

НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

ГБУ СО «Сысертьская центральная районная больница», г. Сысерть, Свердловская обл., Российская Федерация

Резюме. В работе приведены результаты обследования здоровых детей и пациентов с гипоксически-ишемическим повреждением ЦНС в возрасте до 1 года. У них определяли уровень нейротрофических факторов в крови методом ИФА. Выявлено повышение активности нейронспецифической енолазы (NSE), снижение содержания нейротрофического фактора мозга (BDNF) и фактора роста нервов (b-NGF) в сыворотке у детей раннего возраста с энцефалопатией. Эти лабораторные параметры характеризуются при данной патологии разнонаправленными сдвигами. ROC-анализ позволил установить диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность для NSE — 56% и 85% соответственно, а для BDNF — 91% и 46% соответственно. Уровень фактора роста нервов не обладал сколько-нибудь значимой диагностической эффективностью. Корреляционный анализ не позволил выявить связи между состоянием новорожденного при родах по шкале Апгар и уровнем нейротрофических факторов ($r < 0,3$, $p > 0,05$).

Ключевые слова: нейротрофические факторы, гипоксически-ишемическая энцефалопатия

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия рассматривается как сложный патологический процесс, в понимании механизмов патогенеза которого до сих пор существуют пробелы, а лечебно-диагностические технологии не достаточно эффективны. В значительной степени это связано с тем, что в современной клинической практике отсутствуют бесспорно значимые и адекватно определяемые лабораторные критерии нейронального повреждения, которые коррелировали бы с тяжестью заболевания и прогнозом поражения ЦНС, как это показано для электроэнцефалограммы и магнитно-резонансной томографии, диагностическая чувствительность (ДЧ) и диагностическая специфичность (ДС) которых составляет 89–98% [1, 2].

К числу потенциальных лабораторных маркеров диагностики и мониторинга перинатального повреждения ЦНС относят, в частности, глиальный кислый фибриллярный белок — ключевой белок скелета, специфичный для астроцитов; нейронспецифическую енолазу (NSE) и некоторые другие. Особый интерес в последние годы вызывает изучение нейротрофических факторов, представителем которых являются нейротрофический фактор мозга (BDNF — brain-derived neurotrophic factor) и фактор роста нервов (NGF). Это полифункциональные молекулы, участвующие в регуляции роста и дифференцировки нервной ткани, они обладают антиапоптотическим и другими эффектами, обеспечивающими пластичность нервной ткани и восстановительные процессы в ней [3, 4, 5, 6], но их диагностическая эффективность недостаточно оценена.

Учитывая высокую частоту перинатальной патологии ЦНС у детей и отсутствие лабораторных алгоритмов ее мониторинга, нами была сформулирована цель данной работы — определение клинико-диагностической информативности сывороточных биомаркеров повреждения нервной ткани при гипоксически-ишемическом повреждении ЦНС у детей раннего возраста.

Материалы и методы

Работа основана на анализе клинико-лабораторных данных 140 детей в возрасте от 1 месяца до 1 года. Основную группу (100 человек) составили дети с установленным диагнозом — перинатальное поражение центральной нервной системы средне-тяжелой и тяжелой степени. Диагностика и оценка степени тяжести перинатального поражения ЦНС осуществлялась в соответствии с общепринятыми клинико-инструментальными критериями гипоксических и геморрагических последствий перинатальных поражений нервной системы у детей первого года жизни. Контрольная

группа представлена 46 здоровыми младенцами, сопоставимыми с основной группой по полу, возрасту, массе при рождении, возрасту матери с детьми основной группы.

Комплекс лабораторного обследования включал определение в сыворотке детей уровня b-NGF (RayBiotech, Inc), BDNF (R&D Systems) методом твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа. Учет результата реакции проводили на вертикальном планшеточном фотометре Multiscan Ascent 354 (Финляндия).

Определение активности нейронспецифической енолазы (NSE) выполняли на автоматическом анализаторе ModularAnalytics E170 (Roche) с использованием оригинальных тест-систем и контрольных материалов.

Статистическая обработка результатов проведена на основе методов вариационной статистики с использованием программы Statistica 6.0. Для сравнительного анализа количественных признаков использовали критерий Манна-Уитни. Корреляционные связи определяли с помощью коэффициента Спирмена.

Для оценки диагностической эффективности измеряемых параметров использовали ROC-анализ, который заключается в построении кривой зависимости специфичности и чувствительности теста, а площадь под кривой (AUC) является интегральной характеристикой диагностической ценности теста. С этой целью использована надстройка AtteStat для офисной программы Excel.

Результаты

Клинически дети основной группы были практически здоровы. У 100% обследованных в основной группе выявлены различные неврологические отклонения, прежде всего — двигательные нарушения (пирамидная недостаточность, миотонический синдром, парез/паралич центрального и периферического характера), гипертензионно-гидроцефальный синдром и вегето-висцеральная дисфункция. У всех детей была выполнена нейросонография (НСГ), при которой установлено отсутствие изменений в НСГ-картине у здоровых детей в 100% случаев. У младенцев основной группы выявлены кисты в перивентрикулярной зоне, умеренное расширение субарахноидальных пространств. Следовательно, результаты клинико-инструментального исследования указывают на наличие признаков перинатального повреждения ЦНС у детей основной группы. Позже (в течение года наблюдения) у них была отмечена задержка психомоторного развития в 64 % ($p < 0,001$), в то время как в группе сравнения не выявлено отклонений в неврологическом статусе и психомоторном развитии.

Основная задача данного исследования заключалась в определении уровня нейротрофических факторов у детей обеих групп (таблица 1). Активность NSE при гипоксически-ишемическом поражении ЦНС была существенно повышена, что характерно для данной патологии [1, 7]. Содержание BDNF и NGF у больных детей было снижено на 39% и 32 % соответственно ($p < 0,05$).

Таблица 1

Содержание некоторых сывороточных биомаркеров в крови детей при гипоксически-ишемической энцефалопатии

Показатели (пкг/мл)	Основная группа	Контрольная Группа
BDNF	914,9 ± 63,2 P = 0,003	1498,3 ± 131,2
b-NGF	130,0 ± 13,8 P = 0,039	192,5 ± 20,7
NSE	40,0 ± 2,0 P = 0,001	27,6 ± 1,5

Следовательно, перинатальное повреждение ЦНС при гипоксически-ишемическом повреждении сопровождалось повышением уровня нейронспецифической енолазы и одновременно снижалось содержание нейротрофических факторов роста.

Не все изученные биомаркеры обладали одинаковой диагностической эффективностью, о чем свидетельствуют величи-

ны ДЧ, ДС, показатель AUC (таблица 2). Наиболее высокая ДЧ при гипоксически-ишемической энцефалопатии определена для BDNF — 91%, а ДС — для NSE (85%). То есть, наиболее чувствительным тестом в диагностике гипоксически-ишемической энцефалопатии оказался BDNF (но его специфичность очень низка), наиболее специфичным — NSE.

Таблица 2
Диагностическая информативность сывороточных биомаркеров при гипоксически-ишемической энцефалопатии

Показатели	ДЧ %	ДС %	AUC
BDNF	91	46	0,70
b-NGF	57	72	0,64
NSE	56	85	0,70

При этом следует отметить, что диагностическая эффективность каждого из представленных тестов составляет всего 70%, что несколько ниже представленных в литературе диагностических инструментальных методов нейровизуализации [1, 2]. Диагностическая эффективность показателя фактор роста нервов оказалась достаточно низкой.

Для определения взаимосвязи клинических и лабораторных данных проведен корреляционный анализ между уровнем нейротрофических факторов и состоянием ребенка при рождении, оцененном в баллах по шкале Апгар. Такой методический подход не позволил выявить связей между состоянием ребенка при родах по шкале Апгар и уровнем нейротрофических факторов ($r < 0,3$, $p > 0,05$).

NSE, BDNF и b-NGF в литературе рассматриваются как потенциальные биомаркеры повреждения ЦНС. В частности, изменения их уровня в ликворе показано при травматическом повреждении мозга, при целом ряде неврологических и психиатрических заболеваний [8, 9, 6]. Этим определяется интерес исследователей к оценке возможности их применения в клинической практике.

Диагностика гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных и детей раннего возраста остается одной из проблемных задач неонатологии. В данной работе нами определены изменения уровня вышеперечисленных сывороточных биомаркеров у детей. Установленные изменения могут в определенной степени объяснить нарушения процессов формирования определенных структур ЦНС, течение восстановительных процессов в нервной ткани в ответ на ее гипоксическое повреждение. Соглашаясь с существенным вкладом нейротрофических факторов в механизмы патогенеза, мы не обнаружили их значительной диагностической эффективности. Поэтому общепризнанный комплексный подход к установлению данного диагноза с применением современных методов нейровизуализации остается актуальным.

Заключение. Перинатальное поражение ЦНС гипоксически-ишемической природы характеризуется повышением уровня NSE, снижением содержания BDNF и NGF в крови у детей раннего возраста. Однако, невысокая чувствительность теста на NSE, низкая специфичность BDNF и низкая диагностическая эффективность показателя фактора роста нервов не позволяют рекомендовать их в качестве обязательных тестов. Мы полагаем, что оценка информации о лабораторных биомаркерах перинатального повреждения ЦНС требует дальнейшего анализа.

ЛИТЕРАТУРА

- Massaro A.N., Jeromin A., Kadom N., Vezina G., Hayes R.L., Wang K.K. et al. Serum biomarkers of MRI brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy treated with whole-body hypothermia: a pilot study. *Pediatr Crit Care Med.* 2013; 14(3):310-317.
- van Laerhoven H., de Haan T.R., Offringa M., Post B., van der Lee J.H. Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *Pediatrics.* 2013; 131(1):88-98.
- Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 220:3-15.
- Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., Gass P., Riva M.A., Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:430.
- Lu B., Nagappan G., Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;

220: 223-250.

- Martinez-Levy G.A., Cruz-Fuentes C.S. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med.* 2014; 87(2):173-186.
- Sun J., Li J., Cheng G., Sha B., Zhou W. Effects of hypothermia on NSE and S-100 protein levels in CSF in neonates following hypoxic/ischaemic brain damage. *Acta Paediatr.* 2012; 101(8):316-320.
- Chalak L.F., Sánchez P., Adams-Huet B., Laptook A.R., Heyne R.J., Rosenfeld C.R. Biomarkers for Severity of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Outcomes in Newborns Receiving Hypothermia Therapy. *J Pediatr.* Mar 2014; 164(3): 468-474.
- Huang T.L., Lin C.C. Advances in biomarkers of major depressive disorder. *Adv Clin Chem.* 2015; 68:177-204.

Авторская справка

Базарный Владимир Викторович
Уральский государственный медицинский университет
Доктор медицинских наук, профессор
620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3
Vlad-bazarny@yandex.ru

Вольхина Светлана Алексеевна
Заместитель главного врача
ГБУ СО «Сысертская центральная районная больница»,
624022, Сысерть, ул. Коммуны, 71
volhina-crb@mail.ru

Михайлова Евгения Юрьевна
Уральский государственный медицинский университет
Аспирант
620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3
e-nuevo@mail.ru

Bazarnyi V.V., Volkhina S. A., Mikhaylova E. Yu. **THE SERUM BIOMARKERS IN DIAGNOSTICS OF HYPOXIC-ISCHEMIC LESION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM AT CHILDREN**

Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;
Sysert central district hospital,
Sysert, Sverdlovsk region, Russian Federation

Abstract. Diagnosis of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn remains an urgent problem of neonatology. In this paper we examined the health children and patients with hypoxic-ischemic encephalopathy. The levels of neurotrophic factors in serum by ELISA were tested. The increase of the neuron-specific enolase (NSE) activity and the reduction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) concentration in the blood of young patients were determined. These laboratory parameters are characterized in this pathology multidirectional shifts. The ROC-analysis has allowed to establish the diagnostic sensitivity and diagnostic specificity for NSE — 56% and 85% respectively, and for BDNF — 91% and 46%, respectively. The level of nerve growth factor did not possess any significant diagnostic efficiency. Correlation analysis revealed no links between the state of the newborn at Apgar score and the level of neurotrophic factors ($r < 0,3$, $p > 0,05$).

Keywords: neurotrophic factors, hypoxic-ischemic encephalopathy

REFERENCES

- Massaro A.N., Jeromin A., Kadom N., Vezina G., Hayes R.L., Wang K.K. et al. Serum biomarkers of MRI brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy treated with whole-body hypothermia: a pilot study. *Pediatr Crit Care Med.* 2013; 14(3):310-317.
- van Laerhoven H., de Haan T.R., Offringa M., Post B., van der Lee J.H. Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *Pediatrics.* 2013; 131(1):88-98.
- Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 220:3-15.

4. Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., Gass P., Riva M.A., Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:430.

5. Lu B., Nagappan G., Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 220: 223-250

6. Martínez-Levy G.A., Cruz-Fuentes C.S. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med.* 2014; 87(2):173-186.

7. Sun J., Li J., Cheng G., Sha B., Zhou W. Effects of hypothermia on NSE and S-100 protein levels in CSF in neonates following hypoxic/ischaemic brain damage. *Acta Paediatr.* 2012; 101(8):316-320.

8. Chalak L.F., Sánchez P., Adams-Huet B., Laptook A.R., Heyne R.J., Rosenfeld C.R. Biomarkers for Severity of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Outcomes in Newborns Receiving Hypothermia Therapy. *J Pediatr.* Mar 2014; 164(3): 468-474.

9. Huang T.L., Lin C.C. Advances in biomarkers of major depressive disorder. *Adv Clin Chem.* 2015; 68:177-204.

Authors

Bazarnyi Vladimir V.
Ural State Medical University of the Russian Ministry of Health
Professor, PhD
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3
vlad-bazarnyi@yandex.ru

Volkhina Svetlana A.
Sysert central district hospital
MD, deputy chief doctor
Russian Federation, 624022, Sysert, Communny str., 71
volhina-crbb@mail.ru

Mikhaylova Eugenia Y.
Ural State Medical University of the Russian Ministry of Health
Postdoctoral Student
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3
e-nuevo@mail.ru

УДК 616.36-089.87-005.1-008:616.127

Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О.

ИЗМЕНЕНИЕ АГРЕГАТНОГО СОСТОЯНИЯ КРОВИ В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМОЙ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Российская Федерация

Резюме. В эксперименте на 64 беспородных крысах-самцах была проведена оценка параметров системы регуляции агрегатного состояния крови в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени. Интегративную оценку гемостатического потенциала в различные сроки после операции проводили методом низкочастотной пьезотромбоэластографии цельной крови из хвостовой вены. Изменения гемостатического потенциала в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени носили стадийный характер. Была выявлена стадия гиперкоагуляции — через 1 и 3 часа после операции; стадия нарастающей гипокоагуляции с истощением антикоагулянтной системы — через 6 часов после операции; стадия гипокоагуляции с гиперактивацией фибринолиза — через 12 часов и 1 сутки после операции; стадия нормокоагуляции (восстановления) — на 3-и и 7-е сутки после операции. Таким образом, выявленный паттерн гемостаза послеоперационного периода является предиктором синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Учитывая наличие блокады микроциркуляции, данные изменения агрегатного состояния крови являются одним из патогенетических факторов повреждения миокарда с последующим формированием синдрома малого сердечного выброса в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени.

Ключевые слова: миокард, гемостаз, предельно допустимая резекция печени, гиперкоагуляция, гипокоагуляция

Введение

В ранее проведенных нами исследованиях было выявлено развитие ишемии миокарда с последующим формированием синдрома низкого сердечного выброса в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени у крыс [1, 2]. Известно, что поддержание адекватной тканевой перфузии и метаболизма на должном уровне зависит не только от параметров системной гемодинамики, но и от функционального состояния микроциркуляторного русла и реологических свойств крови [3]. В связи с этим, представляется актуальной следующая цель исследования: оценить изменение агрегатного состояния крови в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени в эксперименте и определить вклад реологических нарушений в формирование недостаточности кровообращения.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 64 сертифицированных беспородных белых крысах-самцах массой 272±24 г, выращенных в

виварии Омской государственной медицинской академии, с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение №5 к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») и согласно положительному заключению Этического комитета ОмГМА. Объем выборки для получения достоверных результатов, рассчитанный по формуле F. Lopez-Jimenez и соавт. [4], составил 8 животных. Крыс наркотизировали диэтиловым эфиром (ОАО «Медхимпром», Россия). У 56 животных проводили атипичную предельно допустимую резекцию 80% массы печени. Контрольную группу составили 8 наркотизированных, неоперированных крыс.

Интегративную оценку функционального состояния гемостаза в различные сроки после операции проводили методом низкочастотной пьезотромбоэластографии цельной крови на аппаратно-программном комплексе АРП-01М «Меднорд» (Россия). Забор крови объемом 0,5 мл осуществляли из хвостовой вены непосредственно в кювету прибора, прогретую до 37°C. Исследование крови проводили *ex tempore*. Расчет параметров исследования производили с помощью специализированной компьютерной программы ИКС «ГЕМО-3».

Определение гемостатического потенциала включало оценку следующих параметров [5]:

- агрегационной активности тромбоцитов и других форменных элементов крови: t_1 — время реакции; ИКК – интенсивность контактной коагуляции,
- тромбиновой активности: КТА — константа тромбиновой активности; ИКД — интенсивность коагуляционного драйва,
- ИПС — интенсивности полимеризации сгустка,
- времени свертывания крови — t_3 ,
- МА — максимальной амплитуды сгустка,
- времени формирования фибрин-тромбоцитарного сгустка — t_5 ,
- КСПА — коэффициента суммарной противосвертывающей активности,
- ИРЛС — интенсивности ретракции и лизиса сгустка.

Также рассчитывали интегральный индекс тромбоэластографии (ИИТ), который позволяет дифференцировать гипо- и гиперкоагуляционные процессы [6]. Объем кровопотери рассчитывали гравиметрическим методом [7]. Восполнение объема циркулирующей крови (ОЦК) в интра- и послеоперационном периоде не проводили.