

УДК 616.853 + 616-097

© Коллектив авторов

УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ К СУБЪЕДИНИЦАМ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ.

В.Г. Базарова, О.К. Гранстрем, С.А. Дамбинова

Институт мозга человека РАН,
197386 Санкт-Петербург, ул.акад.Павлова, д.9.
Тел.+7(812) 234 94 23. Факс +7(812)234-3247.

В работе сопоставлены данные о накоплении аутоантител к фрагментам глутаматных рецепторов AMPA- и NMDA-типа с основными показателями клеточного и гуморального ответа у больных эпилепсией. Специфичность, чувствительность и воспроизводимость результатов анализа аутоантител к GluR1- и NR2-субъединицам AMPA и NMDA глутаматных рецепторов у больных эпилепсией сравнивали с данными, полученными при обследовании больных олигофренией, пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения, а также здоровых доноров. Показано существенное повышение количества аутоантител к GluR1 у больных эпилепсией по сравнению с контрольной группой пациентов. У больных с ишемическими нарушениями наблюдали повышение титра аутоантител к NR2, которое не обнаружено у других исследуемых групп. Обнаружено, что Т-клеточный иммунный ответ неоднороден у больных эпилепсией и преимущественно снижен по сравнению с активацией В-лимфоцитов и повышением уровня IgM и IgG к антигенам мозга. Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи гуморального ответа иммунной системы с нарушением структурной целостности нейрорецепторов глутамата при эпилепсии. В этом случае появление аутоантител к GluR1 в крови пациентов коррелирует с инструментально подтвержденным (ЭЭГ, КТ головного мозга) наличием пароксизмальной активности и эпилептических очагов.

Ключевые слова: эпилепсия, рецепторы глутамина, Т-клеточный иммунный ответ, В-клеточный иммунный ответ, IgM, IgG

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время большинством исследователей [1-3] признается важная роль глутаматных рецепторов (особенно AMPA-типа) в формировании пароксизмальной активности и эпилепсии. Имеются сведения об участии аутоиммунных механизмов в развитии эпилептического процесса [4-6]. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что при изменении структуры мозговой ткани под влиянием инфекций, травм, гипоксии, и связанного с этим изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера, наблюдается массивный выход в кровь и прямой контакт с иммунной системой антигенов мозга и, в частности, N-концевых фрагментов глутаматных рецепторов [1,2,4,7-9].

В наших исследованиях впервые было показано, что вышеуказанный процесс вызывает появление аутоантител к GluR1 в крови больных эпилепсией [10-13]. На основе этого феномена в нашей лаборатории был разработан диагностический набор - ПА-тест (тест пароксизмальной активности), который успешно используется в ряде неврологических клиник для диагностики эпилепсии у детей [12, 13] и взрослых [11]. Появление аутоантител к "забарьерным" мозговым антигенам может быть нормальным физиологическим ответом, в

котором аутоантитела являются "свидетелями" структурных нарушений в ткани мозга и участниками утилизации и/или интернализации нейрональных антигенов с помощью иммунных комплексов. Известно, что длительно циркулирующие иммунные комплексы способны, в свою очередь, проникать в мозг через поврежденный гематоэнцефалический барьер и взаимодействовать с соответствующими нейрорецепторами, вызывая их активацию и гипервозбуждение, как, например, показано при энцефалите Рассмусена [14].

Целью настоящей работы является сопоставление лабораторных иммунологических показателей и данных накопления аутоантител к специфическим фрагментам глутаматных рецепторов с помощью ПА-теста у больных эпилепсией по сравнению со здоровыми донорами. Для того, чтобы выявить специфичность, чувствительность и воспроизводимость ПА-теста в качестве второго контроля исследовали кровь больных олигофренией и больных с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК).

МЕТОДИКА. В работе обобщены результаты исследования больных, страдающих эпилепсией и сосудистыми заболеваниями головного мозга, которые были госпитализированы в клинику Института мозга человека. Исследования крови больных олигофренией и эпилепсией проводили по совместной межинститутской программе сотрудничества с клиникой неврологии Oasi Maria Institute of Research on Mental Retardation and Age Disorders (Troina, Italy). Клинический диагноз был установлен на основании неврологического обследования и данных инструментальных методов (КТ головного мозга, Эхо-ЭС, ЭЭГ, РЭГ и УЗДГ). Исследования проводили на фоне комплексной антисудорожной терапии, дегидратационно-сосудистой, гипотензивной и метаболической терапии.

Исследовано 146 человек в возрасте от 16 до 70 лет. Из них 72 - больные эпилепсией, 20 - пациенты с олигофренией, 20 - с острым нарушением мозгового кровообращения, 34 - контрольная группа, представленная здоровыми донорами.

Подавляющее большинство больных эпилепсией, олигофренией и обследуемых контрольной группы находились в репродуктивном возрасте, среднее значение которого составило 34,4 года. На основании анализа клинико-анамнестических данных 72 больных эпилепсией выделены 3 группы: первую составили 27 человек (37%) с тяжелым течением эпилептического синдрома, ежедневными приступами, наличием очаговой неврологической симптоматики; вторую - 21 человек (29%) со средне-тяжелым течением заболевания, ежемесячными приступами с умеренно выраженными неврологическими признаками, наличием ЭЭГ-стигм; третью - 24 человека (33%) с редкими приступами без отчетливой неврологической симптоматики.

Отбор обследуемых происходил после предварительного анализа периферической крови с лейкоцитарной формулой на предмет отсутствия выраженных лимфо- и нейтропений, анамнестических данных за первичное иммунодефицитное состояние. Иммунный статус исследовался у больных эпилепсией и в группе контроля. У всех пациентов определяли уровень аАТ к субъединице GluR1 рецепторов AMPA - типа в сыворотке крови. Анализ сывороток крови проводился в 2 этапа: больные эпилепсией и пациенты с олигофренией, больные эпилепсией и инсультами. На втором этапе дополнительно определялись аАТ к субъединице NR2 рецепторов NMDA - типа для выявления большей или меньшей специфичности того или иного фрагмента рецептора при соответствующих патологиях [15]. Больным эпилепсией дважды проводили ЭЭГ-исследования и дважды определялись аАТ (до лечения и после лечения).

ЭЭГ-исследования проводились на 16-канальном электроэнцефалографе фирмы "Медикор" (Венгрия). При интерпретации данных в пользу эпилептического процесса учитывалось наличие на ЭЭГ острых амплитудных волн, пиков, комплексов пик-волна, острая волна - медленная волна как в периоде спокойного бодрствования, так и при использовании функциональных нагрузок (ритмической фотостимуляции и гипервентиляции).

АУТОАНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРАМ ГЛУТАМАТА ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

Пробы крови (2-5 мл) отбирались из вены. Сыворотку получали путем центрифугирования (4000g) в течение 5 мин. при +4°C. Образцы хранили до момента анализа при температуре -70°C.

Иммуноферментный анализ образцов сывороток проводили методом ELISA на стандартных полистироловых 96-луночных планшетах высокой сорбционной емкости ("Biohit", Финляндия). В качестве антигенов использовали синтетические пептиды (ООО "ДИАС", Санкт-Петербург), повторяющие аминокислотные последовательности субъединиц GluR1 и NR2 глутаматных рецепторов (в количестве 0,5 мкг/яч). Образцы сыворотки пациентов и здоровых лиц в разведении 1:50 (PBS, 0,5% Твин-20, pH 7,5) наносили в лунки микропланшетов, содержащих антиген, и инкубировали 1 час при комнатной температуре на шейкере. По окончании инкубации лунки промывали рабочим буфером (PBS, 0,5% Твин-20, pH 7,5) и добавляли вторые антитела, меченные пероксидазой хрена ("Sigma", США) в разведении 1:5000, и инкубировали 1 час при комнатной температуре на шейкере. Лунки многократно промывали рабочим буфером, затем - дистиллированной водой. В качестве хромогена использовали орто-фенилендиамин (3 мг/мл) в присутствии H_2O_2 (0,015%) в 0,05 М цитратном буфере pH 5,3. Окрашивание осуществляли в течение 20 мин в темноте. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм на мультиспектрофотометре ("Dynatech", Англия).

Определение уровней иммуноглобулинов в сыворотке крови также осуществляли методом ELISA, для чего были использованы тест-системы, разработанные фирмой "Протеиновый контур" (С.-Петербург). Анализ проводили в соответствии с рекомендациями к набору. Определение субпопуляций лимфоцитов периферической крови проводилось лимфоцитотоксическим тестом (ЛЦТТ) по стандартной методике [16].

Для статистического анализа результатов исследования в работе использовали стандартный пакет программ STATGRAPHICS Plus/Win. При оценке данных ориентировались на уровень значимости $p < 0,05$, принятый для большинства медико-биологических исследований [17, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В последние 15 лет получены доказательства присутствия аутоантител к различным антигенам мозга, причем достаточно часто они обнаруживаются как у здоровых людей, так и при заболеваниях неаутоиммунной природы [3]. Рядом исследователей было показано, что способность лимфоцитов распознавать "свое" (собственные АГ = аАГ) и реагировать на них является их нормальным свойством, естественной характеристикой общей программы функционирования иммунной системы [3, 22]. Очевидно, что в самой иммунной системе должны быть механизмы, контролирующие и регулирующие иммунный ответ на свои АГ и предотвращающие развитие аутоиммунного повреждения, т.е. в здоровом организме не должна развиваться эффекторная фаза иммунного ответа на аАГ. По современным представлениям срыв аутоотолерантности на аАГ и возникновение аутоиммунного конфликта происходит из-за нарушения механизмов регуляции активности иммунокомпетентных клеток и их взаимодействия. Есть данные, что основным патогенетическим звеном аутоиммунного процесса является нарушение дифференцировки Т-ЛФ, выражающееся сначала в снижении супрессорной активности, а затем в утрате и других функций Т-клеток [19].

Наши предыдущие работы [11-13] продемонстрировали повышение уровня аутоантител к глутаматным рецепторам у больных эпилепсией, что свидетельствует об участии аутоиммунных механизмов в эпилептогенезе, по меньшей мере, в качестве биохимических маркеров происходящих в ЦНС процессов.

В ходе проделанной работы было выявлено достоверное отличие в уровне GluR1 аАТ между группой больных эпилепсией, пациентов с олигофренией и группой контроля (рис. 1). В основной исследуемой группе больных эпилепсией

уровень аАТ к GluR1 субъединице глутаматного рецептора был достоверно выше, чем в группе больных с инсультами. Важно отметить, что наиболее показательным оказалось не абсолютное значение уровня аАТ в крови того или иного больного, а пропорция между количеством аАТ к AMPA (GluR1) и NMDA (NR2) типа рецепторам. Так, у больных с эпилепсией уровень аАТ к GluR1-субъединице в крови оказался значительно повышенным, в то время как уровень аАТ к NR2-субъединице не превышал контрольных значений. Напротив, у больных с инсультами повышенным был уровень аАТ к NR2-субъединице NMDA рецептора, что говорит о большей специфичности повреждения AMPA и NMDA субъединиц рецептора при соответствующих патологиях (рис. 2).

Следует также отметить, что уровень аАТ в ликворе был значительно ниже,

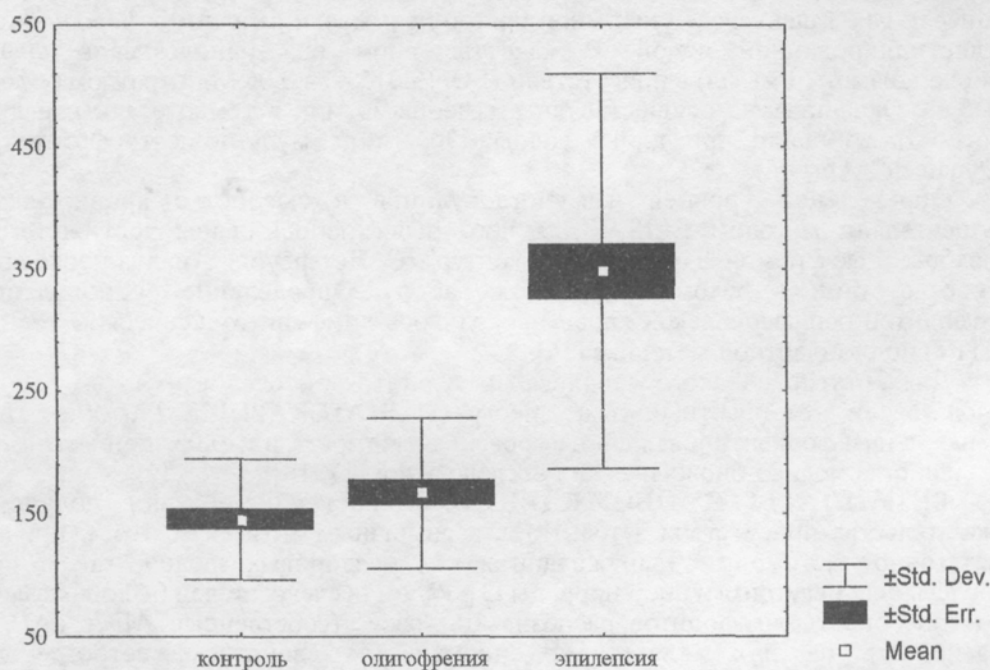


Рисунок 1.

Уровень GluR1 в крови больных эпилепсией ($n=72$), контроля ($n=34$), олигофренией ($n=20$), $p < 0,05$. Результаты представлены в единицах оптической плотности при 490 нм.

чем в сыворотке у одних и тех же больных эпилепсией. Это может свидетельствовать об относительной целостности гематоэнцефалического барьера (в отличие от острых воспалительных процессов в ЦНС), сохранности его селективности, отсутствии (или достаточно низком) интратекальном синтезе аАТ.

Иммунологический статус больных эпилепсией характеризуется недостоверным снижением количества маркеров Т-хелперов (CD4), иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8), повышением количества маркеров цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8), уровней IgG и IgM, повышением количества В-лимфоцитов. Отмечена положительная корреляция между повышенным уровнем IgM и уровнем аАТ в группе больных эпилепсией ($r=0,69$; $n=72$; $p < 0,05$), значения которых соответственно повышались с учащением эпилептических приступов. Увеличение концентрации IgM на фоне учащения эпилептических приступов может говорить об активизации гуморального звена иммунитета.

АУТОАНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРАМ ГЛУАМАТА ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

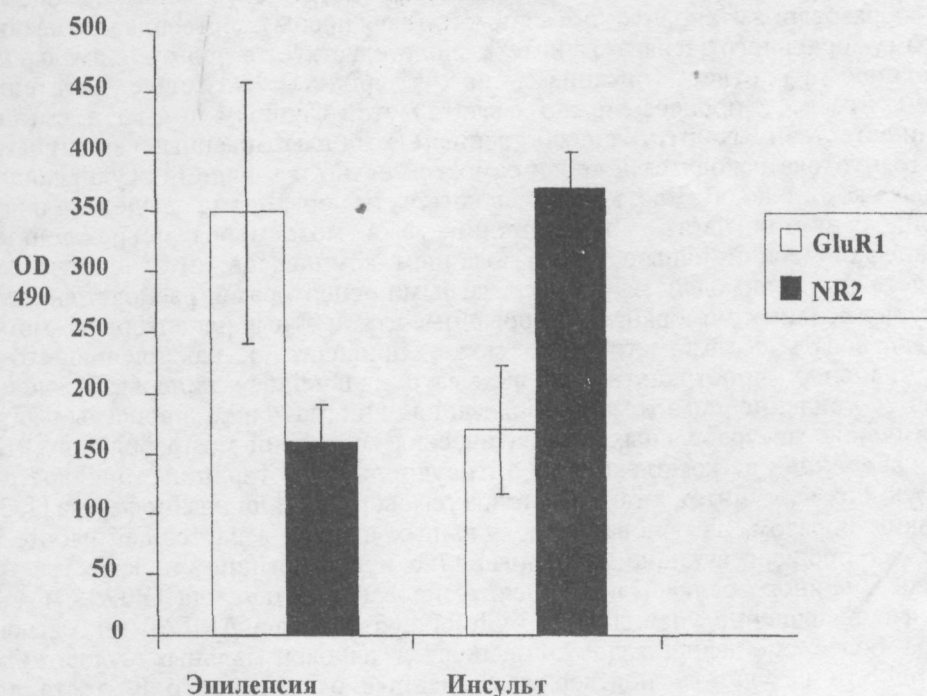


Рисунок 2.

Соотношение уровней аАТ к AMPA и NMDA типам глутаматных рецепторов в крови больных эпилепсией (72 чел.) и инсультами (20 чел.); ($p < 0,05$).

Позитивные сдвиги иммунологических показателей отмечены в группе больных эпилепсией на фоне проведенного лечения: почти в половине случаев с положительной динамикой (значительное снижение частоты приступов, улучшение ЭЭГ-картины) наблюдалась тенденция к нормализации числа иммунокомпетентных клеток и снижение количества аАТ практически до значений контрольной группы (табл. 1). Проведенные исследования иммунного статуса больных с эпилепсией не противоречат работам, проведенным ранее [20, 21].

Таблица 1. Процентное соотношение субпопуляций лимфоцитов и иммуноглобулины сыворотки крови в группе больных эпилепсией ($p < 0,05$, $n=72$).

Показатели иммунологического статуса	Клеточные						Гуморальные		
	CD 3%	CD 4%	CD 8%	CD4/CD8	B %	NK %	IgA мг/мл	IgG мг/мл	IgM мг/мл
Клинические случаи резистентной эпилепсии	63,5	35,4	38,1	0,92	19,4	12,4	2,2±0,5	14,5±3,2	2,8±0,7
Клинические случаи с положительной динамикой на фоне лечения	70,1	39,2	35,1	1,12	13,2	15,3	2,6±0,7	10,3±2,8	1,1±0,04

Хотя изменения иммунологических показателей, характерных для устойчивой клинической ремиссии, вряд ли могут свидетельствовать о "иммунологической ремиссии", существуют особенности активации иммунологических процессов внутри ЦНС при ремиссии, сходные с активацией иммунной системы на ранних этапах иммунологического ответа. Возможно, процессы, происходящие в эту фазу, обуславливают дальнейшее развитие иммунопатологических событий при обострении заболевания [22]. В таком случае

полученная корреляция повышения уровней IgM и IgG с усилением процесса антителообразования становится объяснимой. Такая преимущественная активация быстрого гуморального звена иммунитета свидетельствует в пользу нормального физиологического ответа организма на чужеродные мозговые антигены. Очевидно, что этот процесс можно считать аутоиммунным только в смысле индукции естественных антител к собственным (хотя и забарьерным) антигенам.

Аутоантитела находятся в крови самостоятельно и в виде циркулирующих иммунных комплексов. Часть их выводится из организма выделительной системой, а другая часть может проникать в мозг через поврежденный гематоэнцефалический барьер с образованием комплексов антиген-антитело, непосредственно взаимодействуя с глутаматными рецепторами, расположенными в структурах цельных мембран. Блокированные глутаматные рецепторы не могут взаимодействовать с глутаматом, что может приводить к накоплению его в межнейрональных пространствах и вызывать дальнейшее гипервозбуждение нейронов и усиление симптомов заболевания. Иногда такие процессы могут лежать в основе некурабельных эпилептических состояний мозга больного, что требует введения в комплексную антисудорожную терапию препаратов, коррегирующих иммунитет, а также методов гемосорбции или плазмафереза [1, 3].

Таким образом, на основании полученных данных в настоящей работе и, опираясь на предшествующие исследования с использованием в качестве АГ глутаматмембранного белка (ГМБ) и синтезированного пептида GluR1, можно сказать, что повышение уровня аАТ к GluR1 субъединице AMPA-глутаматного рецептора более специфично для эпилепсии и пароксизмальных судорожных состояний. Эти результаты подтверждают данные о значимости РА-теста для диагностики эпилепсии и выбора стратегии лечения больных с тяжелыми формами заболевания. Определение уровня аАТ к субъединицам глутаматного рецептора является дополнительным критерием выраженности напряжения иммунитета, дает возможность производить динамический контроль за эффективностью проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дамбинова С.А. (1989). Нейрорецепторы глутамата. Л., Наука, 144с.
2. Meldrum B.S. (1994). *Neurology*, **44**, PS14.
3. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В. (1990). Нейроиммунные процессы в механизмах демиелинизирующей патологии ЦНС. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Иммунология. **25**, 121-168.
4. Михайлович Л., Чупич Д. (1973) Моделирование заболеваний. М., Медицина, с.82-91.
5. Aarli J.A., Fontana A. (1980). *Epilepsia*, **21**, 451-458.
6. Baltz M.L., Ettlinger G, Parrish K. et al. (1981). *J.Neurol.Sci.*, **49**, 335-340.
7. Бредбери М. (1983) Концепция гематоэнцефалического барьера. (Пер. с англ). М., Медицина.
8. Малашиха Ю.А., Геладзе М.Г., Глонти Т.И. (1974) Иммунопатология нервных и психических заболеваний. М., с.62-67.
9. Малашиха Ю.А. (1986). Иммунный барьер мозга. (Иммунология и иммунопатология спинномозговой жидкости). М.: Медицина.
10. Dambinova S. A., Granstrom O. K, Tourov A., Salluzzo R., Castello F., Izykenova G.A. (1998) *J. Neurochem.* **71**, 2088-2093.
11. Поляков Ю.И. (1998). Диагностика эпилепсии и оценка степени компенсации болезни в процессе терапии методом биохимического тестирования пароксизмальной активности головного мозга. Автореф. канд.мед.наук, СПб.

АУТОАНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРАМ ГЛУАМАТА ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

12. Атаманова Э.Э. (1997) Особенности ранней диагностики и прогнозирования течения эпилептических синдромов у детей с перинатальной патологией. Автореф. канд.мед.наук, СПб.
13. Пронькина М.Е. (1998) Диагностика эпилептических пароксизмов у детей на основе модифицированного метода биохимического тестирования. Автореф. канд.мед.наук.
14. Whitney K.D., Andrews P.I., McNamara J.O. (1999). *Neurology*, **53**, 699-708
15. Денисенко Т.В., Скулябин Д.И., Громов И.А., Черкас Ю.В., Илюхина А.Ю., Дамбинова С.А. (1998) *Вопр. мед. химии*, **44**, 584-590.
16. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. (1998). *Иммунология для врача*. СПб: Гиппократ.
17. Гублер Е.В. (1990) *Информатика в патологии, клинической медицине, педиатрии*. Л.
18. Матюшичев В.Б. (1990). *Элементы статистической обработки результатов биохимического эксперимента*. Изд. ЛГУ.
19. Шабашова Н.В. (1998) *Лекции по клинической иммунологии*. СПб.
20. Шабалина И.Г. (1982) Роль инфекционных факторов различного генеза в течении и патогенезе эпилепсии. Автореф. канд.мед.наук.
21. Bostantjopoulou S., Hatzizici O. (1994) *Funct-Neurology*, **9** (1), 11-15.
22. Тоголян А.А. (1999) *Мед. иммунология*, № 1-2, 56-67.

Поступила 13.03.01

THE LEVEL OF AUTOANTIBODIES AGAINST GLUTAMATE RECEPTORS SUBUNITS AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN BLOOD OF EPILEPTIC PATIENTS

V.G.Bazarova, O.K.Granstrem, S.A.Dambinova

Institute of Human Brain Brain, Russian Academy of Sciences
197386 St.-Peterburg, Pavlov st., 9;
tel.:+7(812)234-9423; fax:+7(812)234-3247

The role of glutamate receptors in the brain spiking activity was evaluated. The electroencephalographic (EEG) spiking activity was monitored and autoreactive antibodies (aAbs) to subunits of glutamate receptors were assessed in the blood serum of epileptic and ischemic stroke patients. We showed that the level of GluR autoantibodies in blood serum of patients correlates to the intensity of the brain paroxysmal activity. These data confirm our previous observations. The level of GluR1 aAbs has been proposed as a specific biomarker typical for epilepsy. This approach could be recommended as an additional criterion for diagnostic of nervous diseases such as epilepsy and ischemic stroke.

Keywords: epilepsy, glutamate receptors, autoantibody, T-cell immune response, B-cell immune response, IgM and IgG.