

ЭКЗАЙТОТОКСИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ: ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ БИОМАРКЕРОВ ГЛУТАМАТ-ОПОСРЕДОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Савченко О.А.¹, Павлинова Е.Б.¹, Полянская Е.Б.¹, Куклина Л.В.,¹ Замиралов К.А.,² Паладий Е.Е.², Кострик Е.Б.², Чуприк Ю.В.²

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, e-mail: olgasav1978@mail.ru;

²БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр», Омск

Методом ранней диагностики эксайтотоксической гибели олигодендроцитов является определение компонентов глутаматергической нейромедиаторной системы головного мозга. Цель работы: определение прогностической значимости пептидных фрагментов N-метил-D-аспартата рецептора (NMDA) и антител к NMDA и α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионата (AMPA) рецептору в диагностике гипоксического повреждения центральной нервной системы (ЦНС) у недоношенных новорожденных. Обследованы 48 новорожденных детей с гестационным возрастом (ГВ) 28–40 недель в 2 этапа с определением уровня пептида NR2 субъединицы NMDA рецептора пуповинной крови и уровня антител к NR2 субъединице NMDA рецептора и антител к GluR1 субъединице AMPA рецептора глутамата на 21-е сутки жизни. В ходе проведенного исследования при гипоксическом повреждении ЦНС у недоношенных детей установлены более низкие значения уровня NR2 пептида NMDA рецептора в пуповинной крови, чем у доношенных детей. У недоношенных новорожденных с задержкой внутриутробного развития (ЗВУР) запуск механизма эксайтотоксического поражения ЦНС инициируется на антенатальном этапе развития. Уровень антител к NR2 субъединице NMDA рецептора на 14–21-й день жизни в совокупности с уровнем лактата пуповинной крови и резистентностью сосудов головного мозга в 1-е сутки жизни могут выступать предикторами поражения ЦНС у недоношенного ребенка старше 21 дня жизни. У недоношенных детей с поражением ЦНС уровень антител к NR2 субъединицы NMDA рецептора и к GluR1 субъединице AMPA рецептора на 14–21-е сутки жизни выше, чем у здоровых недоношенных новорожденных, что указывает на эксайтотоксический механизм повреждения ЦНС и необходимость проведения длительной антиоксидантной терапии у данной категории детей.

Ключевые слова: недоношенный новорожденный, эксайтотоксичность, глутаматергические рецепторы, гипоксия, головной мозг.

EXCITOTOXIC BRAIN DAMAGE IN PREMATURE INFANTS: PROGNOSTIC RELEVANCE OF BIOMARKERS OF GLUTAMATE MEDIATED DAMAGE

Savchenko O.A.¹, Pavlynova E.B.¹, Polyanskaya E.B.¹, Kuklina L.V.¹, Zamiralov K.A.², Paladiy E.E.², Kostryk E.B.², Chuprik Yu.V.²

¹ Omsk State Medical University, Omsk, e-mail: olgasav1978@mail.ru

² City Clinical Perinatal Center, Omsk

The method of early diagnosis of excitotoxic death of oligodendrocytes is the identification of components of glutamatergic neurotransmitter system of brain. Aim of work: identification of prognostic significance of peptide fragments of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) and antibodies protective protein to NMDA and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionate (AMPA) receptor in diagnosis of hypoxic damage of central nervous system (CNS) in premature newborns. 48 newborn infants with the gestational age (GA) of 28-40 weeks were examined and defined in 2 stages the level of NR2 peptide of a subunit of NMDA receptor of umbilical blood and level of antibodies to NR2 of subunit of NMDA receptor and antibodies to GluR1 of a glutamate receptor of AMPA subunit on 21st day of life. A study of hypoxic damage of CNS in premature infants investigates lower quantity of NR2 peptide of NMDA receptor in umbilical cord blood than in full-term infants. In preterm newborns with fetal growth restriction (FGR) the launch of the mechanism of excitotoxic damage of CNS is initiated at the antenatal stage of development. The level of antibodies to NR2 of subunit of NMDA receptor on 14–21 day of life in combination with the level of cord blood lactate and cerebral resistance on the 1st day of life, can act as predictors of CNS injuries in a premature infants older than 21 days. In premature infants with CNS injuries, the level of antibodies to the NR2 of subunit of NMDA receptor and to the GluR1 of subunit of AMPA receptor is higher on 14–21 days than in healthy premature newborns, indicating an excitotoxic mechanism of CNS injury and the need for long-term antioxidant therapy for this category of infants.

Keywords: premature newborn, excitotoxicity, glutamatergic receptors, hypoxia, brain.

Изучение патогенеза повреждения ткани головного мозга в результате возникшей в перинатальном периоде гипоксии/ишемии и возможные методы ранней диагностики данного состояния – предмет научного поиска на современном этапе. Эксайтотоксичность – основной механизм повреждения пре- и олигодендроцитов в развивающемся мозге, который опосредуется через популяцию глутаматергических ионотропных рецепторов: N-метил-D-аспартата (NMDA), α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионата (AMPA) [1].

Активность NMDA рецепторов головного мозга высока в антенатальном и постнатальном периодах, в то время как активность AMPA рецепторов в развивающихся олигодендроцитах высока у плода в период с 23-й по 32-ю недели внутриутробного развития и уменьшается к моменту рождения [2]. Таким образом, мозг новорожденного ребенка более восприимчив к NMDA-, а мозг плода – к AMPA-опосредованному повреждению. NMDA рецепторы широко распространены в ЦНС и являются важными медиаторами синаптической передачи, пластичности и играют основную роль в нейрогенезе [3]. Данные рецепторы существуют в виде подтипов, различающихся по своему молекулярному составу: GluNR1, GluNR2 и GluNR3. Субъединица GluNR2 определяет сродство и чувствительность NMDA рецептора к агонистам и антагонистам, таким как глутамат, глицин и магний [4].

После воздействия гипоксии/ишемии запускается каскад событий, характеризующийся увеличением внеклеточного глутамата. Происходит активация NMDA рецепторов, как следствие – повышение уровня внутриклеточного кальция и увеличение митохондриальной проницаемости. Митохондрии набухают и погибают, выделяя в цитоплазму ряд факторов нейронального апоптоза: цитохром C, прокаспазу, эндонуклеазу, апоптоз-индуцирующий фактор [5]. Также в результате митохондриальной дисфункции повышается производство активных форм кислорода, что усугубляет нейрональный апоптоз [6]. В перинатальном периоде апоптотическая NMDA опосредованная гибель нейронов максимальна в стволе мозга, сразу после рождения – в таламусе и других подкорковых областях, а в первые 2 недели постнатальной жизни – в области коры головного мозга [7].

Таким образом, чрезмерная стимуляция рецепторов из-за массового высвобождения возбуждающих нейротрансмиттеров приводит к посттравматическому окислительному стрессу и гибели клеток в течение длительного периода, что ухудшает неврологический исход у новорожденного в будущем.

В настоящее время на основе проведенных исследований было предложено использовать пептид и антитела к фрагментам глутаматных рецепторов NR2 в качестве маркеров инсульта и транзиторной ишемической атаки во взрослой когорте больных.

Определение данных маркеров базируется на механизме повреждения ЦНС. На начальных этапах развития гипоксии/ишемии в мелких мозговых сосудах активируются сериновые протеазы, которые «режут» мембранные «петли» NMDA-рецепторов, расположенные на поверхности синаптической мембраны. Образовавшиеся пептидные фрагменты рецептора (NR2-пептид) попадают в кровоток через поврежденный гематоэнцефалический барьер и вызывают реакцию иммунной системы с образованием специфических NR2-антител. В педиатрии проведены исследования по выявлению зависимости поражения головного мозга гипоксического характера у доношенных новорожденных от уровня NR2-антител к NMDA-рецепторам. Учитывая высокую прогностическую значимость данного метода диагностики тяжести гипоксического повреждения ЦНС у доношенных новорожденных, можно говорить о перспективности данных биомаркеров в прогнозе поражения ЦНС у недоношенных новорожденных [8].

Цель исследования – установить диагностическую значимость биомаркеров эксайтотоксического повреждения головного мозга (пептид NR2 субъединицы NMDA рецептора и антитела к NR2 субъединице NMDA рецептора и GluR1 субъединице AMPA-рецептора глутамата) как ранних предикторов поражения ЦНС у недоношенных детей с целью ранней диагностики, лечения и прогнозирования исходов поражения ЦНС.

Материал и методы исследования. Работа одобрена локальным этическим комитетом (протокол № 118 от 12.03.2020 г.) и выполнена в дизайне проспективного когортного сравнительного исследования. Обследованы 48 новорожденных детей, родившихся и получивших лечение в условиях БУЗОО Городской клинической перинатальный центр (г. Омск). Процедура забора образцов сыворотки крови для проведения теста ИФА проводилась согласно протоколу, разработанному ООО «ДРД» (Москва, Сколково). Забор венозной крови в количестве 1 мл проводился одновременно с взятием крови для биохимических анализов, без дополнительных инвазивных вмешательств, с последующим центрифугированием, замораживанием сыворотки и лабораторной обработкой всего массива. Концентрация антител к GluNR2 в крови у здоровых доношенных новорожденных детей в норме составляет <2,0 нг/мл, нормативные значения NR2 пептида NMDA рецептора не определены.

Исследуемые новорожденные были распределены по группам: основная группа – новорожденные с ГВ 28–34 недель, массой тела 1000–2000 г (n=24), контрольная группа – новорожденные с ГВ 38–40 недель (n=24). 1-я контрольная точка исследования: определение уровня пептида NR2 субъединицы NMDA рецептора в пуповинной крови новорожденных исследуемых групп.

В дальнейшем основная группа новорожденных была разделена на подгруппы: 1-я подгруппа – недоношенные новорожденные с задержкой внутриутробного развития плода (ЗВУР), 2-я подгруппа – недоношенные новорожденные без ЗВУР.

На этапе 2-й контрольной точки (21-е сутки жизни) проведено определение антител к NR2 субъединице NMDA рецептора и антител к GluR1 субъединице AMPA рецептора глутамата в основной группе исследуемых новорожденных с сопоставлением степени поражения ЦНС по НСГ-исследованию в группе исследуемых новорожденных.

На начальном этапе статистической обработки полученной информации проводилось формирование базы данных с использованием программы Microsoft Office Excel – 2003 для работы с электронными таблицами (лицензионное соглашение 74017-640-0000106-57177), включающей характеристику групп (клиническую, лабораторную, морфофункциональную). На основании сформированной базы данных проводились проверка, сортировка и кодирование (шифровка) полученной информации. Для статистического анализа использовался пакет прикладных программ Statistica (версия 6.1., лицензионное соглашение BXXR006B092218FAN11).

Проверка статистических гипотез осуществлялась путем выявления различий между сравниваемыми группами с применением теста Вальда–Вольфовица, U-критерия Манна–Уитни (сравнение двух независимых переменных). При всех статистических расчетах критический уровень ошибки p принимался равным 0,05. Сравнение групп по бинарному признаку или сравнение относительных частот внутри одной группы или в двух независимых группах проводились при помощи построения четырехпольных таблиц абсолютных частот, согласно проверке нулевой статистической гипотезы о равенстве относительных частот в двух популяциях с использованием точного двустороннего критерия Фишера, критерия χ^2 . Если абсолютные частоты в четырехпольных таблицах сопряженности составляли биомаркеров менее 10, то использовался критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность.

Результаты исследования и их обсуждение. Гестационный возраст детей основной группы составил 32 [29; 33] недель, а масса тела при рождении – 1420 [1270; 1650] г. Гестационный возраст новорожденных контрольной группы – 39 [39; 40], а масса тела при рождении – 3420 [3270; 3920] г. Дети в сравниваемых группах были сопоставимы по полу: в 1-й и 2-й группах 17 [47,2%] и 15 девочек [41,7%] соответственно. Недоношенным новорожденным на этапе родильного зала оказание помощи проводилось согласно клиническим рекомендациям «Ведение новорожденных с респираторным дистресс-синдромом» (2016 г.).

На первом этапе исследования биомаркера в пуповинной крови установлено, что уровень NR2 пептида NMDA рецептора у новорожденных основной группы был

статистически ниже, чем у новорожденных контрольной группы ($U=278,0$; $p= 0,012$). В основной группе уровень NR2 пептид NMDA рецептора составил Me 0,043 нг/мл [0,016; 0,057], а в контрольной группе – Me 0,083 нг/мл [0,059; 0,186] (рис. 1).

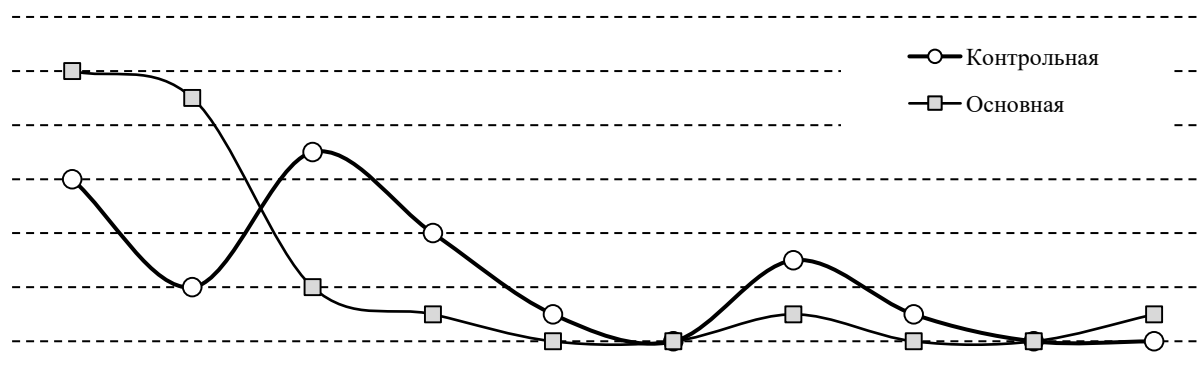


Рис. 1. Распределение значений уровня NR2 пептида NMDA рецептора в пуповинной крови у новорожденных основной и контрольной групп, нг/мл

Ось ординат – число детей, ось абсцисс – значения NR2 пептида NMDA рецептора, нг/мл.

На следующем этапе исследования новорожденных 1-й подгруппы – недоношенные новорожденные с задержкой внутриутробного развития плода (ЗВУР) – и 2-й подгруппы – недоношенные новорожденные без ЗВУР основной группы – не получено статистически значимых различий уровня NR2 пептида NMDA рецептора в пуповинной крови ($U=53,0$; $p=0,403$), однако установлено, что уровень NR2 пептида NMDA рецептора у детей со ЗВУР выше, чем у новорожденных без ЗВУР (0,041 нг/мл [0,014; 0,113] и 0,030 нг/мл [0,008; 0,048] соответственно). Полученный результат дает основание предположить, что гипоксическое-ишемическое повреждение ЦНС у недоношенных новорожденных с ЗВУР происходит на этапе внутриутробного развития.

Данный факт подтверждается оценкой степени метаболических нарушений у новорожденных со ЗВУР, которая проведена по уровню значения лактата в пуповинной крови. У недоношенных новорожденных 1-й подгруппы получен статистически значимо более высокий уровень лактата, чем в подгруппе 2 ($U=22,0$; $p= 0,013$): в подгруппе 1 – Me 4 ммоль/л [3,0; 7,8], во 2-й подгруппе – Me 2,8 ммоль/л [2,2; 3,0].

В дальнейшем нами был проведен эксперимент поискового характера по установлению связей между показателями. Сравнение показателей проводилось по медиане значений. В результате была получена связь значений лактата пуповинной крови с индексом резистентности (ИР) сосудов головного мозга по УЗДГ НСГ исследованию, проведенному к

концу первых суток жизни ($U=2,309$; $p=0,028$) и уровнем антител к NR2 субъединице NMDA рецептора на 14–21-й день жизни ($U=2,409$; $p=0,027$). Новорожденные со значением лактата в интервале 2,95–7,8 ммоль/л имели пограничные, но укладывающиеся в референтные значения показатель ИР сосудов головного мозга – 0,795 (СКО=0,084) и высокие значения уровня антител к NR2 субъединице NMDA рецептора на 14–21-й день жизни – 0,987 нг/мл (СКО=0,360). Новорожденные с уровнем лактата 1,3–2,95 ммоль/л имели более низкие значения ИР сосудов головного мозга – 0,720 (СКО=0,083) и значение уровня антител к NR2 субъединице NMDA рецептора в 14–21-й день жизни – 0,218 нг/мл (СКО=0,653).

В ходе исследования установлено, что уровень лактата пуповинной крови в диапазоне 2,95–7,8 ммоль/л при высокой резистентности сосудов головного мозга в 1-е сутки жизни по результату УЗДГ НСГ исследования является предиктором эксайтотоксического повреждения ЦНС у недоношенного новорожденного.

Далее проанализирован уровень антител к NR2 субъединице NMDA рецептора и к GluR1 субъединице AMPA рецептора на 14–21-е сутки жизни у недоношенных новорожденных с различными исходами по поражению ЦНС (перивентрикулярная лейкомаляция (ПВЛ) и внутрижелудочковое кровоизлияние (ВЖК), без патологии со стороны ЦНС). Получены статистически значимые высокие показатели уровня антител к NR2 субъединице NMDA рецептора и субъединице GluR1 AMPA рецептора в крови новорожденных с тяжелым органическим поражением ЦНС (таблица).

Значения биохимических параметров у недоношенных новорожденных детей с различными исходами по поражению ЦНС, Me [QL; QU]

Параметры	Поражение ЦНС (ПВЛ+ВЖК) n=9	Без поражения ЦНС n=15	U	p*
Антитела к NR2 субъединице NMDA рецептора (нг/мл)	1,24 [0,98; 1,36]	0,29[0,19; 0,50]	6	0,006*
Антитела к GluR1 субъединице AMPA рецептора (нг/мл)	0,53 [0,48;0,64]	0,22 [0,198; 0,27]	1	0,001*

Примечание * – сравнение двух групп переменных по критерию Манна–Уитни.

Заключение. На современном этапе перинатальное поражение ЦНС у недоношенных новорожденных – заболевание с неоднозначным варибельным прогнозом. Когнитивные и поведенческие нарушения у недоношенных новорожденных, даже без явного повреждения головного мозга, при оценке путем нейровизуализации подчеркивают критическую необходимость поиска микроструктурных и биохимических биомаркеров повреждения.

Глутаматные рецепторы в антенатальном и постнатальном периодах обеспечивают высокую нейропластичность. Они играют решающую роль в миграции нейронов, их дифференцировке, формировании дендритов и синапсов.

Высокая рецепторная активность нейронов у плода и новорожденного, с одной стороны, и уязвимость для эксайтотоксичности – с другой создают парадоксальную ситуацию: незрелый мозг может долго выдерживать возникший вследствие гипоксии/ишемии энергодефицит за счет возбудимости глутаматных рецепторов, однако при его определенном критическом пороге развивается апоптотическая гибель нейронов за счет механизма эксайтотоксичности.

С учетом знаний о восстановительном потенциале мозга в виде постнатального нейрогенеза огромное значение имеют раннее установление групп риска недоношенных новорожденных по поражению ЦНС и начало медикаментозной коррекции.

В настоящее время перспективным методом ранней диагностики эксайтотоксической гибели олигодендроцитов является определение компонентов глутаматергической нейромедиаторной системы головного мозга – пептида и антител к фрагментам глутаматных рецепторов NR2.

В ходе проведенного исследования установлены более низкие значения контрольных цифр NR2 пептида NMDA рецептора в пуповинной крови у недоношенных детей, чем у доношенных новорожденных. На основании полученного результата ошибочно делать заключение о степени эксайтотоксического повреждения головного мозга в данных группах новорожденных с учетом восприимчивости мозга недоношенного ребенка к АМРА-опосредованному повреждению, а доношенного – к NMDA- опосредованному повреждению. С учетом данных особенностей активности глутаматергических ионотропных рецепторов требуется дальнейшее исследование NR2 пептида NMDA рецептора у недоношенных детей с установлением контрольных цифр данного биомаркера для ранней диагностики повреждения ЦНС.

Однако у недоношенных новорожденных, имеющих задержку внутриутробного развития, установлены более высокие цифры NR2 пептида NMDA рецептора в совокупности с высоким уровнем лактата пуповинной крови. Это дает основание предполагать, что в данной когорте детей запуск механизма эксайтотоксического поражения ЦНС инициируется на антенатальном этапе развития. Также установлено, что уровень антител к NR2 субъединице NMDA рецептора (0,987 нг/мл (СКО=0,360)) на 14–21-й день жизни в совокупности с уровнем лактата пуповинной крови (в диапазоне 2,95–7,8 ммоль/л) и резистентностью сосудов головного мозга (0,795 (СКО=0,084)) в 1-е сутки жизни могут выступать предикторами поражения ЦНС у недоношенного ребенка старше 21 дня жизни.

По результатам нашего исследования у недоношенных детей с поражением ЦНС (перивентрикулярная лейкомаляция и внутрижелудочковое кровоизлияние) уровень антител к NR2 субъединицы NMDA рецептора и к GluR1 субъединице AMPA рецептора на 14–21-й сутки жизни выше, чем у здоровых недоношенных новорожденных, что указывает на механизм эксайтотоксического повреждения в генезе поражения ЦНС и необходимость проведения длительной антиоксидантной терапии у данной категории детей. Мы видим перспективу в использовании биомаркеров эксайтотоксического поражения ЦНС-пептида NR2 субъединицы NMDA рецептора и антитела к NR2 субъединице NMDA рецептора и GluR1 субъединице AMPA-рецептора глутамата в когорте недоношенных детей с целью диагностики, разработки путей персонализированной медикаментозной терапии и прогнозирования исходов поражения ЦНС.

Список литературы

1. Káradóttir R., Attwell D. Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience*. 2007. vol. 145. no. 4. P. 1426-1438.
2. Cull-Candy S.G., Farrant M. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and their auxiliary subunits in synaptic plasticity and disease. *Physiol*. 2021. vol. 599. no. 10. P. 2655-2671.
3. Åmellem I., Yovianto G., Chong H.T., Nair R.R., Cnops V., Thanawalla A., Tashiro A. Role of NMDA Receptors in Adult Neurogenesis and Normal Development of the Dentate Gyrus. *eNeuro*. 2021. vol. 8 no. 4. ENEURO.0566-20.2021.
4. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013. 14. no. 6. P. 383-400.
5. Lima-Ojeda J.M., Vogt M.A., Pfeiffer N., Dormann C., Köhr G., Sprengel R., Gass P., Inta D. Pharmacological blockade of GluN2B-containing NMDA receptors induces antidepressant-like effects lacking psychotomimetic action and neurotoxicity in the perinatal and adult rodent brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2013. no. 45. P. 28-33.
6. Liu X., Xu S., Wang P., Wang W. Transient mitochondrial permeability transition mediates excitotoxicity in glutamate-sensitive NSC34D motor neuron-like cells. *Exp Neurol*. 2015. no. 271. P. 122-130.
7. Sellinger E.P., Drzewiecki C.M., Willing J., Juraska J.M. Cell death in the male and female rat medial prefrontal cortex during early postnatal development. *IBRO Neurosci Rep*. 2021. no. 10. P. 186-190.

8. Правдухина Г.П., Скоромец А.П. Динамика психомоторного развития и уровня аутоантител к рецепторам глутамата у детей с перинатальными гипоксически-ишемическим поражением ЦНС // Нейрохирургия и Неврология. 2012. Т. 1. № 13. С. 35-39.