mail.ru

Путем иммунизации кроликов экстрактами мозга человека, обработанными сульфосалициловой кислотой, насыщенным раствором сульфата аммония и кипячением, получены моноспецифические антитела к трем белкам мозга: двум нейроспецифическим альфа-глобулинам и белку S-100. Обнаруженные новые антигены мозга имеют молекулярные массы 139 (альфа1-ТС-глобулин) и 145 КДа (альфа2-КС-глобулин мозга). На очищенные нейробелки сконструированы два варианта иммунохимических тест-систем для иммунодиффузионного и иммуноферментного анализа. Установлено, что уровни белка S-100 и нейроспецифических альфа-глобулинов достоверно повышаются в сыворотке пациентов с тяжелой ЧМТ пропорционально объему и степени травмы, а также при развитии поздних неврологических осложнений после нейротравмы. Новые органоспецифические альфа-глобулины мозга могут представлять теоретический интерес для нейрохимии и иметь клиническое значение в диагностике патологии мозга.

Ключевые слова: нейроспецифические белки, термостабильные и кислотостабильные альфа-глобулины мозга, физико-химические свойства, иммуноферментный анализ, клиническое значение, диагностика поздних осложнений нейротравмы

NEUROSPECIFIC PROTEINS WITH EXTREME PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS AND THEIR IMPORTANCE FOR EVALUATION OF COMPLICATIONS OF NEUROTRAUMA

Kokhanov A.V., Voronkova M.Y., Bisaliev R.A., Myasnyankin A.A., Ognev P.V.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia (414000, Astrakhan, Bakinskaya street, 121), e-mail: kokhanov@mail.ru

By immunization of rabbits with extracts of human brain treated sulfosalicylic acid, a saturated ammonium sulfate solution and boiling, was received monospecific antibodies to three brain proteins: two neurospecific alpha-globulins, and S-100 protein. Discovered new brain antigens have molecular weights of 139 (alpha1-TS globulin) and 145 kDa (alpha2-AS globulin). On neuronal purified protein is constructed two variants immunochemical test-systems for immunodiffusion and enzyme immunoassay. It is found that the levels of protein S-100, and alpha-globulins neurospecific significantly elevated in the serum of patients with severe traumatic brain injury is proportional to volume and degree of trauma, and also in the development of late complications of the neurological neurotrauma. New organ-specific alpha-globulin of brain may represent of theoretical interest for Neurochemistry and have clinical significance in the diagnosis of brain pathology.

Keywords: neurospecific proteins, brain thermostable and acid-stable alpha-globulin, physical and chemical properties, enzyme immunoassay, clinical significance, diagnostics of late complications of neurotrauma

Изучение антигенного состава такого важного органа человека, как головной мозг, и такой важной ткани, как нервная, представляет значительный интерес не только с точки зрения анализа структурной антигенной дифференцировки нервной ткани, но и, учитывая забарьерное расположение головного мозга, может иметь важное практическое значение в случае находок органоспецифических антигенов мозга в крови больных с травмами, невропсихическими, воспалительными и опухолевыми заболеваниями центральной нервной системы [5, 6]. Подобные находки не только расширяют наши знания о природе данных заболеваний, но и имеют важное диагностическое значение. Кроме того, даже сама проблема

идентификации тканевых антигенов нервной ткани представляет большой интерес вследствие функциональной важности подобных антигенов, могущих принимать участие в процессах «запоминания», миелинизации и аутоиммунных конфликтах [8].

К концу 1960-х гг. серологическими методами анализа было доказано наличие в составе головного мозга органоспецифических антигенов [6]. Наиболее известными представителями нейроспецифических белков являются белок S-100 [10], нейроспецифическая енолаза (NSE или антиген 14-3-2) [9], альфа-2-гликопротеин Варецкой (α 2-GP) [7] и глиофибрилярный кислый антиген (GFAP) [6].

Совершенствование техники фракционирования белков, применение методов иммунохимического анализа значительно расширили наши знания об антигенном составе нервной ткани [2, 3]. Доказательством этого являются публикации в последние годы ряда обзоров и монографий, посвященных иммунохимической характеристике протеинов, специфических для центральной и периферической нервной системы [06], появление научного журнала «Нейрохимия».

Помимо вышеперечисленных нейробелков S-100, NSE (14-3-2), α 2-GP и GFAP [6, 9, 10], в литературе имеются единичные описания кислых антигенов мозга: «А» и «Д», «а»-протеина, белков группы «В», антигенов «SPR», альфа «BASNT» и «SRANT», термостабильного спиртонерастворимого протеина, альфа2-мозгоспецифического антигена и целого ряда представителей «основных» белков головного мозга [7]. Отличительной особенностью всех этих идентифицированных нейробелков является то, что их молекулярные массы не превышают 50-60 КДа [06, 7].

Основная масса водорастворимых тканевых и сывороточных белков более высокой молекулярной массы денатурирует в экстремальных физико-химических условиях, для их выделения и очистки требуются достаточно мягкие физиологические условия фракционирования [7]. Однако существует небольшая группа водорастворимых белков, способных сохранять свои нативные свойства при жестких методах фракционирования (так, например, ферритин выдерживает длительное кипячение [4], эмбриональный преальбумин – обработку сильными органическими кислотами [2], фетальный гемоглобин – растворами щелочей [4], белок S-100 – насыщенными растворами сульфата аммония [10], альфа-фетопротеин – спиртовым раствором трихлоруксусной кислоты [7] и т.д.). Такие белки-«экстремалы» привлекают внимание биохимиков легкостью своего получения, особенностью своего строения, обеспечивающего уникальную стабильность макромолекулы и биологической функции, физиологов увлекают на поиск особенной биологической роли таких белков в патогенезе, а клиницистов – перспективой их клинического применения.

Все вышесказанное относится и к исследованиям нейроспецифических белков с подобными свойствами и их приложению к клиническим проблемам неврологии и нейрохирургии.

Цель исследования

Поиск новых нейроспецифических белков с экстремальными физико-химическими характеристиками и оценка значения иммунохимических тестов на эти нейробелки для диагностики и прогнозирования нейротравмы.

Материалы и методы

Биологический материал получали в бюро судебно-медицинской экспертизы г. Астрахани в виде аутопсийного материала мозга от лиц, погибших от случайных причин. К диализованным после центрифугирования продуктам фракционирования экстрактов дефинитивного мозга 10%-ной сульфосалициловой кислотой, насыщенным раствором сульфата аммония или термообработкой при $100^{\circ}\text{C} \times 10$ мин получали антисыворотки путем иммунизации кроликов по общепринятым схемам с полным адьювантом Фрейнда.

После абсорбции антисывороток сывороткой крови доноров и сухой плазмой, а также смесью экстрактов различных органов удалось получить моноспецифические антисыворотки к трем органоспецифическим антигенам мозга, аналогичным описанным в литературе нейроспецифическим антигенам: термостабильному антигену Каспари—Филда или к альфа1-ВЕ-глобулин мозга [7], кислотостабильному антигену мозга, идентичному альфа-2-СС-глобулины мозга [7] и органоспецифическому белку мозга, растворимому в насыщенном сульфате аммония, иммунохимически идентифицированному как белок S-100 [10].

Моноспецифические тест-системы к альфа1- и альфа2-глобулинам мозга и белку S-100 были использованы нами для поиска их в составе сывороточных белков при травматической болезни мозга.

Тяжесть повреждения ЦНС при черепно-мозговых травмах (ЧМТ) различной степени тяжести оценивали по шкале ком Глазго (SCG) [1].

Пробы крови брали: из подключичной вены у больных в отделении реанимации и интенсивной терапии, из локтевой вены у доноров и больных нейрохирургических отделений в стандартных условиях при поступлении или натошак. Образцы сыворотки крови отбирали по 1,5 мл в две пластиковые пробирки «Эппендорф» для исследования и хранили при температуре -25°C до анализа. Кровь забирали на 1–3-е, 5–7-е и 14–19-е сутки после поступления больных в стационар. У части пациентов, перенесших ЧМТ и имевших поздние неврологические осложнения, повторно исследовали кровь в сроки от 3 месяцев до 1 года после нейротравмы.

Клинический материал представлен данными 142 больных мужского и женского пола в возрасте от 19 до 70 лет с изолированными закрытыми черепно-мозговыми травмами различной степени тяжести и 30 больных в возрасте от 23 до 66 лет, госпитализированных с последствиями и осложнениями ЧМТ. Диагноз ставили в соответствии с принятой единой классификацией острой ЧМТ [1]. Больные с ЧМТ условно были разделены на две группы.

В группу пациентов с легкой черепно-мозговой травмой (ЧМТ I) были включены больные с сотрясением головного мозга (СГМ) — 30 человек и ушибом головного мозга (УГМ) легкой степени — 22 человека. Средняя оценка по шкале комы Глазго на момент поступления в клинику составила $13,7 \pm 0,09$ балла.

Группу с тяжелой черепно-мозговой травмой (ЧМТ II) составили 90 пациентов, из которых 41 пациент с УГМ средней степени тяжести и 49 с тяжелым УГМ и сдавлением головного мозга. Средняя оценка по шкале комы Глазго на момент поступления в клинику составила $8,0 \pm 0,19$ и колебалась от 11 до 5–4 баллов.

30 пациентов, перенесших ЧМТ и имевших клинические признаки поздних осложнений ЧМТ, составили группу ПО ЧМТ.

Контролем служили 68 образцов сывороток крови доноров обоего пола в возрасте от 30 до 56 лет, полученных из областной станции переливания крови. Общее количество образцов сыворотки крови от 172 пациентов и 68 доноров составило 620 проб.

Полученные результаты подвергались статистической обработке с вычислением средних величин и их ошибок ($M \pm m$), достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ физико-химических свойств выявленных органоспецифических и межорганных антигенов мозга показал, что нами идентифицированы два новых органоспецифических антигена мозга с отличающимися характеристиками от общеизвестных белков мозга и получена собственная иммунохимическая тест-система на хорошо изученный белок S-100.

Один из нейроспецифических альфа1-глобулин мозга обладает свойством термостабильности (поэтому назван нами альфа1-ТС-глобулин), обратимо осаждается этакридином и сульфатом аммония, необратимо – трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами. Второй обнаруженный нами органоспецифический альфа1-глобулин мозга – кислотостабильный, растворим в хлорной или сульфосалициловой кислоте (назван нами альфа2-КС-глобулином).

Сравнение физико-химических параметров выделенных альфа1- и альфа2-глобулинов мозга с параметрами наиболее известных нейроспецифических белков позволяет заключить, что они не идентичны им, так как молекулярные массы ранее описанных

нейроспецифических белков не превышают 40–50 КДа [07], а обнаруженные нами антигены мозга имеют молекулярные массы 139 (альфа1-ТС-глобулин) и 145 КДа (альфа2-КС-глобулин мозга).

На очищенные нейробелки альфа1-ТС-глобулин, альфа2-КС-глобулин сконструированы два варианта иммунохимических тест-систем. Чувствительность ИФА тест-систем составила: для α 1-ТС-глобулина мозга 5 нг/мл, для α 2-КС-глобулина мозга – 10 нг/мл; ИДА тест-систем – 2 мг/л и 5 мг/л соответственно. Верификацию моноспецифических тест-систем проводили с референтными наборами на эти антигены из банка тест-систем кафедры биохимии Астраханского ГМУ.

Исследование содержания двух новых белков мозга в сопоставлении с нейробелком S-100 в сыворотках крови у пострадавших с ЧМТ выявило следующие закономерности (табл. 1). У пациентов с ЧМТ легкой степени в первые 1–3 дня после травмы ни один из трех исследованных нейробелков достоверно не повышен по сравнению с их уровнем в крови доноров. В эти же сроки после ЧМТ тяжелой степени (ЧМТ II) в крови пострадавших в достоверно повышенных количествах обнаруживался только один из трех нейробелков — мозгоспецифический глиальный антиген S-100 ($p < 0,001$). На 5–7-й день достоверно повышенные концентрации S-100 наблюдали у пострадавших ЧМТ любой степени тяжести (различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$ для группы ЧМТ I и при $p < 0,001$ для групп ЧМТ II).

На 2–3-й неделе сывороточная концентрация белка S-100 быстро снижалась практически до нормы (табл. 1). Однако у пациентов с поздними неврологическими осложнениями ЧМТ (группа ПО ЧМТ) концентрация белка S-100 была достоверно повышена на 50% по сравнению с донорским уровнем этого белка ($p < 0,001$).

В отличие от белка S-100 уровни двух других органоспецифических белков мозга достоверно не повышались при легкой ЧМТ и медленно нарастали в первые три дня тяжелой травмы мозга. α 1-ТС-глобулин имел пик в крови больных с тяжелой ЧМТ (ЧМТ II) на 5–7-е сутки с последующим снижением его уровня. Наоборот, статистически значимый повышенный уровень α 2-КС-глобулина на 5–7-й день тяжелой ЧМТ продолжал повышаться к 14–19-м суткам (табл. 1).

При отсутствии осложнений ЧМТ уровни всех трех нейробелков в сроки наблюдения от 3 месяцев до 1 года не отличались от контрольных донорских значений. Наоборот, в отдаленные сроки после ЧМТ (90–180 суток) при развитии у пациентов различных поздних неврологических осложнений (группа ПО ЧМТ) концентрации в крови всех трех исследованных нейробелков были достоверно повышены ($p < 0,001$): белка S-100 в 1,5 раза по

сравнению с донорским уровнем этого белка, α_1 -ТС-глобулина – в 2,4 раза и α_2 -КС-глобулина – в 2,1 раза.

Обнаруженные новые органоспецифические альфа-глобулины мозга могут представлять теоретический интерес для нейрохимии и иметь клиническое значение в диагностике патологии мозга.

Таблица 1

Динамика уровней органоспецифических белков мозга в крови у пациентов с легкой и тяжелой ЧМТ при поступлении и в период поздних осложнений (ПО ЧМТ)

Показатели	Срок после травмы	ЧМТ I (n=52)	ЧМТ II (n=90)	ПО ЧМТ (n=30)	доноры (n=68)
S-100 (нг/мл)	1–3-и сутки	0,7±0,18	1,2±0,20*	0,6±0,08*	0,4±0,05
	5–7-е сутки	0,9±0,24*	1,3±0,18*		
	14–19-е сутки	0,5±0,16	0,5±0,15		
α_1 -ТС-глобулин (нг/мл)	1–3-и сутки	42±12	47±19	104±11*	44±17
	5–7-е сутки	33±11	88±20*		
	14–19-е сутки	45±13	59±13		
α_2 -КС-глобулин (нг/мл)	1–3-и сутки	111±41	106±28	233±41*	110±33
	5–7-е сутки	122±52	203±30*		
	14–19-е сутки	105±47	247±29*		

Примечание: * различия с контрольной группой доноров статистически значимы ($p < 0,05$).

Выводы

1. В экстрактах дефинитивного мозга с помощью кроличьих антисывороток обнаружены три органоспецифических антигена с подвижностью альфа-глобулинов: альфа1-ТС-глобулин мозга (выдерживает термообработку кипячением, идентичен по физико-химическим свойствам ранее описанному антигену Каспари—Филда), альфа2-КС-глобулин мозга (растворим в сульфосалициловой и хлорной кислотах) и белок S-100.
2. На очищенные антигены мозга альфа1-ТС-глобулин, альфа2-КС-глобулин получены моноспецифические антисыворотки и сконструированы два варианта иммунохимических тест-систем. Чувствительность ИФА тест-систем составила: для α_1 -ТС-глобулина мозга 5 нг/мл, для α_2 -КС-глобулина мозга – 10 нг/мл; ИДА тест-систем – 2 мг/л и 5 мг/л соответственно.
3. Установлено, что уровни белка S-100 и нейроспецифических альфа-глобулинов достоверно ($p < 0,01$) повышаются в сыворотке пациентов с тяжелой ЧМТ пропорционально степени травмы. Определение органоспецифических альфа-глобулинов мозга и белка S-100 в сыворотках пациентов с тяжелой ЧМТ может применяться для оценки объема и степени повреждения ткани головного мозга.
4. Длительное (свыше 3–6 месяцев) повышенное содержание нейроспецифических альфа-глобулинов после ЧМТ характерно для поздних осложнений нейротравмы.

Список литературы

1. Клиническое руководство по черепно-мозговой травме / Под ред. А.Н. Коновалова, Л.Б. Лихтермана, А.А. Потапова. – М.: Антидор, 1998. – 550 с
2. Коханов А.В. Возможность использования иммуносенсоров в ургентной медицине // Успехи современного естествознания. — 2005. — № 12. — С. 43–44.
3. Коханов А.В., Николаев А.А. Биохимические аспекты патологических изменений у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой // Клин. лабор. диагностика. – 2007. – № 9. – С. 63.
4. Коханов А.В., Никулина Д.М., Кривенцев Ю.А., Белопасов В.В., Мяснянкин А.А., Метелкина Е.В. Уровни железосодержащих белков крови и динамика рО₂ в остром периоде черепно-мозговой травмы // Международный журнал экспериментального образования. – 2010. – № 11. – С. 93–94.
5. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний. – М.: Медицина, 2002. – 568 с
6. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Жирков Ю.А. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. – М.: Медицина, 1999. – 416 с.
7. Чишиева М.А., Мяснянкин А.А., Коханов А.В. Белки мозга с экстремальными физико-химическими параметрами: иммунохимическая идентификация и моделирование тест-систем // Астраханский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 93–96.
8. Bekhtereva N.P. El cerebro humano sano y enfermo. Buenos Aires-Barcelona-Mexico, Editorial Paidós, 1984. 235 p.
9. Grasso A., Roda G., et al. Preparation and properties of the brain specific protein 14-3-2 // Brain Res. — 1977. — Vol. 124. — P. 497–507.
10. Moore B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system // Biochem. biophys. Res. Commun. – 1965. – Vol. 19. – P. 739–744.

Рецензенты:

Николаев А.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой бионеорганической химии, Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань;

Сентюрова Л.Г., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой биологии, Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань.