

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ПОЛОВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ТЕЧЕНИИ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ПОЗВОНОЧНИКА, ОСЛОЖНЕННОЙ СТЕНОЗОМ ПОЗВОНОЧНОГО КАНАЛА

Родионова Л.В.^{1,2}, Сороковиков В.А.^{1,2}, Самойлова Л.Г.¹, Негреева М.Б.¹,
Скляренко О.В.¹, Кошкарёва З.В.¹

¹ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, e-mail: ars-nataliya@yandex.ru;

²ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» МЗ РФ, Иркутск, e-mail: greidmacho@yandex.ru

Произведена совокупная оценка концентрации эстрадиола в сыворотке крови (иммуноферментным методом) и активности экспрессии генов ESR1 и ESR2 (real time PCR) в образцах желтой связки 36 пациентов со стенозами позвоночного канала дегенеративно-дистрофического генеза. Активная экспрессия генов, кодирующих рецепторы к эстрадиолу ESR1 и ESR2 на одинаковом уровне, выявлена в образцах Ligamentum flavum у всех пациентов независимо от половой принадлежности. Сывороточные показатели концентрации эстрадиола у женщин не имели статистически значимых различий с контролем, а у мужчин в 1,5 раза превышали таковые значения по сравнению с сопоставимой группой доноров. Экспрессия генов, кодирующих рецепторы к эстрадиолу, может быть одним из факторов, определяющих половозрастные различия в течении дегенеративно-дистрофической патологии позвоночника. Наши исследования согласуются с работой Mei-Hsiu Chen с соавт. и подтверждают присутствие рецепторов к эстрогену ESR1 и ESR2 в желтой связке больных со стенозами позвоночного канала.

Ключевые слова: дегенеративно-дистрофические заболевания позвоночника, стеноз, эстрадиол, экспрессия генов, рецепторы к эстрадиолу.

A STUDY OF THE FACTORS DETERMINING THE AGE AND SEX DIFFERENCES FOR DEGENERATIVE PATHOLOGY OF THE SPINE COMPLICATED BY SPINAL STENOSIS

Rodionova L.V.^{1,2}, Sorokovikov V.A.^{1,2}, Samoylova L.G.¹, Negreeva M.B.¹,
Sklyarenko O.V.¹, Koschkareva Z.V.¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology», Irkutsk, e-mail: ars-nataliya@yandex.ru;

² State Educational Institution of Additional Professional Education «Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Irkutsk, e-mail: greidmacho@yandex.ru

We performed a cumulative assessment of the concentration of estradiol in the serum (ELISA) and expression of gene ESR1 and ESR2 (real time PCR) in samples of the Ligamentum flavum 36 patients with degenerative lumbar spinal stenosis. Active expression of the genes ESR1 and ESR2 at the same level identified in the samples of Ligamentum flavum in all patients regardless of gender. Serum concentrations of estradiol in women were not statistically significant differences with the control, and in men 1.5 times higher than those values for the comparable group of donors. The expression of the genes encoding receptors for estradiol can be one of the factors that determine gender and age differences for degenerative pathology of the spine. Our studies are consistent with the investigation of Mei-Hsiu Chen et al. and confirm the presence of estrogen receptors ESR1 and ESR2 in the Ligamentum flavum in patients with stenosis of the spinal canal.

Keywords: degenerative lumbar spinal stenosis, estradiol, gene expression, receptors for estradiol.

Дегенеративно-дистрофические заболевания позвоночника можно отнести к мультифакторным заболеваниям, развитие которых зависит как от наследственности, так и от факторов внешней среды и образа жизни [5, 6, 7]. Дегенеративно-дистрофические процессы в позвоночнике на сегодняшний день занимают лидирующее место в структуре причин стеноза позвоночного канала [1, 2, 4, 8]. Количество больных со стенозами

позвоночного канала на поясничном уровне составляет до 6 % от общего числа пациентов, подлежащих оперативному лечению по поводу вертеброгенных поясничных симптомов [11]. Частота стеноза позвоночного канала на поясничном уровне составляет 11,5 случаев на 100000 населения в год, процент встречаемости центральных и латеральных сужений позвоночного канала на поясничном уровне может достигать до 10 % в популяции [4]. Для категории лиц старше пятидесяти лет эта цифра приближается к 30 % [3]. Вертеброгенные боли являются самой частой причиной нетрудоспособности лиц возрастной категории от 30 до 60 лет. Постоянно увеличивается и число случаев поясничного стеноза в структуре нейрохирургической заболеваемости [3, 4].

В сложном каскаде реакций, протекающих в организме при формировании возрастной патологии, ключевую роль играют гормоны, действие которых не ограничивается тканями, традиционно считающимися тропными [13]. В частности, половые стероиды помимо регуляции половых функций тесно связаны и непосредственно влияют на многие метаболические реакции, что, несомненно, сказывается на процессах саногенеза и дальнейшей адаптации пациентов с любой патологией.

Таким образом, перспективны исследования гормонального фона, претерпевающего изменения с увеличением возраста, и поиск генов-кандидатов, определяющих половозрастные особенности в течении дегенеративно-дистрофической патологии позвоночника. Особенно целесообразна оценка концентрации эстрадиола в сыворотке крови совместно с исследованием экспрессии рецепторов к эстрадиолу в тканях, принимающих участие в формировании патологического очага. Совокупная оценка полученных данных может дать ценную информацию для изучения механизмов развития дегенеративно-дистрофических заболеваний и совершенствования на этой основе методов диагностики, прогнозирования, лечения и профилактики.

Цель: произвести совокупную оценку концентрации эстрадиола в сыворотке крови и активности экспрессии рецепторов ESR1 и ESR2 в образцах желтой связки пациентов со стенозами позвоночного канала дегенеративно-дистрофического генеза.

Материалы и методы

В клинике нейрохирургии ИНЦХТ согласно предложенному и утверждённому алгоритму диагностики стенозирующих процессов позвоночного канала [5] обследовано и хирургически пролечено 36 пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка, из них мужчин – 18 человек, и 18 – женщин. Распределение больных по полу и возрасту (см. таб. 1, n=36).

Таблица 1

Распределение больных по полу и возрасту

Возрастные группы	Пол	Количество пациентов, %
20 до 30 лет	м	2,77
	ж	5,56
31 год – 40 лет	м	5,56
	ж	5,56
От 41 до 50 лет	м	19,44
	ж	22,22
От 51 года и старше	м	19,44
	ж	19,44

При анализе половозрастных особенностей обследованных больных (табл. 1) чётко определяется закономерность увеличения частоты дегенеративно-дистрофических заболеваний позвоночника в возрасте от 41 года и старше.

Моноsegmentарный стеноз выявлен у 22 (61,11 %) пациентов из 36 (табл. 2).

Таблица 2

Распределение больных по локализации стенозирующего процесса (n=36)

Уровень стеноза	Количество пациентов (%)
LII-LIII	2,78
LIII-LIV	2,78
LIV-LV	38,88
LV-SI	16,67
LII-LIII, LIII-LIV	2,78
LIII-LIV, LIV-LV	16,67
LIV-LV, LV-SI	19,44

Основными клинико-неврологическими симптомами у больных исследуемой группы были: синдром люмбоишалгии – в 50 % случаев; синдром люмбалгии – у 76,5 % больных; синдром каудогенной перемежающейся хромоты – у 35,3 % пациентов; крампи-синдром – у 32,3 % больных (табл. 3).

Таблица 3

Распределение больных по клинико-неврологическим синдромам (n=36)

Клинико-неврологические проявления	Количество больных %
Синдром люмбалгии	26 (76,5)
Синдром люмбоишалгии	17 (50)
Радикулоневрит	12 (35,3)
Радикулоишемический синдром	3 (8,8)
Парезы мышц нижних конечностей	3 (8,8)
Тазовые нарушения	1 (2,9)
Крампи-синдром	12 (32,3)
Анталгический сколиоз	7 (20,6)
Синдром каудогенной перемежающейся хромоты	13 (35,3)

Все лица, участвующие в исследовании, в соответствии с законодательством РФ подписали необходимые документы о добровольном информированном согласии на медицинское вмешательство и публикацию полученных данных (без идентификации личности).

Перед оперативным вмешательством у пациентов в соответствии с общими правилами забирали кровь из локтевой вены для определения сывороточной концентрации эстрадиола с помощью иммуноферментного анализа (реагенты «Хема Медика»). Для оценки показателей уровня эстрадиола в крови пациентов исследуемой группы использовали значения, полученные при обследовании 38 разовых доноров крови, жителей г. Иркутска без патологии опорно-двигательного аппарата, не имеющих хронической соматической патологии. В группу доноров вошло 12 мужчин ($55,2 \pm 1,2$ года) и 26 женщин ($47,6 \pm 3,4$ года). Для оценки гормональных исследований крови женщин разделяли на подгруппы: 1) репродуктивный период (12 чел.), 2) менопауза (14 чел.).

Во время операции из патологического очага забирали образцы Ligamentum flavum, немедленно помещая их в раствор, предотвращающий гидролиз нуклеиновых кислот. Затем биоптаты подвергались глубокой заморозке с помощью жидкого азота, деградации и гомогенизации с последующим выделением общей РНК (реагенты Promega), синтезом к ДНК и постановкой real time ПЦР с праймерами (RealTimePrimers.com). В качестве генов «домашнего хозяйства» применяли ACTB, GADP, RPL13A, B2M, GUSB, PGK, PPIA. Уровень экспрессии этих генов находится на высоком уровне во всех видах тканей и используется для стандартизации полученных данных. В нашем исследовании наиболее подходящим (имеющим наименьшие вариации) оказался ген GADP.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel, применяя непараметрические критерии. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изменения концентрации эстрадиола в крови женщин обеих исследуемых подгрупп не достигали уровня значимости. В сыворотке крови мужчин исследуемой группы выявлено увеличение уровня эстрадиола по сравнению с сопоставимой группой лиц без патологии позвоночника (рис. 1).

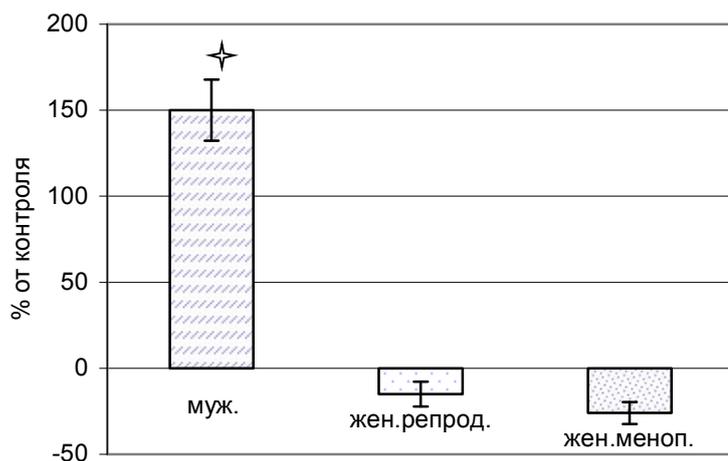


Рис. 1. Изменение концентрации эстрадиола в сыворотке крови больных со стенозами позвоночного канала: в % от уровня доноров сопоставимой возрастной группы; звездочка – $p < 0,05$; ось абсцисс обозначает уровень контрольной группы

Пока сложно интерпретировать эти данные, но однозначно можно сказать, что значение эстрогенов для мужского организма многие годы недооценивалось. Только в 2000 году появились первые свидетельства о важной роли эстрогенов у мужчин как в пубертатном периоде, так и впоследствии. Есть публикации, свидетельствующие о том, что прямое влияние тестостерона на костную ткань у мужчин значительно менее выражено, чем основной эффект эстрогенов, играющий определяющую роль в поддержании костной массы посредством ремоделирования [13].

Метаболическое действие эстрадиола не ограничено исключительно репродуктивной сферой (рис. 2). Описана регуляция эстрадиолом хондрогенеза, его влияние на апоптоз остеобластов и остеокластов, а также на ремоделирование кости [13]. Известно повреждающее действие дефицита эстрадиола на минеральную плотность костной ткани [14, 15], есть работы, описывающие эффекты эстрадиола на гиппокамп и консолидацию памяти [12], а также его влияние на серотониновые рецепторы головного мозга [9]. Гены, кодирующие рецепторы эстрадиола, особенно активно экспрессируются в эндометрии и тканях молочной железы при онкологических заболеваниях, что обуславливает широкое их применение в диагностических целях. Однако практически нет информации об участии эстрадиола и его рецепторов в возникновении и прогрессировании дегенеративно-дистрофических заболеваний позвоночника.

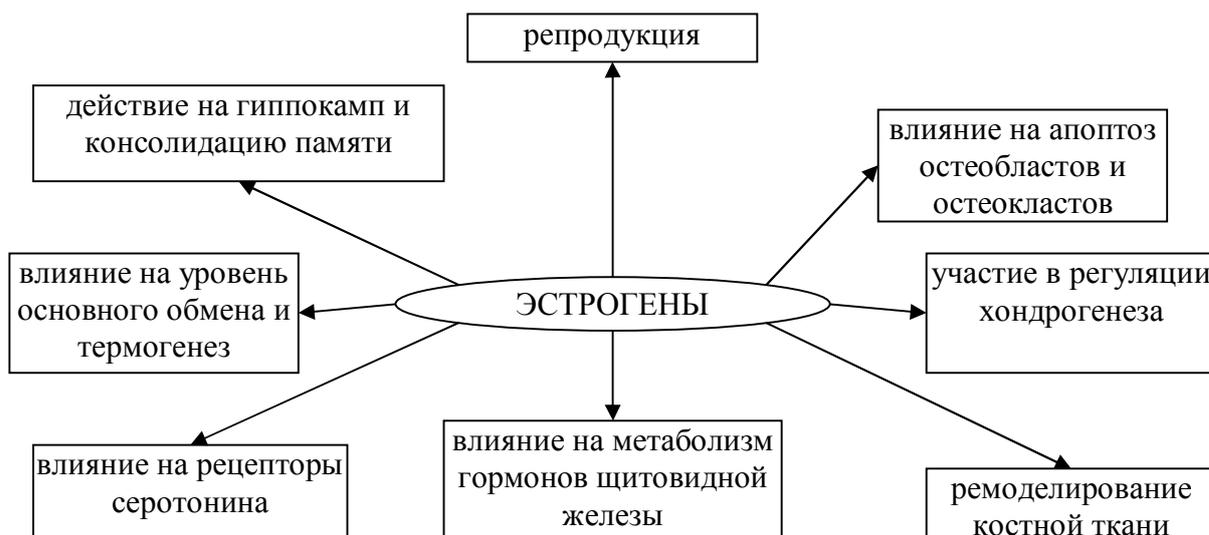


Рис. 2. Многообразие метаболических эффектов эстрогенов

В качестве наиболее подходящего материала для молекулярно-генетических исследований выбрана Ligament flavum из-за возможности интраоперационно получить достаточное количество однородного материала, субстрат которого участвует в образовании спинно-мозгового канала. Основными аргументами в пользу такого выбора являлось то, что утолщение желтой связки приводит к уменьшению свободного места в позвоночном канале и стеноз позвоночного канала может быть вызван или усугублен гипертрофией или оссификацией Ligament flavum. Кроме того, Ligament flavum является слабо изученной в молекулярно-генетическом плане соединительно-тканной структурой, метаболизм которой в большой степени может зависеть от уровня эстрадиола.

В результате проведенного исследования выявлено, что в желтой связке больных со стенозами позвоночного канала наблюдалась выраженная экспрессия генов, кодирующих рецепторы к эстрадиолу (ESR1 и ESR2), это были наиболее активные гены после генов «домашнего хозяйства» (рис. 3). Время выхода, определенное по пороговому циклу (Ct), ESR1 и ESR2 при real time ПЦР приближалось к значениям генов «домашнего хозяйства», что свидетельствует об активной «работе» этих генов в Ligamentum flavum.

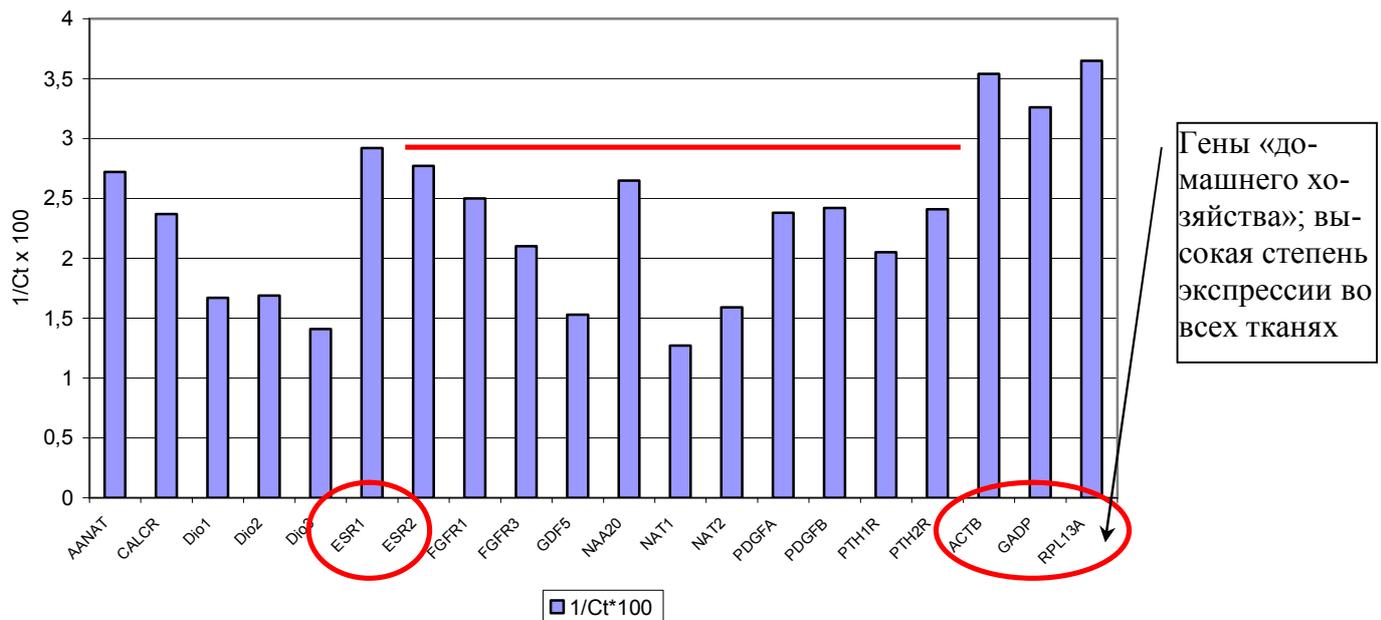


Рис. 3. Выраженность экспрессии генов в интраоперационных образцах желтой связки пациентов со стенозами позвоночного канала: линия, проведенная сверху от уровня экспрессии ESR1 и ESR2, наглядно показывает, что после генов «домашнего хозяйства», это – наиболее активно работающие гены; Ct – пороговый цикл в ПЦР

Статистически значимых различий между женщинами и мужчинами не обнаружено (рис. 4). Ген ESR2 амплифицировался в среднем на 10 % слабее, чем ESR1.

В настоящее время появляются лишь единичные работы по выявлению роли эстрадиола в патогенезе стенозирующих процессов позвоночного канала. Так, Mei-Hsiu Chen с соавторами обнаружили в культуре тканей желтой связки рецепторы к эстрадиолу как у женщин, так и у мужчин, и выявили важную роль эстрадиола в регуляции метаболизма коллагена [10]. В их работе показано, что дефицит эстрадиола вызывает дегенерацию соединительной ткани, изучена дозо-зависимая регуляция эстрадиолом клеточной пролиферации и деградации коллагена в желтой связке; авторы предполагают, что эстрадиол регулирует экспрессию MMP-3 через путь PI3K и способствует гомеостазу внеклеточного матрикса в ligamentum flavum [10].



*Рис. 4. Экспрессия генов, кодирующих рецепторы к эстрадиолу в интраоперационных образцах желтой связки больных со стенозами позвоночного канала:
St – пороговый цикл в ПЦР*

Наши исследования согласуются с работой Mei-Hsiu Chen с соавт. [10] и подтверждают присутствие рецепторов к эстрогену ESR1 и ESR2 в желтой связке больных со стенозами позвоночного канала с использованием других методов исследования, чем применены в вышеприведенной работе. Полученные результаты способствуют пониманию необходимости привлечения специалиста-эндокринолога для выявления фундаментальных особенностей патогенеза и дальнейшего совершенствования схемы лечения. Исследование гормональных аспектов в совокупности с другими клинико-лабораторными данными может дать полезную информацию для понимания фундаментальных основ патогенеза стенозирующих процессов позвоночного канала.

Выводы:

- В желтой связке больных со стенозами позвоночного канала выявлена активная экспрессия генов, кодирующих рецепторы к эстрадиолу (ESR1 и ESR2).
- Активная экспрессия генов, кодирующих рецепторы к эстрадиолу ESR1 и ESR2, на одинаковом уровне наблюдается в желтой связке как у женщин, так и мужчин со стенозами позвоночного канала дегенеративно-дистрофического генеза.
- Экспрессия генов, кодирующих рецепторы к эстрадиолу, может быть одним из факторов, определяющих половозрастные различия в течении дегенеративно-дистрофической патологии позвоночника.

Список литературы

1. Антипко Л.Э. Стеноз позвоночного канала. – Воронеж: ИПФ «Воронеж», 2001. – 272 с.
2. Горбунов А.В. Клинические синдромы при центральных стенозах позвоночно-двигательного сегмента поясничного отдела позвоночника [Текст] / А.В. Горбунов, В.А. Сороковиков, З.В. Кошкарёва, В.Г. Брюханов // Неврологический вестник. – 2009. – Т. XLI, вып.2. – С. 66-68.
3. Кобец Ю.В. Сравнительная оценка трансфораминальных и трансакральных блокад при стенозе поясничного отдела позвоночника [Текст] / Ю.В. Кобец // Журнал «Актуальные проблемы современной медицины: вестник украинской медицинской стоматологической академии. – 2013. – Т.13, № 3 (43). – С. 148-150.
4. Кошкарёва З.В. Взаимосвязь и взаимозависимость клинических синдромов от степени

стенозирующего процесса позвоночного канала на поясничном уровне [Текст] / З.В. Кошкарёва, В.А. Сороковиков, А.В. Горбунов, В.Г. Брюханов, Л.В. Родионова, О.В. Складенко // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2013. – № 2-2 (90). – С. 29-33.

5. Негреева М.Б. Риск развития сопутствующих заболеваний у женщин со стенозом позвоночного канала поясничного отдела позвоночника [Текст] / М.Б. Негреева, С.Н. Ларионов, Л.В. Родионова, В.Э. Потапов, О.В. Складенко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – Т. 56, № 2. – С. 109-110.

6. Негреева М.Б. Демографические особенности пациентов со стенозом позвоночного канала [Текст] / М.Б. Негреева, Л.В. Родионова // Вестник Всероссийской Гильдии протезистов-ортопедов. – 2014. – № 4 (58). – С. 29-30.

7. Негреева М.Б. Динамика лабораторных показателей крови, функциональные показатели сердечно-сосудистой системы и особенности телосложения пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями позвоночника, проживающих в г. Иркутске и Иркутской области: база данных / М.Б. Негреева, Л.В. Родионова, В.А. Сороковиков // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2016620673 от 26 мая 2016 г.

8. Сороковиков В.А. Классификации стенозов позвоночного канала в поясничном отделе позвоночника: обзор литературы [Текст] / В.А. Сороковиков, А.В. Горбунов, З.В. Кошкарёва, В.Г. Брюханов, Н.А. Поздеева // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2010. – № 2. – С. 243-247.

9. Файзуллина Г.И. Влияние женских половых гормонов на серотониновые рецепторы головного мозга [Текст] / Г.И. Файзуллина, Э.М. Нургалина, Л.А. Валеева // Психофармакология и биологическая наркология. – 2008. – Т. 8, № 1-2-2. – С. 2379-2380.

10. Chen M.H. Dose-dependent regulation of cell proliferation and collagen degradation by estradiol on ligamentum flavum [Text] / Chen M.H., Hu C.K., Chen P.R., Chen Y.S., Sun J.S., Chen M.H.// BMC Musculoskelet Disord. – 2014. – V. 15. – P. 238. doi: 10.1186/1471-2474-15-238.

11. Fehlings M.G. The Aging of the Global Population: The Changing Epidemiology of Disease and Spinal Disorders [Text] / Fehlings M.G., Tetreault L., Nater A., Choma T., Harrop J., Mroz T., Santaguida C., Smith J.S.// Neurosurgery. – 2015. – No. 4. – P. 1-5. doi: 10.1227/NEU.0000000000000953.

12. Frick K.M. Epigenetics, oestradiol and hippocampal memory consolidation: review [Text] / Frick K.M. // J. Neuroendocrinol. – 2013. – No. 25(11). – P. 1151-1162. doi: 10.1111/jne.12106.

13. Grumbach M.M. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom [Text] / Grumbach M.M.// J. Pediatr. Endocrinol. Metab. – 2000. – No. 6. – P. 1439-1455.

14. Katulski K. Bone mineral density in women with polycystic ovary syndrome [Text] / Katulski K., Slawek S., Czyzyk A., Podfigurna-Stopa A., Paczkowska K., Ignaszak N., Podkowa N., Meczekalski B. // *J. Endocrinol. Invest.* – 2014. – No. 37(12). – P. 1219-1224. doi: 10.1007/s40618-014-0175-5.
15. Popat V.B. Bone mineral density in young women with primary ovarian insufficiency: results of a three-year randomized controlled trial of physiological transdermal estradiol and testosterone replacement [Text] / Popat V.B., Calis K.A., Kalantaridou S.N., Vanderhoof V.H., Koziol D., Troendle J.F., Reynolds J.C., Nelson L.M. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2014. – No. 99(9). – P. 3418-3426. doi: 10.1210/jc.2013-4145.