

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ДЕМЬЯНОВА И.М., ТАРАНУШЕНКО Т.Е., САЛМИНА А.Б., ОКУНЕВА О.С., МОРГУН А.В., МАЛИНОВСКАЯ Н.А., ТАГАЕВА Г.А., ШАРОГЛАЗОВА Л.А., КРИЦКАЯ И.А.

МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

И.М. Демьянова, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина, О.С. Окунева, А.В. Моргун, Н.А. Малиновская, Г.А. Тагаева, Л.А. Шароглазова, И.А. Крицкая
Красноярская государственная медицинская академия им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П.Артюхов; кафедра детских болезней №1, зав. – д.м.н., проф. Т.Е.Таранушенко; кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, зав. кафедрой, руководитель НИИ – д.м.н., проф. А.Б. Салмина.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МД-2826.2007.7).

Резюме. Проведено исследование уровней нейронспецифической енолазы, глиального фибриллярного кислого белка, *sFasL* в плазме периферической крови методом ИФА у новорожденных с разной степенью церебральной ишемии. Установлено, что повышение уровня *NSE* в сыворотке крови новорожденных может служить дополнительным критерием ранней диагностики и степени тяжести гипоксического поражения головного мозга; увеличение значений *GFAP* в сыворотке крови новорожденных следует рассматривать как маркер тяжести церебральной ишемии.

Ключевые слова: новорожденный, гипоксически-ишемическое поражение головного мозга, нейронспецифическая енолаза (*NSE*), глиальный фибриллярный кислый белок (*GFAP*), *sFasL*.

Перинатальные гипоксические поражения головного мозга являются основной причиной инвалидизации: до 36% детей, перенесших гипоксию в родах, имеют в дальнейшем задержку развития или двигательные нарушения различной степени тяжести. Диагностика гипоксически-ишемического поражения головного мозга базируется преимущественно на клиничко-анамнестических и нейросонографических критериях, практически не используются объективные лабораторные показатели, указывающие на неблагополучие в ЦНС. Клиническая картина не всегда отражает истинную тяжесть поражения ЦНС и дальнейший прогноз развития ребенка. В связи с этим актуальна проблема поиска маркеров поражения нервной ткани для оценки степени тяжести с целью раннего начала лечения и снижения инвалидизации [1, 5].

Для оценки нейродегенеративного процесса и проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) широко применяется иммуноферментный анализ нейроспецифических антигенов в ликворе и периферической крови [3]. К белкам – маркерам повреждения ЦНС относятся: нейронспецифическая енолаза (NSE) и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP).

Енолаза – фермент гликолиза, катализирующий конверсию 2-фосфоглицерата в 2-фосфоенолпируват. Этот фермент существует в клетках в форме димеров и состоит из субъединиц α , β , γ . Идентифицировано 5 изоферментов енолазы: $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$, $\alpha\beta$, $\gamma\gamma$ и $\beta\beta$. Нейронспецифическая енолаза (NSE), или $\gamma\gamma$ -енолаза, содержится в основном в нейронах головного мозга и нейроэндокринных клетках. В нормальных условиях гематоэнцефалический барьер является непроницаемым для специфических маркеров поражения клеток головного мозга. Значительное проникновение фермента через поврежденные плазматические мембраны клеток мозга и гематоэнцефалический барьер в спинномозговую жидкость и кровь при перинатальных поражениях центральной нервной системы свидетельствует о

глубине и интенсивности структурно-функциональных и деструктивных нарушений клеточных мембран нейронов и ГЭБ.

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) – структурный компонент дифференцированных клеток астроцитарной глии. Астроциты определяются в ближайшем окружении синапсов, регулируют транспорт нейротрансмиттеров и ионов, влияют на митохондриальную функцию нейронов (за счет функционирования астроцит-нейронального лактатного челночного механизма), а также секретируют биологически активные молекулы, действующие на эндотелиоциты, микроглиоциты и нейроны, т.е. в целом, являются детекторами и, одновременно, регуляторами нейрональной активности [7]. Известны реактивные астроглиальные изменения после перенесенной перинатальной гипоксии/ишемии, заключающиеся в изменении морфологии и экспрессии ряда молекул в этих клетках, а также индукции апоптоза [8]. Астроцит-эндотелиальные взаимодействия важны для поддержания целостности ГЭБ [6]. Появление в ликворе и крови GFAP свидетельствует, с одной стороны, о нарушении ГЭБ, а с другой – является маркером активации и гибели астроцитов головного мозга [4].

Fas-лиганд (FasL) представляет собой естественный лиганд Fas-рецептора, активация которого приводит к индукции в клетке апоптоза. FasL - мембранный белок типа II, который является членом семейства TNF. FasL преимущественно экспрессирован на активизированных Т-лимфоцитах клетках некоторых других тканей. Находясь в растворимой форме во внеклеточном пространстве, в том числе в биологических жидкостях, FasL является индуктором и маркером интенсивности апоптоза.

К настоящему времени имеются единичные данные о прогностической и диагностической значимости нейронспецифичных и глиоспецифичных белков в неонатологической практике [3, 4].

Целью нашего исследования стало определение диагностической значимости маркеров поражения нервной ткани в ранней диагностике и оценке степени

тяжести гипоксически-ишемического поражения головного мозга у новорожденных.

Материалы и методы

Объектом наблюдения и исследования были дети периода новорожденности, из которых в целевую группу включены 70 человек: гестационный возраст детей от 28 до 40 ($38,3 \pm 2,8$) нед., масса тела при рождении – от 1130 до 4550 (3080 ± 685) гр.; контрольную группу составили 21 ребенок: гестационный возраст от 37 до 40 ($38,8 \pm 1,6$) нед., масса тела при рождении – от 2800 до 3930 (3192 ± 440) гр. Критерии включения в целевую группу: новорожденные дети (с 2 по 20 день жизни), находившиеся в условиях стационара с диагнозом «Церебральная ишемия» разной степени тяжести. Диагностика степени тяжести производилась на основании критериев, представленных Ю.И. Барашневым [2].

Объем исследований включал анализ анамнестических данных, клиническую оценку неврологического статуса, результаты нейросонографии (УЗ сканер ALOCA 500, датчик 3,5 МГц), биохимическое исследование образцов плазмы крови с определением концентрации нейронспецифической енолазы (NSE), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и sFasL методом иммуноферментного анализа по стандартному протоколу с использованием наборов (Bender Medsystems, CanAg).

Новорожденные целевой группы были разделены на три подгруппы: I (n=3) – с легкой степенью поражения центральной нервной системы (церебральная ишемия 1 степени); II (n=57) – со среднетяжелым повреждением головного мозга (церебральная ишемия 2 степени, внутрижелудочковое кровоизлияние (ВЖК) 2 степени), III (n=10) – с тяжелым гипоксически-ишемическим поражением головного мозга (церебральная ишемия 3 степени, ВЖК 3 и 4 степени).

Статистическая обработка материала была выполнена с помощью пакета программ «Statistica» и С. Гланца «Biostatistic». Использованы: перцентильное распределение значений, вычисление среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$), медианы, минимального и максимального значений,

а также процентов, характеризующих долю детей с определенным признаком. Достоверность полученных различий в сравниваемых группах определена с помощью непараметрического критерия Стьюдента. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p \leq 0,05$). Сравнение качественных признаков проводилось с помощью построения таблиц сопряженности и вычисления критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

Средний уровень NSE у всех детей с гипоксически-ишемическим поражением головного мозга составил $9,46 \pm 7,67$ нг/мл, что в два раза превысило контрольный уровень $4,27 \pm 2,12$ нг/мл ($p < 0,01$). Максимальные значения нейронспецифической енолазы в группе детей с церебральной ишемией в 4,5 раза превысили контрольные значения (табл. 1).

Оценка уровней NSE в целевой и контрольной группах проведена методом перцентильных распределений (табл. 2). Установлено, что различия в концентрациях NSE по низким перцентильным показателям в целевой и контрольной группах отсутствуют; однако по мере роста перцентильных показателей регистрировались более высокие значения NSE. Так на уровне 50 перцентиля концентрация NSE в целевой группе в 2 раза превысила контроль и составила 7,4 нг/мл, против 3,6 нг/мл.

В последующем полученные перцентильные значения NSE у здоровых детей контрольной были использованы для сравнения с целевой группой; при этом показатели NSE контроля в интервале от 25 до 75 перцентиля расценивались как нормальные, от 75 до 90 перцентиля повышенные и соответственно выше 90 перцентиля как высокие. Указанный подход позволил установить следующее (табл. 3): среди всех детей с гипоксически – ишемическим поражением головного мозга средние значения NSE (25 - 75 перцентиль: 3,2-4,4 нг/мл) отмечены только у 7 детей ($10,0 \pm 3,59$ %), тогда как большая часть их была с церебральной ишемией – 51 ($72,9 \pm 5,31$ %), имели повышенные (4,5-7,5 нг/мл) и высокие (выше 7,5 нг/мл) значения NSE – 17 и 34 новорожденных соответственно ($p = 0,0001$). Анализ активности NSE в

плазме периферической крови у новорожденных с различной степенью тяжести церебральной ишемии показал, что из числа с церебральной ишемией 2 степени доля их с увеличенными значениями уровня NSE была достоверно больше, чем доля детей с нормальными показателями и составила 70%, против 12% ($p=0,05$). В 3 подгруппе все дети с тяжелым гипоксически-ишемическим поражением головного мозга имели высокие значения нейронспецифической енолазы в плазме крови (рис 1).

Характер повышения уровня указанного маркера повреждения нервной системы рассмотрен в целевой группе не только с позиции тяжести церебральной ишемии, но и с учетом степени нарушенного сознания на момент обследования. Установлено, что повышенные уровни NSE определяются, как правило, у детей с высокой степенью нарушения сознания (сопор и кома) (рис. 2). В целевой группе 84% новорожденных находились в сопоре, и все дети в коматозном состоянии имели значения нейронспецифической енолазы выше 75 перцентиля, т.е. более 4,4 нг/мл. Среднее значение NSE составило у новорожденных с сопорозным и коматозным нарушением сознания $16,4 \pm 11,7$ нг/мл ($p=0,0001$) и $14,8 \pm 4,7$ нг/мл ($p=0,0001$) соответственно, против $4,27 \pm 2,12$ нг/мл в контроле.

Таким образом, у детей с церебральной ишемией нарастание тяжести поражения ЦНС сопровождается прогрессирующим повреждением плазматических мембран клеток нейрональной природы и нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера, что доказано повышением уровня нейронспецифической енолазы. Подтверждением значимости данного маркера в оценке тяжести структурных и функциональных мозговых нарушений при перинатальных поражениях центральной нервной системы является установленная прямая зависимость между уровнями NSE и степенью нарушенного сознания.

Для оценки вклада повреждения астроглиальных клеток в патогенез неврологического дефицита у детей с церебральной ишемией изучены уровни глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в плазме периферической

крови. Средние значения GFAP не имели достоверных различий в рассматриваемых группах и составили $0,294 \pm 0,97$ нг/мл у детей с церебральной ишемией различной степени тяжести и $0,032 \pm 0,15$ нг/мл у здоровых новорожденных в группе контроля (табл. 1).

При перцентильном анализе полученных показателей GFAP в группе контроля установлены нулевые значения всех расчетных перцентилей (табл. 2). В целевой группе величины 75, 90 и 95 перцентилей составили 1,57 нг/мл, 0,656 нг/мл и 0,039 нг/мл, соответственно (от 50 перцентили и ниже отмечались также нулевые значения диапазонов). Расчеты показали, что среди новорожденных с церебральной ишемией нулевые значения GFAP имели 45 детей ($69 \pm \%$), положительные значения – 20 (31%) новорожденных (табл. 4).

Распределение новорожденных в зависимости от степени тяжести церебральной ишемии с учетом нормативных уровней GFAP показало отсутствие повышенных концентраций маркера повреждения астроцитов в периферической крови детей с легким поражением головного мозга, тогда как нарастание степени тяжести ишемии мозга сопровождалось достоверным ростом доли новорожденных с высокими значениями данного показателя, т.е. в группе с церебральной ишемией 3 степени численность детей с увеличенным уровнем GFAP наблюдалось 5 (55,6%), против 17 (32%) в группе с церебральной ишемией 2 степени (рис. 3).

При оценке распределения новорожденных в зависимости от степени нарушения сознания с учетом нормативных значений GFAP не установлено взаимосвязи между уровнем маркера повреждения астроцитов и выраженностью нарушенного сознания (рис 4).

Таким образом, проявлением повреждения клеток глиальной природы при церебральной ишемии в периоде новорожденности является нарастание уровня глиального фибриллярного белка (GFAP) в периферической крови, который относится к структурным компонентам дифференцированных клеток астроцитарной глии. Указанные изменения могут быть маркерами

последующей дисфункции нейронов и нарушенной секреции регуляторов нейрональной активности.

Интересно, что при определении sFasL как маркера апоптоза в плазме периферической крови, мы не обнаружили достоверного увеличения этого показателя в группе новорожденных, перенесших перинатальное гипоксическое поражение ЦНС.

Таким образом, у детей, перенесших гипоксически-ишемическое поражение головного мозга, имеет место формирование патологической проницаемости гематоэнцефалического барьера, что обуславливает нарастание уровней NSE и GFAP в периферической крови. Церебральная ишемия у новорожденных детей сопровождается повышением уровня NSE в периферической крови. Значения показателя увеличиваются по мере нарастания тяжести гипоксического поражения головного мозга и зависят от степени нарушения сознания на фоне основного заболевания (наибольшие величины NSE зарегистрированы у детей в коматозном состоянии). Значимое увеличение уровня GFAP в периферической крови отмечено у 1/3 детей с церебральной ишемией 2 степени и у более чем половины – 3 степени. Частота же выявляемости положительных значений GFAP не зависила от степени нарушения сознания. Повышение уровня маркера повреждения клеток нейрональной природы – NSE – в сыворотке крови новорожденных может служить дополнительным критерием ранней диагностики и степени тяжести гипоксического поражения головного мозга. Увеличение значений маркера повреждения клеток астроглиальной природы – GFAP в сыворотке крови новорожденных следует рассматривать как маркер тяжести церебральной ишемии.

MARKERS OF NEURON AND ASTROCYTES DAMAGE IN THE BLOOD SERUM OF NEWBORNS WITH DIFFERENT DEGREE OF CEREBRAL ISCHEMIA

I.M. Demyanova, T.E. Taranushenko, A.B. Salmina, O.S. Okuneva, A.V. Morgun,
N.A. Malinovskaya, G.A. Tagaeva, L.A. Sharoglazova, I.A. Kritskaya
Krasnoyarsk state medical academy named in honour of V.F. Vojno-Yasenetskij

Research of permeability of the hematoencephalic barrier in the blood serum of newborns with different degree of hypoxic-ischemic damage of the central nerves system (CNS) was conducted using a quantitative dynamic immune-enzyme analysis of neurospecific enolase (NSE), gliofibrillar antigen (GFAP) and sFasL. It was established that increase of the level of NSE in the blood serum can be additional criterion for early diagnosis of perinatal hypoxic-ischemic damage of CNS and for evaluation of a lesion degree. Enhancement of the maintenance of GFAP in the newborn blood serum should be considered as a marker of hypoxic-ischemic damage of CNS degree.

Литература

1. Барашнев Ю.И., Розанов А.В., Панов В.О. и др. Роль гипоксически-травматических повреждений головного мозга в формировании инвалидности с детства// Педиатрия. – 2006. – №4. – С. 41.
2. Барашнев Ю.И. Перинатальная неврология. – М.:Триада-Х, 2001. – 640с.
3. Рогаткин С.О., Блинов Д.В., Володин Н.Н. и др. Перспективы применения иммуноферментного анализа нейроспецифических антигенов в перинатальной неврологии (клинико-экспериментальное исследование) // Вопр. гинекол., акуш. и перинатологии. – 2003. – № 2 (4). – С. 8-15.
4. Чехонин В.П., Лебедев С.В., Блинов Д.В. и др. Патогенетическая роль нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера для нейроспецифических белков при перинатальных гипоксически-ишемических поражениях центральной нервной системы у новорожденных // Вопр. гинекол., акуш. и перинатологии. – 2004. – Т.3. – С. 50-61.

5. Янушанец Н.С. Анализ уровня и структуры детской инвалидности вследствие заболеваний нервной системы в Санкт-Петербург // Рос. вестн. перинатол. и педиатрии. – 2006. – №4. – С. 53-55.
6. Abbot N.J, Ronnback L., and Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier // Nature Reviews. Neuroscience. – 2006. – Vol.7. – P. 41-53.
7. Hatton G.I. Glial-neuronal interactions in the mammalian brain // Adv. Physiol. Edu. – 2002. – Vol.26. – P. 225-237.
8. Magistretti P.J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity // J. Exper. Biol. – 2006. – Vol. 209. – P. 2304-2311.

Таблица 1.

Уровни NSE и GFAP (нг/мл) в периферической крови новорожденных

Показатели нейронспецифической енолазы в группах (нг/мл)		
	Целевая (n=70)	Контрольная (n=21)
M±σ	9,46±7,67**	4,27±2,12
Медиана	7,4	3,6
Макс-мин.	42,6 – 1,3	9,4 - 2
Глиальный фибриллярный кислый белок (нг/мл)		
	Целевая (n=65)	Контрольная (n=21)
M±σ	0,294±0,97	0,032±0,15
Медиана	0	0
Макс-мин.	0 – 6,38	0 – 0,675

$P=0,003$ ** (критерий Стьюдента) в сравнении с контролем.

Таблица 2.

**Перцентильное распределение значений концентраций NSE и GFAP
в периферической крови новорожденных**

Группы новорожденных	Показатели нейронспецифической енолазы в группах (нг/мл)						
	Перцентили						
	5	10	25	50	75	90	95
Целевая	1,89	2,69	4,33	7,4	11,75	18,22	22,74
Контрольная	2,1	2,2	3,2	3,6	4,4	7,5	8,7
	Глиальный фибриллярный кислый белок (нг/мл)						
	Перцентили						
	5	10	25	50	75	90	95
Целевая	0	0	0	0	0,039	0,656	1,57
Контрольная	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 3.

**Распределение детей с церебральной ишемией
с учетом заданных интервальных значений NSE (нг/мл)**

Подгруппы	Интервальные значения	Распределение новорожденных	
		n	%± m
1	Менее 3,2 нг/мл	12	17,1±4,5
2	3,2 - 4,4 нг/мл	7	10,0±3,59
3	Более 4,4 нг/мл	51	72,9±5,31***

$P=0,0001$ *** (критерий Стьюдента) сравнение средних значений со 2 подгруппой.

Таблица 4.

**Распределение детей с церебральной ишемией с учетом заданных
интервальных значений GFAP (нг/мл)**

Подгруппы	Значения GFAP, нг/мл	Распределение новорожденных	
		n	%± m
1	0	45	69,23±5,7***
2	Выше 0	20	30,77±5,7

$p=0,0001$ *** (критерий Стьюдента) сравнение между подгруппами.

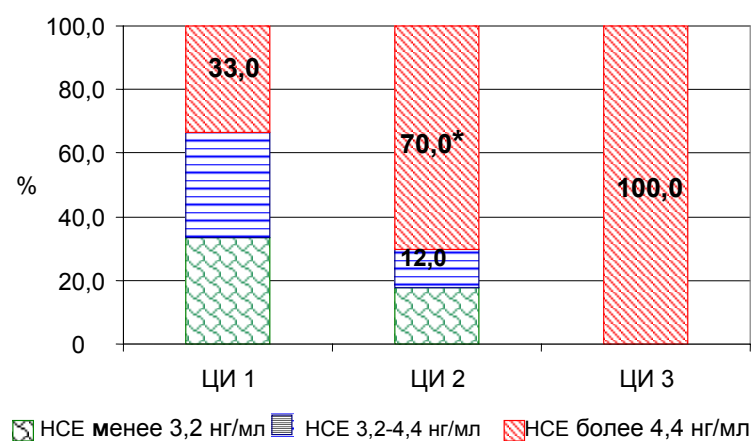


Рис. 1. Распределение детей при разной степени тяжести церебральной ишемии (ЦИ) с учетом значений NSE в периферической крови.

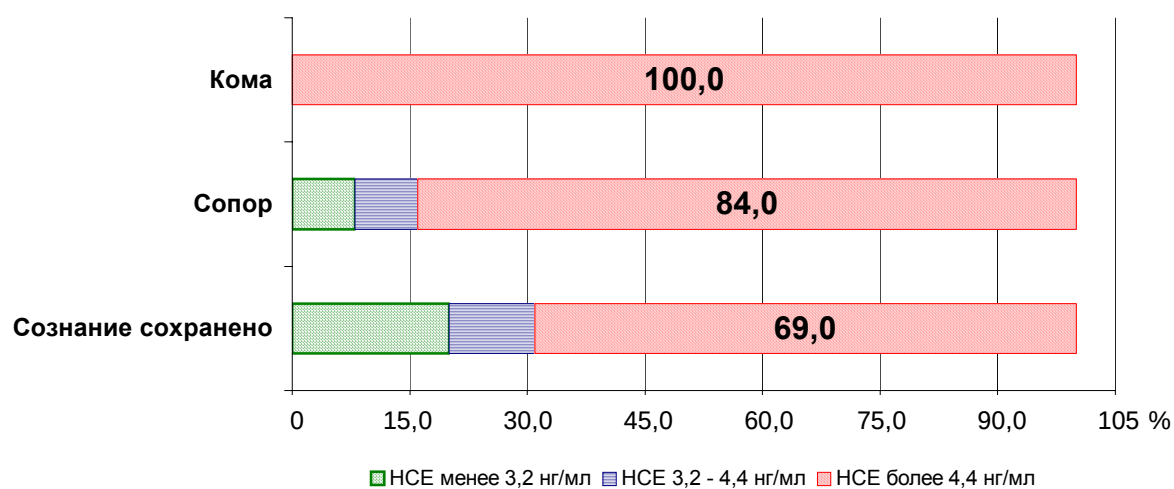


Рис.2. Распределение детей при разной степени нарушения сознания с учетом значений NSE в периферической крови.

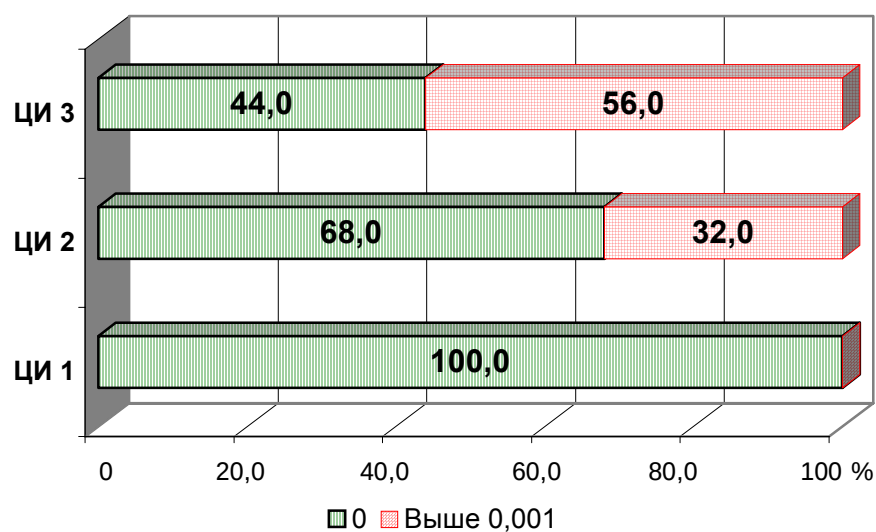


Рис. 3. Распределение детей с разной степенью тяжести церебральной ишемии (ЦИ) с учетом значений GFAP в периферической крови.

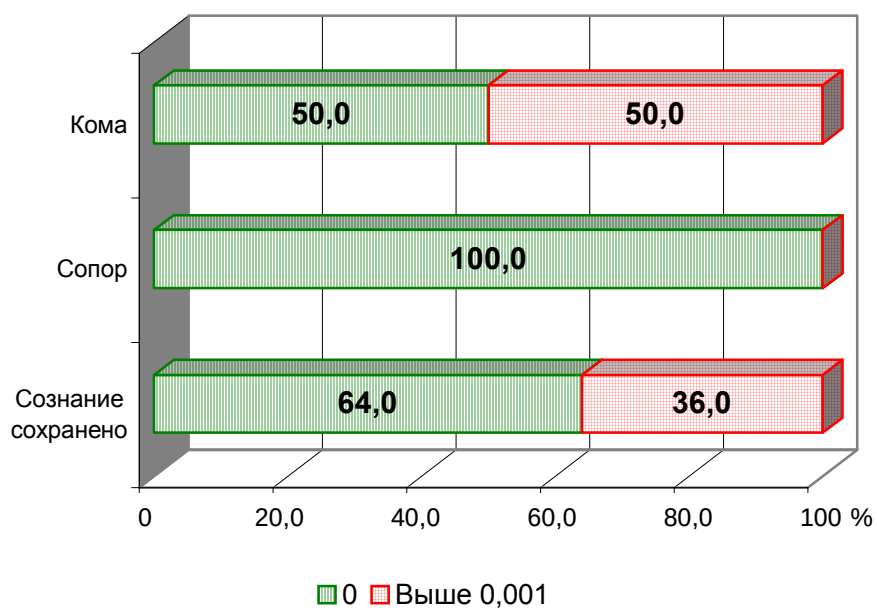


Рис. 4. Распределение детей с разной степенью нарушения сознания с учетом значений GFAP в периферической крови.