

## Иммуно-биохимические показатели в ранней диагностике хронической ишемии головного мозга

*Нечунаева Е.В.<sup>1</sup>, Шумахер Г.И.<sup>2</sup>, Воробьева Е.Н.<sup>2</sup>, Тимошников А.В.<sup>2</sup>, Хорева М.А.<sup>2</sup>*

## Immune and biochemical indexes in early diagnostics of chronic brain ischemia

*Nechunaeva Ye.V., Shumakher G.I., Vorobiyova Ye.N., Timoshnikov A.V., Khoreva M.A.*

<sup>1</sup> КГУЗ «Диагностический центр Алтайского края», г. Барнаул

<sup>2</sup> Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

© Нечунаева Е.В., Шумахер Г.И., Воробьева Е.Н. и др.

Представлены результаты клинического и лабораторного исследования 106 больных с хронической ишемией головного мозга (ХИМ) I—II стадии, которое включало определение количества циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, эндотелина-1, титра аутоантител к мозгоспецифическим белкам: энцефалитогенному протеину, нейроспецифической енолазе и белку S100. Выявленные изменения иммунного статуса, а также признаки эндотелиальной дисфункции прогрессировали со стадией ХИМ. Найдена прямая корреляция между степенью дисфункции эндотелия и активностью нейродегенеративного процесса в головном мозге.

**Ключевые слова:** хроническая ишемия головного мозга, дисфункция эндотелия, нейродегенеративный процесс, циркулирующие десквамированные эндотелиоциты, эндотелин-1, нейроспецифические белки.

The paper presents results of clinical and laboratory investigation of 106 patients with chronic brain ischemia (CBI) I—II stages, included detection levels of circulating desquamated endothelial cells, endothelin-1, autoantibodies to encephalitogenic protein, neuron-specific enolase and protein S100. Reliable changes of immune status as well as signs of endothelium dysfunction progressed with stage of CBI. Direct correlation between intensity of endothelium dysfunction and activity of neurodegenerative process in brain was revealed.

**Key words:** chronic brain ischemia, neurodegenerative process, circulating desquamated endothelial cells, endothelin-1, neurospecific proteins.

УДК 616.831-005.4-002.2-072:612.015/017

### Введение

Несмотря на отчетливые успехи в области лечения инсульта, наиболее оптимальным подходом остается первичная профилактика, в первую очередь ранняя диагностика хронической ишемии головного мозга (ХИМ), когда патологический процесс еще обратим, а профилактические мероприятия наиболее эффективны. Однако клиническая картина ранних стадий ХИМ проявляется в виде неспецифических психоневрологических синдромов, а имеющиеся критерии постадийной диагностики основаны не на объективных количественных параметрах, а на степени выраженности неврологической симптоматики. Существующие ме-

тоды исследования на ранних стадиях часто бывают малоинформативны или неспецифичны.

В настоящее время накопилось большое количество научных данных, свидетельствующих о ключевой роли сосудистого эндотелия в инициации гипертонического и атеросклеротического поражения сосудов [6, 12]. Оценка морфологического и функционального состояния эндотелия диктуется тем, что он является важной составной частью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), повреждение которого ведет к запуску сложного каскада аутоиммунных реакций в головном мозге [3, 5]. В этом плане перспективным направлением научных исследований является изучение нейроспецифических белков (НСБ) и антител

к ним, отражающих степень нейроиммунной аутоагрессии при повреждении ГЭБ [4, 8, 10].

Цель исследования — определить диагностическое значение показателей нейродегенеративных процессов и дисфункции эндотелия на ранних стадиях хронической ишемии головного мозга.

## Материал и методы

В основу работы положены данные 106 больных ХИМ, проходивших обследование в КГУЗ «Диагностический центр Алтайского края» (г. Барнаул) в 2005—2008 гг. Средний возраст обследуемых составил ( $55,6 \pm 2,2$ ) года. Диагноз ХИМ и ее стадия устанавливались в соответствии с существующими критериями [11]. Длительность заболевания составляла в среднем ( $4,8 \pm 0,6$ ) года. Среди обследованных с ХИМ I стадии было 50 человек, ХИМ II стадии — 56. Контролем служили показатели обследования 42 практически здоровых людей без объективных проявлений ХИМ, не предъявлявших жалобы на состояние здоровья. Группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Клиническими критериями исключения из исследования являлись: возраст менее 35 и более 70 лет, ХИМ III стадии, энцефалопатия другой этиологии, инсульт и инфаркт миокарда в анамнезе, заболевания сердца, крови, тяжелая соматическая патология в стадии декомпенсации, сопутствующие эндокринные, наследственно-дегенеративные, онкологические, аутоиммунные, воспалительные заболевания в стадии обострения.

Из биохимических маркеров, отражающих активность атеросклероза на начальных стадиях цереброваскулярной недостаточности, определяли показатели липидного обмена, уровень высокочувствительного С-реактивного белка (hs-СРБ) и фибриногена.

Морфологическое состояние эндотелиальной стенки оценивали по количеству циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов (ЦДЭ) с помощью методики J. Hladovec [14], модифицированной Р.И. Воробьевым [1]. Способ основан на изоляции клеток эндотелия с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата. Количество ЦДЭ подсчитывали в камере Горяева методом фазово-контрастной микроскопии. Функциональное состояние эндотелиальной стенки оценивали по уровню эндотелина-1 (ЭТ-1) методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартного набора реактивов BioMedica (Австрия).

Результаты лабораторного исследования сопоставляли с данными ультразвукового дуплексного сканирования брахиоцефальных и транскраниальных сосудов.

Активность нейродегенеративных процессов оценивали по концентрации в сыворотке крови НСБ, отражающих процессы дегенерации различных клеток нервной ткани: нейрон-специфической енолазе (НСЕ) — маркеру повреждения преимущественно нейронов [8, 10], концентрации белка S100 — маркеру астроглии [8, 10] и по количеству аутоантител к энцефалитогенному протеину (ЭП) — эпитопу основного белка миелина, маркеру олигодендроцитов и миелина [7, 8, 10]. Концентрацию НСБ определяли методом ИФА при помощи стандартных наборов реактивов: CanAg NSE EIA, CanAg S100 EIA, «НИКОМ-Цереброскрин» соответственно.

Полученные результаты обработаны статистически с использованием пакетов прикладных программ Statistica 5.5 for Windows, Microsoft Office Excel 2003. Достоверность различий между средними значениями показателей в группах оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Корреляционные связи между изучаемыми показателями исследовали с помощью коэффициента ранговой корреляции *r* Спирмена [2].

## Результаты и обсуждение

Биохимическое исследование показателей липидного профиля не выявило значимых различий между стадиями. При анализе показателей липидного обмена при различных вариантах поражения магистральных артерий головы (МАГ) достоверно более выраженные нарушения регистрировались в группе больных со стенозами, патологическими извитостями и сочетанными поражениями артерий ( $p < 0,05$ ).

У больных ХИМ установлены достоверные признаки активности атеросклероза в виде повышения hs-СРБ и фибриногена, причем более высокие значения регистрировались при II стадии ХИМ ( $p < 0,05$ ). Уровень hs-СРБ у больных ХИМ был в 2 раза выше, чем в контроле ( $4,46 \pm 0,45$ ) и ( $2,18 \pm 0,34$ ) мг/л соответственно;  $p < 0,01$ ) и соответствовал очень высокому риску цереброваскулярных осложнений. При этом hs-СРБ был выше у больных с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях с развитием стеноза или без

него, чем у больных без бляшек либо утолщенным КИМ. Гиперфибриногенемия выявлялась достоверно чаще у мужчин, чем у женщин (54,5 и 19,4% соответственно;  $p < 0,05$ ). Возможно, это связано со значительно большей долей курильщиков в группе мужчин (88,5% от всех курящих).

Результаты исследования маркеров эндотелиальной дисфункции (ЭД) показали, что у больных ХИМ имеются достоверные признаки ЭД как по морфологическому состоянию — повышение уровня ЦДЭ, так и по функциональному состоянию — повышение ЭТ-1.

У 95 (89,6%) больных ХИМ было выявлено повышение уровня ЦДЭ. На рис. 1 представлена фотография ЦДЭ в камере Горяева. Среднее количество ЦДЭ в основной группе было в 2,3 раза выше, чем в контрольной группе ( $(6,1 \pm 0,7)$  и  $(2,7 \pm 0,3)$  клетки на 100 мкл соответственно;  $p < 0,001$ ). Повышение десквамации эндотелиоцитов регистрировалось у 41 (82,0%) пациента с ХИМ I стадии и у 54 (96,4%) больных II стадии. Среднее количество ЦДЭ при I стадии было в 2 раза выше, чем в контрольной группе. Между стадиями разница также была статистически значимой ( $p < 0,01$ ).

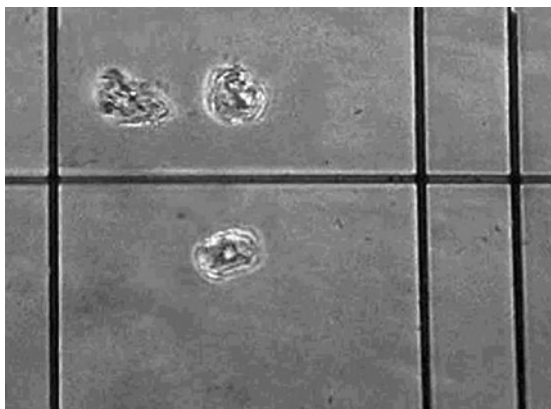


Рис. 1. ЦДЭ больного ХИМ II стадии после автоматизированной компьютерной обработки изображения

Повышение концентрации ЭТ-1 по сравнению с контролем было выявлено у 86 (81,0%) больных ХИМ: у 66,0% больных I стадии и 95,0% больных II стадии. Средний уровень в основной группе превышал 2,5 раза контрольное значение ( $(1,02 \pm 0,13)$  и  $(0,41 \pm 0,06)$  фмоль/мл соответственно;  $p < 0,001$ ). Показательно резкое повышение ЭТ-1 во II стадии ХИМ ( $(1,21 \pm 0,15)$  фмоль/мл) в 1,8 раза по сравнению с I

стадией ( $(0,66 \pm 0,08)$  фмоль/мл;  $p < 0,001$ ) и в 3 раза по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ).

Содержание маркеров ЭД у больных ХИМ увеличивалось даже при отсутствии структурных изменений МАГ по данным дуплексного сканирования и возрастало по мере течения заболевания. При этом максимальная степень десквамации эндотелиоцитов и максимальный уровень ЭТ-1 наблюдались в группе больных с наличием гемодинамически значимого стеноза и (или) деформации МАГ ( $p < 0,05$ ). Выявленная особенность отражает прогрессирующий характер морфологического и функционального поражения эндотелия и важна для диагностики ранних этапов атерогенеза при ХИМ.

Иммуноферментный анализ показал, что уже на ранних стадиях ХИМ развивается генерализованная аутоиммунизация к структурным компонентам нервной ткани в виде повышения содержания НСБ и антител к ним. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у больных ХИМ больше всего страдает микроглия (повышение S100), которая, имея трофическую и регуляторную функцию, способствует выживаемости нейронов. Несколько менее выражены процессы демиелинизации (повышение антител к ЭП), и только в развернутых стадиях в нейродегенеративный процесс вовлекаются нейроны (повышение НСЕ) (рис. 2).

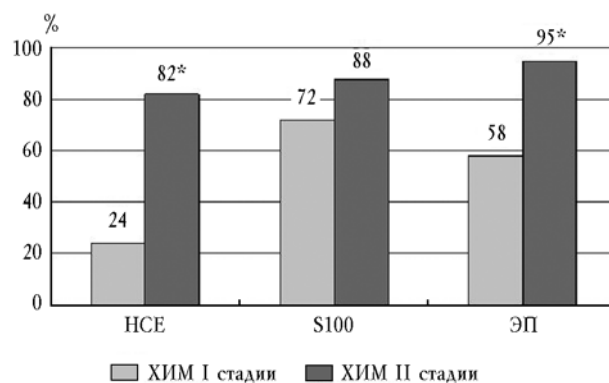


Рис. 2. Распространенность повышенных проб НСБ по стадиям ХИМ: \* —  $p < 0,05$  при сравнении показателей ХИМ I и II стадии

При анализе по стадиям выявлены следующие изменения. В I стадии в первую очередь страдали астроглиальные клетки мозга (повышение S100 в 72,0% случаев), несколько менее были выражены процессы демиелинизации (повышение антител к ЭП в 58%), а нейроны оставались относительно сохранными (повышение НСЕ в 24%). Во II стадии процессы дегене-

рации усиливались, но не было четкого преобладания дегенерации определенного вида клеток (рис. 2).

При анализе средних значений НСБ по стадиям обнаружены следующие особенности. Если для белка S100 и ЭП показательное резкое повышение уровня уже на I стадии, то для НСЕ характерно повышение только во II стадии (рис. 3).

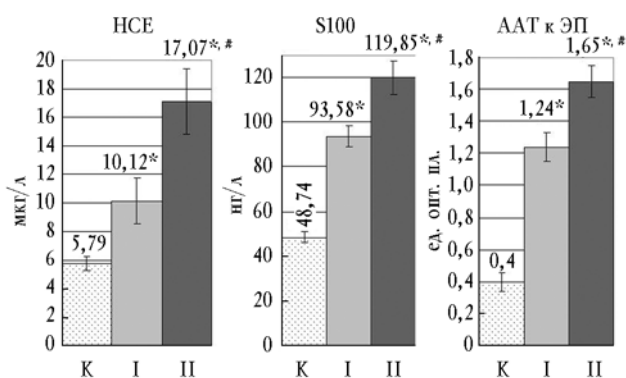


Рис. 3. Средние значения НСБ в группах исследования: \* —  $p < 0,01$  при сравнении с показателями контрольной группы; <sup>#</sup> —  $p < 0,01$  при сравнении показателей ХИМ I и II стадии

В I стадии средний уровень НСЕ хоть и был достоверно выше контроля в 1,7 раза ( $p < 0,01$ ), однако не выходил за границы максимально допустимых концентраций НСЕ по данным литературы (13 мкг/л) [9, 10, 15, 16]. Для II стадии характерно резкое повышение уровня НСЕ в 1,7 раза по сравнению с уровнем в I стадии ( $p < 0,01$ ), а также достаточно большой размах значений — от 13,37 до 54,40 мкг/л.

Средняя концентрация белка S100 уже в I стадии была выше нормы (38—70 нг/л) [9, 10, 13, 15, 16] и превышала показатель контрольной группы в 1,9 раза ( $p < 0,001$ ). У больных II стадии концентрация S100 превышала контроль в 2,5 раза ( $p < 0,001$ ). Различия между средними значениями S100 по стадиям были достоверны ( $p < 0,01$ ).

Уровень антител к ЭП в I стадии ХИМ был немного выше нормы ( $K < 1,2$  ед. опт. пл.) [7, 9, 10], но в 3,1 раза превышал показатель контрольной группы ( $p < 0,001$ ). Между стадиями ХИМ также были установлены статистически значимые различия ( $p < 0,01$ ).

Проанализирована зависимость между выраженностью эндотелиальной дисфункции и активностью нейродегенеративных процессов. Между количеством ЦДЭ и НСБ регистрировалась сильная корреляционная связь. При I стадии ХИМ прослеживалась сильная

зависимость между ЦДЭ и белком S100 и ЭП, что, по-видимому, подтверждает связь процесса деэндотелизации сосудов и нарушения ГЭБ с активацией процессов демиелинизации и дегенерации микроглии на начальных стадиях ХИМ. При II стадии наибольшая зависимость наблюдалась в отношении ЦДЭ к маркеру гибели нейронов (НСЕ), что свидетельствует о вовлечении в процесс дегенерации на II стадии нейронов. Связь ЭТ-1 с НСБ была меньшей по силе. Более сильная связь отмечалась при II стадии ХИМ.

## Выводы

1. На начальных стадиях ХИМ наблюдается дисфункция эндотелия, проявляющаяся прогрессивной десквамацией эндотелиоцитов, повышением уровня эндотелина-1 и высокочувствительного С-реактивного белка. Повышение маркеров эндотелиальной дисфункции регистрируется при отсутствии структурных изменений МАГ по данным дуплексного сканирования.

2. Концентрация НСЕ, S100 и антител к ЭП повышена на ранних стадиях ХИМ, что свидетельствует о хронически протекающем нейродегенеративном процессе в веществе мозга. Изменения нейроспецифических белков в I стадии ХИМ выявляют повреждение микроглии и процессы демиелинизации, а во II стадии ХИМ присоединяется прогрессирующая дегенерация нейронов.

3. Повышение уровня нейроспецифических белков у больных ХИМ коррелирует с выраженностью эндотелиальной дисфункции. При I стадии ХИМ прослеживается сильная зависимость между ЦДЭ и маркером микроглии (S100), маркером миелина (антителами к ЭП). Во II стадии ХИМ наибольшая зависимость наблюдается в отношении ЦДЭ, ЭТ-1 к маркеру гибели нейронов (НСЕ).

## Литература

1. Воробьев Р.И. Рационализаторское предложение «Определение количества десквамированных эндотелиальных клеток в плазме крови» № 791 от 04.07.2005.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. Ю.А. Данилова; под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. М.: Практика, 1999. 459 с.
3. Жданов Г.Н., Герасимова М.М. Оценка роли аутоиммунной воспалительной реакции в патогенезе церебральной ишемии // Невролог. вестн. 2003. Т. 35, № 3/4. С. 13—17.
4. Мартынова Г.И. Клинико-иммунологические сопоставления при хронической ишемической болезни мозга ате-

- росклеротического генеза // Журн. неврологии и психиатрии (прил. Инсульт). 2001. Вып. 2. С. 40—44.
5. *Одинак М.М., Вознюк И.А.* Повреждение и защита гематоэнцефалического барьера при ишемии // Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / под ред. Н.Н. Петрищева. СПб.: СПбГМУ, 2003. С. 146—171.
6. *Петрищев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д. и др.* Диагностическая ценность циркулирующих эндотелиальных клеток в крови // Клинич. лаб. диагностика. 2001. № 1. С. 50—52.
7. *Ребенко Н.М., Ауценилюс А.И., Абрамов В.В. и др.* Уровни антител к энцефалитогенному протеину как критерий степени тяжести у больных с острым ишемическим инсультом // Нейроиммунология: Исследования. Клиника. Диагностика. Лечение. 2003. Т. 1, № 4. С. 23—26.
8. *Скворцова В.И., Шерстнёв В.В., Константинова Н.А. и др.* Участие аутоиммунных механизмов в развитии ишемического повреждения головного мозга // Журн. неврологии и психиатрии. 2005. Т. 105, № 8. С. 36—40.
9. *Хаджиева М.Х., Скворцова В.И., Шерстнев В.В. и др.* Изучение нейротрофических факторов и аутоантител к ним у больных с хронической ишемией головного мозга // Современные подходы к диагностике и лечению нервных и психических заболеваний. СПб., 2000. 341 с.
10. *Чехонин В.П., Гурина О.И., Дмитриева Т.Б.* Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам. М.: Медицина, 2007. 344 с.
11. *Шмидт Е.В.* Сосудистые заболевания головного и спинного мозга. М.: Медицина, 1985. 259 с.
12. *Dimmeler S., Hermann C., Zeiher A.M.* Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? // Eur. Cytokine Netw. 1998. V. 9. P. 697—698.
13. *Fagnart O.C., Sindic C.M.J., Laterre C.* Particle counting immunoassay of S100 protein in serum. Possible relevance in tumors and ischemic disorders of the central nervous system // Clin. Chem. 1988. V. 34. P. 1387—1391.
14. *Hladovec J.* Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions // Physiol. Bohemoslov. 1978. V. 27, № 2. P. 140—144.
15. *Lamers K.J.B., van Engelen B.G.M., Gabreels F.J.M. et al.* Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders // Acta Neurol. Scand. 1995. V. 92. P. 247—251.
16. *Missler U., Wiesmann M., Friedrich C. et al.* S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke // Stroke. 1997. V. 28. P. 1956—1960.

Поступила в редакцию 27.01.2011 г.

Утверждена к печати 21.02.2011 г.

#### Сведения об авторах

*Е.В. Нечунаева* — КГУЗ «Диагностический центр Алтайского края» (г. Барнаул).

*Г.И. Шумахер* — д-р мед. наук, профессор кафедры нервных болезней с курсом неврологии и рефлексотерапии ФПК и ППС АГМУ (г. Барнаул).

*Е.Н. Воробьева* — д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики АГМУ (г. Барнаул).

*А.В. Тимошиков* — кафедра нервных болезней с курсом неврологии и рефлексотерапии ФПК и ППС АГМУ (г. Барнаул).

*М.А. Хорева* — канд. мед. наук, кафедра нервных болезней с курсом неврологии и рефлексотерапии ФПК и ППС АГМУ (г. Барнаул).

#### Для корреспонденции

*Нечунаева Екатерина Владимировна*, тел. 8-913-213-7472; e-mail: nev770@gmail.com