

# Контроль эффективности нейроцитопротекторов с помощью биомаркеров ишемии головного мозга

К.Т. Алиев, Е.В. Бондаренко, Г.В. Пономарев, А.А. Скоромец, А.П. Скоромец, Д.Г. Смолко, М.В. Шумилина  
НИИ неврологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», РФ

**Резюме.** В статье представлены результаты исследования 110 пациентов в возрасте от 25 до 75 лет. У 18 из них диагностирована транзиторная ишемическая атака (ТИА) и у 92 — ишемический инсульт (ИИ): в каротидном бассейне — у 72 больных, в вертебро-базилярном бассейне — у 20 больных. У всех пациентов определена концентрация NR2-пептидных фрагментов, которая была выше нормальных значений ( $>1,3$  нг/мл) ( $p < 0,0001$ ). Наблюдалась прямая корреляция между концентрацией NR2-пептида (от 3,15 до 1,6 нг/мл) и размером зоны ишемии от нескольких мм до 80 мм ( $r_s = 0,73$ ). После проведения 10-дневного курса лечения Кортексином наблюдали снижение концентрации NR2-пептидных фрагментов (от 8,5 до 5,3 нг/мл) ( $p < 0,0001$ ). Полученные данные позволяют сделать вывод о состоятельности исследуемого гемотеста ишемии мозга и достаточной терапевтической эффективности Кортексина.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, диагноз, биомаркер ишемии мозга, NR2-пептид, лечение, Кортексин.

Хорошо известно, что нейровизуализационные исследования достаточно четко позволяют диагностировать ишемический церебральный инсульт [1-3]. Однако почти в 40% случаев экстренное магнитно-резонансное исследование не может быть проведено [4, 5] в силу его недоступности или противопоказаний. Своевременная диагностика ишемического инсульта необходима для сортировки пациентов и выбора лечебной тактики [6]. Это требует поиска быстрого и недорогого лабораторного теста, способного определять степень ишемии головного мозга и снижать диагностические ошибки. В клинике неврологии Первого СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова проводятся клинические исследования диагностических биомаркеров, в частности, оценивается диагностический потенциал NR2-пептида в сопоставлении с неврологическим статусом и данными магнитно-резонансной и компьютерной томографии (МРТ, КТ) головного мозга при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК).

© К.Т. Алиев, Е.В. Бондаренко, Г.В. Пономарев, А.А. Скоромец, А.П. Скоромец, Д.Г. Смолко, М.В. Шумилина

По данным литературы [9, 10], биомаркеры нейротоксичности и окислительного стресса могут сигнализировать о наличии церебральной ишемии. Показано, что N-метил-D-аспартатные (NMDA) возбуждающие рецепторы, расположенные на поверхности микрососудов [10, 11], регулируют процессы вазоконстрикции и вазодилатации и участвуют в развитии нейрососудистых нарушений. Также показано, что NR2-пептид (подвид NMDA-рецепторов) может являться плазменным биомаркером острой церебральной ишемии [12]. В острую фазу ишемического каскада происходит массивный выброс глутамата, который вызывает дисрегуляцию NMDA-рецепторов [13], в частности, на клетках эндотелия мозговых микрососудов [11]. При этом N-концевые фрагменты NR2-субъединиц быстро отщепляются сериновыми протеазами и попадают в кровоток, где возможно определение NR2-пептидных фрагментов с молекулярным весом около 5 kD [12].

**Целью работы** является оптимизация ранней диагностики васкулярно-церебральной патологии путем определения диагно-

стических возможностей NR2-пептидного теста в сопоставлении с данными неврологического и радиологического обследования пациентов с ишемическим инсультом, а также рассмотрение этого гемотеста как потенциального метода оценки действия нейротропекторов на примере Кортексина.

### Материалы и методы

Пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения (ИИ) включали в исследование с января 2016 г. по февраль 2017 г. на основе клинического протокола, утвержденного локальным этическим комитетом Первого СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Всеми пациентами подписывалось информированное согласие на проводимое исследование.

В анализ включены мужчины и женщины в возрасте от 25 до 75 лет, поступавшие с подозрением на ТИА или ишемический инсульт (ИИ) в течение до 72 часов от начала заболевания. Критерием ТИА служило разрешение симптомов в течение 24 часов. Всего обследовано 110 пациентов, среди них 18 пациентов с транзиторной ишемической атакой (ТИА), 72 — с четкой клинической картиной ИИ в каротидном бассейне и 20 больных — в вертебро-базилярном бассейне. Группу контроля составили 20 человек — здоровых добровольцев.

В исследование не включались пациенты с сопутствующими воспалительными, аутоиммунными, психическими, тяжелыми метаболическими и онкологическими заболеваниями, беременностью, а также пациенты с ИИ, которым по объективным причинам не удавалось выполнить МРТ-исследование. Кроме того, из анализа исключены пациенты, чьи образцы плазмы были подвергнуты гемолизу.

**Методы обследования участников.** У всех участников исследования собран анамнез жизни и заболевания. Все пациенты с симптомами ИИ прошли общее клиническое обследование и неврологический осмотр, включавший шкалу инсульта Национального института здоровья (National Institutes of Health Stroke Scale — NIHSS) [17]. В течение 24 часов проводилось КТ-, МР-исследование головного мозга.

Протокол МР-исследования на аппарате Siemens 1.5 Tesla Avanto с возможностью эхо-планарной визуализации включал следующие режимы сканирования: T1-, T2-взве-

шенное изображение в сагиттальной и аксиальной проекциях, FLAIR в аксиальной проекции, DWI. Полученные изображения интерпретировались сертифицированным нейрорадиологом. Отмечалась топика и размер очага.

Объем инфаркта измеряли с помощью программного обеспечения Analyze software 6.1 (Biomedical Imaging Resource, Rochester, Minn). Очаг инфаркта в мм отмечался на аксиальной проекции, при мультифокальном поражении суммировались объемы всех очагов.

Всем пациентам была проведена адекватная терапия с учетом тяжести состояния и патогенетического подтипа ИИ. Нейропротективная терапия проводилась посредством ежедневного внутримышечного введения лекарственного препарата Кортексин 20 мг в течение 10 дней.

**Определение NR2-пептида в плазме.** Анализ образцов производился с помощью наборов Gold Dot Test (CIS Biotech, Inc., Atlanta, GA) согласно инструкции производителя.

**Статистический анализ** проводили в обеих исследуемых группах с использованием общепринятых методов описательной статистики. Различия показателей оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,001$ . Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовался для оценки корреляции между значениями NR2-пептида и объемом инфаркта головного мозга по данным МРТ.

### Результаты и их обсуждение

В группе ИИ средний балл по шкале NIHSS при поступлении составлял 5,3. Клиническая картина варьировала от легких до тяжелых гемипарезов-гемиплегии с чувствительными, координаторными расстройствами и зависела от пораженного сосудистого бассейна.

Этиологическими факторами ИИ были атеросклероз, гипертоническая болезнь, фибрилляция предсердий, аномалии строения снабжающих мозг сосудов (часто гипоплазии и аплазии позвоночных артерий, задних соединительных артерий, патологическая извитость магистральных сосудов головы).

Результаты определения содержания NR2-пептида в плазме крови обследованных групп пациентов в виде усредненных зна-

чений без учета динамики, обусловленной проводимой нейропротективной терапией, представлены в таблице.

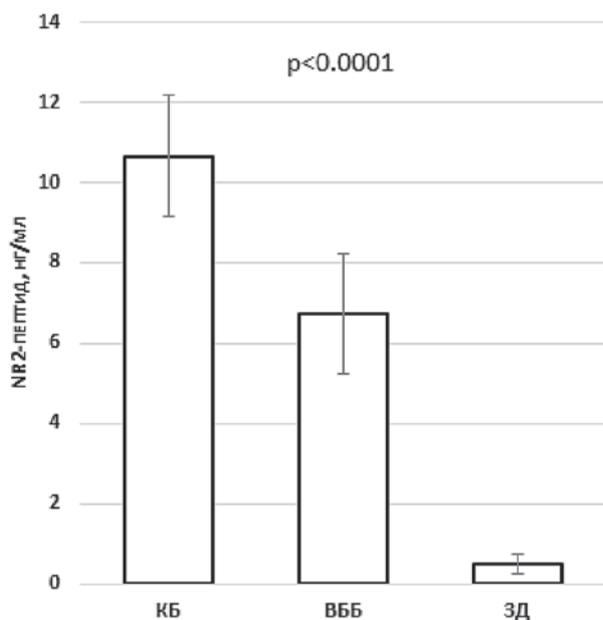
Данные значения NR2-пептида показывают, что его содержание в плазме больных ИИ имело тенденцию к увеличению, особенно при локализации ишемического очага в коре, находящейся в области васкуляризации передних и средних мозговых артерий, что соответствует данным литературы [12, 17]. Этот показатель превышал аналогичный параметр в группе здоровых добровольцев в 5-7 раз ( $p < 0,0005$ ).

Сравнение средних значений NR2-пептида показало значимое ( $p < 0,0001$ ) различие его концентрации в плазме между группой ИИ в каротидном (среднее — 10,5 нг/мл, диапазон — 5,15-24,63 нг/мл) и вертебро-базиллярном бассейнах (среднее — 6,74 нг/мл, диапазон — 2,81-17,25 нг/мл), что отражено на рис. 1.

**Таблица** Средние значения содержания NR2-пептида в плазме крови у пациентов с ОНМК и в контрольной группе

Группа обследованных	Количество человек	NR2-пептид, нг/мл
Здоровые добровольцы	20	0,5±0,35
ТИА	18	1,5±0,5*
Ишемический инсульт:		
• каротидный бассейн	72	10,5±2,0*
• вертебро-базиллярный бассейн	20	6,15±1,40*

Примечание. \*Различия достоверны по сравнению с контролем.

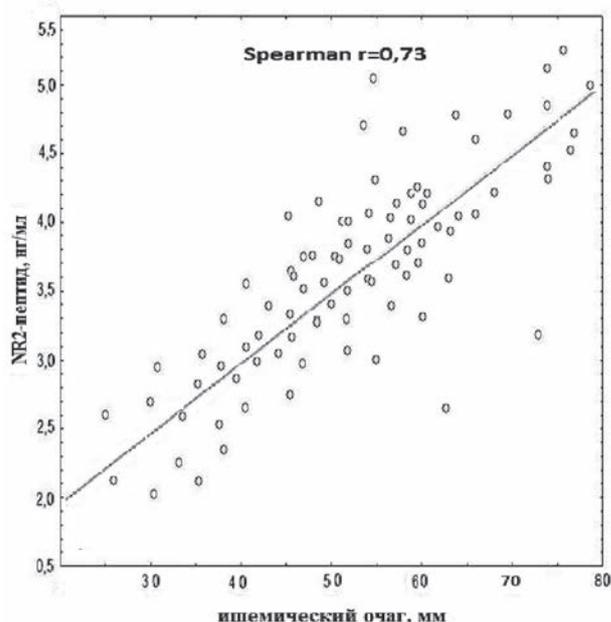


**Рисунок 1** Содержание NR2-пептида (M±σ) в плазме больных с ИИ в каротидном, вертебро-базиллярном бассейнах (КБ, ВББ) и у здоровых добровольцев (ЗД)

Размер инфаркта по данным МРТ варьировал от 20 до 100 мм. Кортиковые инсульты наблюдались в 43% случаев, подкорковые — в 57%. Концентрация NR2-пептида в плазме пациентов с ИИ коррелировала с объемом подкорковых и корковых очагов (до 80 мм), выявленных при проведении МРТ головного мозга ( $r_s = 0,73$ ); данная связь указана на рис. 2. Наибольшие значения отмечались в пределах 1-12 часов от момента появления клинических симптомов.

Как отмечалось выше, концентрация NR2-пептида в плазме крови исследовалась дважды: до и после проведенного курса нейропротективной терапии. Сравнение концентрации NR2-пептида у пациентов с ИИ до и после лечения Кортексином, представленное на рис. 3, показало снижение уровня маркера в среднем на 2,53 нг/мл ( $p < 0,0001$ ).

Со времени открытия биохимической структуры и описания физиологической роли рецепторов глутамата был проведен ряд исследований [12, 13, 16], подтвердивший диагностическую значимость NR2-подтипа NMDA-глутаматных рецепторов в определении преинсультных и инсультных состояний. По данным С.А. Дамбиновой с соавт. [16], у здоровых добровольцев концентрация NR2-пептида в сыворотке крови составляет в среднем 0,33 нг/мл (0,02-1,15 нг/мл). На основе полученных данных для NR2-пептидного гемотеста было предложено два пороговых значения: 0,5 нг/мл и 1,0 нг/мл.

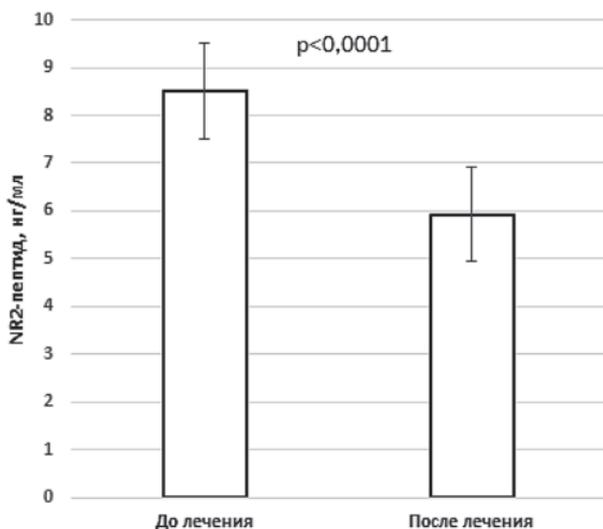


**Рисунок 2** Положительная корреляционная связь ( $r_s = 0,73$ ) между концентрацией NR2-пептида в плазме и объемом ишемического очага по данным МРТ

Проведенное авторами исследование показало статистически значимое увеличение концентрации NR2-пептида при ИИ по сравнению с пациентами без ишемии мозга, что было подтверждено и в нашем исследовании. Умеренная корреляция наблюдалась между результатами пептидного гемотеста и размерами образовавшихся очагов инфаркта в коре головного мозга: 3,38 нг/мл при объеме очага до 10 мм и 25,73 нг/мл при очаге до 100 мм [16].

Отдельно под руководством профессора С.А. Дамбиной проводились исследования по изучению патологических состояний, связанных с повышенным риском ИИ [15]. У пациентов с такими сосудистыми факторами риска, как сахарный диабет и артериальная гипертензия, также отмечались повышенные уровни NR2-пептида (1,54-2 нг/мл), что свидетельствует о наличии микроциркуляторных нарушений у этой группы больных.

Определение клинического значения пептидного гемотеста при пороговом значении 1,0 нг/мл показало, что при поступлении пациента с подозрением на инсульт внутри 72 часов заболевания данный гемотест может дифференцировать ИИ до применения других диагностических процедур. Чувствительность теста при этом составляет 92%, а специфичность — 96%, что демонстрирует в итоге положительную прогностическую значимость теста в 93%. При отрицательных результатах анализа (<1,0 нг/мл) *пост-тестовая вероятность* диагноза ишемического инсульта очень низка (около 4%). Первоначальный диагноз



**Рисунок 3** Содержание NR2-пептида ( $M \pm \sigma$ ) в плазме больных с ИИ до и после проведенного курса лечения препаратом Кортексин

ИИ до проведения дорогостоящей нейровизуализации позволяет существенно сократить ненужные процедуры у лиц с симптомами, похожими на инсульт, и тем самым снизить финансовые затраты.

Одной из ключевых задач нашего исследования было определение динамики NR2-пептида в плазме больных с ишемическим инсультом (ИИ) в результате лечения низкомолекулярным нейроцитопротектором на примере Кортексина. Повторный анализ плазмы крови пациентов выявил снижение NR2-пептида в среднем на 2,53 нг/мл после проведенного 10-дневного курса лечения препаратом.

Эффективность Кортексина при сосудисто-мозговых заболеваниях ранее была доказана в ряде рандомизированных плацебо-контролируемых исследований [19, 20]. В нашей работе это подтверждено не только регрессом клинических проявлений, но и динамикой биомаркера ишемии мозга.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают целесообразность и экономическую полезность внедрения в клиническую практику метода определения концентрации NR2-пептида в плазме крови как биомаркера ишемии мозга. При проведении курса лечения Кортексином по 20 мг внутримышечно в течение 10 дней в остром периоде ИИ отмечено достоверное снижение концентрации данного маркера в плазме крови.

Необходимо дальнейшее накопление фактов по динамике показателей этого теста под влиянием терапии острой и хронической сосудисто-мозговой недостаточности различными лекарственными препаратами и реабилитационными комплексами.

### Список использованной литературы

1. Hand P.J., Kwan J., Lindley R.I., Dennis M.S., Wardlaw J.M. Distinguishing between stroke and mimic at the bedside: the brain attack study // *Stroke*. — 2006. — Vol. 37. — P. 769-775.
2. Hemmen T.M., Meyer B.C., McClean T.L., Lyden P.D. Identification of nonischemic stroke mimics among 411 code strokes at the University of California, San Diego, Stroke Center // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* — 2008. — Vol. 17. — P. 23-25.
3. Vroomen P.C., Buddingh M.K., Luijckx G.J., De Keyser J. The incidence of stroke mimics among stroke department admissions in relation to age group // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* — 2008. — Vol. 17. — P. 418-422.
4. Von Kummer R., Nolte P.N., Schnittger H., Thron A., Ringelstein E.B. Detectability of cerebral hemisphere ischemic infarcts by CT within 6 h of stroke // *Neuroradiol.* — 1996. — 38. — P. 31-33.

5. Hand P.J., Wardlaw J.M., Rowat A.M., Haisma J.A., Lindley R.I., Dennis M.S. Magnetic resonance brain imaging in patients with acute stroke: feasibility and patient related difficulties // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. — 2005. — Vol. 76. — P. 1525-1527.
6. Warlow C., Sudlow C., Dennis M., Wardlaw J., Sandercock P. // *Stroke. Lancet*. — 2003. — Vol. 362. — P. 1211-1224.
7. Furie K.L., Kasner S.E., Adams R.J., Albers G.W. et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack. A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association // *Stroke*. — 2011. — Vol. 42. — P. 227-276.
8. Whiteley W., Tseng M.C., Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke. A systematic review // *Stroke*. — 2008. — Vol. 39. — P. 2902-2909.
9. Bettermann K. Biomarkers for stroke: in search of fingerprints // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* — 2011. — Vol. 20. — P. 173-176.
10. Betzen C., White R., Zehendner C.M., Pietrowski E., Bender B., Luhmann H.J., Kuhlmann R.W. Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium // *Free Radical. Biol. Med.* — 2009. — Vol. 47. — P. 1212-1220.
11. Sharp C.D., Fowler M., Jackson T.H., Houghton J., Warren A., Nanda A. et al. Human neuroepithelial cells express NMDA receptors // *BMC Neurosci.* — 2003. — Vol. 4. — P. 28-32.
12. Dambinova S.A. Biomarkers for transient ischemic attack and ischemic stroke // *Clin. Lab. Int.* — 2008. — Vol. 32. — P. 7-10
13. Gappoeva M.U., Izykenova G.A., Granstrem O.K., Dambinova S.A. NMDA receptor mRNA expression in experimental ischemia // *Biokhimiya*. — 2003. — Vol. 68. — P. 696-702.
14. Barry H., Byrne S., Barrett E., Murphy K.C., Cotter D.R. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: review of clinical presentation, diagnosis and treatment // *BJPsych. Bull.* — 2015. — Vol. 39. — P. 19-23.
15. Weissman J.D., Khunteev G.A., Heath R., Dambinova S.A. NR2 antibodies: risk assessment of transient ischemic attack (TIA)/stroke in patients with history of isolated and multiple cerebrovascular events // *J. Neurol. Sci.* — 2011. — Vol. 300. — P. 97-102.
16. Дамбинова С.А., Скоромец А.А., Скоромец А.П. Биомаркеры церебральной ишемии (разработка, исследование и практика). — СПб.: ООО «ИПК КОСТА», 2013. — 336 с.
17. Скоромец А.А., Скоромец А.П., Скоромец Т.А. Топическая диагностика заболеваний нервной системы. Руководство для врачей. 9-е издание. — СПб.: Политехника, 2014. — 623 с.
18. Скоромец А.А., Скоромец А.П., Скоромец Т.А. Неврологический статус и его интерпретация. Учебное руководство для врачей / Под ред. проф. М.М. Дьяконова. 2-е изд., исправленное и дополненное. — М.: МЕДпресс-информ, 2010. — 256 с.
19. Стаховская Л.В., Мешкова К.С., Дадашева М.Н., Чефранова Ж.Ю. и др. Многоцентровое рандомизированное проспективное двойное слепое плацебо контролируемое исследование безопасности и эффективности кортексина в остром и раннем восстановительном периоде полушарного ишемического инсульта // *Вестник Российской военно-медицинской академии*. — 2012. — Т. 37. № 1. — С. 238-244.
20. Танащян М.М., Бархатова Д.Ю., Глотова Н.А., Коновалов Р.Н. и др. Эффективность нейропротекции у больных с хроническими цереброваскулярными заболеваниями // *Вестник Российской военно-медицинской академии*. — 2011. — Т. 35, № 3. — С. 181-187.

Надійшла до редакції 23.02.2017 р.

#### CONTROL OF THE EFFECTIVENESS OF NEUROCYTOPROTECTORS WITH THE HELP OF CEREBRAL ISCHEMIA BIOMARKERS

K.T. Aliev, Ye.V. Bondarenko, G.V. Ponomarev, A.A. Skoromets, A.P. Skoromets, D.G. Smolko, M.V. Shumilina

##### Abstract

The article presents the results of the study of 110 patients aged 25 to 75 years. 18 of them were diagnosed with transient ischemic attack (TIA) and 92 with ischemic stroke (IS): in carotid basin – 72 patients, in vertebrobasilar basin – 20 patients. In all patients, the concentration of NR2 peptide fragments was determined, which was higher than the normal values (>1.3 ng/ml) ( $p < 0.0001$ ). A direct correlation between the concentration of NR2 peptide (3.15 to 1.6 ng/ml) and the size of the ischemia zone from several mm to 80 mm ( $r_s=0.73$ ) was observed. After a 10-day treatment course with Cortexin, a decrease in the concentration of NR2-peptide fragments (from 8.5 to 5.3 ng/ml) ( $p < 0.0001$ ) was observed. The obtained data allow drawing a conclusion about the consistency of the examined hemostasis of cerebral ischemia and the sufficient therapeutic efficacy of Cortexin.

**Keywords:** ischemic stroke, diagnosis, cerebral ischemia biomarker, NR2 peptide, treatment, Cortexin.