

Практическое значение определения уровня аутоантител к *NMDA*-типу глутаматных рецепторов в диагностике хронических расстройств мозгового кровообращения

Г.А. ХУНТЕЕВ, И.Г. ЗАВОЛОКОВ, Ю.В. ЧЕРКАС, С.А. ДАМБИНОВА

Significance of the level of autoantibodies to *NMDA* type glutamate receptors in diagnosis of chronic cerebral circulation disorders

G.A. KHUNTEEV, I.G. ZAVOLOKOV, YU. V. CHERKAS, S.A. DAMBINOVA

Институт мозга человека РАН, НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

У 30 больных исследованы диагностические возможности нового лабораторного теста церебральной ишемии (*CIS*-тест). Показано, что уровень аутоантител к глутаматному рецептору *NMDA*-типа достоверно повышается (в 3—5 раз) при дисциркуляторной энцефалопатии II стадии. Проведенные параллельные измерения уровня свободного глутамата и гомоцистеина в плазме крови у этих больных не выявили значительных изменений данных параметров по сравнению с показателями аутоантител к *NR2a*-глутаматному рецептору. Измерение титра аутоантител к данному виду рецепторов у больных эпилепсией не обнаружило его существенных изменений. Констатирована зависимость титра аутоантител от степени выраженности дисциркуляторной энцефалопатии и снижение его в процессе лечения. Обсуждаются возможности использования *CIS*-теста для диагностики и контроля терапии у больных с хроническими расстройствами мозгового кровообращения.

For studying diagnostic possibilities of a new laboratory test for cerebral ischemia (*CIS*-test), thirty patients have been examined. The level of autoantibodies to *NMDA* type glutamate receptors is shown to increase significantly (3—5 times) in patients with stage 2 discirculatory encephalopathy. Parallel measurements of free glutamate and homocysteine levels in the patients blood plasma did not reveal any substantial changes of the given parameters, comparing to indices of autoantibodies to *NR2a* glutamate receptor. The titer of autoantibodies to this receptor type did not change significantly in patients with epilepsy; the titer dependence on discirculatory encephalopathy severity level and its decrease during treatment have been found as well. The possibilities of *CIS* using for diagnosis and therapy control in patients with chronic cerebral circulation disorders are discussed.

Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 2001; 11: 44—47

Разработка новых методов ранней диагностики и профилактики цереброваскулярной патологии, являющейся одной из основных причин заболеваемости, инвалидности и смертности взрослого населения, имеет высокую медико-социальную значимость. Смертность по причине сосудистых заболеваний головного мозга в экономически развитых странах составляет 11—12% в общей структуре, занимая третье место после смертности от болезней сердца и опухолей. В России показатель смертности от инсульта на 1000 жителей равен 1,0—1,41 [8].

Очевидно, что проблему профилактики цереброваскулярных заболеваний нельзя решить только путем изучения острых нарушений мозгового кровообращения и последующего реабилитационного периода. Это определяет актуальность в ангионеврологии проблемы диагностики ранних, доинсультных форм сосудистой патологии головного мозга, при которых профилактические и лечебные мероприятия могут быть наиболее эффективны. Доля начальных проявлений недостаточности мозгового кровообращения и его хронических нарушений в структуре цереброваскулярных заболеваний, по данным поликлинической службы, составляет соответственно 52 и 17% [8]. Большинство пациентов с такими формами цереброваскулярных заболеваний не госпитализируются либо вовсе не обращаются за медицинской

помощью. Сложность ранней диагностики сосудистой патологии головного мозга в амбулаторной практике обусловлена тем, что далеко не всегда при массовых обследованиях используются адекватные методы.

В настоящее время диагностические возможности ангионеврологии значительно расширились. Арсенал методов прижизненного дистанционного изучения кровообращения и обмена веществ в головном мозге пополнился высоконформативными методами, как рентгеновская нитро-резонансная, позитронно-эмиссионная томография, дуплексное сканирование, субтракционная ангиография, ультразвуковая доплерография.

В то же время лабораторные методы диагностики цереброваскулярных заболеваний, обладающие такими необходимыми качествами, как простота, достаточно высокая скорость действия, возможность стандартизации для скрининга отдельных групп пациентов, разработаны недостаточно. Ранее была показана связь между нарушением функции *NMDA*-глутаматных рецепторов ЦНС, процессами аутоиммунного повреждения головного мозга [1, 2, 7].

В Институте мозга человека РАН разработан новый метод лабораторной диагностики цереброваскулярных заболеваний — *cerebral ischemia-test* (*CIS*-тест), основанный на определении уровня аутоантител в сыворотке крови к фрагменту глутаматного рецептора *NMDA*-типа. Этот метод заключается в трех последовательных

сах: конкурентном связывании на иммобилизованном и изолированном фрагменте *NMDA*-рецепторов аутоантител, циркулирующих в сыворотке крови больного, детекции осажденных антимозговых аутоантител с помощью «вторых» антител, способных узнавать иммуноглобулины человека в пробе; и в количественном определении связанных на твердой фазе комплексов антиген — антитело по цветовому окрашиванию субстратной смеси.

Диагностическая и прогностическая значимость этого метода установлена у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения [1, 2, 7]. Учитывая общность патогенеза хронических и острых расстройств мозгового кровообращения, мы решили применить его для определения степени выраженности ишемического повреждения головного мозга в случаях хронической сосудистой мозговой недостаточности разной степени тяжести.

Ранее было обнаружено повышенное содержание свободного глутамата в крови при острых нарушениях мозгового кровообращения [9]. Вместе с тем имеются данные о его нормальном содержании при этой патологии [6]. В последнее время в литературе активно обсуждается вопрос о роли повышенного уровня гомоцистеина — серосодержащей аминокислоты как независимого фактора риска развития атеросклероза и его клинических проявлений (ишемической болезни сердца, инсульта, поражения периферических артерий) [10, 11, 13]. Представляло интерес выявить возможные связи между содержанием гомоцистеина, глутамата в плазме крови больных и уровнем аутоантител к *NMDA*-рецепторам.

В данной работе обобщены результаты исследования аутоантител к *NMDA*-рецепторам в сыворотке крови больных с сосудистыми заболеваниями головного мозга, которые находились на лечении в отделении функциональной неврологии клиники Института мозга человека РАН. Клинический диагноз устанавливался на основании анамнестических сведений, результатов клинического неврологического обследования и данных дополнительных исследований — компьютерной томографии головного мозга, эхоэнцефалоскопии, электро- и реоэнцефалографии, ультразвуковой доплерографии. Исследование проводили на фоне комплексной дегидратационно-сосудистой, антигипертензивной и метаболической терапии.

Обследованы 30 пациентов в возрасте 44—77 лет — 16 женщин и 14 мужчин. Их разделили на три группы с учетом степени выраженности органического поражения головного мозга в соответствии с классификацией сосудистых заболеваний нервной системы.

В 1-ю группу вошли 6 больных с клиническими проявлениями дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) I стадии. У этих пациентов преобладали субъективные жалобы на диффузные головные боли невысокой интенсивности, ощущение тяжести в голове, общую слабость, повышенную утомляемость, эмоциональную лабильность, головокружения несистемного характера, некоторое снижение памяти, внимания. В объективном статусе наблюдались легкая анизорефлексия, нечеткие дискоординаторные расстройства, недостаточность глазодвигательных черепных нервов, вегетативные стигмы, негрубые симптомы орального автоматизма.

Группу пациентов с ДЭ II стадии (2-я — 18 человек) разделили на две подгруппы: 2а — с субкомпенсацией (9 больных); 2б — с декомпенсацией процесса (9). У этих больных наблюдалась отчетливая очаговая симптоматика в виде центральной недостаточности VII и XII пар черепных нервов, ярких симптомов

орального автоматизма, координаторных и глазодвигательных расстройств, латерализованной пирамидной недостаточности; эмоциональные расстройства у них были более выраженными, чем у пациентов 1-й группы. При декомпенсации процесса наблюдалось ухудшение клинической картины: нарастание — флюктуация описанных симптомов на фоне общего плохого самочувствия, часто повышенного артериального давления.

В 3-ю группу вошли 6 больных с ДЭ III стадии. В клинической картине у них преобладали амиостатический и психоорганический синдромы, наблюдались грубые центральные парезы как следствие перенесенных ранее мозговых инсультов, выраженный псевдобульбарный синдром.

С целью определения специфичности антигена *NR2* при выявлении аутоантител у больных с хронической сосудистой мозговой недостаточностью была сформирована группа контроля, которую составили 20 пациентов с эпилепсией.

У всех больных определяли содержание в крови аутоантител к изолированному и очищенному фрагменту *NMDA*-рецепторов, используемому в качестве антигена [4]. У больных 2-й группы, помимо этого, оценивали концентрацию свободного глутамата и гомоцистеина в плазме крови.

Для исследования уровня аутоантител к *NMDA*-рецепторам брали кровь из вены, центрифугировали при комнатной температуре и получали сыворотку (100 мкл), которую хранили при +4°C не более 2 нед. Анализ сыворотки проводили с использованием стандартного твердофазного иммуноферментного метода — ELISA (Т. Ngo и Н. Lenhoff, 1980 г.). Количество глутамата и гомоцистеина в плазме крови определяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с флюорометрическим детектированием, чему предшествовала предколоночная деривация аминокислот ортофталевым альдегидом в сочетании с 2-меркаптоэтанолом.

У обследованных здоровых лиц (50 человек) уровень аутоантител к глутаматному рецептору не превышал 1,2 нг/мл. В 1-й группе больных он не выходил за рамки показателей у здоровых лиц (от 0,87 до 1,25 нг/мл). Во 2-й группе у больных с субкомпенсацией процесса (подгруппа 2а) показатели были умеренно повышены — 1,20—1,8 нг/мл. При декомпенсации мозгового кровообращения (подгруппа 2б) на фоне органических изменений головного мозга со стойкими очаговыми неврологическими расстройствами уровень аутоантител в сыворотке крови резко возрастал и составлял от 2,2 до 5,6 нг/мл. В 3-й группе титр аутоантител у большинства больных оказался сниженным до 0,5—0,8 нг/мл. Это дает основание предположить о глубоких атрофических процессах в головном мозге с грубым поражением всего нейротрансмиттерного аппарата, а также — с учетом возраста пациентов — о снижении общего иммунитета.

Больным 2-й группы с декомпенсацией процесса (подгруппа 2б) проводилась массивная комплексная терапия, направленная на оптимизацию мозгового кровообращения, с определением во время и после лечения уровня аутоантител в сыворотке крови. Интересно, что в процессе лечения и регресса клинической симптоматики в течение нескольких

неделя происходило его постепенное стойкое снижение до практически нормальных показателей (1,1—1,5 нг/мл).

В группе контроля (20 больных эпилепсией) уровень аутоантител к *NMDA*-рецепторам значительно не отличался от такового у здоровых лиц и находился в пределах 0,7—1,3 нг/мл.

Примечателен тот факт, что уровень гомоцистеина был повышен независимо от стадии ДЭ и выраженности клинических проявлений. Вместе с тем в обеих подгруппах 2-й группы отмечалось достоверное повышение титра аутоантител к *NR2*-типу глутаматных рецепторов (рис. 1).

Уровень свободного глутамата в плазме крови, который, как отмечалось выше, по некоторым данным [9] повышается при инсульте, в наших наблюдениях находился в рамках показателей у здоровых лиц (рис. 2).

Измерение уровня гомоцистеина в плазме крови больных ДЭ 2-й группы не обнаружило достоверных различий между подгруппами (рис. 3).

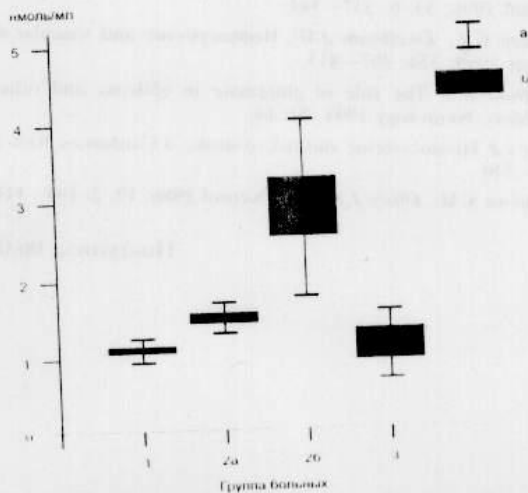


Рис. 1. Содержание аутоантител (нмоль/мл) у больных ДЭ. Здесь и на рис. 2 и 3 σ — стандартное отклонение, σ^2 — стандартная ошибка.

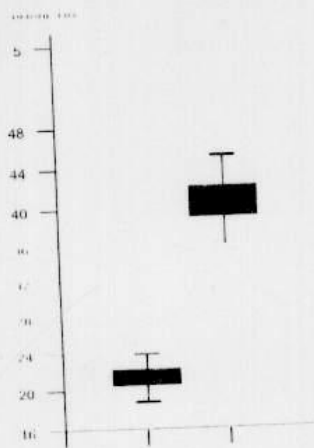


Рис. 2. Содержание глутамата у больных ДЭ 2-й группы.

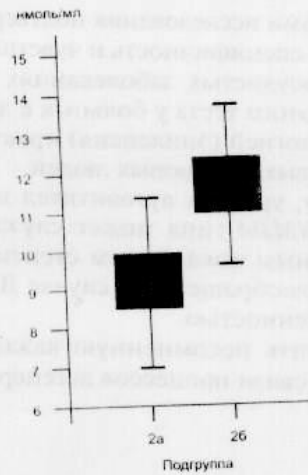


Рис. 3. Содержание гомоцистеина у больных ДЭ 2-й группы.

Таким образом, содержание глутамата и гомоцистеина в крови в нашем случае оказалось неспецифичным показателем для I и II стадии ДЭ и не могло служить объективным критерием степени расстройства мозгового кровообращения.

В соответствии с современными представлениями глутамат и его рецептор, по-видимому, являются главными структурами, ответственными за проведение возбуждающей нейротрансдукции в ЦНС [3]. Известно, что глутаматные рецепторы организуют ионные каналы для Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и могут участвовать в механизмах «возбуждающей токсичности» нервных клеток при гипоксии и ишемии [3]. Как показали S. Rothman и J. Olney [14], в условиях неполной ишемии избыточный вход кальция в клетку осуществляется преимущественно через рецепторзависимые кальциевые каналы, в первую очередь связанные с глутаматными рецепторами, что ведет к селективной гибели нейронов.

Существуют два ионотропных типа глутаматных рецепторов — *NMDA*- и не *NMDA*-, которые в свою очередь были подразделены на соответствующие подтипы — *NR1*, *NR2* и *Glu R1*, *Glu R2*, *Glu R3*, *Glu R4*. Ранее мы обнаружили, что повреждение глутаматергических нейронов при ишемии тесно связано с накоплением аутоантител к глутаматным рецепторам *NMDA*-типа [3—5]. Использование метода диагностики церебральной ишемии по уровню аутоантител к глутаматным рецепторам *NMDA*-типа в крови пациентов базируется на представлениях о тесной связи между процессами аутоиммунизации организма, нарушением функции *NMDA*-рецепторов и распространением ишемических поражений ткани головного мозга [1].

Е. И. Гусев и соавт. [1, 2] рассматривают нарушение структуры и функции глутаматных рецепторов в условиях церебральной ишемии в качестве свидетельства деструкции мембран нервных клеток, нарушения структурной целостности определенных зон головного мозга и функционально-ферментного барьера с целью предотвращения диффузии в него чужеродных антигенов рецепторов в общий кровоток и откликом иммунной системы на «забарьерные» антигены.

Проведенные нами исследования подтверждают эту гипотезу. Выявлена специфичность и чувствительность «CIS-теста» при сосудистых заболеваниях головного мозга. Показатели этого теста у больных с другой неврологической патологией (эпилепсия) практически не отличались от таковых у здоровых людей.

Таким образом, уровень аутоантител к глутаматным рецепторам *NMDA*-типа может служить объективным лабораторным показателем степени нарушения мозгового кровообращения в случае ДЭ и коррелирует с ее выраженностью.

Следует отметить несомненную важность дальнейшего изучения связи процессов дегенерации нерв-

ной ткани, протекающих при хронических расстройствах мозгового кровообращения, и нарушения функций глутаматных рецепторов *NMDA*-типа. Накопление в сыворотке крови аутоантител к данному виду нейрорецепторов может оказаться новым объективным биохимическим показателем, способным существенно облегчить диагностику и контроль эффективности лечения больных с хроническими нарушениями мозгового кровообращения. Значимость теста увеличивает и то, что его применение в целях контроля лечения дает практическому врачу объективный дополнительный метод лабораторного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Изъянова Г.А. и др. Изучение уровня аутоантител к глутаматным рецепторам в сыворотке крови больных в остром периоде ишемического инсульта. Журн неврол и психиатр 1996; 96: 5: 68–72.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М: Медицина 2001.
3. Дамбинова С.А. Нейрорецепторы глутамата. Л: Наука 1988.
4. Дамбинова С.А., Городицкий А.И., Демина М.Н. и др. Фундаментальные науки — медицине. М 1990.
5. Дамбинова С.А. и др. Метод диагностики инсульта. Патент №95103989. 1998.
6. Денисенко Т.В., Скульбин Д.И., Громов И.А. и др. Аутоантитела к *NMDA*-рецепторам в крови больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения. Вопр мед химии 1998; 44: 6: 584–590.
7. Илюхина А.Ю. Динамика накопления аутоантител к глутаматным рецепторам *NMDA*-типа в крови больных в остром периоде церебрального инсульта: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ст-Петербург. 1998.
8. Одилак М.М., Михайленко А.А., Иванюк Ю.С., Сесин Е.Ф. Сосудистые заболевания головного мозга. Ст-Петербург: Гиппократ 1997.
9. Castello J., Davalos A., Noya M. Lancet 1997; 349: 1: 407–413.
10. De Vriese A. S., De Sutter J.H., De Buyzere M., Duprez D. Mild to moderate hyperhomocysteinaemia in cardiovascular disease. Acta Cardiol 1998; 53: 6: 337–344.
11. Hankey G.J., Eikelboom J.W. Homocysteine and vascular disease. Lancet 1999; 354: 407–413.
12. Meldrum B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. Neurology 1994; 44: 14.
13. Perry I.J. Homocysteine and risk of stroke. J Cardiovasc Risk 1999; 6: 235–240.
14. Rothman S.M., Olney J.M. Ann Neurol 1986; 19: 2: 105–111.

Поступила 06.06.2000