

НЕЙРОИММУНОЛОГИЯ

NeuroImmunology

Ежеквартальный научно-практический рецензируемый журнал

Том VII, № 2, 2009



ИССЛЕДОВАНИЯ

КЛИНИКА

ДИАГНОСТИКА

ЛЕЧЕНИЕ

- нейроиммунные взаимодействия
- демиелинизирующие процессы
- рассеянный склероз
- аутоиммунная патология
- сосудистая патология
- нейроинфекции
- нейродегенеративные и нервно-мышечные заболевания
- проблемы паркинсонизма, эпилептологии
- психоневрология
- нейроонкоиммунология
- иммунофармакология, иммунотерапия

НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ПОРАЖЕНИЙ МОЗГА

**А.А.Скоромец, С.А.Дамбинова, М.М.Дьяконов, О.К.Гранстрем,
О.А.Седова, А.П.Скоромец, Т.А.Скоромец, В.А.Сорокоумов,
Д.Г.Смолко, М.В.Шумилина, Г.А.Хунтеев**

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова,
академическая группа академика РАМН А.А.Скоромца, Санкт-Петербург

NEW BIOMARKERS OF BRAIN DAMAGES

**A.A.Skoromets, S.A.Dambinova, M.M.Dyakov, O.K.Granstrem,
O.A.Sedova, A.P.Skoromets, T.A.Skoromets, V.A.Sorokoumov,
D.G.Smolko, M.V.Shumilina, G.A.Khounteev**

St.-Petersburg acad. Pavlov's State Medical University,
The academician group of acad. RAMS A.A.Skoromets, Saint-Petersburg

Анализируются результаты исследования различных биомаркеров у 60 больных с мозговыми инсультами, у 50 больных с дисциркуляторной энцефалопатией вследствие атеросклероза каротидных артерий, у 40 пациентов с эпилептическими синдромами, у 10 детей, рожденных матерями-наркоманками. Делается заключение о большой клинической значимости таких биомаркеров, как: GluR1 AMPA-рецептора, аутоантитела к глутаматным рецепторам NMDA, антитела (aAbs) к опиатным и глутаматным рецепторам, NR1, NR-2A-NR2D и NR3A, PARK7 и nucleoside diphosphate kinase A, S-100b, Acetyl polyamine oxidase [AcPAO], С-реактивный белок. Исследование концентрации таких антител помогает ранней диагностике патологического процесса, его степени выраженности и динамики под влиянием терапевтических мероприятий. Рекомендуется широкое внедрение в клиническую практику биомаркеров: NR1, NR-2A-NR2D и NR3A, GluR1 AMPA-рецептора и др.

Ключевые слова: биомаркеры ишемии мозга, эпилепсии, наркомании матери и плода.

The data of biomarkers' research in patients with brain ischemia, dyscirculatory encephalopathy, epilepsy and in newborn children with drug addiction' mothers are discussed. Some of these biomarkers have the great consequence in the early diagnostics of the pathology process, its heaviness and therapy.

Key words: biomarkers of brain ischemia, epilepsy, drug addiction of mother and foetus.

Хорошо известна важность ранней диагностики различных патологических процессов в головном и спинном мозге. Это требуется в целях своевременного назначения и проведения патогенетически обоснованной интенсивной терапии для лучшего исхода болезни. Исследования биомаркеров патологии мозга являются одним из наиболее перспективных направлений в неврологии [1-10]. Биомаркер должен отличаться норму от соответствующего заболевания, быть чувствительным и высокоспецифичным. В качестве биомаркеров выступают белки (в т.ч. ферменты и аутоантитела) и пептиды.

Сейчас нет сомнения, в том, что функции иммунной системы много шире, чем представлялось

раньше. Еще Илья Мечников высказал идею, что клетки иммунной системы не только "жандармы", но и регуляторы. Сегодня выяснено, что одни аутоантитела служат "мусорщиками", отправляя старые или негодные клетки на переработку, другие, напротив, "телохранителями", в частности, для гормонов, третьи регулируют биохимические реакции в клетке. Тему аутоантител, поднятую учеными три десятилетия тому назад, затмили геномные исследования и масштабный проект "Геном человека". Когда к 2003 году был расшифрован геном человека, мировая пресса пестрела заголовками о расшифровке книги жизни и новой эре в биологии и медицине. Предполагалось, что будут найдены пути ко многим неизлечимым за-

болеванием. Однако уровень “генетической разочарованности” оказался довольно высоким, все оказалось сложнее, ведь для развития большинства генетических заболеваний необходимо взаимодействие целого комплекса генов и предрасполагающих внешних и внутренних факторов. Даже наличие мутации в каком-либо гене не означает обязательного развития болезни.

Вместе с тем, исследования в области иммунологии вывели ее на новый уровень. Признано положение о том, что иммунная система является не только “жандармом” для вирусов и бактерий, но и регулирующей системой, а ее элементы, в частности аутоантитела, способны “говорить” о состоянии организма. Стало ясно, что широкое изучение аутоантител поможет прогнозированию различных заболеваний.

Нами исследованы биомаркеры при различной патологии нервной системы.

Острые и хронические нарушения мозгового кровообращения

Нами исследовано 60 больных в острой стадии нарушения мозгового кровообращения (у 15 пациентов были транзиторные ишемические атаки, у 45 – ишемические инсульты). Возраст больных был от 42 до 76 лет. Мужчин было 31, женщин 29. Ещё у 50 других пациентов была диагностирована хроническая сосудисто-мозговая недостаточность вследствие атеросклероза каротидных артерий, что было подтверждено при транскраниальной доплерографии и МР-ангиографии.

Диагностика сосудистого поражения головного мозга основывалась как на анализе анамнестических данных, развития клинической картины, так и данных нейровизуализационных исследований. Известно, что не всегда возможно сделать компьютерную томографию (КТ) или магнитно-резонансную томографию (МРТ), особенно в тех случаях, когда пациент находится на ИВЛ, либо лечебное учреждение не оборудовано такой техникой, либо очаг начинает визуализироваться на КТ/МРТ исследовании спустя 3-6 часов, либо затруднена оценка очага в задней черепной ямке (при МРТ исследовании). Более информативным может оказаться биомаркер остро возникшей ишемии головного мозга, который сможет обнаруживаться в первые минуты–часы. Вместе с тем, методика измерения биомаркера технически должна быть доступна, «проста» (как глюкозный тест - по одной капле крови) и недорогой.

В последние годы несколько иммунохимических методик были предложены и опробованы для клинического использования в неврологии. В настоящее время Тромбоген-5 и -2 теста Thrombix (Athena Diagnostics) доступны для использования при диагностике инсульта/тромбоза. Эти тесты чувствительны как к венозным тромбозам, так и к состояниям, ассоциированным с гиперкоагуляцией, и

указывают на необходимость антикоагулянтной терапии. Используются тесты для определения маркеров коагуляции: анти-тромбин-3, протеин-С, фактор 9 и антикардиолипиновые антитела (IgG, IgM, и IgA). 20-ти минутный латекс-тест для определения D-димеров обладает достаточной чувствительностью (89-95%), однако, к сожалению, его повышение также происходит и при других состояниях, таких как черепно-мозговая травма, кровотечение, хирургическая операция, злокачественная опухоль, беременность.

Уже изучены и другие биомаркеры и их возможность использования при ТИА/инсульт:

S-100b (Са-связывающий протеин, маркер активации астроцитов) – его количество возрастает в биологических жидкостях при повреждении головного мозга, вызванного различными причинами (ишемия и геморрагия), коррелирует с размером повреждения, может указывать на злокачественное течение повреждения [24].

PARK7 и **nucleoside diphosphate kinase A** (из цереброспинальной жидкости, количество которых возрастает при остром обширном инфаркте мозга, в том числе, и в плазме крови) - не отражают зависимости количества маркера и размера зоны ишемии; скорее всего косвенным образом отражают процессы, происходящие при ишемии [7, 23].

Acetylpolymine oxidase [AcPAO] - возможный биомаркер для инсульта. Он коррелирует с размером ишемии, однако, не специфичен только для нервной ткани, не специфичен для определенного вида повреждения, ложно-негативные результаты до 25% при лакунарных инфарктах [18].

C-реактивный белок - как предиктор увеличения риска повторного инсульта (неспецифичен).

Понимание экспрессии генов глутаматных нейрорецепторов и работы множественного нейрохимического каскада, участвующего в интегративных свойствах нейрона, имеет значение как для обоснования теоретических принципов регуляции сложных поведенческих реакций у высших организмов, так и для практического применения в медицине. Широкая распространенность семейства глутаматных рецепторов в корковых и подкорковых структурах, а также спинном мозге, позволяет им участвовать в многочисленных взаимодействиях между нейронами и в разных звеньях системы обеспечения высших функций мозга.

Глутаматные рецепторы делятся на две основные группы: ионотропные и метаботропные. Ионотропные нейрорецепторы подразделяются на NMDA (80% от количества всех возбуждающих синапсов), AMPA, каинатные и L-AP4.

В настоящее время идентифицированы три класса NMDA-рецепторов. Первый (NR-1), по всей видимости, представлен одиночным геном, а другие (NR-2A-NR2D и NR3A) - множественными генами, кодирующими синтез белков, состоящих примерно из 900 и 1450 аминокислот. NMDA-рецепторный комплекс может из-

меняться при ишемии. Результатом этого является нарушение ионной проницаемости и/или селективности. Немедленные последствия этих процессов заключаются в повышении проницаемости клеточной мембраны для ионов натрия и ее набухании. Однако наиболее разрушительным фактором считается дальнейшее повышение концентрации Ca²⁺.

В лаборатории С.А.Дамбиновой разработаны 2 теста, в основе которых лежит определение уровня пептида NR2 или аутоантител к нему [11-17].

Тест определения уровня пептида NR2 в крови (часть NMDA-рецептора, отщепляемого в результате глутамат-кальциевого каскада, развивающегося во время острого нарушения мозгового кровообращения). Пептидные частицы проникают через гематоэнцефалический барьер в общий кровоток – высокоспецифичен для ишемического инсульта и высокочувствителен, появляется в первые минуты после ОНМК, достигая максимума на 1-3 сутки, затем также быстро его концентрация в крови уменьшается, возможно коррелирует с объемом ишемии.

Тест определения уровня аутоантител к NR2-пептиду. В результате ОНМК в кровь выбрасывается большое количество субъединиц разрушенного NMDA-рецептора (NR2A, NR2B), к ним начинают вырабатываться аутоантитела. аAbs постепенно элиминируют субъединицы NMDA-рецептора из крови с максимумом на 3-5-7 день. Данные антитела являются регуляторными и в небольшом количестве присутствуют и у здорового человека. При нарастании хронической недостаточности мозгового кровообращения содержание аAbs соответственно увеличивается в крови, в связи с этим они могут быть использованы как предикторы риска развития надвигающейся «ишемической катастрофы» [23].

Поставлена задача (С.А.Дамбиновой) определить специфический биомаркер ишемии спинного мозга, что будет иметь важное значение для оценки «сосудистого фактора» в патогенезе поражения спинного мозга при патологии позвоночника (при травме, грыжах межпозвоночного диска, дегенеративных заболеваниях позвоночника и т.п.).

Эпилепсия и эпилептические синдромы

По данным разных авторов [5,16] у 8-12% взрослых больных эпилепсия возникла еще в детском возрасте. Приступы почти у трети больных резистентны к проводимой терапии. В детском возрасте, помимо эпилепсии, часто встречаются такие пароксизмальные состояния, как аффективно-респираторные приступы, мигрень, псевдоэпилептические или конверсивные пароксизмы, парасомнии и др., а также синкопе кардиального сосудистого генеза. Наибольшие трудности возникают в постановке диагноза у детей раннего возраста в результате несформированного нейроэлектrogenеза, а также полиморфизма судорожных пароксизмов.

Нами проанализирована клиническая картина и динамика биомаркеров у 40 пациентов с эпилепсией и эпилептическими синдромами в возрасте от 1 года до 45 лет. Среди них мужчин было 14, женщин – 26.

Одна из главных вспомогательных методик при исследовании пациента с судорогами в анамнезе остается ЭЭГ. Вместе с тем, не всегда возможно выполнить это исследование (особенно, у недоношенных). Обычно ЭЭГ снимается вне приступа и не имеет патологических изменений. Воспользовавшись биомаркером, возможно предсказать развитие эпилепсии у данного конкретного больного, а также судить о тяжести заболевания. Наиболее распространенной точкой зрения на механизм развития эпилепсии является гипотеза о нарушении баланса в метаболизме медиаторов головного мозга (тормозной медиатор - ГАМК и возбуждающий - глутамат) в сторону увеличения глутамата. В настоящее время получены данные о ведущей роли повреждения AMPA-глутаматных рецепторов в патогенезе эпилепсии. В ответ на деструкцию неNMDA-рецепторов усиливается продукция антител к ним. Этот фрагмент был идентифицирован как GluR1 AMPA-рецептора. У пациентов с продолжительным течением заболевания и высокой толерантностью к терапии было обнаружено уменьшение количества AMPA-рецепторов. Это может происходить вследствие деградации их внеклеточных доменов под воздействием специфических протеолитических ферментов (калпаин), активизирующихся при пароксизмальной активности мозга. Иммуноактивные компоненты способны проникать через нарушенный ГЭБ в кровь и вызывать иммунный ответ. Таким образом, GluR1 аутоантитела могут быть показателем гипервозбудимости ЦНС при устойчивых судорожных состояниях мозга и выступать как один из значимых факторов в патогенезе.

С.А.Дамбиновой разработаны 2 теста в этом направлении:

1) определение уровня пептида GluR1 в плазме, обнаруживаемого у людей с судорожным синдромом в анамнезе (при эпилепсии уровень значительно выше, чем при судорожном синдроме при гипогликемии или других состояниях, сопровождающихся судорогами). Тест весьма чувствителен и высоко специфичен;

2) определение уровня аутоантител к GluR1 в сыворотке крови. Отражает готовность нервной системы ответить судорожной активностью при соответствующих факторах (травме, интоксикации, дисциркуляторной ишемии мозга). Тест возможен как предиктор.

Абстинентный синдром

Известно, что потребление морфия и других наркотиков приводит к определенным изменениям уровня в крови аутоантител (аAbs) к опиатным и глутаматным рецепторам (типа AMPA и глутаматным рецепторам NMDA). Такие исследования проводились в Институте Мозга Человека РАН в Санкт-Петербурге у

взрослых людей с наркозависимостью (под руководством академика Н.П.Бехтеревой, лаборатория проф. С.А.Дамбиновой). Уровень аAbs определяли с помощью иммуноферментного анализа.

Эти исследования показали раннее и достоверное увеличение уровня аAbs у данной категории пациентов. Это объясняется наступающими структурными дефектами глутамат- и опиатных рецепторов нейронов, повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера с выбросом антигенов (структурных белковых осколков пострадавших рецепторов) в кровь и последующей выработкой аутоантител к собственным нейрональным глутамат- и опиатным рецепторам.

В 2003-2004 году на базе Детской городской больницы №1 (Санкт-Петербург) совместно с лабораторией С.А.Дамбиновой проводились исследования здоровых новорожденных и 15 детей, рожденных от матерей-наркоманок. Трудность трактовки данных исследования заключалась в том, что выявляемые антитела, относящиеся к классу IgG, легко могут проникать через плацентарный барьер от матери к ребенку. Поэтому уровень антител в крови младенца желательно сравнивать с материнским, однако забор крови у матери-наркоманки в сложившихся условиях оказывается мало осуществимым (женщины, как правило, сбегают и бросают своих детей в роддоме, или травмированные подкожные вены наркоманок затрудняют взятие у них крови). Вместе с тем, даже материнские антитела к рецепторам нейронов могут блокировать такие рецепторы у плода. Известно, что данные аутоантитела выявляются и у здоровых людей (в нашем исследовании у здоровых новорожденных), однако в низких титрах. То есть, они вырабатываются и в норме, являются ауторегуляторными факторами, позволяющими, вероятно, контролировать активность рецепторов нейронов.

Была установлена прямая зависимость между выраженностью абстинентного синдрома и уровнем аAbs, а также выявлено достоверное различие уровня аAbs сыворотки крови у здоровых младенцев и у детей, родившихся от женщин, страдающих наркоманией (рис.1-3).

В литературе имеются указания на поиск специфических нейрпатологических, биохимических и генетических биомаркеров нейродегенеративных заболеваний (включая болезнь Альцгеймера и Паркинсона) с целью постановки диагноза на ранней стадии болезни. Нейрпатологический диагноз является «золотым стандартом», однако он обычно устанавливается при аутопсии пациента. Поэтому очень важен поиск биомаркеров, характерных для ранней стадии заболевания, когда имеется возможность получить раннее лечение с целью притормозить прогрессирование болезни. Биомаркеры могут предсказать не только риск заболевания, но и показать степень прогрессирования болезни или выраженность ответа на лечение [25-27].

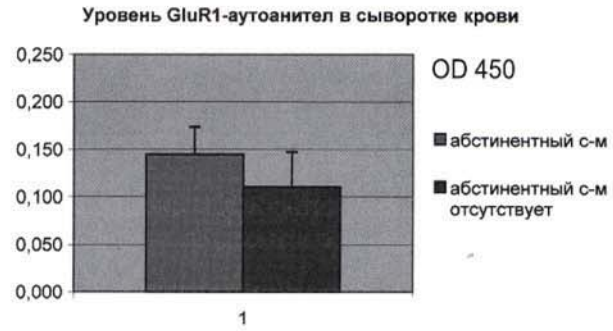


Рис.1. Уровень GluR1-аутоантител в сыворотке крови при абстинентном синдроме и без него.



Рис.2. Уровень NMDA-аутоантител в сыворотке крови при абстинентном синдроме и без него

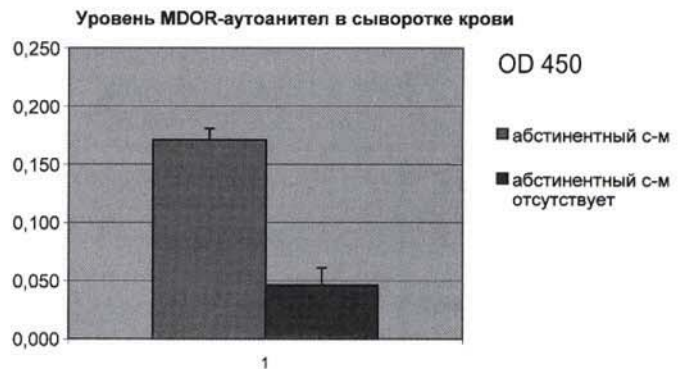


Рис.3. Уровень MDOR-антител в сыворотке крови при абстинентном синдроме и без него.

Заключение

Ранняя и своевременная диагностика заболеваний нервной системы необходима для улучшения качества медицинской помощи таким больным и повышения эффективности терапии. Современные методы лабораторной диагностики позволяют с высокой степенью достоверности определять наличие сосудисто-церебральной патологии, эпилептического

синдрома, алкоголизма и наркомании, дегенеративных поражений нервной системы (включая болезнь Альцгеймера и Паркинсона), повысить точность их диагностики, оценивать последствия или предсказывать возможные исходы заболевания, мониторировать эффективность проводимых лечебно-реабилитационных мероприятий.

Лабораторные тесты, определяющие в крови биомаркеры мозга, такие как NR2 пептид и NR2 антитела, могут стать ключевыми компонентами ус-

пешной стратегии лечения и мониторинга исходов заболевания. Технологические достижения в области аналитических методов диагностики позволяют создавать эффективные, в том числе с экономической точки зрения, системы экспресс-диагностики, которые способны выявлять пациентов с высоким риском сосудистомозговых кризов, пароксизмальных нарушений сознания, наследуемых дегенеративных поражений нервной системы и других нуждающихся в помощи специалиста-невролога.

Литература

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина. 2001. – 327 с.
2. Дамбинова С.А., Скоромец А.А., Громова Л.Г., Илюхина А.Ю. Уровень аутоантител к фрагменту глутаматного рецептора NMDA-типа у больных с острым нарушением мозгового кровообращения. *Нейрохимия* 1998; 14 (4): 420-422.
3. Илюхина А.Ю. Динамика накопления аутоантител к глутаматным рецепторам NMDA-типа в крови больных в остром периоде церебрального инсульта. Автореферат канд. диссерт. СПб. 1998. – 23 с.
4. Скоромец А.А., Дамбинова С.А., Илюхина А.Ю., Сорокоумов В.А. Аутоантитела к глутаматным рецепторам NMDA-типа в крови пациентов с острым ишемическим и геморрагическим инсультом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова* 1997; 97 (6): 53-58.
5. Скоромец А.П. Инфекционные поражения нервной системы у новорожденных. Автореф. доктор. диссерт. СПб. 2001. – 70 с.
6. Скоромец Т.А. Вторичная ишемия головного мозга в остром периоде черепно-мозговой травмы. Автореф. доктор. диссерт. СПб. 2002. – 42 с.
7. Allard L, Burkhard P.R, Lescuyer P. et al. PARK7 and nucleoside diphosphate kinase A as plasma markers for the early diagnosis of stroke. *Clin Chem* 2005; 51: 2043-2051.
8. Albers G.W., Caplan L.R., Easton J.D. et al. Transient ischemic attack—proposal for a new definition. *N Engl J Med* 2002; 347(21): 1713-1716.
9. Bokesch P.M., Izykenova G.A., Justice J.B., Easley K.A., Dambinova S.A. NMDA receptor antibodies predict adverse neurological outcome after cardiac surgery in high-risk patients. *Stroke* 2006; 37: 1432-1436.
10. Brightwell R.E., Sherwood R.A., Athanasiou T., Hamady M., Cheshire N.J.W. The neurological morbidity of carotid revascularisation: using markers of cellular brain injury to compare CEA and CAS. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 34: 552-560.
11. Dambinova S.A., Izykenova G., Gappoeva M., Wang Y., Hoffer B. NMDA receptors expression and immunoreactivity in experimental cerebral ischemia and hemorrhage. *J Neurochem* 2003; 87:144.
12. Gingrich M.D., Traynelis S.F. Serine proteases and brain damage—is there a link? *Trends Neurosci* 2000; 23: 399-407.
13. Dambinova S.A., Khounteev G.A., Izykenova G.A., Zavolokov I.G., Ilyukhina A.Y., Skoromets A.A. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-d-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin Chem* 2003; 49: 1752-1762.
14. Dambinova S.A., Khounteev G.A., Skoromets A.A. Multiple panel of markers for TIA/stroke evaluation [Letter]. *Stroke* 2002; 33: 1181-1182.
15. Dambinova S.A. Brain Biomarkers for Cerebral Ischemia: NMDA Receptor Degradation and Blood Assay Development. AACC Press. Forthcoming.
16. Dambinova S.A., Brightwell R.E., Khunteev G.A., Cheshire N.J. NR2 peptide correlates with acute cerebrovascular events after carotid revascularization. Submitted to *Stroke*.
17. Dambinova S.A., Khunteev G.A., Olson D.A., Izykenova G.A., Heath R., Fedanov A.V., Weissman J.D. NR2 peptide indicates transient ischemic attack and acute ischemic stroke. *Int J Stroke* 2008; 3: 153-154. Abstract PO01-246.
18. Hideyuki Tomitori, Teruyoshi Usui, Naokatsu Saeki, Shiro Ueda, Hiroshi Kase, Kazuhiro Nishimura, Keiko Kashiwagi, Kazuei Igarashi. Polyamine Oxidase and Acrolein as Novel Biochemical Markers for Diagnosis of Cerebral Stroke. *Stroke*. 2005; 36: 2609.
19. Hill M.D., Yiannakoulias N., Jeerakathil T. et al. The high risk of stroke immediately after transient ischemic attack: a population based study. *Neurology* 2004; 62: 2015-2020.

20. Glynn T., Tews M., Izykenova G., Hughes M., Khunteev G., Dambinova S. The clinical utility of serum NR2 peptide assay in the diagnosis of patients presenting to the emergency department with acute cerebrovascular ischemic events. *Ann Emerg Med* 2007; 50: 35. Abstract 107.
21. Gorelick P.B. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of stroke. *Am J Cardiol* 2008; 101(12A): 34F-40F.
22. Mackay J., Mensah G. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. World Health Organization. 2004: 50-51.
23. Mario Di Napoli, Francesca Papa Vittorio Bocola. C-Reactive Protein in Ischemic Stroke An Independent Prognostic Factor. *Stroke* 2001; 32: 917.
24. Pilar Delgado, Jose Alvarez Sabin, Esteban Santamarina et al. Plasma S100B Level After Acute Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 2006; 37: 2837.
25. Sharp C.D., Fowler M., Jackson T.H. et al. Human neuroepithelial cells express NMDA receptors. *BMC Neurosci* 2003; 4: 28.
26. Weissman J.D., Khunteev G.A., Olson D., Izykenova G., Dambinova S. NR2 peptide levels correlate with acute cortical stroke volume and may detect reversible ischemia. *Stroke* 2007; 38: 494. Abstract P39.
27. Whiteley W., Tseng M.C., Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke. A systematic review. *Stroke* 2008; 39: 2902-2909.

Поступила в апреле 2009 г.