

УДК 611.018.54+616.15—07:616.831—005

А.А.Скоромец, А.Ю.Илюхина, С.А.Дамбинова

ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К ГЛУТАМАТНЫМ РЕЦЕПТОРАМ NMDA-ТИПА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ИШЕМИЧЕСКИМ И ГЕМОРРАГИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

Санкт-Петербургский медицинский университет им. акад. И.П.ПАВЛОВА,
Институт мозга человека РАН, г. Санкт-Петербург

Р е ф е р а т. В настоящей работе обобщены результаты динамического исследования уровня аутоантител к NMDA-рецепторам в сыворотке крови больных на разных сроках острого периода нарушения мозгового кровообращения по типу ишемии и геморрагии. Всего обследовано 48 больных с ОНМК в возрасте от 32 до 66 лет, в том числе 29 — с острой церебральной ишемией и 19 — с острой геморрагией. Обнаружены тенденции в изменениях уровня аутоантител к рецепторам в разные фазы острого периода ишемического инсульта и острой церебральной геморрагии. Данные результаты могут быть использованы для диагностики и прогноза течения разных типов острого нарушения мозгового кровообращения.

А.А.Скоромец, А.Ю.Илюхина, С.А.Дамбинова

АУТОАНТИТЕНЧЕКЛӘРНЕ КИСКЕН ИШЕМИК ҺӘМ ГЕМОРРАГИК ИНСУЛЬТЛЫ ПАЦИЕНТЛАРНЫҢ КАНЫНДАГЫ NMDA-ТИПЛЫ ГЛУТАМАТ РЕЦЕПТОРЛАРГА ДИНАМИК ТИКШЕРҮЛӘР

Өлеге хезмәттә баш миә кан әйләнешенә ишемик һәм геморрагик бозылышлары кискен чорының терле сәкләрендә авыру кешенә кан сыркындысында аутоантитәнчекләр һәм NMDA-рецепторлар арасындагы микъдари мөнәсәбәтләрне динамик тикшерүләрнең нәтижәләре гомумиләштереп бирелә. Барлыгы 32 яшьтән алып, 66 яшькә кадәргә ОНМКлы 48 авыру тикшерелде, шуларның 29-ы кискен церебраль ишемиялә һәм 19-ы кискен геморрагиялә. Ишемик инсультның кискен чорының һәм кискен церебраль геморрагиянең терле фазаларында аутоантитәнчекләрнең рецепторларга дәрәжәсе билгеләнә. Алынган нәтижәләрне баш миә кан әйләнешендәге кискен бозылышларның терле типларын, аларның агышын алдан билгеләгәндә һәм диагноз куйганда файдаланырга мөмкин.

А.А.Скоромец, А.Ю.Илюхина, С.А.Дамбинова

DYNAMIC STUDY OF AUTOANTIBODIES TO GLUTAMATE RECEPTORS OF NMDA-TYPE IN BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE ISCHEMIC AND HEMORRHAGIC INSULT

Results of dynamic study of level of antibodies to NMDA-receptors in blood serum of patients at different moments of acute period of disturbance of cerebral circulation of ischemic and hemorrhagic type are generalized in the given work. A total of 48 patients of 32—66 years of age with acute disturbance of cerebral circulation, 29 of which — with acute cerebral ischemic and 19 — with acute hemorrhage has been examined. The trends has been identified in changes of the level of antibodies to receptors at different phases of acute period of ischemic insult and acute cerebral hemorrhage. The results can be used for diagnosis and prognosis of the course of different types of acute disturbance of cerebral circulation.

Исследования последних лет расширили представления о метаболических аспектах патогенеза ишемического инсульта. Установлено, что острое развитие церебральной ишемии вызывает каскад биохимических реакций, которые в конечном итоге приводят к гибели определенных типов клеток ткани мозга.

В рамках теории “эксайтотоксичности” развиваются и аргументируются представления о том, что избыточное высвобождение возбуждающих нейротрансмиттеров (глутамата и аспартата) представляет ключевой момент патогенеза многих заболеваний ЦНС, включая острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), и обуславливает запуск биохимических реакций, ведущих к деструкции мембраны нервных клеток [2, 5, 8, 9, 10, 13].

Одним из начальных звеньев в цепи биохимических нарушений является дестабилизация клеточных мембран и встроенных в них рецепторов. На моделях экспериментальной церебральной ишемии показана важная роль NMDA-рецепторов глутаминовой кислоты в запуске нейрорхимических механизмов острого нарушения мозгового кровообращения [4].

Разработка метода определения в крови пациента содержания аутоантител к фенциклидин-связывающему мембранному белку, одному из компонентов глутаматных NMDA-рецепторов головного мозга (CI-теста — cerebral ischemia test) открыла перспективы клинического направления исследований с определением его диагностической значимости при ОНМК [3, 4, 6].

Установлено, что повышение уровня аутоантител (АА) к фенциклидин-связывающему мембранному белку в сыворотке крови свидетельствует о проявлении аутоиммунной реакции организма на нарушения обмена белковых компонентов глутаматных рецепторов. В настоящее время накоплены данные о диагностической и прогностической значимости высоких значений уровня АА к глутаматным рецепторам каинат-квисквалатного типа при эпилепсии [7, 11, 12].

В исследованиях Е.И.Гусева и С.А.Дамбиновой и соавт. (1996) установлена связь существенного повышения уровня АА (до $5,8 \pm 1,4$ нг/мл) к NMDA-рецепторам в сыворотке крови с тяжестью состояния больного в первые часы развития острой ишемии. Показано, что снижение уровня АА к NMDA-рецепторам в течение 1-х суток было сопоставимо с благоприят-

ным прогнозом течения острой ишемической болезни в ближайшие 2—3 недели. В случаях летального исхода отмечено опережение резкого снижения уровня АА к NMDA-рецепторам в сыворотке крови до $0,9 \pm 0,1$ нг/мл.

В настоящей работе обобщены результаты динамического исследования уровня АА к NMDA-рецепторам в сыворотке крови больных на разных сроках (1—3-и, 5—8-е, 10—31-е сутки) острого периода нарушений мозгового кровообращения по типу ишемии (1-я группа) и по типу геморрагии (2-я группа). Выбор больных этих групп с ОНМК определялся современными представлениями о различных патогенетических механизмах острой церебральной геморрагии и острой церебральной ишемии. Исходя из этих представлений группа больных с острой церебральной геморрагией рассматривалась в качестве группы сравнения с грубыми нарушениями гематоэнцефалического барьера [1], что позволило уточнить влияние данного фактора на показатель уровня АА к NMDA-рецепторам при ОНМК разного типа.

Обследованы 48 больных с ОНМК в возрасте от 32 до 66 лет, в том числе с острой церебральной ишемией — 29 (средний возраст — $54,7 \pm 1,4$) и острой геморрагией — 19 (средний возраст — $53,0 \pm 4,4$). В качестве группы сравнения были обследованы 19 больных с хронической сосудисто-мозговой недостаточностью (средний возраст — $51,6 \pm 4,8$).

Геморрагия в правом полушарии была у 10 больных (лобная область, базальные ганглии). У 6 пациентов геморрагический очаг локализовался в левой гемисфере. У 3 больных очаги острой геморрагии были расположены в области ствола головного мозга.

У 18 из 29 больных с ОНМК по типу ишемии процесс был локализован в бассейне левой внутренней сонной артерии, у 8 — в бассейне правой внутренней сонной артерии, у 3 — в вертебробазилярном бассейне.

Основным этиологическим фактором развития ОНМК у всех обследованных являлись артериальная гипертензия и атеросклероз сосудов головного мозга. У 11 больных развитие ОНМК наблюдали на фоне хронической интоксикационной или дисметаболической (диабетической) энцефалопатии. Клинический диагноз ставили на основании анамнестических сведений, результатов клинического неврологического обследования и данных дополнительных методов — КТ головного мозга, УЗДГ, Эхо-ЭС, ЭЭГ, исследования спинномозговой жидкости. В случае летального исхода диагноз подтверждался данными патологоанатомического исследования.

Для динамического исследования клинических проявлений ОНМК на разных сроках острого периода была использована модификация шкалы, разработанная в Институте неврологии РАМН. Карта клинического наблюдения включала оценку общего состояния больного, уровня нарушения сознания, неврологическую

оценку выраженности общемозговых симптомов, менингеальных знаков, двигательного дефицита и чувствительных расстройств, речевых, координаторных, глазодвигательных, бульбарных нарушений, а также оценку основных показателей системной гемодинамики (АД, ЧСС).

По показателю суммарного балла клинических проявлений основного симптомокомплекса ОНМК дифференцировали легкую (от 3 до 8 баллов) и среднюю степень тяжести (от 9 до 12 баллов), тяжелое (от 13 до 15 баллов) и крайне тяжелое (более 15 баллов) состояние больных.

Для исследования показателей титра аутоантител к NMDA-рецепторам у пациентов брали 100 мкл крови из вены или из пальца, центрифугировали при комнатной температуре и получали сыворотку, которую хранили при температуре $+4,0^\circ\text{C}$ не более 2 недель. Анализ сыворотки проводили с помощью стандартного твердофазного иммуноферментного метода (ELISA). Определяли в крови содержание аутоантител к изолированному и очищенному фрагменту NMDA-рецепторов. Опытная партия диагностических наборов (СI-тест) произведена в Институте мозга человека РАН (Санкт-Петербург). Основным компонентом тест-системы являются фрагменты NMDA-рецепторов, изолированных из мозга человека, иммобилизованные на поверхности 96-луночного полистиролового планшета. В ходе испытаний образцы сыворотки крови пациентов и здоровых лиц наносили в лунки микропланшетов. В качестве контроля служили IgG, выделенные из кроличьей поликлональной антисыворотки к фрагменту NMDA-рецептора, которую наносили в лунки планшета параллельно с исследуемыми образцами в концентрации от 0,1 до 400 нг/мл. После нанесения образцов планшеты инкубировали 1 час при температуре $20\text{--}25^\circ\text{C}$ и уровень связывания с иммуногенным фрагментом NMDA-рецептора определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, используя кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой хрена. Иммуный комплекс детектируют по цветной пероксидазной реакции с субстратом — орто-фенилендиамином. Отсчет результатов производили с помощью многоканального спектрофотометра "Dinatech" (Англия) по величине поглощения растворов при длине волны 492 нм. Строили калибровочную кривую для контроля, откладывая по оси абсцисс концентрацию антител, по оси ординат — величину оптической плотности. Концентрацию аутоантител в образцах крови пациентов определяли по калибровочной кривой, на основании величин получаемых оптических плотностей [6].

У 15 из 19 больных с острыми церебральными геморрагиями было тяжелое состояние. У них отмечалось преобладание низкого уровня АА к NMDA-рецепторам (от 0,95 до 2,1 нг/мл;

среднее значение по группе не превышало $1,67 \pm 0,11$ нг/мл.

У 17 (59%) из 29 больных с ОНМК по типу ишемии в те же сроки заболевания выявлено удовлетворительное состояние (что находило отражение в существенном снижении среднего суммарного балла основных клинических проявлений). Для них был характерен более широкий размах флюктуаций значений АА к NMDA-рецепторам (от 0,95 до 24,0 нг/мл). Средний уровень АА к NMDA-рецепторам в группе лиц с острым ишемическим инсультом вследствие гипертонической болезни и церебрального атеросклероза составлял $3,16 \pm 0,30$ нг/мл. Существенно выше были средние значения АА к NMDA-рецепторам у больных с острым ишемическим инсультом, развившимся на фоне хронической алкогольно-интоксикационной или десметаболической энцефалопатии ($5,85 \pm 1,71$ нг/мл). В группе больных с хронической сосудисто-мозговой недостаточностью среднее значение этого показателя составляло $1,50 \pm 0,10$ нг/мл.

При динамическом исследовании на разных сроках острого периода ОНМК у больных с острой геморрагией наблюдали устойчивость низких значений АА к NMDA-рецепторам, которая сохранялась и при регрессе основных неврологических симптомов. У больных с острым ишемическим инсультом выявлены три типа динамики АА к NMDA-рецепторам. В случаях развития острой церебральной ишемии вследствие гипертонической болезни и атеросклероза сосудов мозга наблюдались волнообразные изменения уровня АА к NMDA-рецепторам от $4,17 \pm 0,56$ нг/мл в 1-е сутки со снижением этого показателя до $2,96 \pm 0,54$ нг/мл на 3—4-е сутки и последующими флюктуациями с нарастанием к 5—8-м суткам до $4,03 \pm 0,66$ нг/мл.

При развитии ОНМК по типу ишемии на фоне хронической алкогольной интоксикационной или десметаболической энцефалопатии высокий уровень АА к NMDA-рецепторам (до 10,0 нг/мл) выявлялся на 3-4-е сутки и сохранялся таким до 10—14-х суток. У некоторых больных этой группы высокий уровень АА к NMDA-рецепторам наблюдался и в более поздние сроки (28—35 суток).

Таким образом, выявлены закономерные различия уровня АА к NMDA-рецепторам в остром периоде у больных с ОНМК по типу геморрагии и ишемии. Обнаруженные тенденции в изменениях уровня АА к NMDA-рецепторам в разные фазы острого периода ишемического инсульта и острой церебральной геморрагии дополняют ранее полученные результаты [4] и могут быть использованы для диагностики и прогноза течения разных типов острого нарушения мозгового кровообращения.

Выявление более высокого уровня АА к NMDA-рецепторам у больных с ОНМК, развившимся на фоне дисметаболической или интоксикационной энцефалопатии, указывает на существенную роль этих факторов в патобиохимических механизмах нарушений глутаматергической нейрорецепции, лежащих в основе развития и поддержания устойчивой гипертонической мембраны, по-видимому, вне очага некроза. Вскрытые закономерности ориентируют на дальнейшие исследования диагностической значимости уровня АА к NMDA-рецепторам с углублением представлений о нейробиохимических механизмах ОНМК различной этиологии и патогенеза как основы для оптимизации схем лечения этих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганнушкина И.В. Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений головного мозга.—М., 1974.
2. Гусев Е.И. Ишемическая болезнь головного мозга /Актовая речь.—М., 1992.
3. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Изыкенова Г.А., Дамбинова С.А. Клинико-биохимическая диагностика церебральной ишемии //Журн. невропатол. и психиатр.—1996.—№ 5.
4. Дамбинова С.А. Нейрорецепторы глутамата.—Л., 1989.
5. Choi D.W. //Neuron.—1988.—P.623—634.
6. Dambinova S.A. et al. Immunosorbent for diagnosis of epilepsy and group risk.—European Patent Bulletin 93/36, 1993, WO, 93/00586.
7. Dambinova S.A., Gromov S.A., Polyakov J.I., Horschew S.K. Application of paroxysmal activit test (PA-test) in diagnosis of epilepsy and control of the disease cours //X Conference on epilepsy.—Warsaw, May 18—21, 1994.—P.95.
8. Ginsberg M.D. The concept of the therapeutic window—a synthesis of critical issues. // In: New Strategies to prevent neural damage from ischemic stroke.—Oct. 27—28, 1994, Boston Marriot Cambridge.
9. Globus M.Y.T., Busto R., Valdes I., Dietrich W.D., Ginsberg M.D. //J. Neurochem.—1991.—Vol. 57.—P.470—478.
10. Meldrum B.S., Garthwaite J. //Trends Neurosci.—1990.—Vol. 11.—P.379—387.
11. Polyakov J.I., Kissin M.Ja., Dambinova S.A. Epitest application for diagnosis and treatment of epileptic patients //IX Conference on epilepsy.—Warsaw, May 13—15, 1993.—P.69.
12. Polyakov J.I., Kissin M.Ja., Izzykhenova G.A., Dambinova S.A. Epitest in diagnosis and treatment of paroxysmal states //X Conference on epilepci, Warsaw, May 18—21, 1994.—P.97.
13. Siesjo B.K., Bengtsson F. //J. Cereb. Blood Flow. Metabol.—1989.—Vol. 9.—P.127—140.
14. Verheul H.B. Experimental Cerebral Ischemia. Temporal Evolution of Ischemic Cell Death /CIP-Data koninklijke bibliotheek, Den Haag ISBN 90-393-0592-7, 1994.—P.168.

Поступила 16.01.97.