

Г.Ю. Галиева¹, Т.В. Попонникова²,
Т.Ю. Бедарева¹

НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЕНОЛАЗА И БЕЛОК S100 В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ

¹ ГУЗ Кемеровская областная клиническая больница, Кемерово

² ГОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия

Проблема прогнозирования течения и возможных исходов клещевых инфекций остается актуальной на протяжении многих лет. В последние годы в качестве возможных диагностических маркеров поражения нервной системы интенсивно изучаются нейроспецифические белки (НСБ). Условно можно выделить 3 этапа в изучении роли НСБ при различных заболеваниях нервной системы [5]. На первом этапе изучались механизмы выхода НСБ в биологические жидкости (кровь и ликвор) при различных патологических процессах в нервной системе. На втором этапе исследовали взаимосвязь концентрации НСБ в биологических жидкостях с объемом поражения нервной системы и степенью неврологических нарушений [6,7,8,9,10,11,12]. В последние годы проводятся работы по изучению влияния изменений уровней НСБ на исход заболевания [13].

Цель настоящего исследования - определить диагностическое значение НСЕ и белка S100 в остром периоде клещевых инфекций у детей.

Материалы и методы. Проведено исследование парных сывороток крови 86 пациентов с различными формами клещевых инфекций и 39 пар образцов ликвора с целью определения содержания белка S100A1B; S100BB и нейронспецифической енолазы. Средний возраст детей составил $10,6 \pm 1,8$ лет. Сыворотка и ликвор исследовались двукратно: в острый период заболевания (1-2 день поступления пациента) и в период регресса клинических проявлений – на 16-18 день. Исследование концентрации

нейронспецифической енолазы (НСЕ) и белка S-100 (S100A1B+S100BB) в парных сыворотках крови и ликворе проводилось диагностическими наборами CanAg-Diagnostics. Иммуоферментные методы количественного определения белка S100B и количественного определения нейронспецифической енолазы в сыворотке крови являются твердофазными, неконкурентными, основанными на использовании двух видов мышинных моноклональных антител, специфически распознающих два разных эпитопа молекулы NS-100, без перекрестной реактивности с другими формами NS-100 и две различные антигенные детерминанты в молекуле НСЕ. Используемые моноклональные антитела к НСЕ связываются с гамма-субъединицей фермента и, следовательно, детектируют $\gamma\gamma$ и $\alpha\gamma$ формы НСЕ. Предел обнаружения НСЕ для данного метода <1 мкг/л. Чувствительность метода определения S100B составила ≤ 10 нг/л. С помощью данного набора определяются S100A1B и S100BB, без перекрестной реактивности с другими формами S100. Определение антител к *Borrelia burgdorferi* осуществлялось методом ИФА (ELISA), определение антител к вирусу клещевого энцефалита в реакции торможения гемагглютинации и ИФА. При подозрении на менингеальную форму клещевой инфекции исследовался ликвор с определением антител к антигену вируса клещевого энцефалита методом ИФА. Диагностика гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) и моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) проводилась методом ИФА, тест-системы производства ООО «Омникс», г. Санкт-Петербург, согласно инструкции производителя. Исследование проведено в иммунологической лаборатории кемеровской Областной клинической больницы. В группу сравнения вошли 50 здоровых детей, с отсутствием клещевой истории в анамнезе. Средний возраст детей контрольной группы был $10,5 \pm 1,6$ лет. Средние значения НСЕ в крови контрольной группы составили $1,7 \pm 0,9$ мкг/л, средние концентрации белка S100 в крови равнялись $49,7 \pm 12,1$

нг/л. Статистическая обработка клинических результатов, полученных в ходе исследования, проводилась в операционной среде Windows-2007, с использованием программ Excel, Origin и др. Вычисляли среднее арифметическое (\bar{x}), стандартное отклонение (S^2x), ошибку средней арифметической (Sx), при математической обработке использовали t-критерий. Методом корреляционного анализа определяли сопряженность между разнородными признаками (r).

Результаты и обсуждение. Проведен клинический анализ 86 случаев клещевых инфекций у детей. Присасывание клещей отмечали 84 человека (97,7%), у 9 из них (10,5%) имели место множественные укусы. 2 (2,3%) пациентов клещей с себя не снимали, но находились в лесной зоне в сроки, соответствующие инкубационному периоду. Среди обследуемой группы моноинфекция клещевого энцефалита выявлена у 31 пациента, иксодовый клещевой боррелиоз - у 16 человек, гранулоцитарный анаплазмоз человека диагностирован в 2 случаях. 37 пациентов перенесли клещевую микст-инфекцию. Распределение клещевых инфекций по клиническим формам было следующим: в случае моноинфекции клещевого энцефалита преобладали лихорадочная (10 пациентов) и менингеальная формы (17 пациентов), что согласуется с результатами исследования других авторов [1, 4]. Менингоэнцефалитическая форма КЭ диагностирована в 4 случаях. ИКБ в виде мигрирующей эритемы (МЭ) зарегистрирован у 4 детей, ИКБ в форме общинфекционного синдрома наблюдался у 11 человек, менингеальная форма ИКБ выявлена у 1 пациента. Гранулоцитарный анаплазмоз в обоих случаях представлен общинфекционным синдромом. Микст-инфекция у 20 пациентов протекала в виде лихорадочной формы. В 8 случаях выявлено сочетание КЭ и ИКБ, у 4 пациентов КЭ встречался одновременно с МЭЧ, у 1 пациента зарегистрировано сочетание ИКБ с МЭЧ, в 3 случаях - сочетание ИКБ и ГАЧ, КЭ в сочетании с ГАЧ диагностирован в 1 случае,

КЭ в сочетании ГАЧ и МЭЧ отмечен у 3 пациентов. Менингеальная форма микст-инфекции выявлена у 13 детей. Наиболее частой причиной менингеальных форм микст-инфекции было сочетание КЭ и ИКБ - 8 случаев (61,5%), в 4 случаях ИКБ зарегистрирован в сочетании с ГАЧ (30,7%), однократно выявлено одновременное инфицирование вирусом КЭ и МЭЧ (7,7%). Менингоэнцефалитическая форма диагностирована у 4 пациентов. В 2 случаях причиной менингоэнцефалитических форм было сочетание ИКБ и КЭ, у 2 пациентов одновременно выявлены КЭ, МЭЧ, ГАЧ. Инкубационный период лихорадочной формы клещевого энцефалита варьировал от 4 до 12 дней и в среднем составил $6,3 \pm 1,8$ дней. Поводом для госпитализации послужили жалобы на общую слабость - 10 детей (100%), повышение температуры до фебрильных цифр в 10 случаях (100%), миалгии в 7 случаях (70%), клинические проявления менингеального синдрома (головная боль, ригидность мышц затылка, симптом Кернига, Брудзинского) в 4 случаях (40%), без воспалительной реакции ликвора. Длительность лихорадочного периода составила $6,0 \pm 1,2$ дней. Преобладала одноволновой характер температурой реакции (9 случаев, 90%). Проявления менингеальной формы клещевого энцефалита включали в себя выраженную головную боль в 100% случаев, повторную рвоту в 94,1% (16 детей), гиперестезию в 64,7% случаев (11 детей), светобоязнь в 52,9% случаев (9 детей), ригидность затылочных мышц, симптомы Кернига, Брудзинского в 100% случаев. Инкубационный период составил $6,8 \pm 1,9$ дней. Длительность лихорадочного периода была $8,1 \pm 1,6$ дней. Двухволновое течение температурной реакции отмечалось в 3 случаях (17,6%). Менингеальный симптомокомплекс сохранялся до 9-12 дня. Санация ликвора наступала в среднем через 17-23 дня. Менингоэнцефалитическая форма диагностирована у 4 человек (12,9%). Во всех случаях наблюдался судорожный синдром: у 2 детей на фоне выраженного отека головного мозга отмечались генерализованные

тонико-клонические судороги, в 2 случаях судороги носили очаговый характер. Инкубационный период составил $7,3 \pm 2,2$ дней. Лихорадочный период сохранялся $13,7 \pm 1,7$ дней. Санация ликвора наступала в среднем через 17-24 дня. Моноинфекция ИКБ в группе обследуемых детей наблюдалась преимущественно в форме общинфекционного синдрома, без симптомов поражения нервной системы - 11 случаев (68,7%), менингеальная форма диагностирована в 1 случае (6,2%). Мигрирующая эритема (МЭ) зафиксирована у 4 пациентов (25%), что совпадает с данными исследованиями других авторов [3] о преобладании в Кузбассе безэритемной формы ИКБ. Инкубационный период моноинфекции ИКБ в среднем составил $4,75 \pm 0,75$ дней, длительность лихорадочного периода $5,75 \pm 0,75$ дней. МЭ у детей во всех случаях сопровождалась региональной лимфаденопатией - 4 человека (100%), без каких-либо неврологических проявлений. Обратное развитие эритемы наступало через 5-7 дней. Инкубационный период при лихорадочной форме ИКБ составил $7,2 \pm 1,7$ дней. Длительность лихорадочного периода в среднем равнялась $6,7 \pm 1,5$ дней. Различия в продолжительности инкубационного и лихорадочного периодов заболевания в сравнении с моноинфекцией КЭ недостоверны ($p > 0,05$). Среди клинических форм микст-инфекций также преобладала лихорадочная форма (20 пациентов, 54%), клинические проявления данной формы были неспецифичны и выражались в виде общинфекционного синдрома. При поступлении дети предъявляли жалобы на повышение температуры 20 человек (100%), головную боль - 18 человек (90%), мышечные боли - 16 детей (80%), артралгии - 11 детей (55%). Инкубационный период при лихорадочной форме микст-инфекции составил в среднем $6,5 \pm 2,1$ дней. Достоверных различий в сравнении с лихорадочной формой моноинфекции КЭ и ИКБ не выявлено ($p > 0,05$). Длительность температурной реакции в среднем составляла $7,6 \pm 1,5$ дней, что достоверно выше в сравнении с моноин-

фекцией КЭ ($p < 0,005$) и ИКБ ($p < 0,05$). Менингеальная форма микст-инфекции диагностирована в 13 случаях (35,1%). Инкубационный период менингеальной формы микст-инфекции составил $6,1 \pm 1,6$ дня. Длительность лихорадочного периода равнялась в среднем $8,6 \pm 1,4$ дней. Достоверных различий в продолжительности инкубационного и лихорадочного периодов менингеальных форм моноинфекции КЭ и микст-инфекции не установлено ($p > 0,05$). Санация ликвора наступала в среднем через 17-23 дня. Менингоэнцефалитическая форма микст-инфекции диагностирована в 4 случаях (10,8%). Инкубационный период равнялся $6,0 \pm 1,4$ дням, сравнение с моноинфекцией КЭ не достоверно ($p > 0,05$). Длительность лихорадочного периода была в среднем $17,4 \pm 2,9$ дней, что достоверно выше, чем при моноинфекции КЭ ($p < 0,05$). Санация ликвора происходила на 19-25 день. Исследование концентрации НСЕ в сыворотке крови пациентов с клещевыми инфекциями показало достоверно более высокие уровни в сравнении с группой контроля. В контрольной группе средний уровень НСЕ составил $1,7 \pm 0,9$ мкг/л ($p < 0,05$, табл.1). Средняя концентрация НСЕ в сыворотке крови при лихорадочной форме КЭ составила $4,06 \pm 2,4$ мкг/л в образцах, взятых для исследования в первые дни заболевания ($p < 0,05$ в сравнении с контролем) и $4,5 \pm 2,3$ мкг/л в образцах сывороток на 16-18 день болезни ($p < 0,05$). При менингеальной форме КЭ средняя концентрация НСЕ в первых образцах сывороток крови равнялась $6,5 \pm 3,6$ мкг/л ($p < 0,05$), повышаясь до $7,3 \pm 4,3$ мкг/л в сыворотках, исследуемых на 16-18 день заболевания ($p < 0,05$). Средние значения НСЕ при менингоэнцефалитической форме КЭ составили $4,1 \pm 1,1$ мкг/л ($p < 0,05$) и $7,3 \pm 3,5$ мкг/л в первых и вторых образцах сывороток соответственно ($p < 0,05$). При ИКБ уровень НСЕ в среднем составил $6,2 \pm 3,2$ мкг/л в первые дни заболевания и $9,9 \pm 4,6$ мкг/л в период регресса клинических симптомов, оба показателя достоверно отличались от показателей в группе контроля ($p < 0,05$). Более отчетливая тенденция

к повышению уровня НСЕ выявлена при клещевых микст-инфекциях, так при лихорадочной форме уровень НСЕ в сыворотке крови в первые дни заболевания составил $7,6 \pm 3,4$ мкг/л ($p < 0,05$), повышаясь на 16-18 день заболевания до $10,8 \pm 3,9$ мкг/л ($p < 0,05$). При менингеальной форме микст-инфекции начальный уровень НСЕ равнялся $5,5 \pm 2,2$ мкг/л, повышаясь до $10,5 \pm 3,7$ мкг/л на 16-18 день заболевания, различия обоих показателей с показателями НСЕ в группе контроля достоверны ($p < 0,05$). В случае менингоэнцефалитической формы микст-инфекций уровень НСЕ в крови в первые дни болезни составил $3,0 \pm 1,1$ мкг/л ($p < 0,05$), на 16-18 день заболевания значения НСЕ увеличивались до $5,45 \pm 1,85$ мкг/л ($p < 0,05$). Выявлена отчетливая тенденция к повышению уровня НСЕ в ликворе на 16-18 день заболевания (таблица 2). Корреляция показателей НСЕ в сыворотке и ликворе была высокой ($r = 0,9$, $p < 0,05$) при менингоэнцефалитических формах моно и микст-инфекций и умеренной ($r = 0,4$, $p < 0,05$) при менингеальных формах клещевых моно и микст-инфекций.

Проведенный анализ концентраций НСЕ в крови и ликворе взаимосвязи данных показателей с различными формами клещевых инфекций не выявил ($p > 0,05$; $r < 0,3$). Выявлена корреляция между показателями НСЕ в сыворотке крови в разные периоды заболевания клещевой инфекцией (в первые три дня заболевания и в период регресса клинических проявлений, на 16-18 день). При менингеальной и менингоэнцефалитической формах моноинфекции КЭ данная корреляция была сильной ($r = 0,9$, $p < 0,05$); во всех случаях микст-инфекции - значительной ($r = 0,7$, $p < 0,05$).

Повышенные концентрации белка S100 в сыворотках крови обнаружены во всех случаях клещевых инфекций в обследуемой группе детей, в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$). У детей с лихорадочной формой КЭ уровень белка S100 в первых образцах сывороток крови был $109,2 \pm 43,7$ нг/л, повышаясь до $128,7 \pm 49,0$ нг/л на 16-18 день болезни ($p < 0,05$).

Концентрация белка S100 при менингеальной форме КЭ составила $157,7 \pm 54,8$ нг/л в первые дни заболевания ($p < 0,05$), повышаясь на 16-18 день до $186,4 \pm 38,9$ нг/л ($p < 0,05$). В случае менингоэнцефалитической формы КЭ показатели белка S100 составили $124,2 \pm 31,1$ нг/л ($p < 0,05$) и $191,8 \pm 39,2$ нг/л ($p < 0,05$) при первом и втором исследовании крови соответственно. У пациентов с менингеальной формой микст-инфекции в первой сыворотке крови содержание белка S100 составило $133,5 \pm 28,3$ нг/л ($p < 0,05$), в динамике нарастая до $167,2 \pm 34,3$ нг/л ($p < 0,05$). При менингоэнцефалитической форме микст-инфекций уровень белка S100 в крови достигал $167,0 \pm 36,7$ нг/л ($p < 0,05$) при первом исследовании, увеличиваясь при повторном исследовании до $174,3 \pm 30,4$ нг/л ($p < 0,05$) на 16-18 день заболевания. В ликворе при менингеальной форме моноинфекции КЭ в первые дни болезни содержание белка S100 достигало $150,6 \pm 53,7$ нг/л, повышаясь на 3 неделе болезни $190,0 \pm 71,0$ нг/л. При менингеальной форме микст-инфекции концентрация белка S100 в ликворе составляла $236,8 \pm 80,1$ нг/л, при повторном исследовании ликвора - $313,8 \pm 77,8$ нг/л. В случаях менингоэнцефалитических форм моноинфекции КЭ концентрация белка S100 в ликворе составила $338,8 \pm 90,5$ нг/л в первые дни заболевания, снижаясь на 16-18 день до $323 \pm 43,8$ нг/л. Менингоэнцефалитические формы микст-инфекции характеризовались уровнем белка S100 в ликворе $214,1 \pm 74,9$ нг/л и увеличением до $223,5 \pm 120,5$ нг/л - в ликворе, взятом на 16-18 день болезни. Выявлена умеренная корреляция показателей белка S100 в сыворотке и ликворе в зависимости от периода заболевания ($r = 0,4$, $p < 0,05$). В качестве причины повышения концентрации НСЕ и белка S100 в крови пациентов с различными неврологическими заболеваниями в литературе обсуждается возможность замедления катаболизма нейроспецифических антигенов, как проявление иммунного дисбаланса на фоне текущего патологического процесса в нервной системе [5]. Большинство авторов [6,7,8, 9,11,12,13], регистрируя повышение

концентрации НСЕ и белка S100 в крови пациентов, объясняют данный феномен нарушением структуры и барьерных функций гематоэнцефалического барьера. Активация клеток астроглии при воспалительных процессах приводит к резкому увеличению экспрессии белка S100 в активированных астроцитах, нарушению резистентности цитоплазматической мембраны и элиминации белка S100 в межклеточную жидкость, с последующей диффузией его в кровь. Повышение уровня белка S100 в крови пациентов зависит от количества поврежденных астроцитов [10]. Повышение уровня концентраций НСЕ и белка S100 на 16-18 день, когда клинически у пациентов, как правило, регрессирует общинфекционный синдром, свидетельствует о неполном восстановлении функциональной активности гематоэнцефалического барьера в данном периоде заболевания.

Известно участие белка S100 в формировании когнитивных функций, молекулярных процессах памяти, ведущая роль в процессах интегративной деятельности нервной системы [5]. Возможно, повышение концентраций белка S100 на 16-18 день заболевания свидетельствует о нарушении интегративной функции нервной системы и формировании у данной группы пациентов церебралитического синдрома после перенесенной клещевой инфекции.

Таким образом, выявленные в результате проведенного исследования изменения показателей НСЕ и белка S100 свидетельствуют о преимущественном нарушении астроглиальных отношений в остром периоде клещевых инфекциях независимо от их этиологии, отражают динамику состояния гематоэнцефалического барьера.

Таблица 1

Уровень НСЕ (мкг/л) и белка S100 (нг/л) в сыворотке крови при различных формах клещевых инфекций в динамике заболевания, M±m

Клиническая форма	НСЕ 1С	НСЕ2С	S100 1С	S1002С
КЭЛФ	4,06±2,4 *	4,5±2,3*	109,2±43,7*	128,7±49,0*
КЭМФ	6,5±3,6 **	7,3±4,3**	157,7±54,8*	186,4±38,9*
КЭМЭФ	4,1±1,1*	8,2±2,3*	124,2±31,1*	191,8±39,2**
ИКБ	6,2±3,2*	9,9 ±4,6*	109,3±43,4*	158,6±42,5*
МИ ЛФ	7,6±3,4*	10,8±3,9*	153,8±55,0*	166,9±56,3*
МИМФ	5,5±2,2*	10,5±3,7**	133,5±28,3*	167,2±34,3**
МИМЭФ	3,0±1,1*	5,45±1,85*	167,0±36,7*	174,3±30,4*
Контроль	1,7±0,9		49,7±12,1	

Примечание. НСЕ1С, S100 1С – обследование, проведенное в первые 3 дня болезни, НСЕ2С, S100 2С –на 16-18 день болезни, * значения при которых $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$.

Таблица 2

Уровень НСЕ (мкг/л) и белка S100 (нг/л) в ликворе у пациентов при различных формах клещевых инфекций в динамике заболевания, M±m

Клиническая форма	НСЕ 1Л	НСЕ 2Л	S100 1 Л	S1002Л
КЭМФ	1,5±1,2	1,8±1,4	150,6±53,7	190,0±71,0
КЭМЭФ	6,7±0,3	14,8±1,3	338,8±90,5	323,0±43,8
МИМФ	2,3±1,2	7,15±1,7	236,8±80,1	313,8±77,8
МИМЭФ	5,75±1,1	9,4±1,0	214,1±74,9	223,5±120,5

Примечание. НСЕ1Л, S100 1Л – обследование, проведенное в первые 3 дня болезни, НСЕ2Л, S100 2Л –на 16-18 день болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. 1. Моргацкий Н.В., Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Иванова М.В., Карасев В.В., Аксенов О.А. Клинические особенности спорадического клещевого энцефалита у детей на территории Северо-Западного региона // Детские инфекции – 2006- №1.- С.24-29.
2. 2. Полетаев А.Б. Мозгоспецифические белки группы 100, их эндогенные акцепторы и лиганды и регуляция метаболических процессов в нервной ткани // Автореферат дисс. на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Москва. -1987. -27с.
3. 3. Попонникова Т.В. Клиническое течение иксодовых клещевых боррелиозов у детей // Материалы конференции, посвященной клещевым инфекциям. Ижевск.-2002. - С.231-236.
4. 4. Попонникова Т.В., Бедарева Т.Ю., Вахрамеева Т.Н., Пиневиц О.С., Галиева Г.Ю. Иммунопатогенетические аспекты развития поражений нервной системы при клещевых инфекциях у детей // Цитокины и воспаление – 2007.- Т.6, №4.- С.54-58.
5. 5. Чехонин В.П. Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам // М. Медицина - 2007.- 344с. – С.173-175.
6. 6..Catharina Nygren de Boussard, Pam Fredman Anders Lundinf, Kerstin Andersson Gunnar Edman and Jorgen Borg S100 in mild traumatic brain injury // Brain Injury. - 2004. Vol. 18, nov. 7. - P. 671-683.
7. 7. Changping Yao, Anthony J. Willams, Andrew K. Ottens, X.-C. May Lu, Renwu Chen, Kevin K. Wang, Ronald L. Hayes, Frank C. Tortella, Dtendra R. Dave. Detection of protein biomarkers using high-throughput immunoblotting following focal ischemic or penetrating ballistic-like brain injuries in rats //Brain Injury. -2008. - Vol. 22, №10. - P. 723-732.
8. 8..Fukuyama R., Izumoto T., Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia // Eur. Neurol. -2001.- Vol. 46, №3.- P. 35-38.
9. 9. Jung C.S, Foerch C, Schänzer A, et al. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme // Brain. - 2007. - Vol. 130.- P. 3336-41.
10. 10. Lamers K. J., Vos P., Verbcek M. M. Et al. Protein S-100, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP), and glial fibrillary acidic protein (GFAR), in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients // Brain Res. Bull. - 2003. - Vol.15, №7.- P.261-264.
11. 11.Meynaar I.A., Straaten H.M., van der Wetering J. et al. Serum neuron-specific enolase predicts outcome in post-anoxic coma: a prospective cohort study // Intensive Care Med. -2003. - Vol. 29, № 9. - P. 189-195.
12. 12.Sojka P., Stalnacke B. M., Bjornstig U. et al. One-year follow-up of patients with mild traumatic brain injury: occurrence of post-traumatic stress-related symptoms at follow-up and serum levels of cortisol S100B and neuron-specific enolase in acute phase // Brain Inj. -2006.-Vol. 20, № 6.-P. 613-620.
13. 13.Woertgen C., Rothoerl R. D. and Brawanski A. Early S-100B serum level correlates to quality of life in patients after severe head injury // Brain Injury. - 2002. - Vol. 16, № 9. - P. 807-816.