

СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АЛЬФА-ГЛОБУЛИНОВ В ЭМБРИОНАЛЬНОЙ, ДЕФИНИТИВНОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ МОЗГОВОЙ ТКАНИ

Мяснянкин А.А., Коханов А.В.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru

С помощью самостоятельно разработанных иммунохимических тест-систем на два нейроспецифических белка (НСБ) исследованы их уровни в экстрактах эмбриональной, дефинитивной и опухолевой ткани мозга. Установлено, что термостабильный $\alpha 1$ -глобулин мозга и кислотостабильный $\alpha 2$ -глобулина мозга обнаруживаются в ткани мозга плода начиная с 9–12 недель внутриутробного развития, и к третьему триместру беременности их концентрация приближается к уровням НСБ, соответствующим мозгу взрослого (5940 ± 1292 нг/мл для $\alpha 1$ -ТС-глобулина и 6150 ± 1583 нг/мл для $\alpha 2$ -КС-глобулина мозга). В экстрактах опухолевых тканей мозга обнаружено достоверное снижение содержания альфа-глобулинов мозга и наблюдается феномен антигенного упрощения. Изучено содержание $\alpha 1$ -ТС- и $\alpha 2$ -КС-глобулинов мозга в экстрактах немозговых опухолей и подтвержден для этих НСБ феномен антигенной дивергенции. Методом ИФА исследованы уровни $\alpha 1$ -ТС- и $\alpha 2$ -КС-глобулинов мозга в сыворотке крови больных с опухолевыми заболеваниями головного мозга. Полученные данные позволяют предполагать, что тест на $\alpha 1$ -ТС-глобулин мозга в сыворотке крови больных с мезенхимальными опухолями может иметь дифференциально-диагностическое значение в неврологии и нейрохирургии.

Ключевые слова: нейроспецифические белки, термостабильные и кислотостабильные альфа-глобулины мозга, иммунохимический анализ, эмбриональная и опухолевая ткань мозга

THE CONTENTS OF NEUROSPECIFIC ALPHA-GLOBULINS IN FETAL, MATURE, AND NEOPLASTIC BRAIN TISSUE

Myasnyankin A.A., Kokhanov A.V.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: agma@astranet.ru

With independently developed immunochemical test systems for two neurospecific protein (NSP) were studied their levels in extracts of fetal, mature, and neoplastic brain tissue. It was found that the thermostable $\alpha 1$ -globulin and acid-stable $\alpha 2$ -globulin are detected in the fetal brain tissue, starting with 9-12 weeks of fetal development, and to the third trimester of pregnancy, their concentration is approaching to the levels of the NSP, the appropriate adult brain (5940 ± 1292 ng / ml for the thermostable $\alpha 1$ -globulin and 6150 ± 1583 ng / ml for the acid-stable $\alpha 2$ -globulin of brain). In extracts of brain neoplastic tissue was detected a significant decrease in the content of the brain alpha-globulin and was observed the phenomenon of antigenic simplification. The content of alpha-1-TS- and alpha-2-AS-globulins in extracts of non-brain tumor was studied and for these NSP was confirmed the phenomenon of antigenic divergence. By the method of ELISA are investigated the levels of brain alpha-1-TS- and alpha-2-AS-globulins in the serum of patients with neoplastic diseases of the brain. The data suggest that the test for brain alpha-1-TS-globulin in serum of patients with mesenchymal tumors may have a differential diagnostic value in neurology and neurosurgery.

Keywords: neurospecific proteins, brain thermostable and acid-stable alpha-globulin, physical and chemical properties, immunochemical analysis, fetal and neoplastic brain tissue

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 нейроспецифических белков (НСБ) в крови больных с травмами, нервно-психическими, воспалительными и опухолевыми заболеваниями центральной нервной системы [1, 3]. Несмотря на то что за 50-летний период появились сообщения о более чем 65

НСБ, научное направление, связанное с их изучением, продолжает активно развиваться как в фундаментальном, так и в прикладном аспектах [2, 4, 6–8, 10].

К концу 1960-х гг. методами иммунохимического анализа было доказано наличие в составе головного мозга органоспецифических антигенов [11]. Наиболее известными представителями нейроспецифических белков являются белок S-100 [11, 12], нейроспецифическая енолаза (NSE или антиген 14–3–2) [9, 12], глиофибрилярный кислый антиген (GFAP) [6, 12] и основной белок миелина (MBP) [5, 10].

Совершенствование техники фракционирования белков, применение методов иммунохимического анализа значительно расширили наши знания об антигенном составе нервной ткани [2–5].

Основная масса водорастворимых тканевых и сывороточных белков, в том числе НСБ, денатурирует в экстремальных физико-химических условиях, и для их выделения и очистки требуются достаточно мягкие физиологические условия фракционирования [3]. Однако существует небольшая группа НСБ, способных сохранять свои нативные свойства при жестких методах фракционирования [6]. К таким белкам-«экстремалам» относятся описанные нами ранее нейробелки: термостабильный альфа1-глобулин и кислотостабильный альфа2-глобулин.

Вследствие большой функциональной важности подобных антигенов, способных принимать участие в процессах запоминания, миелинизации или аутоиммунных конфликтах, представляет большой интерес исследование локализации и динамики изменения уровней этих НСБ в ткани мозга в процессе эмбриогенеза и малигнизации.

Цель исследования: анализ содержания нейроспецифических альфа-глобулинов в эмбриональной, дефинитивной и опухолевой мозговой ткани.

Материалы и методы исследования

Биологический материал получали в бюро судебно-медицинской экспертизы г. Астрахани в виде аутопсийного материала мозга от лиц, погибших от случайных причин (48 образцов), мертворожденных плодов второго-третьего триместров гестации (23 образца) и абортивного материала (эмбрионы первого триместра гестации). Аутопсийный и биопсийный материал опухолей нервной ткани получен из патологоанатомических бюро различных клиник г. Астрахани. Злокачественные образования мозга были представлены 34 образцами нейроэктодермальных опухолей различной степени анаплазии (I степени – 15 и II степени – 19) и 22 образцами мезенхимальных опухолей (арахноэндотелиомы – 18 и саркомы – 6). Экстракты мозга готовились на 0,05М трис-глициновом буфере (рН 8,3) без добавления детергентов в соотношении 1 : 3 (ткань : буфер).

Пробы крови брали из локтевой вены у 83 больных нейрохирургических отделений с опухолями мозга в стандартных условиях. Образцы сыворотки крови отбирали по 1,5 мл в две пластиковые пробирки «Эппендорф» для исследования и хранили при температуре – 25°C до анализа. Контролем служили 68 образцов сывороток крови доноров обоего пола, полученных из областной станции переливания крови, в возрасте от 30 до 56 лет.

Антисыворотки к термостабильному альфа1-глобулину (α 1-ТС-глобулину) и кислотостабильному альфа2-глобулину (α 2-КС-глобулину) мозга получали путем иммунизации кроликов по схеме, описанной ранее [3, 6]. В полученных моноспецифических антисыворотках к НСБ, хорошо работающих в иммунодиффузионном анализе, определялся титр антител, и, если он превышал 1/32, моноспецифическая антисыворотка признавалась гипериммунной, пригодной для активации планшетов и приготовления конъюгатов в ИФА.

Для иммунохимической идентификации и количественного определения в экстрактах этих НСБ применяли методы иммунодиффузии по Оухтерлони, радиальной иммунодиффузии по Манчини, иммуноферментный анализ (ИФА). 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. Всего было протестировано 238 сывороток крови и образцов экстрактов фетальных, дефинитивных и опухолевых тканей мозга.

Статистическую обработку клинического и лабораторного материала проводили методами, принятыми в вариационной статистике, с вычислением средних величин и их ошибок ($M \pm m$). За достоверные различия в сравнении средних величин в парных сравнениях брали t-критерий Стьюдента при $p < 0,05$. Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием лицензионной программы Excel-2003 (Microsoft).

Результаты исследований

При изучении экстрактов фетального мозга установлено, что оба нейроспецифических антигена — и α 1-ТС-глобулин, и α 2-КС-глобулин — методом иммуноферментного анализа обнаруживаются в ткани мозга плода начиная с 9–12 недель внутриутробного развития в концентрации 3000–5000 мкг/мл, и к третьему триместру беременности концентрация НМС приближается к уровням НСБ, зафиксированным в мозге взрослого.

Средние концентрации обоих НСБ в экстрактах дефинитивного мозга были приблизительно равны и составили 5940 ± 1292 нг/мл для α 1-ТС-глобулина и 6150 ± 1583 нг/мл для α 2-КС-глобулина мозга (табл. 1).

Следует отметить, что термостабильный α 1-ТС-глобулин мозга обладает высокой антигенной потенцией. Это выражается в том, что антисыворотки к термически

обработанным экстрактам мозга человека преципитируют иммунохимически идентичный антиген из состава ауто- и гомологичных экстрактов мозга кролика – продуцента антител.

Таблица 1

Результаты иммунохимического определения α_1 -ТС- и α_2 -КС-глобулинов мозга в составе экстрактов опухолей головного мозга человека

Исследуемые образцы тканей	Число наблюдений	Нейроспецифические белки (нг/мл)	
		α_1 -ТС-глобулин	α_2 -КС-глобулин
1. Нейроэктодермальные:	34		
Анаплазия I степени	15	5830±1665	2250±861*
Анаплазия II–III степени	19	6320±1343	2630±929
2. Мезенхимальные:	24		
арахноидэндотелиома	18	2360±769*	1840±630*
саркома	6	3750±968	1670±323*
Дефинитивный мозг	48	5940±1292	6150±1583

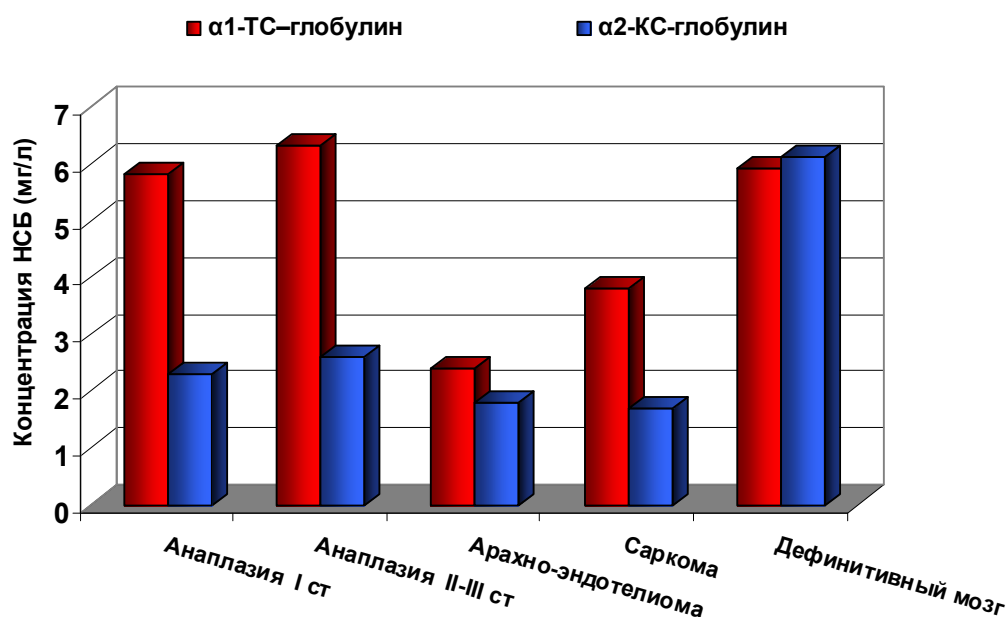
Примечание: * – достоверные значения по сравнению с экстрактом дефинитивного мозга ($p < 0,05$).

Кислотостабильный α_2 -КС-глобулин, кроме мозга, обнаруживается в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) плодов 16–24 недель гестации. Характерно, что этот антиген обнаруживается в составе экстрактов некоторых аденокарцином яичника и ЖКТ.

Моноспецифические тест-системы на оба НСБ были использованы для характеристики антигенного состава опухолей головного мозга различного гистогенеза и степени злокачественности (табл. 1). Полученные данные указывают на достоверное снижение в некоторых опухолях содержания НСБ и позволяют заключить, что в отношении этих нейроспецифических антигенов наблюдаются процессы антигенного упрощения.

Данный феномен в большей степени обусловлен α_2 -КС-глобулином мозга, уровни которого снижаются и при нейроэктодермальных, и при мезенхимальных опухолях. Достоверное снижение α_1 -ТС-глобулина мозга характерно только для опухолей мозга мезенхимального происхождения (рисунок).

В связи с участием некоторых известных НСБ в феномене, которое носит название «антигенная дивергенция опухолевой ткани», мы протестировали содержание α_1 -ТС- и α_2 -КС-глобулинов мозга в экстрактах немозговых опухолей. В частности, хорошо известен факт синтеза такого НСБ, как нейрон-специфическая енолаза (NSE), опухолевой тканью легкого, поэтому иммуноферментный анализ онкомаркера NSE в сыворотке крови больных злокачественными опухолями легкого имеет высокую диагностическую ценность [2]. В настоящее время этот иммуноферментный тест применяется для мониторинга течения заболевания и контроля эффективности проводимой терапии и является обязательным при дифференциальной диагностике мелкоклеточного рака легких.



Концентрация $\alpha 1$ -ТС- и $\alpha 2$ -КС-глобулинов мозга в экстрактах опухолей мозга нейроэктодермального и мезенхимального генеза

На основании результатов иммуноферментного анализа НСБ при нейроэктодермальных и мезенхимальных опухолях головного мозга в качестве положительного теста на НСБ при немозговых опухолях считали референтную величину в 1000 нг/мл. При такой чувствительности теста наиболее часто НСБ выявляли аденокарциному яичника (табл. 2).

Таблица 2

Результаты иммунохимического исследования $\alpha 1$ -ТС- и $\alpha 2$ -КС-глобулинов мозга в гетерологических опухолях

Исследуемые образцы тканей	Число наблюдений	Нейроспецифические белки	
		$\alpha 1$ -ТС-глобулин	$\alpha 2$ -КС-глобулин
1. Аденокарцинома яичника	15	1	6
2. Псевдомуцинозная киста яичника	9	–	–
3. Тератома яичника	6	2	1
4. Гепатоцеллюлярный рак	9	–	3
5. Опухоль почки	8	1	4
6. Аденокарцинома желудка	8	–	4
7. Аденома простаты	12	–	2
8. Мелкоклеточный рак легкого	5	–	1

Как следует из таблицы 2, в качестве дивергирующего антигена мозга чаще выступает кислотостабильный $\alpha 2$ -КС-глобулин. Это особенно характерно для аденокарциномы яичника (частота положительных результатов, превышающих 1000 нг/мл, составила 40%), аденокарциномы желудка (50%), опухолей почки (50%) и печени (30%).

Напротив, термостабильный α 1-ТС-глобулин мозга проявил себя как дивергирующий антиген только в отношении тератомы яичника (2 положительных случая из 6).

Методом ИФА нами проанализированы сыворотки крови больных с опухолевыми заболеваниями головного мозга (табл. 3). Термостабильный α 1-ТС-глобулин мозга в наиболее высокой концентрации ($1235 \pm 256,3$ нг/мл) выявлен у пациентов с арахноидэндотелиомой, достоверно ($p < 0,05$) превышающей значения не только в контрольной группе доноров ($208 \pm 45,4$ нг/мл), но и у пациентов с немезенхиальными опухолями ($565 \pm 141,4$ нг/мл). Полученные данные позволяют предполагать, что тест на α 1-ТС-глобулин мозга в сыворотке крови больных с мезенхиальными опухолями может иметь дифференциально-диагностическое значение в неврологии и нейрохирургии. Уровни кислотостабильного α 2-КС-глобулинов мозга в сыворотках крови пациентов с опухолевыми заболеваниями головного мозга ни в одной группе достоверно от донорских значений не отличались ($95 \pm 28,8$ нг/мл).

Таблица 3

Уровни нейроспецифических α 1-ТС- и α 2-КС-глобулинов в сыворотке крови больных с опухолевыми заболеваниями головного мозга

Исследуемые образцы тканей	Число наблюдений	Нейроспецифические белки (нг/мл)	
		α 1-ТС-глобулин	α 2-КС-глобулин
1. Нейроэктодермальные:			
Анаплазия I степени	20	$448 \pm 128,1$	$110 \pm 43,6$
Анаплазия II–III степени	9	$565 \pm 141,4^*$	$94 \pm 39,2$
2. Мезенхимальные:			
арахноидэндотелиома	28	$1235 \pm 256,3^*$	$77 \pm 30,5$
саркома	8	$1406 \pm 363,0^*$	$111 \pm 45,3$
3. Эпителиальные:			
аденома гипофиза	15	$283 \pm 92,2$	$61 \pm 21,1$
краниофарингиома	3	$607 \pm 156,7^*$	$84 \pm 20,4$

Примечание: * – достоверные значения по сравнению с донорами ($p < 0,05$).

Заключение

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

Установлено, что оба нейроспецифических антигена – и α 1-ТС-глобулин, и α 2-КС-глобулин — методом иммуноферментного анализа с чувствительностью тест-систем для α 1-ТС-глобулина мозга 5 нг/мл и для α 2-КС-глобулина мозга 10 нг/мл обнаруживаются в ткани мозга плода начиная с 9–12 недель внутриутробного развития, и к третьему триместру беременности концентрация НМС приближается к уровням НСБ, зафиксированным в мозге взрослого.

Средние концентрации обоих НСБ в экстрактах дефинитивного мозга были приблизительно равны и составили 5940 ± 1292 нг/мл для $\alpha 1$ -ТС-глобулина и 6150 ± 1583 нг/мл для $\alpha 2$ -КС-глобулина мозга.

В экстрактах опухолевых тканей мозга обнаружено достоверное снижение содержания альфа-глобулинов мозга. Это означает, что в отношении этих нейроспецифических антигенов в опухолях мозга наблюдаются процессы антигенного упрощения.

Изучено содержание $\alpha 1$ -ТС- и $\alpha 2$ -КС-глобулинов мозга в экстрактах немозговых опухолей и установлено, что в качестве дивергирующего антигена мозга чаще выступает кислотостабильный $\alpha 2$ -КС-глобулин.

Методом ИФА исследованы уровни $\alpha 1$ -ТС- и $\alpha 2$ -КС-глобулинов мозга в сыворотке крови больных с опухолевыми заболеваниями головного мозга. Полученные данные позволяют предполагать, что тест на $\alpha 1$ -ТС-глобулин мозга в сыворотке крови больных с мезенхиальными опухолями может иметь дифференциально-диагностическое значение в неврологии и нейрохирургии.

Список литературы

1. Белопасов В.В. Клинико-диагностическое значение иммунохимического анализа белкового спектра ликвора при заболеваниях нервной системы: автореферат дис. ... д-ра мед. наук / В.В. Белопасов. – М., 1997. – 36 с.
2. Гурина О.И. Моноклональные антитела к нейроспецифическим антигенам. Получение, иммунохимический анализ, исследование проницаемости гемато-энцефалического барьера: автореферат дис. ... д-ра мед. наук / О.И. Гурина. – М., 2005. – 46 с.
3. Коханов А.В., Воронкова М.Ю., Бисалиева Р.А., Мяснянкин А.А., Огнев П.В. Нейроспецифические белки с экстремальными физико-химическими характеристиками и их значение в оценке осложнений нейротравмы // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.; URL: <http://www.science-education.ru/120-17016>.
4. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Жирков Ю.А. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. – М.: Медицина, 1999. – 416 с.
5. Чехонин В.П. Основной белок миелина. Строение, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний / В.П. Чехонин, О.И. Гурина, Т.Б. Дмитриева, А.В. Семенова, Е.А. Савченко // Вопросы медицинской химии. – 2000. — Т. 46, № 6. – С. 549–563.

6. 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.
7. Chen W.J. Reexpression of glial fibrillary acidic protein rescues the ability of astrocytoma cells to form processes in response to neurons / W.J. Chen, R.K. Liem // J. Cell Biol. – 1994 – V. 127. – P. 813–823.
8. Farr S.A. Antibody to beta-amyloid protein increases acetylcholine in the hippocampus of 12 month SAMP8 male mice / S.A. Farr, W.A. Banks, K. Uezu et al. // Life Sci. – 2003. – № 20. – V. 73(5). – P. 555–562.
9. Grasso A. Preparation and properties of the brain specific protein 14-3-2 / A. Grasso, G. Roda et al. // Brain Res. – 1977. – Vol. 124. – P. 497–507.
10. Meinel E. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: MBP and beyond / E. Meinel, R. Hohlfeld // Clin Exp Immunol. – 2002 – V. 128 – P. 395–397.
11. Moore B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system / B.W. Moore // Biochem. biophys. Res. Commun. – 1965. – Vol. 19. – P. 739–744.
12. Moore B.W. Brain-specific proteins, S100 protein, 14-3-2 protein and glial fibrillary protein / B.W. Moore // Advances in Neurochemistry. – 1976. – V. 1. – P. 137–155.