

УДК 577.12:612.15:612.82

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

*БЕРЕЖНОЙ Г. А., ЛИСЯНЫЙ Н. Н., *БЕЛИК Я. В., ЧЕРЕНЬКО Т. М.,
*ЛЫХМУС Е. Ю., *КОМИССАРЕНКО С. В., ТУХТАЕВ Н. Х., АРУСТАМЯН Р. С.

НИИ нейрохирургии АМН УССР

*Институт биохимии АН УССР им. А. В. Палладина, Киев

Выявление в крови у больных с различной патологией нервной системы противомозговых антител послужило толчком к выяснению антигенной направленности этих аутоантител. Наиболее часто, как показывает анализ спектра противомозговых антител в индукции аутоиммунных реакций участвуют специфические для нервной ткани белки: S-100, ОБМ—основной белок миелина, нейроспецифическая енолаза или белок 14-3-2, глальный фибриллярный кислый белок и некоторые другие. Определение этих и прочих нейроспецифических белков (НСБ) в биологических жидкостях у больных с помощью высокочувствительных радиоиммунного и иммуноферментного методов при некоторых видах иммунопатологических заболеваний нервной системы позволяет делать некоторые диагностические и прогностические выводы [1—5].

В то же время практически не изучены особенности циркуляции НСБ в крови больных с травматическими поражениями головного мозга [6, 7]. В этой связи в наших исследованиях было изучено содержание маркера олигодендроглии и миелина—ОБМ и нейроспецифического белка 14-3-2 в сыворотке крови больных в ранние сроки после легкой и тяжелой закрытой черепно-мозговой травмы (ЧМТ).

Исследовано содержание нейроспецифических белков ОБМ и 14-3-2 в сыворотке крови 87 больных с закрытой ЧМТ и 21 донора. Определение нейроантисывов проводили методом непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [8]. Принцип метода заключался в двухэтапной постановке реакции: на первом этапе взаимодействовали антиген и антитела в жидкой среде, а затем прореагировавшая смесь вступала во взаимодействие с антигеном, сорбированным на планшете с последующим тестированием вторичными противовидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена.

ОБМ и белок 14-3-2 выделяли из бычьего головного мозга [9, 10]. Получение антисывороток к ОБМ и 14-3-2 описано ранее [10, 11].

Для тестирования конечных этапов определения НСБ методом ИФА использовали конъюгат антивидовых кроличьих иммуноглобулинов с пероксидазой («Amersham», Англия; Институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. Н. Ф. Гамален), а также биотин-стрептавидиновую систему («Amersham», Англия). НСБ сорбировали в течение 18 ч при 3° на планшетах (Dynatech) в концентрации 5 мкг/мл. Для сорбции ОБМ использовали 0,1 М фосфатно-цитратный буфер pH 6,5, для белка 14-3-2—0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфер pH 9,6. Не связавшиеся места на лунках заполняли 1%-ным раствором БСА в 0,01 М фосфатно-солевом буфере pH 7,4 в течение 20 мин при комнатной температуре. Параллельно на втором планшете смешивали исследуемые сыворотки больных или доноров с антисывороткой к соответствующему нейроантигену в разведении, установленном предварительными исследованиями (1:6400 для 14-3-2 и 1:6000 для ОБМ). Исследуемую сыворотку и стандартную тест-систему антигена использовали в трех дублях. Пробы инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре. Впоследствии прореагировавшую смесь исследуемых сыворотки и антисыворотки наносили на планшеты с сорбированными НСБ. После двухчасовой инкубации при 37° планшеты промывали и добавляли конъюгат антивидовых антител с пероксидазой. Инкубация продолжалась 1 ч при 37°. В качестве субстрата использовали 0,08%-ный раствор 5-аминосалициловой кислоты с добавлением 0,005%-ной перекиси водорода. Планшеты фотометрировали на приборе КАИ-Ц-01.

Использование в качестве варианта индикации биотин-стрептавидиновой системы заключалось: а) в добавлении противовидовых биотинилированных антител в разведении, выбранном предварительными исследованиями (1:1000) с последующей инкубацией при 37°; б) в нанесении стрептавидин-биотинилированного ферментного комплекса в разведении 1:1500 и 30 мин, инкубации при 37°.

В качестве субстрата использовали АВТ (0,55 мг 2,2-азинодиэтил-бензиалозолинесульфоновой кислоты) в фосфатно-цитратном буфере pH 4,3 с содержанием 0,002%-ной перекиси водорода. Останавливали реакцию 0,1 н раствором лимонной кислоты с 0,01%-ным азидом натрия. Спектрофотометрировали при длине волны 410 нм.

Определение содержания НСБ, в частности белка 14-3-2, в сыворотке крови здоровых лиц показало, что у 13 из 21 донора (у 62%) концентрация белка находилась за пределами чувствительности ИФА, основанного на применении меченых пероксидазой антител и составляла менее 2 нг/мл. Применение биотин-стрептавидиновой системы позволило добиться повышения чувствительности метода и определить меньшее количество нейронального антигена, вплоть до 0,4 нг/мл. Используя эту модификацию ИФА стало возможным выявить белок 14-3-2 у 21 донора в концентрации $1,67 \pm 0,43$ нг/мл (таблица). При этом средние концентрации, превышающие указанные цифры, считали повышенными и обнаруживали с определенной частотой при гравме мозга различной степени. Так, число отклонений от нормы в содер-

жании белка 14-3-2 у больных с сотрясением мозга и ушибом легкой степени составляло 26—41%. Существенно, до 87—88%, увеличивалась частота повышения концентраций нейронального антигена при тяжелой травме—ушибах мозга средней и тяжелой степени.

Средние значения концентраций белка 14-3-2, определяемого в крови в 1—2-е сутки после травмы, колебались в пределах от 2,5 до 10,2 нг/мл и находились в определенной зависимости от тяжести ЧМТ. При этом значительное увеличение содержания антигена по сравнению с донорским уровнем найдено нами при тяжелой травме мозга. Продолжали возрастать концентрации нейроспецифического антигена в более поздние сроки после ЧМТ—на 5—6 сутки и достигали в среднем 16 нг/мл.

Таблица

Содержание белка 14-3-2 и основного белка миелина (ОБМ) в крови у больных с ЧМТ различной тяжести (в нг/мл)

Тяжесть травмы	Срок после травмы			
	белок 14-3-2		ОБМ	
	1—2 сутки	5—6 сутки	1—2 сутки	5—6 сутки
Сотрясение мозга	2,51±0,71 n=19	3,65±0,99 n=19	16,43±3,97 n=19	18,9*±4,23 n=19
Ушиб легкой степени	4,09±1,13 n=17	5,91**±1,24 n=17	21,23*±5,67 n=17	24,42*±6,38 n=17
Ушиб средней степени	9,57***±1,76 n=16	14,52**±4,14 n=16	42,15**±9,74 n=16	35,41*±10,14 n=16
Ушиб тяжелой степени	10,20***±2,5 n=17	16,53***±4,31 n=17	47,64**±10,55 n=17	37,22**±10,20 n=17
Контрольная группа (доноры)	1,67±0,43 n=21		8,63±2,30 n=21	

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ —достоверность различий изучаемых показателей с показателями у доноров.

По данным единичных публикаций [5], концентрация белка 14-3-2 при кровоизлияниях в мозг травматической природы составляет 364 нг/мл.

Исследования содержания другого специфического для нервной ткани белка—маркера олигодендроглина и миелина не только обнаруживало его повышение в сыворотке крови (по сравнению с донорскими значениями $8,6 \pm 2,3$ нг/мл), но и выявило определенную зависимость между увеличением концентрации ОБМ и степенью деструкции нервной ткани (таблица). В ранние сроки после ЧМТ (1—2 сутки) средние значения концентраций ОБМ находились в пределах от 16,4 до 47,6 нг/мл, причем у некоторых пострадавших выявлялось до 200 нг/мл белка, что свидетельствовало о значительном деструктивном процессе в головном мозгу и проникновении большого количества этого антигена в кровь. По содержанию ОБМ от здоровых существенно отличались не только больные с тяжелыми повреждениями мозга, но и с легким ушибом. Следует отметить, что увеличение содержания ОБМ в сыворотке крови травмированных выявлялось не во

всех случаях. Так, при легкой ЧМТ повышение концентраций антигена в 1—2 сутки после нее обнаруживалось в крови только в 36—58% случаев, при тяжелых повреждениях—в 76—81%.

При исследовании крови пострадавших после ЧМТ на 5—6 сутки после травмы установлено, что концентрации ОБМ имеют тенденцию к возрастанию при легкой травме, а при тяжелых ушибах мозга уже на 1—2 сутки отмечается высокое содержание ОБМ, которое в дальнейшем снижается. Наиболее простым объяснением такой диспропорции может быть медленное нарастание деструктивно-воспалительной иммунопатологической реакции при незначительном легком повреждении головного мозга и быстрое ее развитие при тяжелой травме головного мозга.

Таким образом, обнаружение малых количеств НСБ в сыворотке крови доноров, что стало возможным благодаря биотин-стрептавидиновой модификации ИФА, свидетельствует, с одной стороны, о неполной иммунологической изолированности головного мозга и его аутоантигенов, с другой стороны—о возможном существовании активно-супрессорной формы иммунологической толерантности к этим антигенам в норме. Исследование содержания различных НСБ в ликворе и крови больных с ЧМТ позволяет определять не только тяжесть травмы, но и дифференцировать вовлечение в патологический процесс нейроглии или нейронов, что представляется важным для понимания патогенеза и исходов этого вида патологии.

THE LEVEL OF SOME NEUROSPECIFIC PROTEINS IN BLOOD OF PATIENTS AFTER CEREBRAL TRAUMA

BEREZHNOI G. A., LISYANYI N. I., BELIK Ya. V., CHEREN'KO T. M.,
LYKHIMUS N. Ya., KOMISSARENKO S. V., TUKHTAEV N. Kh.,
ARUSTAMYAN R. S.

Institute of Neurosurgery, USSR Academy of Medical Sciences, Kiev
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

The level of neurospecific proteins has been studied in peripheral blood of donors and patients with cerebral trauma using immunoenzyme analysis (ELISA). It has been demonstrated that the use of non-direct competitive ELISA allows the detection of neurospecific autoantigens in blood. Specifically these antigens include myelin basic protein and protein 14-3-2. After cerebral trauma the level of neurospecific proteins, specifically of protein 14-3-2, in circulating blood depends on the severity of trauma and the time of investigation.

Myelin basic protein appears after mild as well as after severe trauma, whereas protein 14-3-2, a marker of neurons, is detected predominantly after severe trauma. This points out to a different extent of damage of neuroglia and neurons after trauma of different severity. The neurospecific proteins appear in blood immediately after trauma and their level in circulation increases at days 3—5 post-trauma.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Michetti F., Massaro A., Russo G., Rigon G. J. Neurol. Sci., № 41, p. 259—263, 1980.
2. Mokuno K. J. Neurol. Sci., № 60, p. 443—451, 1983.
3. Noppe M. Clin. chim. Acta, v. 155, № 2, p. 143—150, 1986.
4. Palfreyman J. W., Johnston R. V., Ratcliffe J. G. et al. Clin. chim. acta, v. 148, № 3, p. 403—409, 1979.
5. Voller A., Bidwell D. E., Barthe N. A. Bull. world Health organ, № 53, p. 55—65, 1976.
6. Graham D. I., Thomas D. G. T., Brown I. Histopathology, № 7, p. 1—21, 1983.
7. Thomas D. G. T., Palfreyman C. W., Ratcliffe J. G. Lancet, v. 1, p. 113—116, 1978.
8. Zeltner P. M., Schneider S. L., Marangos P. J., Zvelg M. N. J. Natl. Cancer Invest., v. 77, № 3, p. 625—631, 1986.
9. Autilio L. A., Norton W. T., Ferry R. D. J. Neurochem., v. 11, № 1, p. 17—27, 1964.
10. Бережной Г. А. Укр. биохим. журн., т. 56, № 2, с. 123—126, 1984.
11. Лисяный Н. Н., Черенько Т. М., Терлецкая Я. Т. Врачеб. дело, № 10, с. 310—311, 1987.

Поступила 4. VII 1990

N. B. Wery GABA_n. J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester. 350 p., 1990.

ГАМК_B

В историческом аспекте рассматриваются и обобщаются данные литературы о рецепторах ГАМК_B охватывающие фармакологические, биохимические и электрофизиологические аспекты, сведения о возникновении вторичных мессенджеров и их роли в нейротрансмиссии и нейромодуляции.

В книге изложены новейшие сведения о рецепторах ГАМК_B. Так, в ней впервые содержатся данные об антагонистах рецепторов ГАМК_B, проникающих через ГЭБ, благодаря которым можно найти пути для оценки потенциала этих рецепторов как мишеней для препаратов, используемых при лечении эпилепсии, депрессии, расстройствах памяти и болеутоления.