

УДК 616.831-053.31

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К NMDA-РЕЦЕПТОРАМ И БЕЛКУ S-100 У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ, РОДИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ АСФИКСИИ

А.П. СКОРОМЕЦ*, Ю.В. ВЕТЧИНКИНА, А.В. ВЕТЧИНКИН*****

**ГОУ ВПО Северо-Западный медицинский университет им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург*

***ГУ РК «Поликлиника», г. Сыктывкар*

****ГУ РК «Кардиологический диспансер», г. Сыктывкар*

Vetcamp@inbox.ru

Целью нашего исследования было определение уровня аутоантител к NMDA-рецепторам и белку S-100 у доношенных новорожденных, родившихся в асфиксии в зависимости от степени тяжести перенесенной гипоксии, дыхательных расстройств и основных неврологических нарушений. Обследовано 47 доношенных новорожденных основной группы и 25 практически здоровых контрольной группы. Определены нормальные показатели антител для белка S-100: 0 - 0,003OD, у NMDA-теста: 0-0,02OD. Выявлены предикторы развития церебральной ишемии у новорожденных. Доказана зависимость между уровнем антител к NMDA-рецепторам и белку S-100 и тяжестью состояния новорожденного.

Ключевые слова: асфиксия новорожденных, биомаркеры ишемии мозга, антитела к NMDA-рецепторам и белку S-100, гипоксически-ишемическая энцефалопатия

A.P. SKOROMETZ, YU.V. VETCHINKINA, A.V. VETCHINKIN. DYNAMICS OF ACCUMULATION OF AUTOANTIBODIES TO NMDA-RECEPTORS AND PROTEIN S-100 IN FULL TERM NEWBORNS BORN IN ASPHYXIA

The purpose of our study was determination of the level of autoantibodies to NMDA-receptors and protein S-100 in reported newborns born in asphyxia depending on the degree of gravity of previous hypoxia, respiratory disorders, the basic neurologic disturbances. We examined 47 full term newborns of the core group and 25 practically healthy of the control group. Normal indices of antibodies for protein S-100: 0-0,003OD, in NMDA-test: 0-0,02OD are determined. The predictors of the development of cerebral ischemia in newborns are revealed. Dependence between the level of antibodies to NMDA-receptors and protein S-100 and the severity of the condition of the newborn is proved.

Key words: asphyxia of newborns, biomarkers of ischemia of the brain, antibody to NMDA-receptors and protein S-100, hypoxic-ischemic encephalopathy

Гипоксически-ишемическое поражение головного мозга у новорожденных детей представляет собой важную медико-социальную проблему, поскольку может способствовать неполноценному развитию ребенка как в интеллектуальном, так и физическом отношении. По данным экспертов ВОЗ, до 65-80% патологии нервной системы у детей связано с перинатальным повреждением головного мозга. В 35-40% случаев заболевания нервной системы приводят к инвалидизации и дезадаптации детей [1, 2]. Анатомо-физиологические особенности детей грудного возраста таковы, что иногда даже обширное повреждение мозга в первом полугодии жизни может не вызывать неврологический дефи-

цит и очаговые нарушения и этот период обозначают как «немой» [3, 4]. Новорожденные дети, имеющие неврологические проблемы, как правило, рождаются у женщин, относящихся к категории повышенного или высокого перинатального риска (бесплодие, привычное невынашивание, экстрагенитальные заболевания и пр.). Дальнейший прогноз определяет действие факторов в антенатальном периоде, а не продолжительность натальной асфиксии. Асфиксия продолжительностью более 10 мин чаще возникает на неполноценной метаболической и морфофункциональной основе мозга, пострадавшего на ранних этапах онтогенеза [5]. Поэтому у детей с высоким риском поражения голов-

ного мозга гипоксического характера необходима тщательная диагностика этих состояний.

В настоящее время диагностика гипоксических поражений мозга у новорожденных является результатом комплексной оценки состояния ребенка. Она включает изучение протекания беременности и родов у женщины, неврологическое обследование, изучение метаболических показателей новорожденных, а также дополнительные методы обследования [7]: нейросонография, доплерография, различные виды томографии – компьютерная, магнитно-резонансная, позитронно-эмиссионная; нейрофизиологические – электроэнцефалография, полиграфия, вызванные потенциалы, различные виды электромиографии; диагностические пункции – люмбальная, субокципитальная. Наиболее информативными методами определения ишемического поражения головного мозга являются методы нейровизуализации. Их прогностическая ценность составляет около 90 %, однако экономические возможности государства не позволяют этими методами диагностики провести 100%-ный охват новорожденных в связи с высокой стоимостью оборудования и невозможностью оснастить ими все родильные дома.

Таким образом, одна из актуальных проблем – поиск биохимических маркеров для диагностики гипоксически-ишемических поражений мозга. А перспективное направление – метод определения аутоантител к NMDA-рецепторам и белку S-100 как маркерам поражения головного мозга у новорожденных, родившихся в асфиксии [2, 5].

Белок S-100 как специфический белок астроцитарной глии способен связывать кальций. Астроглиальные клетки — это наиболее многочисленные клетки в мозговой ткани. Они образуют трехмерную сеть, которая представляет собой опорный каркас для нейронов. Увеличение концентрации S-100 ($\alpha\beta$) и S-100 ($\beta\beta$) в спинномозговой жидкости (СМЖ) и плазме является маркером повреждения головного мозга. У пациентов с повреждением мозга при раннем определении содержания белка S-100 его концентрация отражает степень повреждения [10, 11]. Для ишемии тест не специфичен. Антитела могут появляться при черепно-мозговых травмах, эпилепсии [1, 2]. Но исследований по определению антител к белку S-100 у новорожденных, родившихся в асфиксии, немного. Только в одной из них была выявлена достоверная корреляционная связь между тяжестью поражения мозга и высоким титром белка S-100 в сыворотке крови у новорожденных с перинатальным гипоксическим поражением центральной нервной системы [2].

В последние годы уделяется большое внимание определению аутоантител к глутаматным рецепторам как маркерам церебральной ишемии. Данные рецепторы выявляются на поверхности эпителия микрососудов, формирующих гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), и участвуют в регуляции функции микрососудов. Дегенерация NMDA-рецепторов, наблюдаемая в результате процессов нейротоксичности, которые лежат в основе ишемического повреждения мозга, позволяет судить о

степени поражения церебральных сосудов [11]. Диагностическое значение NR2-антител при ишемическом инсульте с объемом ишемии 5–70 см³ приближается к 95,9 %, а при ТИА – к 98 [7]. Практически все исследования этого профиля проводятся на взрослых пациентах. Показана достоверная корреляционная связь между уровнем титра антител к разным подтипам глутамат зависимых рецепторов и клинической картиной у больных с различными неврологическими заболеваниями: острыми нарушениями мозгового кровообращения [7, 11], эпилепсией [10]. Нами впервые проведено исследование аутоантител, образующихся к NMDA-рецепторам, в условиях ишемии у новорожденных.

Целью нашего исследования было определение уровня аутоантител к NMDA-рецепторам и белку S-100 у доношенных новорожденных, родившихся в асфиксии в зависимости от степени тяжести перенесенной гипоксии, дыхательных расстройств и основных неврологических нарушений.

Материалы и методы исследования

Основная группа

В основную группу были включены родившиеся в состоянии асфиксии 47 новорожденных в возрасте от 0 до 1 месяца. Асфиксия новорожденных сформирована факторами со стороны матери, условиями и характером родов и общим состоянием ребенка на момент рождения. Новорожденные находились в условиях стационара с диагнозом «церебральная гипоксия» различной степени тяжести. Гестационный возраст детей варьировал от 37 до 40 недель. Критерии для исключения из исследования: грубые пороки развития, недоношенность, билирубиновые энцефалопатии, наследственные заболевания, метаболические и токсические поражения головного мозга. Половой состав группы: 20 мальчиков и 27 девочек.

Проводился соматический и неврологический осмотр новорожденных. Всего по 57 показателям по каждому пациенту в формализованном виде фиксировались: ключевые моменты анамнеза, возраст матери, история ее беременности и родов и наличие или отсутствие сопутствующей патологии, номер данной беременности, характеристика родов, оценка лабораторных данных ребенка. В дальнейшем производились забор венозной крови в количестве 1 мл, центрифугирование, замораживание сыворотки и лабораторная обработка всего массива. Для каждого ребенка определялись показатели титра аутоантител к NMDA-рецепторам и белку S-100. Далее детально изучались взаимосвязи между показателями.

Контрольная группа

Контрольную группу составили 25 здоровых доношенных новорожденных. Гестационный возраст – 38–40 недель. По шкале Апгар при рождении дети имели 8 – 9 баллов, вес свыше 3 кг. Нахождение в стационаре было обусловлено наличием патологии, не связанной с поражением головного мозга или наличием гипоксических состояний, например пупочные грыжи, кисты яичников, затянущаяся физиологическая желтуха и т.д. Акушерско-ги-

некологический и соматический анамнез матерей не отягощен патологией. Прошедших без осложненных количество самостоятельных родов составило 80%, 20% – плановые операции кесарева сечения. По половому составу контрольную группу представляли 13 девочек и 12 мальчиков. Их состояние с рождения и в раннем неонатальном периоде соответствовало возрастным нормам. Для детей проводился также полный набор для новорожденных основной группы диагностических манипуляций. В исследование были включены и матери новорожденных, всего 72 женщины, 25 из которых представляли контрольную группу. Возраст рожениц колебался от 17 до 41 лет, составив в среднем (29,6±6,1) года.

Структура показателей, влияющих на формирование гипоксии плода в основной группе, а затем и новорожденного, со стороны матери представлена в табл. 1.

Таблица 1

Основная патология беременности и родов матерей основной группы (N = 47)

Основные характеристики	Количество (N = 47)	
	Абс. число	%
Обвитие пуповины	10	21
Наличие мекония в околоплодных водах	31	66
Гипоксия плода	40	85
Отслойка плаценты	1	2
Сопутствующая соматическая патология	39	83
Инфекции беременности	22	46

Родившимся в тяжелом состоянии детям проводили комплекс первичных реанимационных мероприятий. 66% от общего количества новорожденных (31 ребенок) переведены на искусственную вентиляцию лёгких. У трёх младенцев (6 % от численности группы) после рождения отмечалась кома. У 69% новорожденных диагностирована дыхательная недостаточность, из них первой и второй степени она составила по 10%. Наибольшая часть – 49% – это дети с третьей степенью дыхательной недостаточности (табл.2)

Все дети основной группы имели признаки перинатального поражения ЦНС. Оно было диагностировано по данным анамнеза матери (соматический, акушерско-гинекологический, неврологический, соматический осмотр новорожденных, лабораторно-диагностических обследований).

В раннем неонатальном периоде неврологические нарушения в основном были представлены синдромом угнетения ЦНС (табл. 2). Об этом говорят случаи комы (6% новорожденных) и судороги (6%), спонтанный генерализованный тремор (9% случаев), мышечная гипотония (94%), в т.ч. тяжелая гипотония (поза лягушки) – 43% новорожденных, снижение сухожильных и периостальных рефлек-

Таблица 2

Основные клинические характеристики новорожденных основной группы

Показатели	Абс.число	%
Оценка по шкале Апгар на 1-й минуте		
0-3	21	45
4-6	10	21
7 и более	16	34
Дыхательная недостаточность	33	69
Отек легких	6	13
Кома	3	6
Судороги	3	6
Недостаточность кровообращения	33	70
Цианоз при рождении	7	15

сов (87% детей), угнетение рефлексов новорожденных наблюдалось в 81% случаев. В результате адекватных лечебно-диагностических мероприятий неврологический дефицит уменьшался.

По данным нейросонографии, проведенной всем новорожденным в раннем и позднем неонатальных периодах, выявлен отек головного мозга (55% новорожденных), внутрижелудочковые кровоизлияния (23%), признаки церебральной ишемии (70%). В динамике нейросонографические нарушения претерпевали характерные изменения для постгипоксической энцефалопатии.

Определение биомаркеров

Забор крови в количестве 1 мл. производился в острый период асфиксии до 10-14 суток. Полученная сыворотка замораживалась в морозильной камере бытового холодильника. Повторного замораживания не допускалось. Параллельно проводилось определение уровня антител к NMDA-рецепторам и белку S-100 у новорожденных основной и контрольной групп. При исследовании антител к белку S-100 была использована иммуноферментная тест-система для обнаружения нарушений проницаемости гематоэнцефалического барьера с использованием природного Ca⁺² – связывающего глиального белка в качестве антигена. Для определения уровня антител к NMDA-рецепторам в качестве антигена был использован синтетический пептидный фрагмент NR2-субъединицы NMDA-рецептора человека. Для получения нормативных показателей использовались сыворотки практически здоровых доношенных новорожденных. Определены нормальные значения для белка S-100: 0- 0,003OD, у NMDA-теста: 0-0,02OD.

Полученные результаты и обсуждение

Показатели уровня антител к белку S-100 по основной группе наблюдения (0,119±0,089) составили в среднем от 0,003 до 0,435. У 36% новорожденных значения антител определились в диапазоне 0,05-0,1, у одного ребенка (2%) значения были в пределах нормы. В основной группе показатели

уровня антител к NMDA-рецепторам выявились в пределах от 0,04 до 0,391, составив в среднем $0,083 \pm 0,079$. Наибольшее количество новорожденных (45%) имели значения антител в пределах 0-0,05, из них у 14% определились нормальные показатели антител к NMDA-рецепторам.

Для теста к белку S-100 получено 16 достоверных корреляций с показателями, характеризующими тяжесть состояния ребенка. Корреляционные связи выявились во всем числовом диапазоне при $p < 0,05$ и $0,25 \leq R \leq 0,75$ (умеренная сила корреляции). Метод регрессионного анализа показал, что только 8 явились предикторами развития церебральной ишемии: наличие мекония в околоплодных водах, цианоз у новорожденных, обвитие пуповины, недостаточность кровообращения первой степени, низкая оценка на 1-й минуте по шкале Апгар, оценка на 5-й минуте по шкале Апгар, наличие комы у новорожденных, уровень рН крови новорожденных в позднем неонатальном периоде.

Для NMDA-теста получено 10 взаимных корреляций между уровнем антител к NMDA-рецепторам в сыворотке крови и клиническими, инструментальными данными матерей и новорожденных в разных диапазонах показателей NMDA теста. Все корреляции находятся в диапазонах значений больше нормы (0,05-0,2 и выше) при $p < 0,05$ и $0,25 \leq R \leq 0,75$ (умеренная сила корреляции). Метод регрессионного анализа выявил 5 предикторов церебральной ишемии: патологическая поза (лягушки), обвитие пуповиной, дыхательная недостаточность 1-й степени, уровень билирубина сыворотки крови, наличие отека лёгких у новорожденных.

Все показатели, которые явились предикторами развития церебральной ишемии, являются тяжелыми проявлениями острой фазы постгипоксической энцефалопатии. Максимальное количество предикторов выявлено с наибольшими числовыми значениями антител к белку S-100. Это доказывает, что белок S-100, являясь структурным белком нейрональных мембран, уже в первые часы воздействия гипоксии начинает разрушаться и проникать сквозь гематоэнцефалический барьер в кровоток с последующей активацией иммунной системы и формированием к нему антител. Являясь очень чувствительным к изменениям кальциевого гомеостаза, он одним из первых реагирует на повреждение мозга, высвобождаясь из своих молекулярных связей.

Увеличение его концентрации в ликворе по срокам примерно соответствует разворачиванию стадий глутаматно-кальциевого каскада. Таким образом, в острую фазу белок S-100 может служить маркером повреждения головного мозга [2].

На основании полученных данных можно сделать вывод, что для NMDA-теста практически на всем протяжении числовых диапазонов имеется корреляция с показателями, характеризующими дыхательные нарушения и приводящие к ним состояния (отек легких, обвитие пуповины, дыхательную недостаточность первой степени, асфиксия третьей степени). А поскольку дыхательная недостаточность является одной из основных причин церебральной ишемии [2, 5], ее закономерно можно считать достоверным предиктором.

В патогенезе острой асфиксии можно выделить несколько этапов ее развития. Первоначально у новорожденного развиваются нарушения дыхания, возникает гипоксия, гипоксемия. Уже на этом этапе происходят изменения рН крови (ацидоз), а также деструкция мембран нейронов и глии, проникновение белка S-100 через гематоэнцефалический барьер в кровоток с последующей активацией иммунной системы и формированием к нему антител. Этот период занимает несколько часов или дней. Вследствие нарушения системной гемодинамики развивается ишемия мозга и изменяется ауторегуляция мозгового кровотока. В дальнейшем, при артериальной гипотензии возникает церебральная гипоперфузия с последующим формированием зон ишемии головного мозга, особенно в зонах смежного кровоснабжения [2]. Преимущественно на этапе формирования очагов ишемии определяются антитела к NMDA-рецепторам (рисунок).

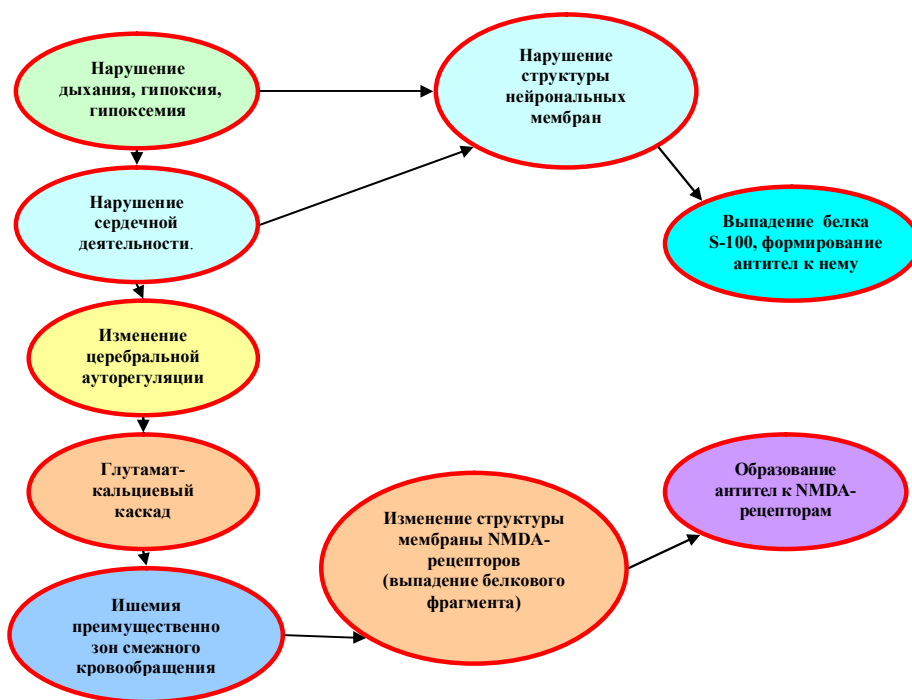


Рис. Соотношение патогенетических этапов асфиксии с периодами образования аутоантител к NMDA рецепторам и белку S-100.

Заключение

Новорожденным с поражением головного мозга гипоксического характера необходима всесторонняя оценка тяжести состояния, в том числе и с помощью современных нейрохимических методов. При повреждении мозга белок S-100 первым высвобождается из нейрональной мембраны с последующим образованием к нему антител. Для запуска глутамат-кальциевого каскада, повреждения NMDA-рецепторов и образования антител к ним необходимо более продолжительное время, поэтому числовые значения антител к NR2 субъединице NMDA-рецептора в нашем исследовании оказались менее высокими по сравнению с нормой. Возможно, определение NR2 пептида в крови, а не уровня антител к нему, в острый период постгипоксической энцефалопатии у новорожденных диагностически будет более показательным.

Исследование является первой работой по одномоментному определению антител к NMDA-рецепторам и белку S-100 у родившихся в асфиксии доношенных новорожденных. Определение уровня антител к NMDA-рецепторам и белку S-100 в острый период постгипоксической энцефалопатии может служить критерием оценки тяжести состояния новорожденного. Для находящихся в тяжелом состоянии новорожденных очень важно, что для определения антител необходимо небольшое количество крови. Не требуется дополнительного инвазивного вмешательства. Возможно использование минимального количества сыворотки крови, остающейся после проведения плановых биохимических анализов. Метод определения антител к NMDA-рецепторам и белку S-100 в совокупности с клиническими и лабораторно-диагностическими методами может значительно улучшить качество диагностики. Дальнейшее развитие этих исследований будет способствовать выработке более эффективной стратегии нейропротекции в лечении постгипоксических энцефалопатий новорожденных.

Литература

1. Фрухт Э.Л., Тонкова-Ямпольская Р.В. Некоторые особенности развития и поведения детей с перинатальным поражением нервной системы // Рос. пед. журнал. 2001. № 1. С.9–12.
2. Пальчик А.Б., Шабалов Н.П. Гипоксическо-ишемическая энцефалопатия новорожденных. М.: МЕД пресс-информ, 2006. 256 с.
3. Петрухин А.С. // Перинатальная неврология: Тезисы 2-го съезда РАСПМ. М., 1997. С.3–4.
4. Distefano J., Curreri R., Betta P. et al. // Am. J. Perinatol. 2002. Vol.19. № 6. P.317–322.
5. Соколов А.Л., Кузнецова Л.В., Варламова Т.В. Перинатальные повреждения нервной системы у детей: вопросы этиологии, диагностики и лечения. Петрозаводск: изд-во ПетрГУ, 2006. 104 с.
6. Голосная Г.С., Петрухин А.С., Маркевич К.А. и др. Изменение уровня белка S-100 у новорожденных с перинатальным гипоксическим поражением ЦНС // Педиатрия. 2004. №1. С. 1–6.
7. Скоромец А.А., Дамбинова С.А., Дьяконов М.М. и др. Биохимические маркеры в диагностике ишемии головного мозга //Международный неврологический журнал. 2009. №5(27). С.15–20.
8. Fassbender K., Schmidt R. et al. // J. of Neur. Sciences. 1997. Vol.148. P.101–105.
9. Shaefer B.W., Helemann C.W. // Trends Biochem. Sol. 1996. Vol.21. P.134 – 140.
10. Гранстрем О.К., Дамбинова С.А. Роль глутаматных рецепторов в механизмах формирования эпилепсии // Нейрохимия. 2001. Т.18. С.19–29.
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. Vol.87. P. 144.

Статья поступила в редакцию: 09.04.2012