

А. І. Семененко

## Динаміка активності нейрон-специфічної енолази та вмісту білка S 100 у крові щурів за умов гострого порушення мозкового кровообігу та курсового введення 0,9 % розчину NaCl

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

*Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, 0,9 % розчин NaCl, нейрон-специфічна енолаза, білок S 100*

Лікування хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу (ГПМК) є складною міждисциплінарною задачею, вирішення якої потребує залучення спеціалістів різного профілю та проведення комплексної інтенсивної терапії, спрямованої, перш за все, на збереження життєздатності функціонально активних нейронів [3].

Важливе практичне значення для розробки нових методів патогенетичної терапії інсульту має з'ясування питання про те, який вид клітинної смерті переважає в ході розвитку постреперфузійних пошкоджень головного мозку, оскільки регенераторний потенціал нейронів обмежений, і втрата навіть частини клітин може закінчитись фатально [1, 12, 13]. Дискутабельним залишається й питання, який вид загибелі клітин є найсприятливішим для головного мозку з точки зору функціональних наслідків: апоптоз чи некроз. Останній являє собою лавиноподібний, хаотичний процес деструкції клітин, що супроводжується запаленням. Руйнування десмосом та збільшення простору щілин між окремими нейронами дозволяє вільним радикалам та вторинним месенджерам вільно розповсюджуватись та вражати неушкоджені клітини, що сприяє збільшенню вогнища ураження [2, 14].

Доведено, якщо клітина втрачає можливість загинути апоптотично, то це виступає тригерним фактором для запуску механізмів некрозу, що є небажаним, оскільки останній сприяє ек-

пансії вогнища ішемії за рахунок залучення до зони запалення нових нейронів [2]. На думку фахівців [6, 8] схему лікування хворих на ГПМК слід обов'язково доповнювати препаратами, які впливають на окремі ланки патобіохімічного каскаду в нейронах, спроможні подовжити період «терапевтичного вікна» та створити захист від реперфузійного пошкодження. Серед лікувальних заходів, що знижують імовірність розвитку ішемії головного мозку за ГПМК, великий інтерес приділяють впливу на центральну гемодинаміку [4]. Існуюча тривалий час практика обмеження рідини пацієнтам з патологією мозку ґрунтується на припущенні, що інтенсивна терапія великими обсягами рідини з використанням кристалоїдів може посилити набряк головного мозку і викликати збільшення внутрішньочерепного тиску (ВЧТ) [4].

З існуючих досліджень не можливо однозначно сказати, що доцільніше, створення гіпер- чи ізоволемічної гемодилуції за ГПМК. Клінічні дослідження ізоволемічної гемодилуції не показали зменшення смертності або інвалідизації при лікуванні ішемічного інсульту. Гіперволемічну гемодилуцію вивчали в рандомізованих дослідженнях, які дали суперечливі дані [9].

Для ґрунтовного з'ясування наявності в кристалоїдів, а саме 0,9 % розчину NaCl захисної дії на головний мозок за ГПМК, необхідно було дослідити вплив курсової терапії цим препаратом на інтенсивність перебігу деструктивних змін у нейронах за динамікою активності нейрон-специфічної енолази (NSE) та рівнем білка S 100.

Цінність моніторингу динаміки нейрональних маркерів (активність

NSE та рівень білка S 100) за умов гострої церебральної ішемії дозволяє не тільки дослідити глибину та ступінь ішемічного пошкодження головного мозку, а й оцінити ефективність церебропротекторної терапії [11].

**Мета дослідження** – на моделі експериментального ішемічного постреперфузійного пошкодження головного мозку охарактеризувати вплив 0,9 % розчину NaCl на динаміку активності NSE та рівня білка S 100.

**Матеріали та методи.** Досліди проведено на 63 білих щурах-самцях масою 160–170 г. Експериментальну модель ішемії-реперфузії (ІР) створювали шляхом накладання кліпс на обидві внутрішні сонні артерії під пропофоловим наркозом (60 мг/кг) терміном на 20 хв [10]. 0,9 % розчин NaCl вводили внутрішньовенно в умовно ефективній дозі 2,5 мл/кг 2 рази на день, через 30 хв після ІР і далі щодоби через кожні 12 год упродовж 7 діб. Тварини групи контрольної патології не отримували жодної терапії (ІР без лікування).

Для визначення специфічних маркерів ушкодження головного мозку [5] – активності NSE та рівня білка S 100 у відповідні строки (4 та 7 доба ГПМК) у щурів, шляхом катетеризації стегнової вени проводили забір крові (2,5–3,0 мл). Активність NSE та рівень білка S 100 у сироватці крові вимірювали методом імуноферментного аналізу з використанням набору NSE ELISA KIT (CUSABIO, China) та S 100 ELISA KIT (BlueGene, China) на приладі фірми «HUMAN» (Німеччина).

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t-Стьюдента та випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W. Уайта – за його відсутності, парний критерій К. Вілкоксона – для визначення змін у динаміці всередині групи. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Аналіз динаміки активності NSE у щурів у постреперфузійний період ГПМК показав, що через 96 год після моделювання патології (4 доба ішемії) цей показник

вірогідно підвищився відносно рівня інтактних тварин у 15,2 разу, що свідчить про інтенсивне формування вогнища ішемії, значну деструкцію нейронів, які знаходяться в цій зоні та превалювання некротичного типу їх загибелі. У кінці гострого періоду інсульту (7 доба) процеси організації ядра ішемії суттєво слабшають, а інтенсивність нейронекрозу зменшується, на що вказує зниження активності NSE відносно тих показників, які мали місце на 4 добу експерименту в середньому на 27 % (табл. 1).

Аналіз рівня іншого маркера пошкодження нервової тканини білка S 100 показав, що вірогідно високі титри досліджуваного показника мали місце вже на 4 добу після реперфузії. У зазначений термін спостереження у групі контрольної патології його вміст у сироватці крові був у 19 разів вищий відносно рівня інтактних тварин (табл. 2).

У динаміці спостереження, станом на 7 добу реперфузії головного мозку, відмічали подальше підвищення вмісту досліджуваного маркера, який був вірогідно вищим за аналогічний показник у групі інтактних тварин у середньому в 36,9 разу, а відносно 4 доби

Таблиця 1

*Активність нейрон-специфічної енولاзи в крові щурів за умов церебральної ішемії та курсового внутрішньовенного введення 0,9 % розчину NaCl,  $M \pm m$ ,  $n = 7$*

Дослідна група	Активність NSE, нг/мл
Інтактні щури	0,20 ± 0,12
4 доба	
ІР без лікування (контрольна патологія)	3,04 ± 0,32*
ІР + 0,9 % р-н NaCl	2,01 ± 0,02**
7 доба	
ІР без лікування (контрольна патологія)	2,22 ± 0,24*
ІР + 0,9 % р-н NaCl	1,68 ± 0,03**•

*Примітка: ІР – ішемія-реперфузія; NSE – нейрон-специфічна енoлаза; \* $p < 0,05$  відносно показника інтактних щурів; \*\* $p < 0,05$  відносно показника контрольної патології; • $p < 0,05$  відносно показника на 4 добу.*

Таблиця 2

*Динаміка рівня білка S 100 у крові щурів за умов церебральної ішемії та курсового внутрішньовенного введення 0,9 % розчину NaCl,  $M \pm m$ ,  $n = 5$*

Дослідна група	Рівень білка S 100, нг/мл
Інтактні щури	0,395 ± 0,049
4 доба	
ІР без лікування (контрольна патологія)	7,510 ± 0,772*
ІР + 0,9% NaCl	4,142 ± 0,020**
7 доба	
ІР без лікування (контрольна патологія)	14,566 ± 0,024*·
ІР + 0,9% NaCl	5,346 ± 0,251**·

*Примітка. ІР – ішемія-реперфузія; \* $p < 0,05$  відносно показника інтактних щурів; \*\* $p < 0,05$  відносно показника контрольної патології; · $p < 0,05$  відносно показника на 4 добу.*

ішемії – зріс майже удвічі ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Аналіз отриманих даних стосовно динаміки активності NSE та рівня білка S 100 як маркерів пошкодження нервової тканини дає змогу зробити висновок про те, що в ранньому постреперфузійному періоді модельного ГПМК у щурів відбувається інтенсивне формування ядра ішемічного вогнища, яке завершується його організацією на 7 добу експерименту.

Курсове введення щурам у постреперфузійний період 0,9 % розчину NaCl сприяло вірогідному зменшенню активності NSE відносно рівня щурів групи контрольної патології, як на 4 добу експерименту (у середньому на 33,9 %), так і в кінці терміну спостереження (у середньому на 24,3 %). Подібна динаміка активності NSE на тлі внутрішньовенного курсового введення 0,9 % розчину NaCl, певним чином, сприяє гальмуванню неконтрольованої експансії зони ішемічного вогнища та пенумбри (табл. 1).

Оцінюючи динаміку рівня білка S 100, нами було встановлено, що на тлі курсового внутрішньовенного введення 0,9 % розчину NaCl на 4 та 7 добу терапії його вміст зменшився відносно рівня щурів групи контрольної патології в середньому в 1,8 та 2,7 разу відповідно (табл. 2).

На нашу думку, певне зменшення маркерів постреперфузійного пошкодження нейронів при курсовому внутрішньовенному введення 0,9 % розчину NaCl може бути пов'язане з розвитком помірної гемодилуції, яка виникає на тлі його застосування двічі на добу в дозі 2,5 мл/кг. Гемодилуція забезпечує покращання мікроциркуляції крові по колатераліях зони пенумбри, розкриття та функціонування яких на 4 та максимально на 7 добу має місце в щурів як адаптаційна відповідь на розвиток гострої церебральної ішемії.

Таким чином, результати, отримані в ході проведеного дослідження стосовно впливу розчинів 0,9 % NaCl на активність та рівень у сироватці крові щурів у постреперфузійний період модельного інсульту нейромаркерів NSE та білка S 100, свідчать про те, що церебропротекторний ефект 0,9 % розчину NaCl пов'язаний з гальмуванням процесів нейронекрозу.

## Висновки

1. Модельна 20 хв ішемія головного мозку (білатеральна оклюзія внутрішніх сонних артерій) у щурів з наступною реперфузією супроводжується вірогідним зростанням відносно показників інтактних тварин активності NSE та рівнів білка S 100 на 4 добу експерименту в середньому в 15,2 та 19,0 разу відповідно, а наприкінці спостереження (7 доба ГПМК) у середньому в 11,1 та 36,9 разу відповідно.

2. Фармакотерапія модельного постреперфузійного синдрому шляхом курсового введення 0,9 % р-ну NaCl гальмувала розвиток нейронекрозу, що проявилось в достовірно менших рівнях активності NSE, як у гострій, так і у відновний період ГПМК.

3. Інфузійна терапія ГПМК (курсове введення 0,9 % р-ну NaCl) на фоні реоклюзії інфаркт-залежних судин сприяла зменшенню процесів утворення нейроглії та розвитку в ній запальних реакцій, на що вказувало вірогідне відносно групи контрольної патології зменшення титрів білка S 100 у середньому в 1,8 разу (4 доба) та у 2,7 разу (7 доба).

1. Вплив діакамфу гідрохлориду на інтенсивність нейроапоптозу при експериментальному порушенні мозкового кровообігу на тлі цукрового діабету / В. В. Шведський, С. Ю. Штриголь, С. І. Мерзлікін, І. Л. Черешнюк // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 2. – С. 49–53.
2. Запальна реакція та прогностичне значення маркерів запалення у хворих із геморагічним характером мозкового інсульту / А. С. Кость, М. С. Білобрин, Б. Д. Луцик [та ін.] // Лабораторна діагностика. – 2010. – № 2 (52). – С. 11–15.
3. Йолтуховский В. М. Организация помощи пациентам с острыми нарушениями мозгового кровообращения в Германии. Менеджмент в остром периоде инсульта: ключевые элементы эффективности / В. М. Йолтуховский // Практик. ангиология. – 2008. – № 1/1. – С. 27–28.
4. Карзин А. В. Особенности инфузионной терапии при острых заболеваниях и повреждениях головного мозга, сопровождающихся внутрисерепными кровоизлияниями: автореф. дис. ... кандидата мед. наук: 14.00.37; 14.00.28 / Карзин Алексей Владимирович. – М., 2003. – 21 с.
5. Нейронспецифические белки – маркеры энцефалопатии при тяжелой сочетанной травме / Е. В. Григорьев, Г. В. Вавин, Т. Г. Гришанова [и др.] // Медицина неотложных состояний. – 2010. – № 2 (27). – С. 72–76.
6. Никонов В. В. Роль антагонистов глутаматных рецепторов (ПК-Мерц) в лечении поврежденных мозга (обзор литературы) / В. В. Никонов, И. Б. Савицкая // Медицина неотложных состояний. – 2012. – № 5 (44). – С. 36–40.
7. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник [и др.] – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2009. – 262 с.
8. Трошин В. Д. Неотложная кардионеврология / В. Д. Трошин, Н. Н. Бровков. – М.: Медицинское информационное агентство, 2010. – 672 с.
9. Ишемический инсульт глазами анестезиолога: современные подходы к интенсивной терапии / Усенко Л. В., Мальцева Л. А., Царев А. В. [и др.]. – Днепропетровск, 2004. – 137 с.
10. Ходаковский А. А. Особенности формирования постреперфузионного повреждения нейронов – характеристика модели «ишемия-реперфузия». Новые направления и перспективы развития современной церебропротекторной терапии ишемического инсульта / А. А. Ходаковский, Л. И. Маринич, О. В. Багаури // Врач-аспирант. – 2013. – № 3 (58). – С. 69–76.
11. Ходаківський О. А. Оцінка впливу експериментальної терапії адемолом на інтенсивність перебігу деструктивних змін в мембранах нейронів у монгольських піщанок в умовах гострої церебральної ішемії / О. А. Ходаківський // Вісник морфології. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 62–65.
12. Knight R. A. Cell death in disease: from 2010 onwards / R. A. Knight, G. Melino // Cell Death Dis. – 2011. – V. 2. – P. 202.
13. Role of Apoptosis in disease / B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano [et al.] // Aging. – 2012. – № 5, V. 4. – P. 330–349.
14. SOD1 and MitoTEMPO partially prevent mitochondrial permeability transition pore opening, necrosis, and mitochondrial apoptosis after ATP depletion recovery / H. L. Liang, F. Sedlic, Z. Bosnjak [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2010. – V. 49, № 10. – P. 1550–1560.

#### **А. И. Семененко**

### **Динамика активности нейрон-специфической энolahзы и содержания белка S 100 в крови у крыс в условиях острого нарушения мозгового кровообращения и курсового внутривенного введения 0,9 % раствора NaCl**

На модели острого ишемического нарушения мозгового кровообращения (20-мин билатеральная окклюзия внутренних сонных артерий с последующей реперфузией у крыс) установлено, что лечебное введение 0,9 % раствора NaCl в дозе 2,5 мл/кг 2 раза в день (через 30 мин после ишемии-реперфузии и дальше ежесуточно через каждые 12 ч) снижает степень нейродегенеративных изменений в этих условиях. Оценивая динамику активности нейрон-специфической энolahзы и содержания белка S 100, было установлено, что на фоне курсового введения 0,9 % раствора NaCl на 4 и 7 сутки терапии содержание нейромаркеров уменьшилось относительно уровня группы контрольной патологии.

*Ключевые слова:* острое нарушение мозгового кровообращения, 0,9 % раствор NaCl, нейрон-специфическая энolahза, белок S 100

#### **A. I. Semenenko**

### **The dynamics of neuron specific enolase activity and protein S 100 level in rat's blood under of acute disorder of the cerebral circulation and course intravenous injection of 0,9 % solution NaCl**

There are no data about what is more expedient to create hyper or isovolemic hemodilution by acute disorder of the cerebral circulation. It was interesting to investigate influence of the separate course therapy with the 0,9 % NaCl solution on the intensity of destructive changes occurring in the neurons according to dynamics of neuron specific enolase activity and level of protein S 100. The aim of this

---

---

research was to characterize influence of 0,9 % NaCl solution on the dynamics of NSE and level of protein S 100 on the model of the experimental ischemic postperfusion damage of the brain. The investigation was conducted on 63 white male rats with weight 160–170 g. Experimental model of ischemia reperfusion (IR) was created by means of overlaying clips on both internal carotid arteries under propofol anesthesia (60 mg/kg) with 20 minutes term. 0,9 % NaCl solution was introduced intravenous in conditionally effective dose 2,5 ml/kg 2 times a day in 30 minutes after IR and further every day in every 12 hours during 7 days. Animals of the control pathology group didn't get any therapy (IR without treatment). Activity of NSE and level of protein S 100 in the serum of the blood was evaluated by the method of immunoassay analysis using NSE ELISA KIT (CUSABIO, China) and S 100 ELISA KIT (BlueGene, China) on the equipment of firm "HUMAN" (Germany). Course introduction of 0,9% NaCl solution to the rats in the postperfusion period contributed to probable diminution of increasing NSE activity relatively to the level of it in the rats of the control pathology group as on the 4th day of experiment (on the average by 33,9 %) so in the end of observation term (on the average by 24,3 %). Similar dynamics of the NSE contributes inhibition of uncontrolled expansion of the area of ischemic center and penumbra. On 4th and 7th day of therapy the protein S 100 level diminished relatively to the level of it in the rats of the control pathology group on the average respectively in 1,8 and 2,5 times. Results received during conducted experiment relatively to the influence of 0,9 % NaCl solution indicated that its cerebroprotective effect connected with inhibition of neuron necrosis processes.

*Key words: acute stroke, 0,9 % solution of NaCl, neuron-specific enolase, protein S 100*

---

*Надійшла: 14.11.2013 р.*

**Контактна особа:** Семененко Андрій Ігорович, кандидат медичних наук, асистент, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, буд. 56, вул. Пирогова, м. Вінниця, 21018. Тел.: +38 0973541664.