УДК: 616.853–616–071

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЕНОЛАЗЫ, S100B И ГЛИОФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО ПРОТЕИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА IN VITRO

Хикматуллаев Рухулла Забихуллаевич – Ph.D.
Ташкентская медицинская академия (Ташкент, Узбекистан)

Аннотация. *До 3 дней уровни S100B и NSE (нг/мл) были значительно повышены в группе 1по сравнению с группой 2 (S100: 12,45 ± 5,46 против 5,64 ± 3,36; NSE: 313,20 ± 45,51 против 107,80 ± 112,10). Уровни GFAP не различались между группами. В группе 2B уровни S100B, GFAP и NSE все еще были повышены по сравнению с 3 группой (4,59 ± 2,19, 2,48 ± 2,55 и 89,80 ± 131,10 соответственно). Чтобы сравнить S100B и NSE для прогнозирования мы выполнили кривые рабочих характеристик. При наступлении травмы уровень NSE в цереброспинальной жидкости предсказывает смерть мозга точнее, чем S100B. Ранние повышения (до 3 дней) S100B и NSE вследствие тяжелой ТСМ предсказывают ухудшение состояния вплоть до смерти мозга. Однако эта особенность была более выраженно связана с NSE, чем с S100B.*

Ключевые слова: *травма спинного мозга, нейронспецифическая енолаза, S100B, глиофибриллярный кислый протеин, моделирование, эксперимент, крысы, корреляция, критерий Спирмена.*

CORRELATION RELATIONSHIPS BETWEEN NEURON-SPECIFIC ENOLASE, S100B, AND GLIOFIBRILLARY ACIDIC PROTEIN DURING SPINAL CORD INJURY MODELING IN VITRO

Khikmatullaev Rukhulla Zabiullaevich – Ph.D.
Tashkent Medical Academy (Tashkent, Uzbekistan)

Abstract: *Up to day 3, S100B and NSE (ng/mL) levels were significantly elevated in group 1 compared with group 2 (S100: 12.45 ± 5.46 vs. 5.64 ± 3.36; NSE: 313.20 ± 45.51 vs. 107.80 ± 112.10). GFAP levels did not differ between groups. In group 2B, S100B, GFAP, and NSE levels were still elevated compared with group 3 (4.59 ± 2.19, 2.48 ± 2.55, and 89.80 ± 131.10, respectively). To compare S100B and NSE for prognosis, we performed receiver operating characteristic curves. At the onset of injury, the level of NSE in the cerebrospinal fluid predicts brain death more accurately than S100B. Early increases (up to 3 days) in S100B and NSE following severe SCI predict deterioration up to brain death. However, this feature was more significantly associated with NSE than with S100B.*

Keywords*: spinal cord injury, neuron–specific enolase, S100B, glial fibrillary acidic protein, modeling; experiment, rats, correlation, Spearman's test.*

ИН ВИТРО ШАРОИТИДА ОРҚА МИЯ ЖАРОҲАТИНИ МОДЕЛЛАШТИРИШДА НЕЙРОНСПЕЦИФИК ЭНОЛАЗА, S100B ВА ГЛИОФИБРИЛЛЯР КИСЛОТАЛИ ОҚСИЛ ЎРТАСИДАГИ КОРРЕЛЯЦИОН АЛОҚАЛАР

Ҳикматуллаев Рухулла Забиҳуллоевич – Ph.D.
Тошкент тиббиёт академияси (Тошкент, Ўзбекистон)

Izoh. *3 kungacha S100B va NSE darajalari (ng/ml) 1–guruhda 2–guruhga nisbatan sezilarli darajada oshdi (S100: 12,45 ± 5,46 va 5,64 ± 3,36; NSE: 313,20 ± 45,51 107,80 ± 1 ga nisbatan). GFAP darajalari guruhlar orasida farq qilmadi. 2B guruhida S100B, GFAP va NSE darajalari 3–guruh bilan solishtirganda hali ham yuqori edi (mos ravishda 4,59 ± 2,19, 2,48 ± 2,55 va 89,80 ± 131,10). S100B va NSEni bashorat qilish uchun solishtirish uchun biz ishlash egri chiziqlarini bajardik. Shikastlanish boshlanishida miya omurilik suyuqligi NSE darajasi miya o'limini S100B ga qaraganda aniqroq taxmin qiladi. Og'ir SCI tufayli S100B va NSE ning erta ko'tarilishi (3 kungacha) miya o'limiga qadar yomonlashishini taxmin qiladi. Biroq, bu xususiyat S100Bga qaraganda NSE bilan kuchliroq bog'langan.*

Kalit so'zlar*: orqa miya shikastlanishi, neyronga xos enolaza, S100B, gliofibrilyar kislotali oqsil, modellashtirish, tajriba, kalamushlar, korrelyatsiya, Spearman testi.*

Актуальность. Повреждение спинного мозга (ПСМ) запускает сложный каскад молекулярных и химических событий, который приводит к прогрессирующей потере клеток и повреждению тканей [2]. Почти столетие фундаментальных исследований фундаментальной науки раскрыло важные механизмы, лежащие в основе патофизиологии ПСМ, и дало информацию о разработке перспективных экспериментальных стратегий лечения. Однако эффективное клиническое применение этих методов лечения потребовало дальнейшего изучения пространственной и временной интеграции каскадов сигнализации, вызванных травмой, гетерогенности патогенеза в образцах травм наряду с глобальными изменениями на уровне нейронной сети, которые происходят после ПСМ [1,3].

Травма спинного мозга (ТСМ) – это катастрофическое неврологическое состояние, приводящее к повышенной физической зависимости, сопутствующим заболеваниям, психологическому стрессу и экономическому бремени. Ежегодно новые ТСМ поражают 250 000–500 000 человек [5]. Финансовые расходы на протяжении всей жизни, связанные со ТСМ, для пострадавших оцениваются в 3 миллиона долларов. Дорожно–транспортные происшествия, падения и спортивные травмы являются наиболее распространенной причиной ТСМ в развитых странах [6].

Большинство этих исследований основаны на корреляциях между уровнями сывороточных белков с результатами нейровизуализации, клиническими оценками и нейропсихологической оценкой. Однако меньше исследований изучали корреляцию с уровнями спинномозговой жидкости (СМЖ). Кроме того, при лечении травмы спинного мозга было показано, что выбор жидкости и осмотерапии, по–видимому, влияет на уровни сывороточных биомаркеров и исход после травмы спинного мозга [4,7].

Цель исследования. Изучить корреляционные взаимосвязи нейронспецифической енолазы, S100B и глиофибриллярного кислого протеина при моделировании травмы спинного мозга in vitro.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 180 крысах самцах на модели травмы позвоночника. Экспериментальную травму позвоночника воспроизводят согласно модификации стандартной модели контузионной травмы спинного мозга средней степени тяжести (Кубрак Н.В., Краснов В.В. 2015). Содержание животных, оперативные вмешательства и вывод из эксперимента осуществляли на основе этических принципов, декларированной Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене дня и ночи. Эксперименты проводились в условиях спонтанного дыхания и температуры окружающей среды 24–25°С.

В качестве экспериментальных животных используют беспородные половозрелые крысы–самцы массой 200–230 г. При исследовании животные разбиты на три группы: первая контрольная – 6 животных, которые содержались в условиях вивария в течение всего эксперимента при t = 22° С. Вторая группа, состоящая из 20 животных, поясничный отдел позвоночника, которых

был травмирован грузом весом 250 г с высоты 20 см. В третью группу входили 20 животных, поясничный отдел позвоночника, которых был травмирован грузом весом 250 г с высоты 40 см.

Крысам проводился забор венозной крови путем венепункции. Полученные образцы крови центрифугировались и замораживались при температуре – 32°C. Концентрация нейрон–специфической энолазы в сыворотке определялась методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест–систем (Fujirebio). Анализ S100B в образцах крови были получены в течение 6 ч после травмы, а образцы сыворотки были проанализированы с помощью анализа Elecsys S100 (Roche Diagnostics, Индианаполис, Индиана, США). Оценка нейроспецифических белков глиофибриллярного кислого протеина (GFAP), в сыворотке крови у крыс проводилась методом двухцентрового иммуноферментного анализа на основе колоночной иммуносорбционной хроматографии (ДИФАИХ).

Статистические методы исследования. Для каждого нейробиохимического маркера образцы были взяты вместе в одном эксперименте, и коэффициент вариации составил менее 5% для образцов и стандартов. Данные были отправлены на тестирование Колмогорова–Смирнова для оценки нормальности. Данные были проанализированы с использованием теста Манна–Уитни. Корреляции между числовыми переменными были выполнены с помощью теста Пирсона. Числовые переменные были приведены как среднее стандартное отклонение. P<0.05 считалось статистически значимым различием.

Результаты исследования. Крысы с ТСМ (измерения с 1–го по 3–й день после ТСМ) показали повышенные уровни CSF S100B (7,34 ± 4,87), GFAP (5,32 ± 3,41) и NSE (159,20 ± 134,30) по сравнению с контрольными лицами (S100B: 2,51 ± 0,52; GFAP: 0,00 ± 0,00; NSE: 1,01 ± 0,72 соответственно) (P<001). Это указывает на то, что ТСМ вызвала общее повреждение нервных клеток (S100B и GFAP, и NSE, нейроны) и отражает первичное повреждение мозга в результате тяжелой ТСМ. Различия между каждой группой во всех измерениях составили **P<0.05.

Уровни S100B были значительно повышены в 1 группе по сравнению с 2 группой (12,45 ± 5,46 против 5,64 ± 3,36). Аналогично, уровни NSE были повышены в 1 группе по сравнению с 2 группой (313,20 ± 45,51 против 107,80 ± 112,10). Уровни GFAP не различались между группами (1 группа: 7,30 ± 1,85 против 2 группы: 4,56 ± 3,62) (рисунок 1).

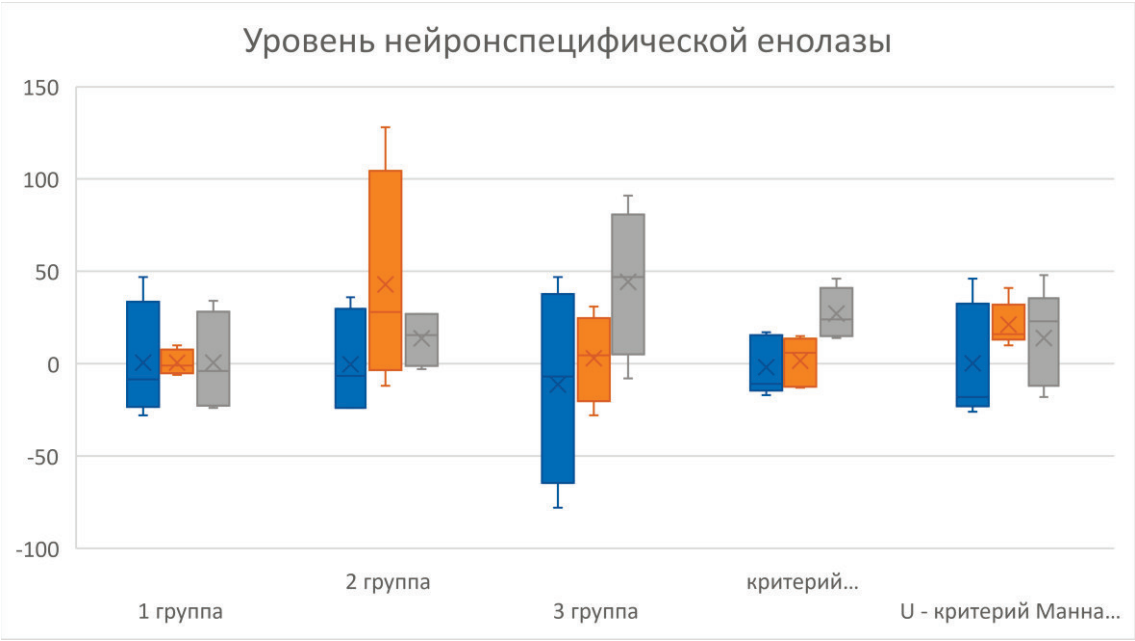
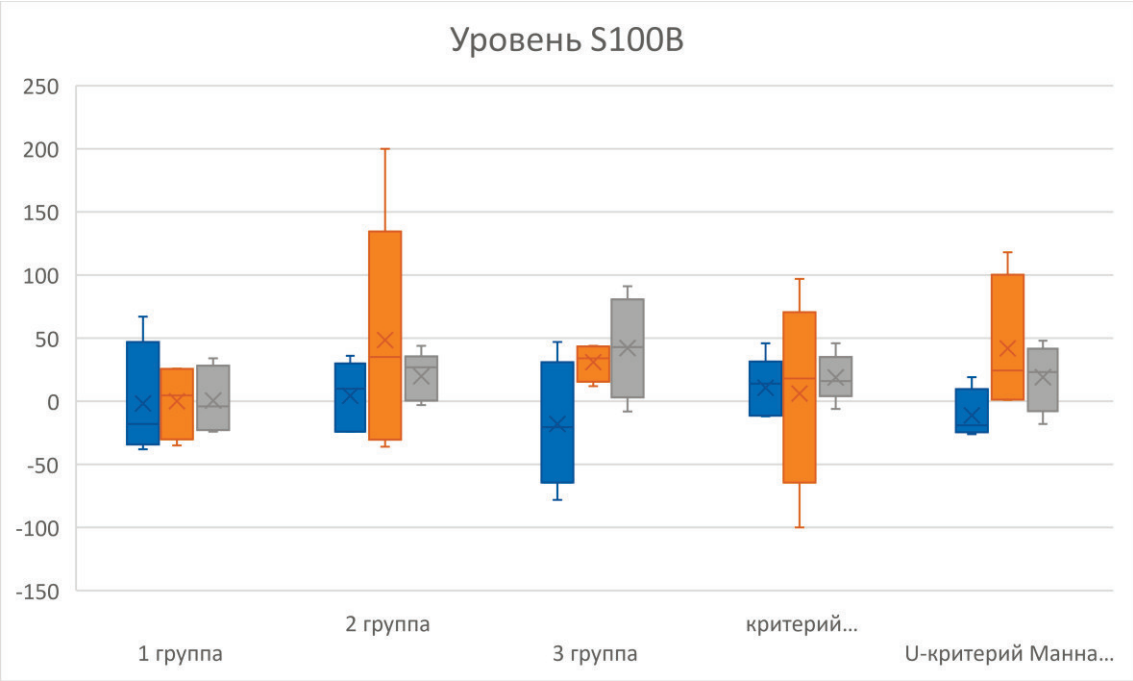
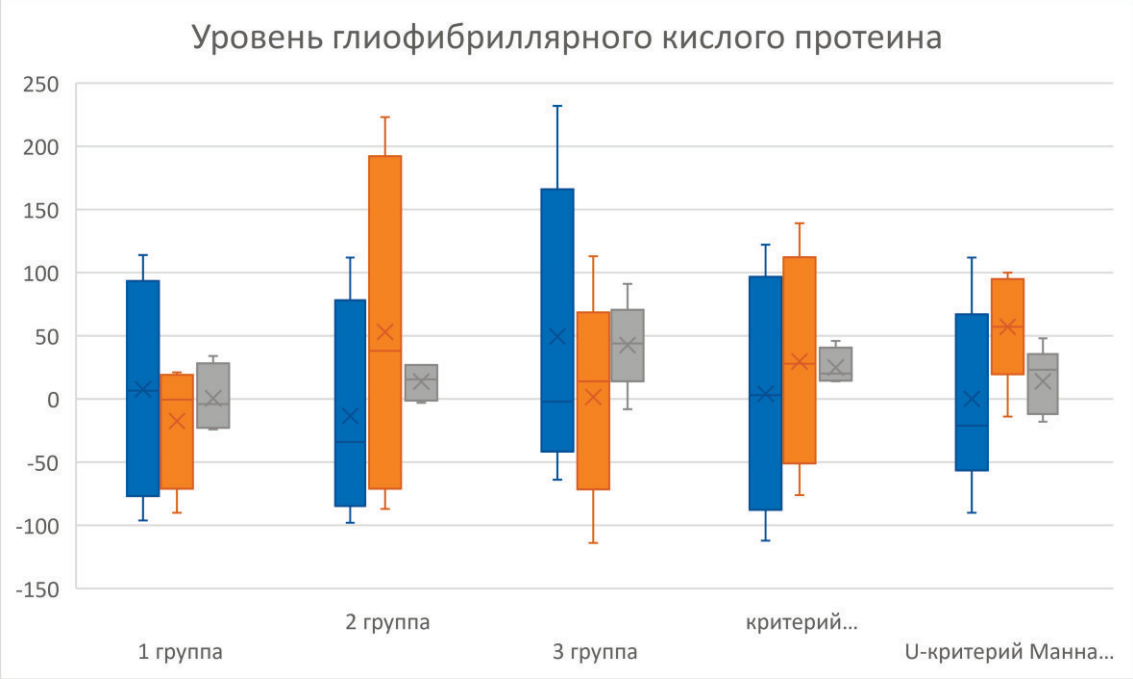


Рис. 1. **Уровни различных биомаркеров в первые дни травмы спинного мозга.**





Была выявлена значимая корреляция между уровнями S100B и GFAP в 1 группе (R = 0,93, P<0.01).

Уровни S100B снизились почти в 2 раза в группе 2 по сравнению с группой 1, но корреляции с GFAP оставались значимыми (R = 0,72, P<0.05 и R = 0,93, P<0.01, соответственно).

Была статистически значимая корреляция между уровнями NSE и GFAP в группах1 (R = 0,74, P <0.04) и B (R = 0,78, P<0.03). За исключением, все еще существует статистически значимая корреляция при более низких уровнях GFAP и NSE (группа 1 против группа 2). В группе 2 уровни NSE составляли приблизительно 300–370 нг/мл, а вариация уровней S100B составляла приблизительно 4–20 нг/мл; в группе 3 (уровни NSE были ниже 120 нг/мл, а вариация уровней S100B составляла приблизительно от 3 до 12 нг/мл.

Уровни NSE показали лишь небольшое снижение от группы 1 к группе 2 в течение 7 дней после ТСМ. Тем не менее, ста-

тистически значимая корреляция между уровнями NSE и S100B наблюдалась только в группе 2 (R = 0,87, P< 0.09).

В целом, ТСМ немедленно увеличила уровни нейробиохимических маркеров в СМЖ, что было более выражено в группе 1. На ранней стадии после ТСМ (до 3 дней) только уровни GFAP не отличались между группами 1 и 2. На поздней стадии (4–7 дней) все еще наблюдалось некоторое проявление повреждения нервных клеток у крыс группы 2.

Заключение и обсуждение. В этом исследовании мы изучили уровни мозговых белков в СМЖ у крыс с тяжелой ТСМ. Предварительно мы продемонстрировали, что уровни СМЖ S100B, GFAP и NSE были повышены у крыс с тяжелой ТСМ по сравнению с контрольными лицами, что в нашем понимании отражает первичное повреждение мозга, в частности, астроцитов и нейронов. Более того, до 3 дней с момента нанесения травмы уровни S100B и NSE были выше у крыс 1 группы по сравнению с 2 группой, что предполагает роль в раннем прогнозировании летального исхода с различной степенью специфичности и чувствительности. Напротив, уровни СМЖ GFAP не могли отражать клинический исход.

Учитывая клеточную специфичность этих нейронных белков, можно предположить, что группа 1представила меньше нейрональное повреждение (уровни NSE) по сравнению с группой 2. До сих пор хорошо известно, что GFAP высвобождается в СМЖ/сыворотку вторично по отношению к повреждению мембран астроцитов, и белок S100B может высвобождаться в СМЖ/сыворотку из–за повреждения и/или секреции. Принимая во внимание эти особенности, уровни астроглиальных белков в жидкостях организма могут отражать как повреждение, так и физиологические реакции астроцитов, пытающихся сохранить нейронную функцию и выживание. Астроциты играют активную и жизненно важную роль в ЦНС, включая регуляцию развития мозга, поддержание клеточного гомеостаза и репаративные ответы на острые и хронические мозговые инсульты.

Выводы. Комбинированная оценка глиальных (S100B и GFAP) и нейрональных (NSE) белков в СМЖ позволяет нам предположить, что повышенные уровни S100B до 7 дней с момента наступления травмы могут отражать нейропротекторную роль реактивного астроглиоза. Кроме того, в соответствии с предыдущими отчетами по сыворотке/СМЖ, раннее повышение (до 3 дней) уровней S100B и NSE в СМЖ вследствие тяжелой ТСМ могло предсказать крыс, у которых наступит ухудшение. Эта особенность была более выраженно связана с уровнями NSE, чем S100B.

Литература.

1. Rofik A, Ambarsari U, Sodali HA, et al. The Relationship Between Leukocytes Numbers and Consciousness Level of Craniotomy Patients at The Jemursari Islamic Hospital Surabaya in 2018–2019. Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology. 2021; 3(2): 81–89; doi: 10.33086/ijmlst.v3i2.1889.

2. Saleh SC. Sinopsis Neuroanestesia Klinik. Zifatama: Surabaya; 2013.

3. Hamzah. Terapi Nutrisi Pada Cedera Otak Traumatik. Airlangga University Press; 2020.

4. Cheng F, Yuan Q, Yang J. The Prognostic Value of Serum NeuronSpecific Enolase in Traumatic Brain Injury: Systematic Review and Meta–Analysis. PLoS ONE. 2014;9(9).

5. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. Curr Opin Cell Biol. 2015; 32:121–130; doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.004.

6. Thelin EP, Jeppsson E, Frostell A, et al. Utility of neuron–specific enolase in traumatic brain injury; relations to S100B levels, outcome, and extracranial injury severity. Crit Care. 2016;20(1):285; doi: 10.1186/s13054–016–1450–y.

7. Berger RP. The Use of Serum Biomarkers to Predict Outcome After Traumatic Brain Injury in Adults and Children. Journal of Head Trauma Rehabilitation. 2006;21(4):315–333; doi: 10.1097/00001199–200607000–00004.