

АУТОАНТИТЕЛА К NMDA- РЕЦЕПТОРАМ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМИ НАРУШЕНИЯМИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Т. В. ДЕНИСЕНКО¹, Д. И. СКУЛЯБИН¹, И.А. ГРОМОВ¹, Ю. В. ЧЕРКАС²,
А. Ю. ИЛЮХИНА³, С. А. ДАМБИНОВА¹

¹ Институт мозга человека РАН, 197 386 Санкт-Петербург ул. акад. Павлова, д.9.
Тел. +7 (812) 234-1392 Факс +7 (812) 234-3247

² Институт экспериментальной медицины РАМН, 197386 Санкт-Петербург
ул. акад. Павлова, д.12. Тел. +7 (812) 234-9341 Факс +7 (812) 234-3247

³ Санкт-Петербургский Медицинский Университет им. И.П. Павлова. 197022
Санкт-Петербург ул. Л. Толстого, д. 7.

В работе приводятся данные о повышенном содержании аутоантител к NMDA-рецепторам мозга человека в крови больных с острым нарушением мозгового кровообращения ОНМК по сравнению со здоровыми донорами и больными другими неврологическими заболеваниями. Концентрация в крови аутоантител к NMDA-рецепторам мозга может служить наиболее информативным биохимическим критерием оценки состояния больных с ОНМК по сравнению с другими изученными в данной работе биохимическими показателями крови (концентрацией глутамата, холестерина и триглицеридов, продуктов перекисного окисления липидов). Использование метода определения в крови концентрации аутоантител к NMDA-рецепторам может дать дополнительную информацию о состоянии больного с ОНМК и эффективности применяемого лечения.

Ключевые слова: аутоантитела, глутаматный рецептор, NMDA – рецептор, ишемический инсульт головного мозга, ОНМК, иммунодиагностика

ВВЕДЕНИЕ. В большинстве экономически развитых стран смертность населения от сосудистых заболеваний головного мозга занимает 2-3 место в структуре общей смертности; в России - 2 место после ишемической болезни сердца. Наиболее тяжелая форма сосудистых поражений мозга - острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), ишемический инсульт (инфаркт) мозга. Проблема мозгового инсульта остается крайне актуальной в настоящее время в связи со значительной частотой его развития, высоким процентом инвалидизации и высокой смертностью (185 мужчин и 137 женщин на 100000 человек) [1-3]. Несмотря на то, что метаболические аспекты патогенеза ишемического инсульта интенсивно изучаются, к настоящему времени клиницисты не располагают универсальными биохимическими критериями, отражающими развитие ишемических поражений мозга.

Исследования последних лет существенно расширили представления о нейробиохимических механизмах патогенеза ишемического инсульта головного мозга человека [4-6]. Кроме нарушения метаболизма мозга, наступающего вследствие недостаточности снабжения его кислородом и другими жизненно важными субстратами, внимание исследователей привлекает изучение медиаторных систем мозга при этой патологии. Было показано, что развитие острой церебральной ишемии

сопровождается резким увеличением внеклеточной концентрации глутамата [7-9]. Поэтому в качестве одного из критериев оценки риска развития инсульта головного мозга человека был предложен метод определения концентрации глутамата в крови и цереброспинальной жидкости у больных с нарушением мозгового кровообращения [10].

Имеются также данные, свидетельствующие о вовлечении рецепторов возбуждающих аминокислот в ключевые моменты ишемического повреждения нейронов [5, 11]. В этом случае дисфункция глутаматных рецепторов NMDA-типа связывается с запуском нейрохимических событий при ишемическом инсульте [12]. В связи с этим разработка новых методов исследования, отражающих прижизненное состояние нейрорецепторов при различной патологии ЦНС, является одним из приоритетных направлений медицинской химии.

В настоящей работе приводятся данные о содержании аутоантител (ААТ) к NMDA-рецепторам в крови больных с острым нарушением кровообращения. Кроме того, у этих же больных были определены концентрации в крови глутамата и других аминокислот, а также липидов и продуктов их перекисного окисления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для изучения биохимических параметров использовали сыворотку крови, взятой натощак у здоровых доноров ($n = 19$) и больных, госпитализированных в неврологическое отделение 3-ей городской больницы с диагнозом «острое нарушение мозгового кровообращения, церебральный ишемический инсульт», а также больных с другими неврологическими заболеваниями (черепно-мозговая травма, эпилепсия, хроническая сосудисто-мозговая недостаточность) в качестве группы сравнения ($n = 19$).

Сравнительное исследование биохимических параметров крови провели на группе из 25 больных с ОНМК, находящихся в палате интенсивного наблюдения, на 1 – 2й день после развития инсульта. В группу включили 14 мужчин, 11 женщин, в возрасте от 34 до 84 лет (средний возраст 59). Клинический диагноз ОНМК ставился на основании анамнеза и результатов клинического неврологического обследования, включая данные КТ. Состояние отобранных для анализа больных оценивалось как тяжелое или средне – тяжелое.

Взятую из вены кровь центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин, полученную сыворотку использовали для определения изучаемых биохимических параметров.

Концентрацию холестерина и триглицеридов определяли в изопропаноловых экстрактах сыворотки крови с помощью автоанализатора АА-II фирмы «Техникон», США.

О количестве перекисей в сыворотке крови судили по концентрации ТБК-реактивных продуктов (в основном, малонового диальдегида); в качестве стандарта использовали 1,1,(3,3)-тетраметоксипропан [13].

Количественный анализ аминокислот в сыворотке крови проводили методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором, которой предшествовала доколлонная дериватизация с ортофталевым альдегидом и 2-меркаптоэтанолам [14].

Обнаружение ААТ к NMDA-типу глутаматного рецептора проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

В качестве антигена использовали фракцию глутаматсвязывающих мембранных белков, выделенных из коры головного мозга человека как описано ранее [15,16]. Степень обогащения белка в полученном препарате ГМБ составляла около $\times 2500$. Выделенный белковый фрагмент с молекулярным весом порядка 68 кД, низкой аффинностью к ^3H -AMPA и конкурентно связывавший NMDA, был охарактеризован как NMDA-связывающий белок [17]; его наносили на планшеты в качестве антигена для проведения иммуноферментного анализа в концентрации 1 мкг в лунку. Для выявления ААТ использовали конъюгат антииммуноглобулинов с пероксидазой хрена и ортофенилендиамин в качестве субстрата цветной реакции.

Белок определяли по методу Лоури [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Среднее содержание холестерина в сыворотке крови больных с острым ишемическим инсультом не отличалось от такового у здоровых доноров, тогда как концентрация триглицеридов была несколько выше у больных (рис.1). Следует отметить, что повышенный уровень триглицеридов в крови больных с ишемическим инсультом обнаруживали и другие исследователи [19]. Данные по холестерину в крови у больных с ишемией мозга согласуются с аналогичными результатами, полученными D. Magic и соавт. [20] и G.Rodrigues и соавт. [21], которые считают концентрацию холестерина в крови минорным фактором риска для развития ишемического инсульта. В то же время другие исследователи [22,23] рассматривают концентрацию холестерина в крови как одну из причин, приводящих к инсульту и дальнейшему развитию атеросклеротических поражений сосудов. Показано также, что ингибиторы ключевого фермента синтеза холестерина ГМГ-КоА-редуктазы уменьшают поражения мозга при церебральной ишемии [24].

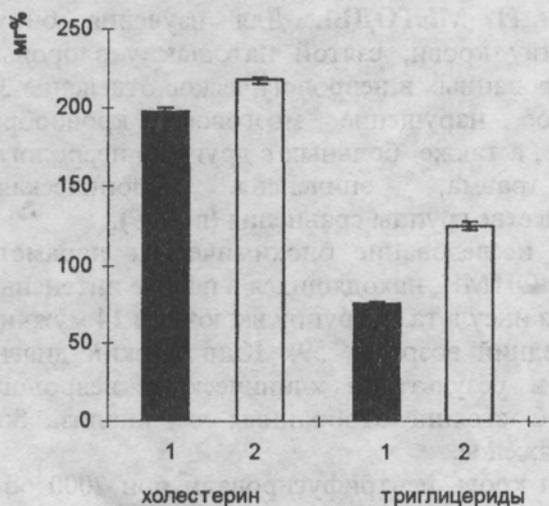


Рисунок 1.

Концентрация холестерина и триглицеридов в сыворотке крови:

- 1 - здоровых доноров, (n= 19);
- 2 - больных ишемическим инсультом, (n=25).

Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-продуктов) в сыворотке крови имело тенденцию к повышению в изученной группе пациентов с ишемическим инсультом по сравнению с их концентрацией в норме и у больных с другими неврологическими заболеваниями (рис.2). Анализ литературы показал противоречивость данных по этому показателю в крови больных с изучаемой патологией [25,26]. Повышенную перекисидацию липидов в крови больных с ишемическим инсультом отмечали N. Serban и V. Nita [19], в эритроцитах крови таких больных - S. G. Imge и соавт. [27]. Некоторые исследователи связывают уровень перекисидации липидов крови с выраженностью и интенсивностью мозгового инсульта [26].

Определение в крови концентрации свободных аминокислот показало, что у больных с ишемическим инсультом концентрация в крови глутаминовой кислоты не отличалась от ее уровня в контрольной группе, тогда как концентрация серина, таурина, аргинина, орнитина, триптофана, лейцина, изолейцина и фенилаланина была у больных достоверно выше, чем у здоровых доноров (табл.1). Таким образом, мы не подтвердили наблюдений Castello и соавт. [10] о возможной диагностической значимости и повышенного уровня глутамата в крови больных с ишемией головного мозга.

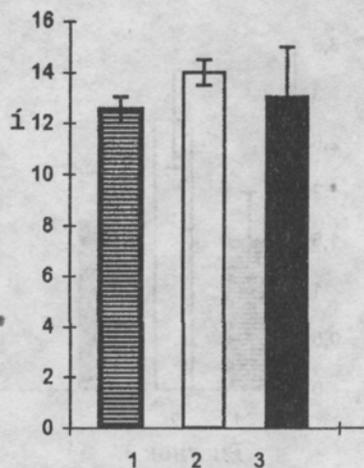


Рисунок 2.

Концентрация перекисей липидов (ТБК - продуктов) в сыворотке крови: 1 - здоровых доноров, (n=19); 2 - больных ишемическим инсультом, (n=25); 3 - больных другими неврологическими заболеваниями, (n=19).

Таблица 1. Концентрация свободных аминокислот в сыворотке крови здоровых доноров и больных с ишемическим инсультом (в нмоль/мл сыворотки).

Аминокислота	Группа I Контроль (доноры) N=6	Группа II Больные с ишемическим инсультом N=9
Glu	165,0 ± 28,3	172,1 ± 20,6
Asn	40,3 ± 4,5	48,3 ± 2,8
Ser	116,7 ± 9,0	135,3 ± 5,4 *
Gln	363,8 ± 36,7	408,9 ± 26,1
His	85,7 ± 5,4	78,4 ± 4,9
Tau	102,5 ± 17,3	146,5 ± 10,1 *
Ala	397,6 ± 50,3	357,9 ± 55,2
Arg	80,0 ± 6,8	60,0 ± 7,3 *
Met	18,5 ± 2,1	21,5 ± 1,9
Ile	60,2 ± 8,5	91,5 ± 5,0 **
Orn	272,0 ± 33,2	382,4 ± 44,6 *
Leu	100,5 ± 11,7	146,2 ± 9,1 **
Phe	59,5 ± 5,6	99,4 ± 7,2 ***
Lys	156,0 ± 11,4	168,9 ± 11,1
Trp	70,9 ± 6,8	54,6 ± 4,4 *

Примечание: достоверность различий при сравнении концентрации аминокислот в сыворотке крови у здоровых доноров (группа I) и больных с ишемическим инсультом (группа II): * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

Для определения ААТ к NMDA-рецептору мозга выделенный из коры головного мозга человека обогащенный препарат рецептора иммобилизовали на планшете и проводили иммуноферментный анализ сыворотки крови пациентов [17]. Оказалось, что в крови больных с церебральным инсультом концентрация ААТ к NMDA-рецептору значительно превышала ее величину как в группе здоровых доноров, так и в группе больных с другими неврологическими заболеваниями (рис.3). Полученные данные согласуются с результатами Дамбиновой и Изыкеновой [17].

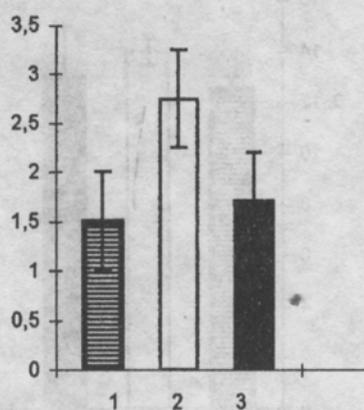


Рисунок 3.

Концентрация аутоантител к NMDA-рецептору головного мозга человека в сыворотке крови здоровых доноров (1.), больных ишемическим инсультом (2, $p<0,01$) и другими неврологическими заболеваниями (3.)

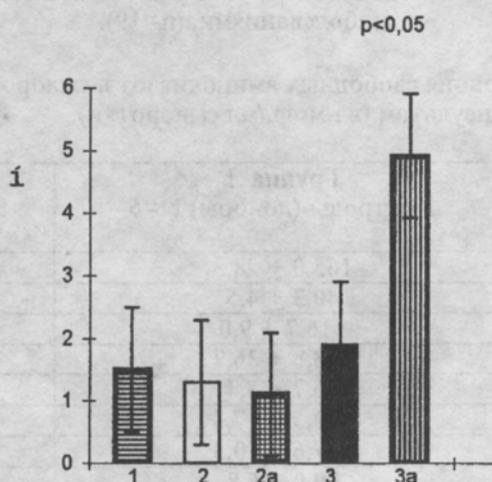


Рисунок 4.

Концентрация аутоантител к к NMDA-рецептору головного мозга человека в сыворотке крови больных с различными типами острого нарушения мозгового кровообращения 1 - контрольная группа здоровых доноров (n=19); 2 - больные ОНМК по типу геморрагии (n=18), $p<0,05$; 2а - больные ОНМК по типу геморрагии с атонической комой, интоксикационной энцефалопатией (n=5), $p<0,01$; 3 - больные ОНМК по типу ишемии (n=42), $p<0,01$; 3а- больные ОНМК по типу ишемии с хронической алкогольной интоксикацией, дисметаболической энцефалопатией (n=11), $p<0,01$.

Более детальное изучение группы больных с острым нарушением мозгового кровообращения показало неоднородность этой группы по концентрации ААТ к NMDA-R, которая зависела от типа нарушения мозгового кровообращения (ишемического или геморрагического) и наличия осложнений (рис.4).

Таким образом, мы обнаружили, что в крови больных с острым нарушением мозгового кровообращения концентрация холестерина была близка к таковой у здоровых доноров. Содержание триглицеридов и перекисей липидов (ТБК-продуктов) в крови изученной группы больных было несколько выше контрольного уровня, но это повышение было недостоверно. Концентрация глутамата в крови изученной группы больных не отличалась от нормы, тогда как содержание ряда других аминокислот (серина, таурина, аргинина, орнитина, триптофана, лейцина, изолейцина и

фенилаланина) была у больных достоверно выше, чем у здоровых доноров. В то же время концентрация ААТ к NMDA-рецептору головного мозга человека в сыворотке крови больных острым нарушением мозгового кровообращения достоверно превышала контрольный уровень у здоровых лиц и пациентов с другой невропатологией. Этот показатель может служить наиболее информативным биохимическим критерием оценки состояния больного по сравнению с другими изученными в данной работе и применяемыми в клинике – концентрацией в крови липидов и их перекисей, а также возбуждающих аминокислот, в первую очередь, глутамата. Наличие такого метода иммунодиагностики может позволить проводить контроль состояния пациентов и эффективности применяемого лечения.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Е. И. Гусев.* (1992) Ишемическая болезнь головного мозга. М., 288 с.
2. *Е. В. Шмидт, Д. К. Лунев, Н. В. Верещагин.* (1978) Сосудистые заболевания головного и спинного мозга. М., «Медицина».
3. *Н. В. Верещагин.* (1996) Неврол. и психиатр. им. С. С. Корсакова, **96**, 1, 11-13
4. *A. Doble.* (1995) *Therapie*, **50**, 319 – 337
5. *B. S. Meldrum.* (1995) *Ann. NY Acad. Sci.*, **757**, 492 – 505
6. *C. Ikonomidou, L. Turski.* (1995) *Current Opinion in Neurol.*, **8**, 487 – 497
7. *H. Benveniste, J. Drejer, A. Schousboe, N.H. Diemer.* (1984) *J. Neurochem.*, **43**, 1369 - 1374
8. *K. A. Hossmann.* (1994) In: *Pharmacology of cerebral ischemia.*, (J. Krieglstein, H. Oberpichler – Schwenket eds al.) Stuttgart, «Medpharm», 251.
9. *Y. Uchiyama-Tsuyuki, H. Araki, T. Yae, S. Otomo.* (1994) *J. Neurochem.*, **62**, 1074 - 1078
10. *J. Castello, A. Davalos, M. Noya.* (1997) *Lancet*, **349**, 1, 79 – 83
11. *C. D. Blackstone, A. I. Levey, L. J. Martin, D. L. Price, R.L. Huganir.* (1992) *Ann. Neurol.*, **31**, 6, 680 – 683
12. *S. Nakanishi.* (1992) *Science*, **258**, 10, 597 – 603
13. *K. Yagi.* (1976) *Biochem. Med.*, **15**, 2, 212 - 216
14. *И. Н. Краснова, Л. А. Карцова, Ю.В. Черкас.* Журн. аналитич. хим., в печати
15. *С. А. Дамбинова, А. И. Городинский, Т. М. Лекомцева, О. Н. Корешонков.* (1987) *Биохимия*, **52**, 10, 1642 – 1648.
16. *K. N. Kumar, K. K. Babcock, P. S. Johnson, X. Chen, K. T. Eggeman, E. K. Michaelis.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 44, 27384-27393
17. *С. А. Дамбинова, Г. А. Изыкенова.* (1997) Журн. высшей нервной деятельности, **47**, 2, 151
18. *O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 275
19. *M. G. Serban, V. Nita.* (1994) *Rom. J. Intern. Med.*, **32**, 1, 51 - 56
20. *D. Marik, V. Ivanisevic, T. Ilic, P. Jovic.* (1994) *Vojnosanit Pregl.*, **51**, 4, 271 – 276
21. *G. Rodrigues, S. Bertolini, F. Nobili, A. Arrigo, P. Masturzo, N. Elicio, M. Gambaro, G. Rosadini.* (1994) *Stroke*, **25**, 4, 831 – 836
22. *W. B. Kannel.* (1994) *J. Cardiovasc. Risk*, **1**, 4, 333 – 339
23. *I. G. Szirmai, A. Kamondi, H. Magyar, C. Juhasz.* (1993) *Stroke*, **24**, 12, 1811 – 1816
24. *M. Endres, U. Laufs, Z. Huang, T. Nakamura, P. Huang, M. A. Moskowitz, J. K. Liao.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15, 8880 - 8885

25. *S. A. Lipton, D.J. Singel, J.S. Stamler.* (1994) *Prog. Brain Res.*, **103**, 359 – 364
26. *E. Bonfoco, D. Kranc, M. Ankarcrona, P. Nicotera, S. A.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 16, 7162 – 7166
27. *S. G. Imre, I. Fekete, T. Farkas.* (1994) *Stroke*, **25**, 12, 2416- 2420.

AUTOANTIBODIES TO HUMAN BRAIN NMDA-RECEPTORS IN THE BLOOD OF THE PATIENTS WITH BRAIN STROKE

T. V. DENISENKO¹, D.I. SKULYABIN¹, I. A. GROMOV¹, YU.V. CHERKAS²,
A.YU. ILYUCHINA³, S.A. DAMBINOVA

¹Institute of the Human Brain RAS¹, Institute for Experimental Medicine RAMS²,
Saint - Petersburg Medical University named after I.P.Pavlov³

Concentration of autoantibodies to human brain NMDA-receptor in blood serum of patients with acute brain ischemic stroke was significantly higher than in healthy persons and patients with other neurological diseases. Average content of cholesterol, lipid peroxides and glutamate in the serum were close in all patient groups investigated.

It was suggested that the content of autoantibodies to human brain NMDA-receptor could be used as biochemical criteria for acute brain stroke patient's condition control and their treatment efficiency.

Key words: autoantibodies, glutamate receptor, NMDA – receptor, acute brain ischemic stroke, Immunodiagnosics