

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С ТРАВМАТИЧЕСКИМИ ОЧАГОВЫМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Выгодчикова Г.Ю.¹, Чехонацкий А.А.¹, Ульянов В.Ю.², Щуковский В.В.²,
Чехонацкий И.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия (410012, ул. Большая Казачья, 112), e-mail: neuros.sgmu@gmail.com;

²ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, Саратов, Россия (410002, Саратов, ул. Чернышевского, 148), e-mail: v.u.ulyanov@gmail.com

В сыворотке крови 45 больных с контузионными очагами и внутричерепными гематомами малого объема на 1-е, 3-и, 7, 14 и 21-е сутки посттравматического периода методом иммуноферментного анализа определяли количественное содержание нейроспецифических белков – общего белка S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$), глиального кислого фибриллярного белка (GFAP), основного белка миелина (MBP) и цилиарного нейротрофического фактора (CNTF). Установлено, что процесс ремоделирования нервной ткани у пациентов с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга в посттравматическом периоде характеризовался развитием цитолиза белого вещества и глии, а также индукцией регенерации, выраженность которых определялась динамическими изменениями содержания нейроспецифических белков в сыворотке крови. Цитолиз белого вещества головного мозга сопровождался повышением концентрации MBP во все периоды наблюдения, астроглиальная реакция - повышением уровня общего белка S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$) на 1-е сутки и GFAP на 1-3-и сутки с момента травмы, регенерация нервной ткани – повышением содержания CNTF во все сроки наблюдения.

Ключевые слова: головной мозг, очаговые повреждения, нервная ткань, нейроспецифические белки, иммуноцитохимическая диагностика.

IMMUNOCYTOCHEMICAL DIAGNOSIS OF THE CONDITION OF THE NERVOUS TISSUE IN PATIENTS WITH TRAUMATIC FOCAL BRAIN INJURY

Vygodchikova G.Y.¹, Chekhonatskiy A.A.¹, Ulyanov V.Y.², Shchukovsky V.V.²,
Chekhonatskiy I.A.¹

¹PBE IHE «The Saratov GMU of V.I. Razumovsky» Ministry of Health of Russia, Saratov, Russia (410012, Saratov, Bolschaya Kazachya st., 112), e-mail: neuros.sgmu@gmail.com;

²FGBU "SarNIITO" Ministry of Health of Russia, Saratov, Russia (410002, Saratov, Chernyshevsky st., 148), e-mail: v.u.ulyanov@gmail.com

The quantity of neurospecific proteins: total protein S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$), glial acidic fibrillary protein (GFAP), myelin basic protein (MBP) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) was determined in blood serum of 45 patients with contusional focuses and intracranial small-size hematomas on 1st, 3rd, 7th, 14th and 21st days post-injury by ELISA. It was found that remodeling process of nerve tissue in patients with focal traumatic injuries of cerebrum in post-traumatic period was characterized by alba and glia cytolysis and also by regeneration induction and the grade of the foregoing correlated with dynamic changes in the number of neurospecific proteins in blood serum. Alba cytolysis was accompanied by the rise in MBP concentration at any period, astroglial reaction – by the rise in total protein S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$) level on 1st and GFAP rise from 1st to 3rd days post-injury. Nerve tissue regeneration came along with CNTF rise at any period.

Keywords: brain, focal damage, nerve tissue, neurospecific proteins, immunocytochemical diagnosis.

Одной из актуальных проблем неврологии и нейрохирургии являются травматические очаговые повреждения головного мозга, которые обычно своевременно не диагностируются и проявляются в отдаленном посттравматическом периоде в виде осложнений или так называемых «последствий сотрясения головного мозга» [1, 3]. Широкое внедрение в клиническую практику компьютерной и магнитно-резонансной томографии позволило определять количественные характеристики травматических очаговых повреждений

головного мозга, их локализацию, вид (контузионный очаг, внутричерепная гематома малого объема), сроки образования и рассасывания. Однако эти клинико-интраскопические методики не являются чувствительными и специфичными для оценки тяжести травматического воздействия на другие, визуально интактные отделы головного мозга. В этой связи для оценки тяжести повреждения вещества головного мозга в зоне «пенумбры» в посттравматическом периоде могут быть использованы иммуноцитохимические методы определения содержания нейроспецифических белков в спинно-мозговой жидкости, сыворотке крови [4, 8].

В литературе приводятся сведения об изменениях содержания отдельных нейроспецифических белков при тяжелой черепно-мозговой травме, возможных иммуноцитохимических критериях прогноза тяжести полученной травмы [2, 6], однако отсутствует информация о роли определения содержания этих маркеров при очаговых травматических повреждениях головного мозга. Поэтому определение в динамике изменений содержания нейроспецифических белков в сыворотке крови является малоинвазивным и перспективным методом, позволяющим в комплексе с клинико-интраскопическими методами, достоверно оценивать состояние нервной ткани в процессе ее ремоделирования.

Цель: на основании количественной оценки содержания иммуноцитохимических маркеров в сыворотке крови определить состояние нервной ткани в процессе ее ремоделирования у пациентов с травматическими очаговыми повреждениями головного мозга.

Материал и методы исследования

Объектом исследования явились 45 пациентов (основная группа) обоего пола в возрасте $43 \pm 7,5$ лет с травматическими очаговыми повреждениями головного мозга (основная группа), находившихся в клинике нейрохирургии ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница №1 им. Ю.Я. Гордеева» и ГАУЗ «Энгельсская городская больница №1» в период с 2011 по 2013 гг. и 45 условно здоровых лиц, не имеющих в анамнезе указаний на повреждения и заболевания головного мозга, сопоставимых по полу и возрасту (контрольная группа). Критериями включения пациентов в основную группу были максимальный диаметр очаговых повреждений головного мозга, не превышающий 4 см, объем оболочечной гематомы менее 30 мл при височной локализации и не более 50 мл – при лобной или иной супратенториальной локализации.

В обеих группах обследуемых осуществляли взятие образцов периферической крови из кубитальных вен в объеме 5 мл, которые экспонировали при температуре 23°C и после

образования сгустка центрифугировали при 200 об/мин в течение 10 мин для получения сыворотки.

Характер ответной реакции нервной ткани в посттравматическом периоде изучали на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки путем оценки концентрации нейроспецифических белков в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью наборов для определения общего белка S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$), глиального кислого фибриллярного белка (GFAP), основного белка миелина (MBP) и цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) в соответствии с инструкциями к их применению.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistical Package for the Social Science (IBM SPSS 20 Statistics). Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро-Уилкса). Большинство полученных нами данных не соответствовало закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и показатель достоверности (p). Результаты считали статистически достоверными при $p<0,05$, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Результаты исследования

Уровень общего белка S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$) на 1-е сутки с момента получения травмы увеличился в 27,05 раз по сравнению с контролем ($p<0,001$). В остальные периоды наблюдения концентрация изучаемого показателя постепенно снижалась ($p_{1-4}<0,001$), оставаясь, однако достоверно выше контрольного значения ($p<0,001$).

Содержание GFAP на 1-е сутки посттравматического периода увеличилось в 25,11 раз по сравнению со значением, полученным в группе контроля ($p<0,001$) и на 3-и сутки еще в 1,16 раз по сравнению с предыдущим периодом наблюдения ($p_1<0,001$). Затем происходило последовательное снижение концентрации исследуемого белка в 1,86 ($p_2<0,001$), 1,06 ($p_3<0,001$) и 1,61 ($p_4<0,001$) раз по сравнению с каждым предыдущими сутками. Следует отметить, что уровень GFAP во все сроки исследования находился выше контрольного значения ($p<0,001$).

Концентрация MBP на 1-е сутки с момента травмы увеличивалась в 2,56 раза по сравнению с контролем ($p<0,001$) с последующим ростом значений на 3-и – 14-е сутки ($p_{1-3}<0,001$). На 21-е сутки после травмы достоверных изменений уровня исследуемого белка обнаружено не было. При этом, также во все сроки наблюдения значения показателя превышали контрольное ($p<0,001$).

Уровень CNTF на 1-е сутки с момента получения травмы увеличился в 64,67 раза по сравнению с контрольным ($p<0,001$). На 3-и сутки фиксировали снижение количества изучаемого фактора в 1,11 раз ($p_1<0,001$), на 7-е сутки статистически значимых изменений

выявлено не было ($p=0,096$), на 14-е сутки отмечали увеличение концентрации в 1,07 раз ($p_3<0,001$), на 21-е сутки статистически значимых изменений также не было ($p_4=0,809$). Во все сроки наблюдения значения CNTF превышали контрольное ($p<0,001$).

Таблица 1

Динамика содержания нейроспецифических белков в сыворотке крови пациентов с травматическими очаговыми повреждениями головного мозга

Показатель, n=45	Контроль, n=45	Периоды наблюдения, сут.				
		1-е	3-и	7-е	14-е	21-е
1	2	3	4	5	6	7
Общий белок S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$), нг/мл	16,54 (13,35; 20,26)	447,54 (388,40; 533,44) $p<0,001$	377,65 (349,95; 398,94) $p<0,001$ $p_1<0,001$	346,78 (305,94; 376,56) $p<0,001$ $p_2<0,001$	284,16 (244,58; 316,56) $p<0,001$ $p_3<0,001$	245,32 (225,02; 278,05) $p<0,001$ $p_4=0,002$
GFAP, нг/мл	0,27 (0,21; 0,43)	6,78 (6,43; 8,24) $p<0,001$	7,89 (7,25; 8,87) $p<0,001$ $p_1<0,001$	4,22 (3,56; 4,67) $p<0,001$ $p_2<0,001$	3,98 (3,67; 4,60) $p<0,001$ $p_3=0,831$	2,46 (1,91; 2,82) $p<0,001$ $p_4<0,001$
MBP, нг/мл	0,23 (0,17; 0,27)	0,59 (0,47; 0,67) $p<0,001$	0,92 (0,78; 1,16) $p<0,001$ $p_1<0,001$	1,12 (0,92; 1,23) $p<0,001$ $p_2<0,001$	1,23 (1,03; 1,38) $p<0,001$ $p_3=0,026$	1,25 (1,06; 1,43) $p<0,001$ $p_4=0,564$
CNTF, пг/мл	13,21 (11,11; 15,67)	854,31 (768,54; 926,18) $p<0,001$	765,45 (731,88; 844,50) $p<0,001$ $p_1<0,001$	742,28 (681,36; 782,73) $p<0,001$ $p_2=0,096$	798,67 (735,11; 894,11) $p<0,001$ $p_3=0,002$	835,66 (762,11; 886,06) $p<0,001$ $p_4=0,809$
Примечание 1 Me – медиана; 2 Нижний (25%) квартиль; 3 Верхний (75%) квартиль; 4 p – достоверность по сравнению с контролем; 5 p_1 – достоверность по сравнению с 1-ми сутками; 6 p_2 – достоверность по сравнению с 3-ми сутками; 7 p_3 – достоверность по сравнению с 7-ми сутками; 8 p_4 – достоверность по сравнению с 14-ми сутками.						

Обсуждение полученных результатов

Прогрессирующее увеличение концентрации MBP, обнаруженное нами во все сроки наблюдения, вероятно, было обусловлено массивной деструкцией (цитоллизом) белого вещества головного мозга, которая сопровождалась повреждением мембран аксонов, выходом MBP из поврежденной нервной ткани и накоплением его в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови. Это соответствует данным [5, 10] о том, что миелин является изолирующим покрытием, окружающим нейроны, повреждаемым в момент травмы белого вещества головного мозга.

Увеличение концентрации общего белка S-100 ($\alpha\beta+\beta\beta$) на 1-е сутки и GFAP на 1–3-и сутки, по нашему мнению, свидетельствовало о развитии цитолиза нервной ткани и астроглиальной реакции (глиоза и/или глиоцитопении), что соответствовало сведениям [7] о возрастании концентраций данных маркеров в первые часы – сутки после получения травмы головного мозга.

Возрастание содержания CNTF, фиксируемое нами во все сроки наблюдения, свидетельствовало о развитии регенерации нервной ткани и соответствовало данным [9] о роли факторов роста нервной ткани в механизмах долговременной адаптации центральной нервной системы после ее повреждения через структурные изменения синапсов и сохранение нейронов.

Заключение:

Комплексное исследование уровней содержания нейроспецифических белков в сыворотке крови у больных с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга позволяет селективно оценивать на биохимическом уровне отдельные механизмы процесса ремоделирования нервной ткани, повышая в совокупности чувствительность и специфичность используемых клинико-интраскопических методов диагностики данной патологии.

Список литературы

1. Агаджанян В.В., Устьянцева И.М., Хохлова О.И. Патогенетические аспекты посттравматической иммуновоспалительной реакции // Политравма. – 2009. – №4. – С. 5-8.
2. Балабан П.М., Гуляева Н.В. Общность молекулярных механизмов нейропластичности и нейропатологии: интегративный подход // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2006. – №2. – С. 145-152.
3. Гомазков О.А. Ростовые и нейротрофические факторы в регуляции трансформации стволовых клеток и нейрогенеза // Нейрохимия. – 2007. – №2. – С. 101-120.
4. Гусев Е.И., Коновалов А.Н. Клинические рекомендации. Неврология и нейрохирургия. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 368 с.
5. Кондратьев, А.Н. Неотложная нейротравматология - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 192 с.
6. Конюченко Е.А., Ульянов В.Ю., Гладкова Е.В., Пучиньян Д.М. Иммунологические маркеры повреждения нервной ткани при осложненной травме верхнешейного отдела позвоночника / Вертебрология в России: итоги и перспективы развития // Сб. тезисов V съезда хирургов-вертебрологов России. – Саратов, 2014. – С. 86-87.
7. Крылов В.В., Петриков С.С. Нейрореанимация: Практическое рук-во. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176 с.
8. Лебедев В.В. Гематоэнцефалический барьер в практической нейрохирургии // Нейрохирургия. – 2006. – №2. – С. 6-11.
9. Лихтерман Л.Б., Коновалов А.Н., Потапов А.А. Нейротравматология: Справочник. – М.: ВАЗАР-ФЕРРО, 1994. – С. 32-295.

10. Сидоркина А.Н., Сидоркин В.Г. Биохимические аспекты травматической болезни и ее осложнений. – Н. Новгород: ННИИТО, 2007. – 120 с.

Рецензенты:

Чехонацкая М.Л., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой лучевой диагностики и лучевой терапии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов;

Тахтамыш М.А., д.м.н., заведующий хирургическим отделением ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница №2 им. В.И. Разумовского», г. Саратов.