

СОПОСТАВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРЕГУЛИНА 1-beta1 И ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОЧАГОВЫМИ ТРАВМАТИЧЕСКИМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Конюченко Е.А.^{1,2}, Выгодчикова Г.Ю.², Ульянов В.Ю.^{1,2}, Дроздова Г.А.³, Решетников А.Н.², Щуковский В.В.¹

¹ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России, Саратов, e-mail: koniuchienko1983@mail.ru;

²ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов;

³Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Методом твердофазного иммуноферментного анализа у 40 пациентов с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга в динамике было изучено содержание в сыворотке крови нейрегулина 1-beta1, а также про- (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов. На основании проведенного сопоставительного анализа обнаружены новые корреляции разного характера и силы, характеризующие взаимосвязь процессов ремоделирования нервной ткани и системного воспалительного ответа, развивающихся в посттравматическом периоде у пациентов с черепно-мозговой травмой. Выявлено наличие средних и сильных положительных корреляций между содержанием в сыворотке крови нейрегулина 1-beta1 с уровнями TNF α , IL-6, IL-4 на 1-4-е и 7-е сутки, средней силы - с уровнями TNF α , IL-4, IL-10 на 14-е сутки; средней силы отрицательных корреляций нейрегулина 1-beta1 с TNF α на 21-е сутки.

Ключевые слова: головной мозг, очаговые повреждения, нейрегулин 1beta1, цитокины, иммуноферментный анализ.

COMPARATIVE ANALYSIS OF NEUREGULIN 1 β 1 AND CYTOKINES CONTENT IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH FOCAL BRAIN INJURIES

Konyuchenko E.A.^{1,2}, Vygodchikova G.Yu.², Ulyanov V.Yu.^{1,2}, Drozdova G.A.³, Reshetnikov A.N.², Schukovskiy V.V.¹

¹FSBI "Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopedics" of the Ministry of Health of Russian Federation, Saratov, e-mail: koniuchienko1983@mail.ru;

²SBEI HPE "Saratov State Medical University n. a. V. I. Razumovsky" of the Ministry of Health of Russian Federation, Saratov;

³FSAEI HE Medical Institute of "People's Friendship University of Russia", Moscow

Enzyme linked immunosorbent assay method in 40 patients with focal cerebral traumatic injuries in the dynamics in the blood serum content neuregulin 1-beta1 as well pro- (TNF α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines has been studied. Based on the comparative analysis revealed new correlations of different character and power were found and characterizing the relationship between remodeling processes of nervous tissue and systemic inflammatory response developing in the posttraumatic period in patients with traumatic brain injury. The presence of positive correlations of medium and weak power between content neuregulin-1 β 1 in blood serum and TNF α , IL-6, IL-4 levels were found on the 1st- 4th and 7th days, medium power—with levels of TNF α , IL-4, IL-10 on 14th day; medium power negative correlations neuregulin 1-beta1 with TNF α on 21th day.

Keywords: brain, focal injuries, neuregulin 1-beta1, cytokines, ELISA.

Первичное повреждение вещества головного мозга инициирует долгосрочные вторичные патофизиологические изменения на клеточном и молекулярном уровнях, определяющие в итоге выраженность процесса ремоделирования нервной ткани в послеоперационном периоде и, конечно, функциональный результат. Последние определяются комплексом одновременно развивающихся патогенетических и саногенетических механизмов. В условиях очаговых повреждений головного мозга

патогенетическими звеньями травматической болезни будут являться аксональный и нейрональный некрозы, нарушение метаболизма нервной ткани, оксидативный стресс, эксайтотоксичность и нейровоспаление. Наряду с патогенетическими происходит активация и саногенетических звеньев, которая включает внутриклеточную регенерацию, ремиелинизацию и нейропластичность [2, 4, 5, 13]. Кроме того, травматическая болезнь сопровождается развитием синдрома смешанного антагонистического ответа, который характеризуется высвобождением как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Провоспалительные цитокины могут инициировать процессы деструкции клеточных мембран и последующее высвобождение в системный кровоток внутриклеточных нейроспецифических белков, способствующих вторичному иммуно-воспалительному повреждению вещества головного мозга [1, 8, 10, 11]. Данный процесс реализуется за счет аутокринных, паракринных, эндокринных гуморальных межклеточных и межсистемных взаимодействий интерлейкинов, факторов некроза опухолей, хемокинов, интерферонов, колониестимулирующих и ростовых факторов, которые определяют функциональную активность отдельных нейронов и астроцитарной глии в зоне первичной альтерации, а также их способность к пролиферации, дифференцировке и выживаемости нейронов. Эти факторы определяют конечный объем повреждения головного мозга и интенсивность неонейрогенеза [1, 3, 8]. Патогенетически значимый цитокиновый дисбаланс, развивающийся при травматическом повреждении вещества головного мозга, способствует формированию множества новых «цитокиновых каскадов», определяющих амплификацию и пролонгирование эффектов цитокинов, ведущих к возникновению множественной органной дисфункции или недостаточности и системных осложнений [7, 9].

Активация провоспалительных цитокинов в остром периоде черепно-мозговой травмы сопровождается одновременным увеличением синтеза их антагонистов – противовоспалительных цитокинов – интерлейкинов 4, 10, за которым следует выработка различных подсемейств нейроспецифических белков – нейротрофинов, которые способствуют выживанию нейронов и глии в зоне так называемой «пенумбры» за счет ингибирования нейровоспаления [5], что, в конечном итоге, способствует ремоделированию нервной ткани в посттравматическом периоде. Наиболее изученной и разнообразной является группа нейрегулинов-1. Нейрегулины-1 (NRG) относятся к семейству трофических факторов, которые присутствуют в центральной и периферической нервной системе, а также участвует в выживаемости, регенерации, регулировке, пролиферации шванновских клеток, формирующих миелиновый слой, которые в свою очередь увеличивают продукцию нейрегулинов-1 после травматического повреждения [15]. Из литературных данных известно, что высокие концентрации некоторых из изоформ нейрегулина-1 воздействуют на

семейство трансмембранных рецепторов ErbB, включающее рецепторы EGF, ErbB2, ErbB3, ErbB4. Посредством этого нейрегулины вызывают рост и дифференциацию эпителиальных, нейронных, глиальных и иных типов клеток. Сигнальные пути нейрегулин-ErbB играют ключевую роль в регулировке, пролиферации шванновских клеток, а также в дифференцировке клеток-предшественников в нейроны, регенерации различных типов клеток, в том числе мотонейронов, активации микроглии в периоды максимальной потери клеточного пула вещества головного мозга [2, 4, 14].

В этой связи выявление корреляционных взаимоотношений содержания нейрегулина1-beta1 и цитокинов в сыворотке крови у больных с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга позволяет вскрыть новые механизмы ремоделирования нервной ткани при черепно-мозговой травме.

Цель: на основании сопоставительного анализа содержания в сыворотке крови нейрегулина1-beta1, про- и противовоспалительных цитокинов выявить отдельные корреляции, характеризующие системный воспалительный ответ в посттравматическом периоде у пациентов с очаговыми повреждениями головного мозга.

Все пациенты поступили в стационар в течение 1-х суток с момента получения травмы и были сопоставимы по механизму, объему повреждений и степени выраженности неврологического дефицита. Контрольную группу составили 40 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

В обеих группах, обследованных в утренние часы и натощак, при пункции локтевой вены осуществляли взятие проб крови в объеме 5 мл. Кровь оставляли для свертывания при комнатной температуре, центрифугировали при 2000 оборотах/мин в течение 10 минут для получения сыворотки. Методом иммуноферментного анализа изучали количественное содержание в сыворотке крови нейрегулина (human NRG1-beta1) (Ray Bio, USA) и цитокинов – фактора некроза опухоли (TNF α , пг/мл), интерлейкина 1 β (IL-1 β , пг/мл), интерлейкина-6 (IL-6, пг/мл), интерлейкина-4 (IL-4, пг/мл), интерлейкина-10 (IL-10, пг/мл) (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, РФ). В основной группе исследование указанных параметров осуществляли на 1-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 IBM SPSS 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 $R < 0,3$ свидетельствовали о слабой связи изученных признаков, $R > 0,3 < 0,7$ – о средней связи и $R > 0,7$ – о сильной связи. Рассчитывали показатель достоверности (p), который считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Изучение содержания нейрегулина1-beta1 и уровней провоспалительных цитокинов (табл.) у пациентов с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга позволило нам выявить сильную положительную корреляцию нейрегулина1-beta 1 и TNF_{α} на 1-е сутки ($p < 0,05$), затем происходило ее ослабление до средней силы на 7-е ($p < 0,05$) и 14-е ($p < 0,05$) сутки. На 21-е сутки после травмы обнаруживали появление средней силы отрицательной корреляции между исследуемыми показателями ($p < 0,05$).

Корреляции содержания нейрегулина1-beta1 и цитокинов у пациентов с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга (n=40)

Содержание в сыворотке крови цитокинов, пг/мл	Содержание в плазме крови human NRG1-beta1, пг/мл				
	Сроки наблюдения (сутки)				
	1-е	7-е	14-е	21-е	30-е
1	2	3	4	5	6
TNF_{α}	R=0,711 $p < 0,05$	R=0,457 $p < 0,05$	R=0,319 $p < 0,05$	R=-0,312 $p < 0,05$	R=-0,075 $p > 0,05$
IL-1 β	R=0,037 $p > 0,05$	R=0,075 $p > 0,05$	R=0,249 $p < 0,05$	R=-0,071 $p > 0,05$	R=-0,025 $p > 0,05$
IL-6	R=0,511 $p < 0,05$	R=0,411 $p < 0,05$	R=0,215 $p < 0,05$	R=-0,212 $p < 0,05$	R=-0,039 $p > 0,05$
IL-4	R=0,387 $p < 0,05$	R=0,435 $p < 0,05$	R=0,623 $p < 0,05$	R=0,287 $p < 0,05$	R=0,071 $p > 0,05$
IL-10	R=0,043 $p > 0,05$	R=0,214 $p < 0,05$	R=0,475 $p < 0,05$	R=0,075 $p > 0,05$	R=0,032 $p > 0,05$

Примечание:
R – коэффициент корреляции рангов Спирмена; p – показатель достоверности.

Достоверных корреляций этих параметров на 30-е сутки выявлено не было. Также были выявлены средней силы положительные корреляции нейрегулина1-beta 1 и IL-6 на 1-е ($p < 0,05$) и 7-е ($p < 0,05$) сутки. Достоверных корреляций между данными параметрами на 14-е – 30-е сутки зафиксировано не было. Статистически значимых корреляций содержания нейрегулина1-beta 1 и IL-1 β во все периоды наблюдения не обнаружили.

Изучение содержания нейрегулина 1-beta1 и уровней противовоспалительных цитокинов (табл.) у пациентов с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга позволило нам выявить нарастание средней силы положительной корреляции уровней нейрегулина 1-beta1 и IL-4 на 1-е ($p < 0,05$), 7-е ($p < 0,05$) и 14-е ($p < 0,05$) сутки после травмы. Достоверных корреляций этих параметров на 21-е и 30-е сутки выявлено не было. Исследование уровней нейрегулина 1-beta1 и IL-10 выявило наличие средней силы положительной корреляции только на 14-е сутки ($p < 0,05$).

Обсуждение полученных результатов

Согласно современным представлениям процессы ремоделирования нервной ткани при черепно-мозговой травме характеризуются усилением экспрессии различных нейроспецифических белков – факторов роста нервной ткани, про- и противовоспалительных цитокинов, которые одновременно могут оказывать как стимулирующее, так и угнетающее влияние на структуру и функционирование вторично поврежденных нейронов и клеток глии [1, 5, 10, 12].

Согласно данным [8], клетками макрофагальной глии синтезируются TNF α , IL-1 β и 6, которые при определенных условиях потенцируют выработку нейрегулина 1-beta1, максимально необходимого для восстановления поврежденных нейронов головного мозга. Это, в некоторой степени, соответствует наличию положительных сильных и средних корреляций содержания нейрегулина 1-beta1 и TNF α , а также средней силы положительной корреляции концентрации нейрегулина 1-beta1 с IL-6 в сроки с 1-х по 14-е сутки с момента получения травмы. Согласно данным литературы это является одним из саногенетических механизмов, направленных на повышение чувствительности нервной ткани к действию нейротрофических факторов. Появление средней силы отрицательной корреляции нейрегулина 1-beta1 и TNF α , IL-6 на 21-е сутки, на наш взгляд, свидетельствует об угнетении провоспалительных механизмов системного воспалительного ответа, реализуемых посредством TNF α и достижения эффективных концентраций нейрегулина 1-beta1, обеспечивающих выживание нейронов в зоне «ишемической полутени». Это соответствует данным, приводимым в работе [1, 6].

Согласно данным [3, 14] синтез нейротрофических белков может быть также инициирован и противовоспалительными цитокинами, такими как IL-4 и IL-10. Это соответствует нашим данным о наличии средней силы положительной корреляции уровней нейрегулина 1-beta1 и IL-4 на 1-е – 21-е сутки после травмы. Появление средней силы положительной корреляции уровня нейрегулина 1-beta1 с IL-10 на 7-е – 14-е сутки посттравматического периода, согласно данным литературы, является подтверждением роли комплексных трофических влияний на нервную ткань.

Отсутствие каких-либо корреляций между содержанием нейрегулина 1-beta1 и уровнями про- и противовоспалительных цитокинов на 30-е сутки с момента получения травмы, возможно, может свидетельствовать о преобладании внутриклеточной регенерации над провоспалительными механизмами системного воспалительного ответа, однако, сведений по этому вопросу в доступной литературе мы не обнаружили.

Таким образом, главным саногенетическим эффектом внутриклеточной регенерации нейронов, развивающимся под влиянием экспрессируемого фактора роста нервной ткани – нейрегулина-1beta1, является нейроцитопротекция, обеспечивающая выживаемость нейронов, восстановление клеточной популяции и глии в зоне вторичного повреждения вещества головного мозга.

Выводы:

1. Провоспалительные механизмы синдрома смешанного антагонистического ответа в процессе ремоделирования нервной ткани у пациентов с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга характеризуются наличием средних и сильных положительных корреляций между содержанием в сыворотке крови нейрегулина 1-beta1 с уровнями TNF α и IL-6 на 1–4-е и 7-е сутки, средней силы - с уровнями TNF α на 14-е сутки с момента получения травмы.

2. Противовоспалительные механизмы синдрома смешанного антагонистического ответа в процессе ремоделирования нервной ткани у пациентов с очаговыми травматическими повреждениями головного мозга характеризуются наличием средней силы положительной корреляции нейрегулина 1-beta1 с IL-4, IL-10 на 14-е сутки и средней силы отрицательных корреляций его с TNF α на 21-е сутки посттравматического периода.

Список литературы

1. Бэр М. Нейропротекция: модели, механизмы, терапия / М. Бэр; под ред. М. Бэра; пер. с англ.; под ред. В.П. Зыкова, П.Р. Камчатного. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 429 с.
2. Калинина Н.М., Сосюкина А.Е., Вологжанин Д.А. Травма: воспаление и иммунитет // Цитокины и воспаление. – 2005. – № 1. – С. 28-35.
3. Конюченко Е.А., Ульянов В.Ю., Пучиньян Д.М., Карякина Е.В. Динамика концентраций иммуноглобулинов классов М, G, А в сыворотке крови у пациентов с бронхолегочными осложнениями в остром и раннем периодах позвоночно-спинномозговой травмы // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 841-844.

4. Травматология и ортопедия / Норкин И.А. [и др.]. – Саратов: Медицина, 2015. – 220 с.
5. Одинак М.М., Цыган Н.В. Факторы роста нервной ткани в центральной нервной системе. – СПб.: Наука, 2005. – 157 с.
6. Суфианова Г.З., Шапкин А.Г. Повреждение нервной ткани: механизмы, модели, методы оценки. – М.: Изд-во РАМН, 2014. – 288 с.
7. Устьянцева И.М. Клинико-патогенетические аспекты формирования системного воспалительного ответа при политравме // Политравма. – 2006. – № 3. – С. 55-59.
8. Чехонин В.П. Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам / В.П. Чехонин, О.И. Гурина, Т.Б. Дмитриева. – М.: Медицина, 2007. – 344 с.
9. Щуковский В.В., Ульянов В.Ю., Бажанов С.П. Изменение системы гемостаза, свободно-радикального перекисного окисления липидов при травматической болезни спинного мозга в условиях действия гипербарической оксигенации и антиоксидантов // Международный журнал экспериментального образования. – 2012. – № 7. – С. 84-85.
10. Конюченко Е.А., Ульянов В.Ю., Пучиньян Д.М., Норкин И.А., Дроздова Г.А. Сопоставительный анализ содержания нейроспецифических белков и цитокинов в сыворотке крови пациентов в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-5. – С. 974-979.
11. Ульянов В.Ю., Норкин И.А., Дроздова Г.А., Конюченко Е.А. Факторы роста нервной ткани как маркеры оценки процессов нейрогенеза при травматической болезни спинного мозга // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 446-449.
12. Конюченко Е.А., Ульянов В.Ю., Гладкова Е.В., Пучиньян Д.М. Иммунологические маркеры повреждения нервной ткани при осложненной травме верхнешейного отдела позвоночника // Сборник тезисов V съезда хирургов-вертебрологов России «Вертебрология в России: итоги и перспективы развития». – Саратов. – 2014. – С. 86-87.
13. Крылов В.В., Пурас Ю.В. Патологические механизмы вторичного повреждения мозга при черепно-мозговой травме // Неврологический журнал. – 2013. – № 3. – С. 4-7.
14. Issa A.N., Zhan W.Z., Sieck G.C., Mantilla C.B. Neuregulin-1 at synapses on phrenic motoneurons // Journal Neuropathology and Experimental Neurology. – 2010. – Vol. 15(3). – pp. 4213-25.
15. Neuregulin-1 and ErbB4 Immunoreactivity is Associated with Neuritic Plaques in Alzheimer Disease Brain and in Transgenic Model of Alzheimer Disease // Journal Neuropathology and Experimental Neurology. – 2013. – Vol. 62(1). – pp. 42-54.