

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ  
УДК 576.8.097.2 + 612.82 + 616.834

**АУТОАНТИТЕЛА К БЕЛКАМ НЕРВНОЙ ТКАНИ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ  
ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ**

**С.Г. МОРОЗОВ, Л.М. АСАНОВА, Б.Б. ГНЕДЕНКО, Л.Ф. ПАНЧЕНКО,  
Т.Н. ЛАВРОВА**

ГНЦ психиатрии и наркологии Минздравмедпрома РФ, Фонд Чернобыльтест.  
Адрес ГНЦ психиатрии и наркологии : 107076, г. Москва, ул. Потешная ; факс 162 10 03

Протестировано 20 образцов сывороток больных с отдаленными последствиями черепно-мозговой травмы на аутоантитела (а-АТ) к белкам мозга S-100 и НКП. С помощью стандартного иммуноферментного анализа значимых отклонений от нормы в данной группе, в целом, выявлено не было. Тогда была применена оригинальная методика, позволяющая оценивать уровень а-АТ сразу ко всему комплексу антигенных детерминант. С помощью этого метода было выявлено повышение уровней а-АТ к S-100 и НКП у 16 пациентов. Выявлено нарушение у данной группы больных идиотип-антиидиотипической регуляции и сделано предположение о том, что недостаточное "экранирование" а-АТ соответствующими антиидиотипами создает условия для аутоиммунной агрессии а-АТ против ткани мозга.

Клиническое улучшение, наблюдаемое у больных с черепно-мозговой травмой (ЧМТ) в периоде компенсации не всегда свидетельствует о благоприятном исходе заболевания. В ряде случаев болезнь продолжает прогрессировать с появлением новых неврологических симптомов [1]. Поэтому особый интерес представляет изучение патохимических механизмов отдаленных последствий ЧМТ.

В настоящее время многие исследователи сходятся во мнении, что аутоиммунная агрессия к антигенам (АГ) ткани мозга лежит в основе патогенеза наблюдаемого деструктивного процесса [2, 3]. В литературе приводятся данные о выходе ряда белков, специфических для ткани мозга в сыворотку крови и спинно-мозговую жидкость, что создает условия для аутоаллергизации организма [4, 5]. Причем наличие нейроспецифических белков в сыворотке было обнаружено также у больных с отдаленными последствиями ЧМТ, у которых был диагностирован посттравматический церебральный арахноидит. Отмечается повышение титров аутоантител (а-АТ) против нейроантигенов в различные периоды травматической болезни головного мозга [6]. По мнению ряда авторов, именно характер аутоиммунных процессов в нервной ткани и определяет выраженность наблюдаемых патоморфологических изменений [7, 8]. В связи с этим, оценка продукции/активности а-АТ к нейроантигенам в отдаленном периоде ЧМТ, а также степень их "экранирования" соответствующими антиидиотипами, имеют большое значение для прогноза характера течения заболевания и контроля за эффективностью проводимой терапии.

Задача настоящего исследования состояла в определении уровней а-АТ к белку ткани мозга S-100 и к полученному авторами нейроспецифическому кислому протеину (НКП) у пациентов с отдаленными последствиями ЧМТ, а также в оценке у этих больных идиотип-антиидиотипической регуляции.

Белки S-100 и НКП обладают относительно высокой нейроспецифичностью [9, 10]. Выход в сыворотку крови S-100 отмечен при целом ряде патологических состояний нервной системы, и в связи с этим его часто используют в качестве маркера при повреждении ткани мозга [11]. НКП является сильным иммуногеном, и поэтому нами было сделано предположение, что а-АТ к этому белку могут быть показателем степени аутоиммунной агрессии к нейроантигенам при различных заболеваниях нервной системы.

**Методика.** Протестировано 20 образцов сывороток больных с отдаленными последствиями ЧМТ в виде неврозоподобных расстройств, проявляющихся вегето-сосудистыми нарушениями, расстройствами сна, навязчивыми состояниями. Возраст пациентов от 19 до 48 лет (15 мужчин, 5 женщин). Период после ЧМТ от 2 до 6 лет. Соматическая патология у всех больных данной группы отсутствовала. Показатели клинического анализа крови, мочи, а также биохимического анализа крови у всех обследуемых были в норме. В ходе выполнения данной работы протестировано также 120 образцов сывороток здоровых доноров. Полученные сыворотки хранили при  $-40^{\circ}\text{C}$  (однократное замораживание).

Белки S-100 и НКП и поликлональные антитела к ним (АТ1) получали по методикам, описанным ранее [12, 9]. Антиидиотипические антитела (АТ2) (антитела против F(ab)-фрагментов АТ1) получали, используя те же методы, только на колонке с носителем иммобилизовали не сам АГ, а АТ1.

Сыворотки больных тестировали с помощью стандартного твердофазного иммуноферментного анализа. На полистироловые планшеты фирмы "Nunc" (Дания) наносили растворы S-100 и НКП в 0,05 М карбонатном буфере pH 9,6 в концентрации 2 мкг/мл по 100 мкл в лунку. Инкубацию проводили при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 16 ч. Затем планшеты отмывали от несвязавшейся части АГ отмывающим буфером (140 мм NaCl; 2,7 мм KCl; 1,5 мм  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8,7 мм  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), содержащим 0,05 % Твина 20, и обрабатывали 0,05 % раствором желатины в течение 1 ч при  $36^{\circ}\text{C}$ . После этого наносили сыворотки исследуемых больных и здоровых доноров, разведенные в 200 раз. После инкубации в течение 3 часов при комнатной температуре планшеты отмывали и наносили вторичные антитела - антивидовые IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена ("Sigma", США). Для определения АТ1 к S-100 и НКП, связывающихся с антиидиотипическими АТ2, планшеты активировали АТ2 аналогичным образом. Для определения сывороточного уровня соответствующих АТ2 планшеты активировали АТ1 к S-100 и НКП при тех же условиях. Реакцию проявляли о-фенилендиамином/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ("Диа-М, Россия) в концентрации 1 мг/мл. Определение оптической плотности проводили фотометрически при длине волны 490 нм.

Ранее при тестировании более 500 сывороток крови клинически здоровых лиц было установлено, что "нормальная иммунореактивность" находится в пределах от -15 % до +40 % оптической плотности от эталонных значений [13]. Соответствующие "нормальные" значения (N), получаемые при тестировании в данной работе сывороток здоровых доноров, принимались за нулевые. Результаты реакций более интенсивных, по сравнению с сыворотками доноров, считались завышенными (+ или ++ см. табл. 1, 2). Силь-

Таблица 1

Результаты определения уровней АТ1 к S-100, АТ2 к S-100 и коэффициента АТ2/АТ1 (реагирующие с АТ2)

Количество больных	Уровень АТ1, реагирующих с S-100	Уровень АТ1, реагирующих с АТ2	Уровень АТ2	Коэффициент АТ2/АТ1 (реагирующие с АТ2)
5	N	++	N	--
4	N	++	+	-
3	N	++	-	--
2	--	N	N	-
2	N	+	N	-
1	N	N	+	N
1	N	++	N	-
1	N	N	--	--
1	N	N	N	N

Таблица 2

Результаты определения уровней АТ1 к НКП, АТ2 к НКП и коэффициента АТ2/АТ1 (реагирующие с АТ2)

Количество больных	Уровень АТ1, реагирующих с НКП	Уровень АТ1, реагирующих с АТ2	Уровень АТ2	Коэффициент АТ2/АТ1 (реагирующие с АТ2)
4	N	+	N	-
3	N	++	N	--
3	+	+	N	-
2	N	N	-	-
2	N	+	-	--
1	+	++	-	--
1	+	++	N	-
1	N	++	N	-
1	N	+	+	N
1	N	N	-	N
1	N	N	N	N

но завышенными (+ +) считались реакции, когда оптическая плотность превышала эталонные значения более чем на 80 %. Результаты реакций менее интенсивных, по сравнению со статистической "нормой", считались заниженными (- или -- см. табл. 1, 2). Реакции считались сильно заниженными (- -), если оптическая плотность была менее -40 % от эталонных значений. Расчет данных проводили по программе ELITEST [13]. Для оценки степени "экранирования" АТ1 соответствующими АТ2 был введен коэффициент АТ2/АТ1 (взаимодействующие с АТ2). Его расчет проводили по этой же программе. Значения этого показателя представлены в виде тех же параметров (- -, N, +, ++).

С целью определения оптимального разведения тестируемых сывороток, три позитивные анти-S-100 и анти-НКП сыворотки были использованы для построения калибровочной кривой (рис. 1). Наиболее оптимальным для определения АТ1, связывающихся с иммобилизованным АГ, было разведение сывороток 1:200. Аналогичный результат был получен и при определении оптимального разведения сывороток для оценки уровня АТ2, а также АТ1 реагирующих с АТ2.

С помощью многократного повторения эксперимента все используемые в работе тест-

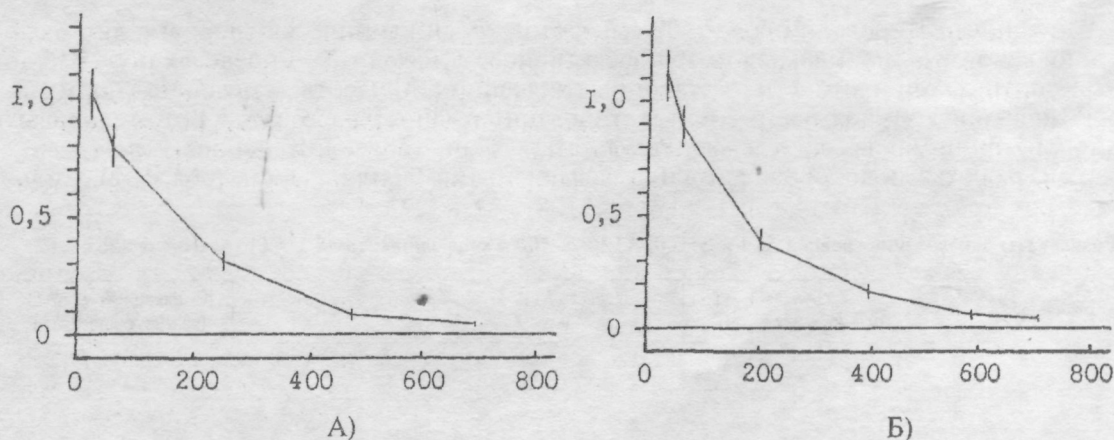


Рис. 1. Калибровочные кривые иммуноферментного определения а-АТ и S-100 (А) и НКП (Б), взаимодействующих с иммобилизованным АГ.  
По оси ОХ — разведения позитивных сывороток, по оси ОУ — оптическая плотность

системы были охарактеризованы как высокоточные, надежные и воспроизводимые.

**Результаты и обсуждение.** Разработаны стандартные иммуноферментные тест-системы для определения уровней а-АТ к белкам S-100 и НКП в биологических жидкостях. Проведено тестирование сывороток исследуемой группы пациентов и здоровых доноров. Нормальный уровень а-АТ к S-100 был выявлен у 18 из 20 пациентов. У 2 больных он оказался сильно занижен. При тестировании данных сывороток на а-АТ к НКП было показано, что у 17 из 20 пациентов этот уровень был в пределах нормы, а у 3 больных

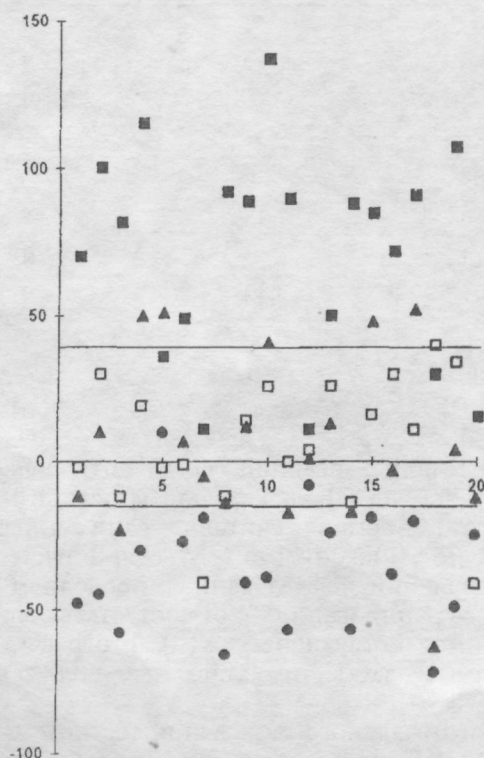


Рис. 2. Вариация уровней АТ1 и АТ2 к S-100, а также коэффициента АТ2/АТ1 у пациентов с отдаленными последствиями ЧМТ.  
По оси ОХ — номера образцов сывороток, по оси ОУ — значения исследуемых показателей в процентах от эталона. □ — АТ1, реагирующие с S-100, ■ — АТ1, реагирующие с АТ2 к S-100, ▲ — уровень АТ2 к S-100, ● — коэффициент АТ2/АТ1 (реагирующие с АТ2)

завышен. Таким образом, в целом, наблюдалась картина относительного "спокойствия", и полученные данные свидетельствовали о том, что для больных с отдаленными последствиями ЧМТ повышение титров а-АТ к белкам ткани мозга не характерно.

Однако нами было сделано предположение о том, что применение в данном случае стандартного метода определения а-АТ может не давать объективного представления о нарушениях в системе гуморального иммунитета у обследуемых больных. В связи с этим была применена оригинальная методика определения а-АТ.

Молекулы S-100 и НКП имеют ряд антигенных детерминант. Вероятно, когда а-АТ связываются с наиболее иммуногенными эпитопами иммобилизованных АГ, то другие, "минорные", эпитопы оказываются стереохимически блокированными, вследствие чего не могут связать соответствующие антитела.

Как известно, антисыворотки иммунизируемых АГ животных содержат как антитела (АТ1) против АГ, так и антитела-антиидиотипы (АТ2), т.е. антиантитела. Вариабельные участки АТ2 являются таким образом как бы "зеркальным отображением" детерминант АГ. А так как используемые в данной работе АТ1 представляет собой набор антител к различным детерминантам S-100 и НКП, то и АТ2 представляют собою набор соответствующих антиантител.

Исходя из этого, для постановки иммуноферментного анализа мы провели активацию планшет не самими АГ, а соответствующими АТ2, как бы "раздвигая" таким путем антигенные детерминанты S-100 и НКП и делая их доступными для соответствующих а-АТ.

С помощью такого метода проведено тестирование сывороток исследуемой группы пациентов и здоровых доноров. Результаты иммуноферментного анализа представлены в таблицах 1 и 2. Прежде всего следует отметить резкий контраст между данными, полу-

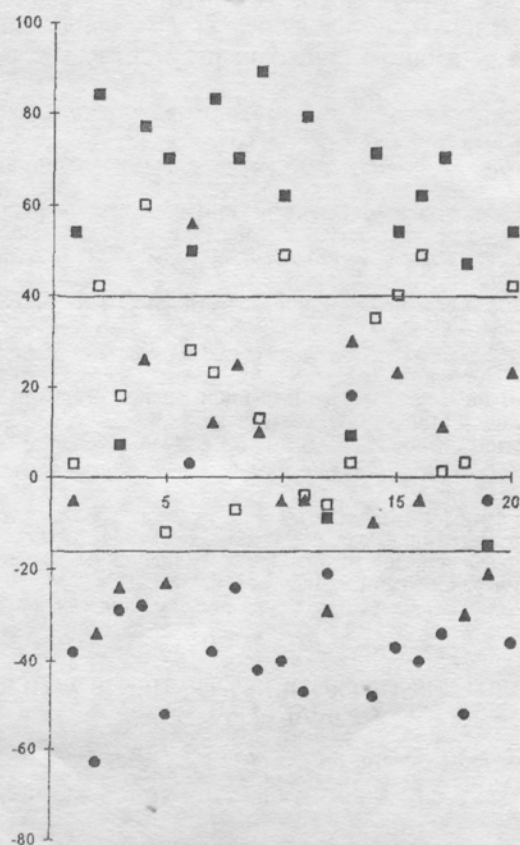


Рис. 3. Вариация уровней АТ1 и АТ2 к НКП, а также коэффициента АТ2/АТ1 у пациентов с отдаленными последствиями ЧМТ.

По оси ОХ — номера образцов сывороток, по оси ОУ — значения исследуемых показателей в процентах от эталона. □ — АТ1, реагирующие с НКП, ■ — АТ1, реагирующие с АТ2 к НКП, ▲ — уровень АТ2 к НКП, ● — коэффициент АТ2/АТ1 (реагирующие с АТ2)

ченными при определении а-АТ с помощью первого и второго метода. Так, при исследовании уровня а-АТ ко всему комплексу антигенных детерминант молекулы S-100, оказалось, что их уровень завышен у 16 из 20 пациентов. Причем у 15 человек он был значительно завышен. У 4 пациентов он оставался в норме. Следует отметить, что у двух пациентов, у которых при использовании стандартного метода наблюдалось значительное снижение титров а-АТ к S-100, в данном случае этот показатель был в пределах нормы. Мы полагаем, что высокий уровень а-АТ к "минорным" антигенным эпитопам S-100 нивелировал снижение титров а-АТ к "мажорным" эпитопам данной молекулы.

При тестировании а-АТ ко всем детерминантам НКП было показано, что титры этих а-АТ были завышены тоже у 16 из 20 пациентов. Из них у 6 пациентов сильно завышены. У 4 пациентов они были в пределах нормы.

Проведено изучение уровней АТ2 у обследуемой группы пациентов к S-100 и НКП (табл. 1, 2). Какой-либо определенной тенденции изменения данного показателя не наблюдалось.

Для оценки степени "экранирования" выявляемых АТ1 соответствующими АТ2 нами был введен специальный коэффициент АТ2/АТ1 (реагирующие с АТ2). Расчет этого параметра у данной группы больных показал, что у большинства обследуемых он оказался занижен (табл. 1, 2). Это свидетельствует о том, что повышение уровней а-АТ к комплексу антигенных детерминант S-100 и НКП не сопровождается адекватным повышением соответствующих АТ2. Вариация результатов проведенного исследования наглядно представлена на рисунках 2 и 3.

Таким образом, в заключение можно сделать вывод о том, что у больных с отдаленными последствиями ЧМТ наблюдаются серьезные нарушения в системе гуморального иммунитета. На примере S-100 и НКП было показано, что повышение уровня/активности а-АТ при данной патологии наблюдается главным образом к "минорным" антигенным детерминантам белков мозга. Адекватного повышения АТ2 к используемым в работе АГ мозга, в целом, не наблюдалось, что свидетельствует о нарушении у этих пациентов идиотип-антиидиотипической регуляции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ромоданов А.П. // *Вопр. нейрохир.* - 1986. - N 1. - С. 13-17.
2. Руднеко В.А., Черенько Т.М., Приходченко Н.А. // *Всероссийский съезд нейрохирургов, 4-ый: Тезисы докладов.* - М., 1988. - С. 86-87.
3. Цибульский А.П. Ведущие формы и механизмы изменения иммунологической реактивности при черепно-мозговых травмах. // *Автореф. дис. ... докт. мед. наук.* - Казань, 1981.
4. Белопасов В.В., Хрусталева Н.А., Гроппа С.А., Рябухин И.А., Морозов С.Г. // *Журн. невропат. и псих. им. С.С. Корсакова.* - 1994. - N 3. - С. 74-77.
5. Васильева Т.Г., Алексеева Л.А., Вальберг А.Ю. // *Клиника, диагностика и комплексное лечение больных с черепно-мозговой травмой.* - Л., 1984. - С. 53-59.
6. Пивоварова Л.П., Кузнецов С.И., Тарасов М.И., Крутицкая Л.И., Краснова М.А., Ермоленко Т.И. // *Тез. докл. I Съезда иммунологов России.* Новосибирск, 1992. - С. 363.
7. Горелик И.И. О роли аутоиммунных факторов в отдаленном периоде открытой черепно-мозговой травмы. // *Автореф. дис. ... канд. мед. наук.* - Минск, 1981.
8. Лисянский Н.И. // *Нейрохирургия.* - Киев, 1989. - Вып. 22. - С. 1316.
9. Панченко Л.Ф., Врублевский А.Г., Брюн Е.А., Морозов С.Г., Абрамова О.С. // *Вопр. наркологии.* - 1994. - N 3. - С. 41-44.
10. Donato R. // *Cell Calcium.* - 1991. - N 12. - P. 713-726.
11. Fagnart O.C., Sindic C., Laterre C. // *Clin. Chem.* - 1988. - N 34. - P. 1387-1391.
12. Полежаев А.Б. Мозгоспецифические белки группы S-100, их эндогенные акцепторы и лиганды, и регуляция метаболических процессов в нервной ткани. // *Дисс. ... докт. мед. наук.* - М., 1987. - С. 43-48.
13. Полежаев А.Б., Вабищевич Н.К., Зверева О.А. // *Сборник "Экопатология детского возраста".* - М., 1995. - С. 294-300.

#### AUTOANTIBODIES TO NERVOUS TISSUE PROTEINS IN PATIENTS WITH REMOTE CONSEQUENCES OF BRAIN TRAUMA

S.G. Morozov, L.M. Asanova, B.B. Gnedenko, L.F. Panchenko, T.N. Lavrova

Centre for phychiatry and addiction, Poteshnaya 10, 107076, Moscow, fax 162-10-63

20 samples of serum of patients with remote consequences of brain trauma were tested to detect autoantibodies (a-AB) against brain proteins S-100 and NKP. Essential pathology was not found out by standart solid-phase immunoassay. The original method was used to detect a-AB to the whole complex of antigen determinants. Using this method the elevation of a-AB against S-100 and NKP was shown at 16 cases. The disturbance of idiotype-antiidiotype regulation was revealed at this group of patients. It is suggested that insufficient level of corresponding antiidiotypes creates the conditions for autoimmune aggression of a-AB against brain tissue.