

## МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ — В ПРАКТИКУ

© Голосная Г.С., 2004

Г.С. Голосная

### РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ АПОПТОЗА В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ ИСХОДОВ ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У НОВОРОЖДЕННЫХ

Кафедра нервных болезней педиатрического факультета (зав. проф. А.С. Петрухин)  
РГМУ, ГКБ № 7 (главный врач В.А. Афанасьев), Москва

Целью работы было изучение сывороточной концентрации ингибиторов апоптоза — нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF), а также проапоптотического фактора («рецептор смерти» — DR5) у новорожденных с перинатальным гипоксическим поражением ЦНС для исследования их роли в патогенезе постгипоксических изменений и возможности использования результатов в диагностике и прогнозировании. Обследовано 75 новорожденных. Дети были разделены на 4 группы в соответствии с изменениями на нейросонографии (НСГ): 1-я группа — 30 новорожденных, у которых на НСГ не отмечалось структурных изменений; 2-я группа — 15 детей с перивентрикулярной лейкомаляцией; 3-я группа — 15 детей с внутрижелудочковыми кровоизлияниями; 4-я группа — 15 детей с сочетанием внутрижелудочкового кровоизлияния и перивентрикулярной лейкомаляции. Определение сывороточной концентрации BDNF проводили в первые 48 ч и на 3—5-е сутки жизни; уровень VEGF измеряли в первые 48 ч, на 7-е и 28-е сутки жизни. Определение сывороточного уровня DR5 проводили однократно в возрасте 24—48 ч жизни, когда регистрируется максимальное количество апоптотических клеток. Выявлено повышение сывороточного уровня DR5 у всех обследованных новорожденных. Уровень BDNF и VEGF был значительно снижен у новорожденных 2-й и 4-й групп. Изучение нейротрофинов, факторов роста и маркеров апоптоза открывает дополнительные возможности для исследования постгипоксических изменений и восстановительных процессов ЦНС.

Authors examined serum concentration of apoptosis inhibitors in neonates with perinatal hypoxic CNS lesion in order to study their role in pathogenesis of posthypoxic changes and possible usage of these results in diagnosis and prognosis of posthypoxic lesions. Next inhibitors were determined in 75 neonates — brain neurotrophic factor (BDNF) and vasculoendothelial growth factor (VEGF), and also «death receptor» (DR5) as apoptosis promoter. Patients were divided on 4 groups according to neurosonographic (NSG) data: 1<sup>st</sup> group — 30 patients without NSG changes; 2<sup>nd</sup> group — 15 patients with periventricular leukomalation; 3<sup>rd</sup> group — 15 patients with intraventricular hemorrhage and 4<sup>th</sup> — 15 patients with combination of intraventricular hemorrhage and periventricular leukomalation. Serum BDNF concentration was determined in first 48 hours of life and in 3—5 day of life, VEGF concentration — in first 48 hours of life and in 7 and 28 day of life. Serum DR5 was determined once in 24—48 hours of life, then the number of apoptosis cells was maximal. Serum DR5 concentration was increased in all neonates. BDNF and VEGF level was significantly decreased in patients of 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> groups. Study of neurotrophines, growth factors and apoptosis markers give more possibilities to investigate posthypoxic changes and reparative processes in central nervous system.

В настоящее время успехи неонатологии значительно повысили возможности выхаживания глубоко недоношенных детей и сократили уровень летальности, в то же время проблема ранней диагностики и определения прогноза состояния у детей группы риска по развитию тяжелых гипоксических пора-

жений ЦНС приобрела еще большую актуальность. Изучение процессов, происходящих в ткани мозга при гипоксии-ишемии, с помощью иммуноферментных методов исследования позволило получить новые данные об изменениях в клетках на молекулярном уровне, что способствовало расширению возмож-

ности раннего обнаружения церебральных нарушений. Но современный уровень знаний о механизмах гипоксического повреждения мозга у новорожденных еще недостаточен для понимания всех аспектов патогенеза постгипоксических изменений. Есть мнение, что при тяжелых гипоксически-ишемических поражениях ЦНС развивается некроз клеток, при поражениях меньшей тяжести смерть клеток происходит по типу апоптоза [1, 2].

К наименее изученным вопросам, несмотря на их актуальность, относится роль проапоптотических, нейротрофических и ростовых факторов в нарушении функций ЦНС в перинатальном периоде.

Механизмы апоптоза включаются позже быстрых реакций некротических каскадов и принимают участие в «доформировывании» очагов повреждения [3]. Хорошо известно, что гипоксия инициирует запуск целого каскада патологических процессов, развитие которых в течение определенного промежутка времени приводит к гибели нервных клеток. Некоторые из этих процессов становятся причинами быстрого некроза клетки (нарушение ионных соотношений, внутриклеточный отек с последующим лизисом), другие — ведут к усилению апоптоза. К числу индукторов апоптоза можно отнести активацию фагоцитарных реакций, изменения в системе нейромодуляторов — накопление возбуждающих аминокислот (например, глутаминовой кислоты), активацию свободнорадикальных реакций. Каскад апоптотических процессов может быть спровоцирован либо прямым действием на геном клетки (вирусы), либо через нейромедиаторы (глутамат), либо причинами, связанными с ишемией клетки, ее физическим повреждением, реперфузией, токсическим воздействием [4].

Основными «фигурантами» эффекторной фазы апоптоза («демонтаж» клеточных структур) являются цистеиновые протеазы (каспазы). Они расщепляют белки, являющиеся мишенями для их действия. Каспазы-индукторы при обычном состоянии клетки неактивны и существуют в форме прокаспаз. Поэтому действие разнообразных проапоптотических сигналов направлено на их активацию. В частности, проапоптотические сигналы, возникающие при активации рецепторов «региона клеточной смерти» (например, FasR, TNFR) — активация каспазы-8 [5—7]. «Рецепторы смерти» содержат цитоплазматические домены смерти DD (death domain), которые, связываясь с лигандом смерти, привлекают адапторные белки, содержащие домены DD и домен исполнителя смерти — DED (death effector domain). Взаимодействие DED доменов адаптора и прокаспазы приводит к аутопротеолитической активации и включению каспазного каскада. Одновременно индуцируется образование эндогенных нейропротекторов (BDNF, NGF) и формируются восстановительные механизмы [8, 9]. Торможение апоптоза в результате нарушений его эффекторных механизмов и путей передачи проапоптоти-

ческих сигналов является малоизученной, но не менее важной проблемой. Существенную роль в ингибировании апоптоза играют трофические и ростовые факторы [10—12].

Нейротрофины — регуляторные белки нервной ткани, которые синтезируются в нейронах и глии, и оказывают наиболее сильное трофическое влияние на все основные процессы жизнедеятельности нейронов. Наиболее изучены 3 нейротрофина, сходных по структуре: фактор роста нервов (NGF), фактор роста, выделенный из головного мозга (BDNF), и нейротрофин-3 (NT-3). BDNF экспрессируется на фибробластах, астроцитах, нейронах различного фенотипа и локализации, мегакариocyтах/тромбоцитах, шванновских клетках (в районах повреждения) и, возможно, на клетках гладкой мускулатуры. BDNF в плазме обнаруживается в количествах порядка нг/мл, разница обуславливается высвобождением BDNF при дегрануляции тромбоцитов и свертывании крови. Считается, что BDNF реализует свое действие как непосредственно, так и через генетические механизмы торможения апоптоза [13].

Ростовые факторы относятся к наиболее серьезным физиологическим ингибиторам запрограммированной гибели клеток. Они снижают концентрацию эффекторов апоптоза или их активность до безопасного уровня, активируют антиапоптотические факторы (например, такие, как ген Bcl2 и др.). При гипоксии или в условиях повреждения тканей происходит активация роста сосудов, в которой эндотелий принимает самое непосредственное участие [14, 15].

Васкулоэндотелиальный ростовой фактор (VEGF) — основной индуктор ангиогенеза. VEGF продуцируется клетками, находящимися в тесной близости к эндотелиальным клеткам, такими как миокард, во время активного ангиогенеза капилляров, во время развития и неонатального роста. VEGF индуцирует плеiotропные реакции, позволяющие эндотелиальным клеткам пролиферировать, мигрировать, собираться в трубки и формировать связанную сеть (морфоген), выживать и усиливать свою проницаемость. Экспрессия VEGF регулируется гипоксией. Процесс ангиогенеза является необходимым для длительной адаптации тканей в условиях повреждения. При этом происходит частичное поступление факторов роста в кровь, что имеет диагностическое значение.

Совместное исследование нейроспецифических белков, факторов роста и маркеров апоптоза, возможно, позволит использовать этот комплекс лабораторных методов для диагностики и прогнозирования исходов гипоксически-ишемического поражения ЦНС у новорожденных.

Целью работы было изучение сывороточной концентрации нейротропного фактора роста нервов (BDNF), васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и проапоптотического фактора («рецептор смерти» — DR5) у новорожденных с перинатальным гипоксическим поражением ЦНС.

### Материалы и методы исследования

Под нашим наблюдением находилось 75 детей с гестационным возрастом от 25 до 42 нед, массой тела при рождении от 890 г до 4630 г. Мальчиков было 44, девочек — 31. Дети были разделены на 4 группы в соответствии с изменениями на нейросонографии (НСГ): 1-я группа — 30 новорожденных, у которых на НСГ отмечалось повышение перивентрикулярной эхогенности — от умеренной до выраженной; 2-я группа — 15 новорожденных с перивентрикулярной лейкомаляцией (ПВЛ); 3-я группа — 15 новорожденных с внутрижелудочковыми кровоизлияниями (ВЖК); 4-я группа — 15 новорожденных с сочетанием ВЖК и ПВЛ.

Контрольная группа (20 новорожденных) была представлена 10 здоровыми доношенными детьми, а также 10 недоношенными детьми без поражения ЦНС.

Взятие проб крови у детей контрольной группы осуществляли при проведении необходимых анализов в стационаре по показаниям (биохимические анализы, общий анализ крови).

Все дети 1-й, 2-й, 3-й и 4-й групп родились от матерей с отягощенным течением беременности и родов. Оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни составила 1—4 балла у 35 детей, 5—7 баллов — у 29, 7—8 баллов — у 11 детей. Все новорожденные имели признаки тяжелого перинатального гипоксического поражения ЦНС, которое было диагностировано на основании данных анамнеза, оценки динамики неврологического статуса и НСГ. Основными клиническими проявлениями были угнетение ЦНС (68 новорожденных), судороги (25 детей), кома (4 ребенка). Тяжесть состояния детей была обусловлена комплексом различных патологических процессов: внутриутробная пневмония, синдром дыхательных расстройств, гемолитическая болезнь, нарушение водно-электролитного баланса. Наличие и тяжесть дыхательной недостаточности обусловили необходимость проведения ИВЛ с первых часов жизни у 77,3% детей (58 новорожденных), причем у половины из них в первые 5 минут жизни. Перевод в отделение реанимации и интенсивной терапии осуществляли на 1—3-е сутки жизни. Длительность ИВЛ составила в среднем 7, максимально — 32 суток.

Пробы крови для определения сывороточной концентрации BDNF были получены при поступлении в отделение реанимации в первые 48 ч и на 3—5-е сутки жизни; для определения VEGF — в первые 48 ч; на 7-е и 28-е сутки жизни. Определение сывороточного уровня DR5 проводили однократно в возрасте 24—48 ч жизни, когда регистрируется максимальное количество апоптотных клеток. Полученную сыворотку в объеме 0,5 мл замораживали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 2 месяцев. Определение содержания белков проводили твердофазным иммуноферментным методом. Принцип тест-систем для определения белков основан на количественном ИФА сэндвичевого типа. Для BDNF использовали реактивы фирмы R&D (Англия), сывороточный уровень VEGF и DR5 исследовали с помощью тест-систем фирмы Biosource (Бельгия). Нормальные значения BDNF составили 1,0—3,9 нг/мл; VEGF — 122—400 нг/мл; DR5 — 1,24—8,67 нг/мл.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistika 5. Для оценки достоверности различий между группами использовали тест множественного сравнения средних ANOVA, с последующим сравнением групп по методу Манна — Уитни. В каждой группе данные сравнивали между собой по методу Вилкоксона. Корреляционную зависимость вычисляли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ).

### Результаты и их обсуждение

При изучении динамики сывороточной концентрации BDNF, VEGF и DR5 у новорожденных с гипоксическим поражением ЦНС нами были получены следующие результаты.

Анализируя сывороточный уровень BDNF, мы выявили тенденцию к повышению показателей антигена первой пробы у детей без структурных изменений на НСГ (в 1,5—2 раза), что в среднем составило  $5,59 \pm 3,16$  нг/мл. При развитии ВЖК (3-я группа) концентрация нейротрофина возрастала до 4 раз ( $10,9 \pm 11,77$  нг/мл). У новорожденных с тяжелым ишемическим поражением (ПВЛ) и сочетанным (ПВЛ+ВЖК) средние значения BDNF существенно снижались и практически были равны между собой:  $0,53 \pm 0,42$  нг/мл и  $0,47 \pm 0,64$  нг/мл соответственно.

При изучении динамики значений второй пробы — на 3—5-е сутки жизни — у новорожденных без структурных изменений головного мозга концентрация нейротрофина имела тенденцию к уменьшению.

У детей с гипоксически-геморрагическим поражением ЦНС (ВЖК) концентрация антигена достоверно снижалась (в среднем на 50%), составляя  $6,14 \pm 5,5$  нг/мл, но оставалась увеличенной по сравнению с верхней границей нормы более чем в 2 раза ( $p < 0,01$ ). У детей с ишемическими структурными нарушениями ЦНС (ПВЛ) и сочетанной формой поражения (ПВЛ+ВЖК) сывороточный уровень BDNF увеличивался по сравнению с исходными данными в 4—5 раз ( $2,28 \pm 1,96$  нг/мл) и в среднем становился равным норме ( $p < 0,01$ ). Данные представлены в табл. 1.

Сывороточная концентрация VEGF во всех исследуемых группах характеризовалась значительной разницей между минимальными и максимальными значениями, особенно в группах новорожденных со структурными изменениями головного мозга на НСГ. Сравнивая средние значения показателей VEGF за время наблюдения, можно отметить, что в 1-й группе не было выявлено достоверных различий с нормативными данными. Однако в этой группе новорожденных в отличие от контрольной группы отмечалась тенденция к повышению среднего сывороточного уровня концентрации VEGF к 28-м суткам жизни.

У новорожденных с ВЖК наблюдалось снижение концентрации VEGF к 4-й неделе жизни ( $p < 0,01$  при сравнении с контролем и уровнем на 1-й неделе жизни).

У детей с тяжелыми ишемическими поражениями головного мозга (2-я и 4-я группы) начальные

Таблица 1

**Средние значения сывороточной концентрации BDNF у новорожденных  
в зависимости от характера изменений на НСГ**

| BDNF, нг/мл                   | 1-я группа                  | 2-я группа                  | 3-я группа                   | 4-я группа                  | Контрольная группа |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------|
|                               | 1-я проба (48 ч жизни)      |                             |                              |                             |                    |
| M±SD                          | 5,59±3,16 <sup>1), 2)</sup> | 0,53±0,42 <sup>1), 2)</sup> | 10,9±11,77 <sup>1), 2)</sup> | 0,47±0,64 <sup>1), 2)</sup> | 2,5±1,7            |
| min—max                       | 0,03—11,7                   | 0,02—1,57                   | 8,2—44,96                    | 0,03—2,4                    |                    |
| 2-я проба (3—5-е сутки жизни) |                             |                             |                              |                             |                    |
| M±SD                          | 3,8±1,73                    | 2,87±1,52                   | 6,14±5,5 <sup>1)</sup>       | 2,28±1,96                   | 3,1±1,05           |
| min—max                       | 3,16—9,4                    | 0,1—5,6                     | 4,1—18,2                     | 0,59—3,5                    |                    |

Здесь и в табл. 2 и 3: достоверность различия: <sup>1)</sup> при сравнении показателей с контрольной группой по методу Манна — Уитни ( $p < 0,01$ ); <sup>2)</sup> при сравнении показателей 1-й и 2-й проб внутри группы по методу Вилкоксона ( $p < 0,01$ ).

Таблица 2

**Средние значения сывороточной концентрации VEGF у новорожденных  
в зависимости от характера изменений на НСГ**

| VEGF, нг/мл                  | 1-я группа                  | 2-я группа                    | 3-я группа                     | 4-я группа                    | Контрольная группа |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|
|                              | 1-я проба (48 ч жизни)      |                               |                                |                               |                    |
| M±SD                         | 170,3±91,97 <sup>2)</sup>   | 173,68±125,94 <sup>2)</sup>   | 182,12±119,32 <sup>2)</sup>    | 151,48±106,95 <sup>2)</sup>   | 193,48±59,04       |
| min—max                      | 27,11—657,96                | 18,8—301,74                   | 50,3—192,04                    | 11,09—277,03                  |                    |
| 2-я проба (7-е сутки жизни)  |                             |                               |                                |                               |                    |
| M±SD                         | 250,6±132,24                | 108,0±68,96 <sup>1), 2)</sup> | 186,141±129,2                  | 119,15±74,46 <sup>2)</sup>    | 218,13±62,34       |
| min—max                      | 23,56—615,07                | 53,81—371,8                   | 30,7—301,23                    | 13,09—126,22                  |                    |
| 3-я проба (28-е сутки жизни) |                             |                               |                                |                               |                    |
| M±SD                         | 376,76±185,59 <sup>2)</sup> | 78,54±37,01 <sup>1), 2)</sup> | 117,46±84,91 <sup>1), 2)</sup> | 53,22±40,96 <sup>1), 2)</sup> | 200,13±49,73       |
| min—max                      | 27,01—646,1                 | 4,6—116                       | 19,93—151,65                   | 0—89,06                       |                    |

Таблица 3

**Сывороточный уровень маркера апоптоза DR5 в исследуемых группах новорожденных**

| DR5, нг/мл | 1-я группа               | 2-я группа                     | 3-я группа                   | 4-я группа                     | Контрольная группа |
|------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| M±SD       | 10,35±9,98 <sup>1)</sup> | 73,22±53,898 <sup>1), 2)</sup> | 74,4±38,99 <sup>1), 2)</sup> | 100,72±27,22 <sup>1), 2)</sup> | 4,1±0,9            |
| min—max    | 3,71—26,05               | 48,1—112,47                    | 89,9—118,57                  | 90,7—146,66                    | 1,24—8,67          |

уровни VEGF в сыворотке соответствовали нормативным, затем наблюдалось достоверное снижение средних значений сывороточной концентрации к 28-м суткам жизни ( $p < 0,01$ ). При индивидуальном анализе у всех детей также отмечалось снижение VEGF к 4-й неделе жизни. В этих группах у каждого 3-го новорожденного в течение 1-й недели наблюдения фиксировались значения VEGF меньше 50 нг/мл.

В 4-й группе при комбинации ВЖК и ПВЛ средние сывороточные значения в первые 48 ч жизни достоверно не отличались от нормальных

значений, что связано в наших наблюдениях с тем, что у 5 новорожденных концентрация VEGF превышала 220 нг/мл. К 28-м суткам жизни концентрация VEGF значительно снижалась и составляла 53,22 нг/мл, что было в 2 раза ниже минимальных нормативных показателей. У новорожденных с неблагоприятным исходом (умерших) к 28-м суткам жизни регистрировались и крайне низкие значения сывороточной концентрации VEGF — от 0 до 27,01 нг/мл. Данные представлены в табл. 2.

Наиболее выраженные изменения сывороточного уровня из изучаемых факторов были выяв-

Таблица 4

## Средние концентрации BDNF у новорожденных в зависимости от исхода заболевания

| Исход   | BDNF, нг/мл                 |                        | VEGF, нг/мл                   |                               |                               | DR5, нг/мл                     |
|---|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|   | 1-я проба                   | 2-я проба              | 1-я проба                     | 2-я проба                     | 3-я проба                     |                                |
| 1-я группа (без структурных изменений на НСГ) |                             |                        |                               |                               |                               |                                |
| Выжил   | 5,4±2,9 <sup>1)</sup>       | 4,1±1,7                | 224,87±152,05                 | 225,87±143,35 <sup>2)</sup>   | 267,06±213 <sup>2)</sup>      | 8,71±6,13 <sup>2)</sup>        |
| Умер  | 3,56±3,5                    | 2,99±1,2               | 172,58±70,46                  | 95,4±90,78 <sup>1), 2)</sup>  | 60,16±46,37 <sup>1), 2)</sup> | 23,7±10,13 <sup>1), 2)</sup>   |
| 2-я группа (ПВЛ)                              |                             |                        |                               |                               |                               |                                |
| Выжил   | 0,58±0,4 <sup>1), 2)</sup>  | 2,96±1,4               | 225,35±219,58 <sup>2)</sup>   | 233,8±172,01 <sup>2)</sup>    | 122,28±94,16 <sup>2)</sup>    | 59,91±43,1 <sup>1), 2)</sup>   |
| Умер  | 0,32±0,5 <sup>1), 2)</sup>  | 2,53±2,3               | 64,47±61,76 <sup>1), 2)</sup> | 30,46±21,79 <sup>1), 2)</sup> | 40,57±41,69 <sup>1), 2)</sup> | 109,69±33,19 <sup>1), 2)</sup> |
| 3-я группа (ВЖК)                              |                             |                        |                               |                               |                               |                                |
| Выжил   | 11,8±12,3 <sup>1), 2)</sup> | 6,9±5,5 <sup>2)</sup>  | 197,32±122,43 <sup>2)</sup>   | 221,57±118,75 <sup>2)</sup>   | 207,03±180,6 <sup>2)</sup>    | 67,78±31,95 <sup>1), 2)</sup>  |
| Умер  | 5,51±7,2 <sup>1), 2)</sup>  | 1,13±1,4 <sup>2)</sup> | 117,29±53,42 <sup>2)</sup>    | 45,22±43,75 <sup>1), 2)</sup> | 18,51±16,61 <sup>1), 2)</sup> | 104,87±44,7 <sup>1), 2)</sup>  |
| 4-я группа (ПВЛ+ВЖК)                          |                             |                        |                               |                               |                               |                                |
| Выжил   | 1,76±1,05 <sup>2)</sup>     | 2,95±1,34              | 174,35±122,43 <sup>2)</sup>   | 134,39±84,5 <sup>2)</sup>     | 70,53±34,53 <sup>1), 2)</sup> | 88,13±21,02 <sup>1), 2)</sup>  |
| Умер  | 0,25±0,19 <sup>1), 2)</sup> | 2,18±2,07              | 98,13±20,25 <sup>1), 2)</sup> | 83,6±28,56 <sup>1), 2)</sup>  | 12,83±14,39 <sup>1), 2)</sup> | 110,11±11,58 <sup>1), 2)</sup> |

Достоверность различия: <sup>1)</sup> при сравнении с показателями контрольной группы, <sup>2)</sup> при сравнении показателей в зависимости от исходов.

ны при исследовании маркера апоптоза DR5. Концентрация этого маркера была значительно повышена по сравнению с нормой во всех группах. Но если в 1-й группе уровень DR5 превышал верхнюю границу нормы в 1,2—2 раза, то во 2-й и 3-й группах — в 8,5 раз, а в группе у новорожденных с комбинированным поражением — в 11,5 раз. Данные представлены в табл. 3.

При проведении корреляционного анализа (все данные представлены при  $p < 0,01$ ) была выявлена зависимость между тяжестью перенесенной асфиксии при рождении и сывороточным уровнем DR5 и BDNF. Уровень DR5 в сыровотке крови обратно коррелировал с оценкой по шкале Апгар на 1-й минуте ( $r = -0,64$  во 2-й и 3-й группах и  $r = -0,92$  в 4-й группе). То есть, чем тяжелее была асфиксия при рождении, тем выше был уровень маркера апоптоза. Концентрация BDNF в сыровотке прямо коррелировала с оценкой по шкале Апгар на 1-й минуте ( $r = 0,65$ ) в 1-й, 2-й и 4-й группах: чем ниже была оценка по Апгар, тем ниже регистрировались показатели нейротрофина.

Прямая корреляционная зависимость была определена между уровнем DR5 и неблагоприятным исходом (смертью) ( $r = 0,79$ ), обратная зависимость — между неблагоприятным исходом и сывороточным уровнем VEGF и BDNF ( $r = -0,61$  и  $r = -0,68$  соответственно).

Была выявлена обратная корреляционная зависимость между сывороточной концентрацией DR5 и VEGF 2-й пробы и DR5 с BDNF 1-й пробы ( $r = -0,82$  и  $r = -0,93$  соответственно). Таким образом, чем меньше был в сыровотке крови уровень

нейротрофического и васкулоэндотелиального факторов, тем выше были уровень проапоптотического фактора и вероятность формирования структурных постгипоксических изменений головного мозга и неблагоприятного исхода.

При статистической обработке рассматривались значения концентрации нейротрофического, васкулоэндотелиального фактора и маркера апоптоза DR5 в зависимости от исхода (выжил, умер). Был проведен дисперсионный анализ (ANOVA), чтобы выявить зависимость влияния на исход значений этих переменных. Группы дополнительно обсчитывались по переменной, учитывающей изменения на НСГ. Данные приведены в табл. 4.

Из данных табл. 4 видно, что у новорожденных без структурных изменений и с ВЖК, как у выживших, так и у умерших, уровень BDNF был увеличенным соответственно до 2 раз, а в группе с ВЖК — в среднем до 4 раз, но у выживших в группе с ВЖК наблюдались 3 новорожденных, сывороточный уровень BDNF у которых был 22,7; 29,0 и 44,96 нг/мл. В дальнейшем у них отмечался неблагоприятный неврологический исход. У новорожденных с ПВЛ и сочетанными формами поражения на НСГ отмечалась тенденция к снижению концентрации BDNF: средние показатели у выживших — от 0,58 нг/мл до 1,75 нг/мл, а у умерших — от 0,25 нг/мл до 0,32 нг/мл. Низкое, практически следовое содержание нейротрофина (0,03 нг/мл в 1-е сутки и 0,01 нг/мл в 3—5-е сутки) имело место у крайне тяжелых пациентов, впоследствии умерших.

Анализируя сывороточный уровень VEGF, в 1-й группе различия между показателями у выживших

и умерших отмечались с 7-х суток жизни: уровень у выживших был в 3 раза выше, а к 28-м суткам — в 4 раза. У новорожденных со структурными изменениями на НСГ различия в концентрации VEGF отмечались с 48 ч жизни. К 7-м суткам жизни разница в уровне достигала до 8 раз во 2-й и до 2 раз 4-й группах соответственно и в 4,5 раза у новорожденных с ВЖК. Снижение концентрации VEGF свидетельствует об угнетении процессов васкулогенеза в случаях тяжелых поражений ЦНС, особенно при неблагоприятном исходе заболевания.

Уровень маркера апоптоза DR5 в сыворотке крови у умерших новорожденных всех групп был значительно повышен по сравнению с нормативными значениями ( $p < 0,01$ ) — в 2,5—3 раза в 1-й группе, в 15 раз у новорожденных с ВЖК и при сочетании ВЖК и ПВЛ. Максимальное повышение DR5 регистрировалось у умерших среди детей с ПВЛ — уровень превышал верхнюю границу нормы в 18 раз. У выживших новорожденных только из 1-й группы не было достоверных различий с нормативными показателями, у детей с изменениями на НСГ отмечалось повышение сывороточного уровня DR5 в 7—10 раз ( $p < 0,01$ ).

### Заключение

Связь процессов апоптоза с нейротрофическими и ростовыми факторами при гипоксически-ишемическом поражении мозга у новорожденных чрезвычайно важна и свидетельствует, что запрограммированная смерть клеток находится в тесной зависимости от трофического обеспечения нейронов.

Наши результаты согласуются с данными исследователей, доказывающих значимость влияния нейротропических и ростовых факторов для нормальной и патологической деятельности мозга. Они отражают организацию поливариантной системы химической регуляции, обеспечивающей как жизнеспособность и защиту нейронов от неблагоприятных влияний, так и программируемую гибель определенной части клеточной популяции в случае повреждения мозга.

Значительное повышение сывороточного уровня маркера апоптоза DR5 у новорожденных с постгипоксическими структурными изменениями головного мозга подтверждает, что при активном процессе апоптоза увеличивается количество погибших клеток. Концентрация нейротрофического фактора роста головного мозга, поддерживающего функциональную активность нейронов в условиях гипок-

сии-ишемии, находится в обратно пропорциональной зависимости от концентрации проапоптотического фактора DR5. Можно предположить, что новорожденные, испытавшие хроническую внутриутробную гипоксию и острую асфиксию в родах, с морфофункциональной незрелостью и малым гестационным возрастом имеют самое низкое содержание нейротрофического фактора BDNF, обладающего протективным действием на нервные клетки. Такие дети неспособны адекватно перенести гипоксический стресс, и, вероятнее всего, это одна из причин развивающегося тяжелого гипоксически-ишемического поражения мозга. Напротив, у новорожденных с повышенным в 2—3 раза сывороточным содержанием BDNF в 1-е сутки даже при перенесенной тяжелой гипоксии-ишемии мозга в дальнейшем не формируются структурные изменения ЦНС. Самая низкая концентрация нейротрофина отмечалась у новорожденных с ишемическими поражениями — ПВЛ и сочетанным поражением (ПВЛ и ВЖК), в последнем случае отмечались максимальные значения маркера апоптоза.

Более высокий сывороточный уровень DR5 находился также в обратной корреляционной зависимости с концентрацией VEGF на 1-й и 4-й неделе жизни, самые низкие значения которого были отмечены у новорожденных с тяжелыми ишемическими поражениями головного мозга. Во всех случаях при индивидуальной оценке низкий уровень концентрации VEGF был отмечен у детей со сформировавшимися тяжелыми постгипоксическими изменениями и прямо коррелировал с уровнем нейротрофина. При благоприятном течении заболевания у всех новорожденных отмечалось значительное увеличение сывороточного уровня VEGF до 450—620 нг/мл, что свидетельствует об активном ангиогенезе, позволяющем компенсировать последствия тяжелой гипоксии-ишемии мозга.

Полученные в работе данные говорят о том, что микроциркуляторные и клеточные процессы являются компонентами единой тканевой системы и взаимозависимы настолько, что трудно рассматривать их в причинно-следственном взаимоотношении. При перинатальных гипоксических поражениях ЦНС нарушения в системе индукторов и ингибиторов апоптоза оказывают синергическое действие при формировании постгипоксических изменений головного мозга и могут быть использованы для прогнозирования тяжести поражения головного мозга у новорожденных.

### ЛИТЕРАТУРА

См. online-версию журнала <http://www.pediatricjournal.ru> № 3/2005, приложение № 4.

1. Гомазков О.А. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2002. — № 7. — Приложение. — С. 17— 21.
2. Martin L.J. // Int. J. Mol. Med. — 2001. — Vol. 7, № 5. — P. 455 — 478.
3. Блинов Д.В. Иммуноферментный анализ нейроспецифических антигенов в оценке проницаемости гематоэнцефалического барьера при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС ( клиничко-экспериментальное исследование): Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — М., 2004.
4. Кожура В.Л., Носова Н.В. // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 2000. — № 2. — Приложение. 2. — С. 30 — 32.
5. Aoudjit F., Vuori K. // J. Cell Biol. — 2001. — Vol. 152. — P. 633 — 643.
6. Chan F. K., Chun H.J., Zheng L. et al. // Science. — 2000. — Vol. 288. — P. 2351 — 2354.
7. Hymowitz S.G., Christinger H.W., Fun G. // Molec. Cell. — 1999. — Vol. 4. — P. 563 — 571.
8. Барашнев Ю.И. // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. — 1996. — № 2. — С. 26 — 29.
9. Schmitz L., Kirchhoff S., Krammer P.H. // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2000. — Vol. 32. — P. 1123—1136.
10. Pardridge W.M. // Curr. Opin. Investig. Drugs. — 2002. — Vol. 3, № 12. — P. 1753 — 1757.
11. Liao S.L., Lai S.H., Chou Y.H., Kuo C.Y. // Acta. Paediatr. Taiwan. — 2001. — Vol. 42, № 2. — P. 90 — 93.
12. Мягих М.В., Катюков В.Ю., Посыпанова Г.А. и др. // Нейрохимия. — 1998. — № 2. — С. 99—116.
13. Коршунов А.М., Преображенская И.С. // Неврол. журн. — 1998. — № 1. — С. 40 — 46.
14. Ferrara N. // Semin. Oncol. — 2002. — Vol. 29. — P. 10 —14.
15. Fern R. // Progress in Brain Res. — 2001. — Vol. 132. — P. 405 — 411.