

*Г.С. Голосная, А.С. Петрухин, Т.М. Красильщикова, Д.И. Албагачиева,
А.Л. Эрлих, С.В. Трепилец, А.Б. Карпенко, А.Ю. Герасимов, А.С. Трифонова*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ И ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА У НОВОРОЖДЕННЫХ

Кафедра нервных болезней педиатрического факультета (зав. проф. А.С. Петрухин) ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава», отделения реанимации, интенсивной терапии, патологии новорожденных и катамнестического отделения ГКБ № 7 (зам. глав. врача по детскому корпусу А.Л. Эрлих) и родильного дома № 15 г. Москвы (глав. врач А.Ю. Пастарнак), Москва

Целью работы было изучение сывороточной концентрации нейротропного фактора роста нервов (BDNF), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и индукторов апоптоза: проапоптотического фактора («рецептор смерти» – DR5) и активированной молекулы лейкоцитарной клеточной адгезии (ALCAM) у новорожденных детей с перинатальным гипоксическим поражением ЦНС. Под нашим наблюдением находились 120 новорожденных с гестационным возрастом от 25 до 42 недель. Дети были разделены 4 группы в соответствии с изменениями на нейросонографии (НСГ): 1-я группа – 30 новорожденных, у которых на НСГ не было выявлено структурных изменений, но отмечалось повышение перивентрикулярной эхогенности – от умеренной до выраженной; 2-я группа – 30 новорожденных с перивентрикулярной лейкомаляцией (ПВЛ); 3-я группа – 30 новорожденных с внутрижелудочковыми кровоизлияниями (ВЖК); 4-я группа – 30 ново-

Контактная информация:

Голосная Галина Станиславовна – д.м.н. проф. каф. нервных болезней педиатрического факультета ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава»

Адрес: 117997 г. Москва, Островитянова, 1

Тел.: (495) 695-00-20, **E-mail:** ggolosnaya@yandex.ru

Статья поступила 14.04.09, принята к печати 23.09.09.

рожденных с сочетанием ВЖК и ПВЛ. Выявлено значительное повышение уровней DR5 и ALCAM в сыворотке крови у новорожденных 2–4-й групп. Концентрация BDNF и VEGF была снижена у новорожденных 2-й и 4-й групп. CNTF определялся только при ВЖК и сочетании ВЖК и ПВЛ. Совместное изучение различных факторов патогенеза открывает дополнительные возможности для исследования постгипоксических процессов в ткани мозга и репаративных процессов в ЦНС.

Ключевые слова: новорожденные дети, гипоксия, факторы защиты нервной ткани, факторы воспаления, прогноз, внутрижелудочковые кровоизлияния, перивентрикулярная лейкомаляция.

The aim of present study was to determine level of brain derived neurotropic factor (BDNF), ciliar neurotrophic factor (CNTF), vasculoendothelial growth factor (VEGF) and apoptosis inductors: proapoptotic factor («death receptor» DR5) and activated leukocytic cellular adhesion molecule (ALCAM) in neonates with hypoxic brain damage. Authors examined 120 neonates with gestational age 25–42 weeks. Neonates were divided into 4 groups according to neurosonographic (NSG) changes: 1st group – 30 neonates without structural NSG changes but with increased periventricular echogenicity (from mild to significant changes); 2nd group – 30 neonates with periventricular leukomalation (PVL); 3rd group – 30 neonates with intraventricular hemorrhages (IVH), 4th group – 30 neonates with combination of PVL and IVH. Examination showed significantly increased levels of DR5 and ALCAM in serum of neonates in 2–4 groups. Serum concentration of BDNF and VEGF was decreases in neonates of 2–4 groups. CNTF was detected inflammatory factors, prognosis, only in cases of IVH and combination of IVH and PVL. Concurrent study of different pathogenetical factors gives new possibilities in investigation of posthypoxic processes in brain tissue and reparative processes in CNS.

Key words: neonates, hypoxia, protective factors of brain tissue, intraventricular hemorrhages, periventricular leucomalation.

В настоящее время большой интерес представляет изучение компенсаторных механизмов, влияющих на течение и исходы гипоксического поражения мозга у детей, а также определение состояния системы трофической защиты мозга в неонатальном периоде с помощью иммуноферментного метода. В экспериментальных работах доказано, что именно баланс в системе трофических и ростовых факторов обеспечивает сохранение ткани мозга в критические моменты [1–7].

Поэтому целью нашей работы было изучение сывороточной концентрации нейротропного фактора роста нервов (BDNF), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и индукторов апоптоза: проапоптотического фактора («рецептор смерти» – DR5) и активированной молекулы лейкоцитарной клеточной адгезии (ALCAM) у новорожденных детей с перинатальным гипоксическим поражением ЦНС.

Материалы и методы исследования

Под нашим наблюдением находились 120 новорожденных детей с гестационным возрастом от 25 до 42 недель, массой тела при рождении от 890 до 4630 г. Мальчиков – 78, девочек – 42. Дети были разделены 4 группы в соответствии с изменениями на нейросонографии (НСГ): 1-я группа – 30 новорожденных, у которых на НСГ не было выявлено структурных изменений, но отмечалось повышение перивентрикулярной эхогенности – от умеренной до выраженной; 2-я группа – 30 новорожденных с перивентрикулярной лейкомаляцией (ПВЛ); 3-я группа – 30 новорожденных с внутрижелудочко-

выми кровоизлияниями (ВЖК); 4-я группа – 30 новорожденных с сочетанием ВЖК и ПВЛ.

Контрольная группа была представлена 15 здоровыми доношенными детьми, а также 15 недоношенными детьми без поражения ЦНС.

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 BDNF использовали реактивы фирмы R&D (Англия). Для определения концентрации VEGF проводили 3 пробы: 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. Уровень VEGF и DR5 в сыворотке крови исследовали с помощью тест-систем фирмы Biosource (Бельгия). CNTF исследовали в мониторинговом режиме: в 1–2-е, 5–7-е, 12–14-е, 24–28-е сутки жизни с использованием реактивов фирмы R&D (Англия).

Для определения уровня ALCAM применяли реактивы фирмы R&D (Англия). Пробы крови проводили трижды: в возрасте до 48 ч жизни; на 5–7-е, 12–14-е сутки жизни.

Полученную сыворотку в объеме 0,5 мл замораживали и хранили при температуре – 20 °С не более 2 месяцев.

Принцип всех тест-систем основан на количественном иммуноферментном анализе сэндвичевого типа (ELISA: Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay), который проводили по стандартному протоколу.

Ультразвуковое сканирование головного мозга (НСГ) проводили в течение всего времени наблюдения за ребенком с первых суток поступления в стационар (в среднем 1 раз в 5–7 дней, при необходимости – ежедневно).

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

Изучение концентрации исследуемых факторов у новорожденных контрольной группы показало, что в нормальных условиях все антигены, кроме CNTF, присутствуют в сыворотке крови. В контрольной группе у новорожденных без поражения ЦНС не было выявлено достоверных различий исследуемых антигенов в зависимости от гестационного возраста, а также сроков исследования (табл. 1).

Анализируя сывороточный уровень BDNF, мы выявили тенденцию к повышению показателей антигена первой пробы у детей без структурных изменений на НСГ (1-я группа) в 1,5–2 раза, что в среднем составило $5,59 \pm 3,16$ мкг/л.

При развитии ВЖК (3-я группа) концентрация нейротрофина резко возрастала (до 4 раз) и составила в среднем $10,9 \pm 11,77$ мкг/л.

У новорожденных с тяжелым ишемическим поражением (ПВЛ) и сочетанным поражением (ПВЛ+ВЖК) средние значения BDNF существенно снижались и были практически равны между собой: $0,53 \pm 0,42$ мкг/л и $0,47 \pm 0,64$ мкг/л соответственно.

При изучении динамики значений второй пробы (на 3–5-е сутки жизни) у новорожденных без структурных изменений головного мозга (1-я группа) концентрация нейротрофина имела тенденцию к уменьшению ($p > 0,05$).

В 3-й группе с ВЖК концентрация антигена достоверно снижалась (в среднем на 50%) и составила $6,14 \pm 5,5$ мкг/л, но оставалась увеличенной по сравнению с верхней границей нормы более чем в 2 раза ($p < 0,01$).

У детей с ишемическими структурными нарушениями (2-я группа) и сочетанной формой поражения ЦНС (ПВЛ+ВЖК) (4-я группа) сывороточный уровень BDNF увеличивался по сравнению с исходными данными в 4–5 раз, составлял

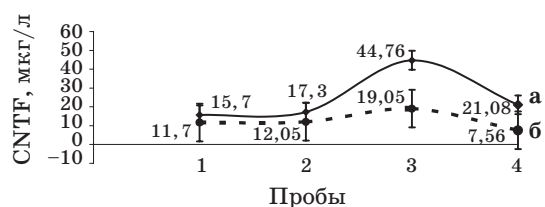


Рисунок. Динамика сывороточной концентрации CNTF у новорожденных в зависимости от изменений на НСГ. а – ВЖК, б – ВЖК+ПВЛ.

$2,28 \pm 1,96$ мкг/л и в среднем становился равным норме ($p < 0,01$).

При изучении полученных результатов иммуноферментного анализа сывороточного уровня CNTF мы выявили, что у новорожденных 1-й группы (без структурных изменений головного мозга на НСГ) и у детей с постгипоксической ПВЛ (2-я группа) эндогенный уровень CNTF не определялся в сыворотке крови. Возможно, это связано с тем, что при описанных выше нарушениях CNTF не проникает через гематоэнцефалический барьер.

В группах с геморрагическими и комбинированными формами постгипоксических изменений головного мозга на НСГ (ВЖК и сочетание ВЖК и ПВЛ) CNTF определялся в сыворотке крови уже в первые 48 ч жизни.

Говоря об этих группах новорожденных, необходимо отметить, что характер изменения сывороточного уровня CNTF был идентичен (см. рисунок). Все данные достоверно ($p < 0,01$) отличались от контрольной группы при сравнении по методу Манна-Уитни.

CNTF рассматривается как ключевой фактор дифференцировки для развивающихся нейронов и глиальных клеток. CNTF обеспечивает трофику и участвует в защите поврежденных или аксонотомированных нейронов. У новорожденных с геморрагическим типом поражения ЦНС уровень его в сыворотке крови фиксируется с первых суток жизни, что, несомненно, может служить ранним маркером ВЖК. Сравнение концентрации CNTF в сыворотке крови новорожденных с изолированным и сочетанным поражением ЦНС свидетельствует о том, что при обширном поражении головного мозга экспрессия CNTF угнетается в большей степени, уменьшая функциональные возможности новорожденных.

Таблица 1

Концентрация исследуемых факторов у детей контрольной группы

Исследуемые факторы	M±SD	min-max
BDNF, мкг/л	$2,5 \pm 1,7$	1,0–3,9
CNTF, мкг/л	Не определяется в сыворотке крови	
VEGF, мкг/л	$193,467 \pm 59,035$	122–400
ALCAM, мкг/л	$0,036 \pm 0,015$	0,018–0,06
DR5, мкг/л	$4,1 \pm 0,9$	1,2–8,67

Таблица 2

Средние значения сывороточной концентрации VEGF у новорожденных в зависимости от результатов НСГ

Статистические показатели	Группы детей			
	1-я	2-я	3-я	4-я
1-я проба (48 ч жизни)				
M±SD, мкг/л	170,3 ± 91,97**	173,68±125,94**	182,12±119,32**	151,48±106,95**
min-max, мкг/л	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, мкг/л	250,6±132,24	108,0± 68,96*,**	186,141±129,2	119,15±74,46**
min-max, мкг/л	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, мкг/л	376,76±185,59**	78,54±37,01*,**	117,46±84,91*,**	53,22±40,96*,**
min-max, мкг/л	27,01–646,1	4,6–116	19,93–151,65	0–89,06

* достоверность различий средних показателей сывороточной концентрации VEGF от контрольной группы по методу Манна–Уитни ($p<0,01$); ** достоверность различия концентрации проб внутри группы (по методу Вилкоксона) ($p<0,01$).

Таблица 3

Сывороточный уровень маркера апоптоза DR5 в исследуемых группах

Статистические показатели	Группы детей			
	1-я	2-я	3-я	4-я
M±SD, мкг/л	10,35±9,98*	73,22±53,89*,**	74,4±38,99*,**	100,72±27,22*,**
min-max, мкг/л	3,71–26,05	48,1–112,47	89,9–118,57	90,7–146,66

* достоверность различий средних показателей сывороточной концентрации DR5 от контрольной группы по методу Манна–Уитни ($p<0,01$); ** достоверность различия средних показателей сывороточной концентрации DR5 от 1-й группы по методу Манна–Уитни ($p<0,01$).

Сывороточная концентрация VEGF во всех исследуемых группах характеризовалась значительной разницей между минимальными и максимальными значениями, особенно у 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 VEGF к 28-м суткам жизни.

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

У детей с тяжелыми ишемическими поражениями головного мозга (2-я и 4-я группы) начальные уровни VEGF в сыворотке соответствовали нормативным, затем наблюдалось достоверное снижение средних значений сывороточной концентрации VEGF 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 мкг/л.

В 4-й группе при комбинации ВЖК и ПВЛ средние сывороточные значения VEGF 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 мкг/л. К 28-м суткам жизни концентрация VEGF значительно снижалась и составляла 53,22 мкг/л, что было в 2 раза ниже минимальных нормативных показателей (табл. 2).

Говоря о проапоптотических факторах, наиболее выраженные изменения сывороточного уровня были выявлены 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 ЦНС – в 11,5 раз (табл. 3).

При изучении динамики ALCAM в зависимости от развившихся и выявленных с помощью НСГ изменений головного мозга установлено, что максимальные значения концентрации ALCAM регистрировались у новорожденных с сочетанными поражениями головного мозга – ВЖК и ПВЛ. У них также отмечались самые низкие темпы снижения антигена, что, возможно, отражает процесс воспаления и тромбообразования в сосудах и связано с большим объемом поражения ткани головного мозга и более длительным течением процессов организации в очаге постипоксических изменений (табл. 4).

Таблица 4

Изменение средних значений сывороточной концентрации ALCAM у новорожденных в зависимости от результатов НСГ

Статистические показатели	Группы детей			
	1-я	2-я	3-я	4-я
1-я проба (48 ч жизни)				
M±SD, мкг/л	0,65±0,21*	2,05±0,3*,**	2,44±0,33*,**	4,33±0,73*,**
min-max, мкг/л	0,19-1,03	1,2-2,78	1,92-2,81	2,66-9,0
2-я проба (5-7-е сутки жизни)				
M±SD, мкг/л	0,18±0,12*	1,94±0,41*,**	2,07±0,41*,**	2,93±0,38*,**
min-max, мкг/л	0,1-0,82	1,2-2,63	1,65-2,9	1,99-4,8
3-я проба (12-14-е сутки жизни)				
M±SD, мкг/л	0,14±0,09*	0,76±0,16*,**	1,06±0,48*,**	1,67±0,27*,**
min-max, мкг/л	0,04-0,26	0,53-2,1	0,82-1,6	1,07-1,93

* достоверность различий средних показателей сывороточной концентрации ALCAM от контрольной группы по методу Манна-Уитни ($p < 0,01$); ** достоверность различия концентрации ALCAM от 1-й группы по методу Манна-Уитни ($p < 0,01$).

Таблица 5

Корреляционные связи исследуемых факторов с развитием структурных изменений на НСГ

Исследуемые факторы	Группы детей				
	Контрольная	1-я	2-я	3-я	4-я
BDNF	Корреляционный связи нет		-0,63	-	-0,68
CNTF			в сыворотке крови не определяется	0,68	0,94
VEGF			корреляционной связи нет		
ALKAM			0,94	0,68	0,83
DR5			0,939	0,69	0,797

Указаны только сильные корреляционные связи ($R > 0,6$; $p < 0,01$).

Данные, характеризующие корреляционные связи между уровнями исследуемых факторов и формированием постгипоксических структурных изменений головного мозга, представлены в табл. 5.

Факторы, определяющие выраженность деструктивного и воспалительного процесса (DR5, ALKAM), находились в прямой корреляционной связи с формированием постгипоксических структурных изменений головного мозга у новорожденных.

Уровень BDNF в сыворотке крови в раннем неонатальном периоде находился в обратной зависимости с формированием постгипоксических ишемических поражений головного мозга: чем ниже был его уровень, тем с большей вероятностью у ребенка формировалась ПВЛ. CNTF прямо коррелировал с формированием гипоксически-геморрагических поражений ЦНС.

Обсуждение

Таким образом, длительная гипоксия ткани приводит к грубому энергетическому дефициту, неспособности рецепторного аппарата клеток воспринимать сигналы трофических факторов и аутокринной стимуляции [8-12]. Недостаточность трофического обеспечения, усиление воспалительных

реакций (повышение уровня ALKAM в сыворотке крови и медленное его снижение), усиление процессов апоптоза ведет к необратимым изменениям в клетках мозга, и даже повышение уровня трофических факторов BDNF, CNTF оказывается недостаточным для спасения поврежденных клеток.

В работе показаны достоверные различия в концентрации нейротрофинов и VEGF у новорожденных с повышенной экзогенностью перивентрикулярных зон с формированием и без трансформации в ПВЛ.

Нейротрофические факторы при развитии геморрагических инсультов могут быть ранними маркерами поражения, а динамика их концентрации в сыворотке крови может служить прогностическим критерием при определении прогноза заболевания.

VEGF не может выступать маркером поражения в острейшем периоде (до 5 дней жизни), так как концентрация его исходных уровней в сыворотке крови достоверно не отличается от контрольной группы. Однако снижение уровня VEGF к концу 1-й недели жизни позволяет достоверно прогнозировать формирование постгипоксических изменений головного мозга.

Заключение

Клиническое исследование, проведенное у новорожденных с гипоксическим поражением головного мозга, позволило увидеть суммарный результат разнонаправленных дегенеративно-репаративных процессов в ЦНС. В первые сутки жизни при неблагоприятном прогнозе снижено

содержание нейротрофических и ростовых факторов на фоне выраженного увеличения проапоптотических факторов, что свидетельствует о недостаточности защитных механизмов, снижении устойчивости нейронов и сосудистой системы к ишемии, низкой способности к репаративным процессам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lobner D, Golner S, Hjelmhaug J.* Neurotrophic factor effects on oxidative stress-induced neuronal death. *Neurochem. Res.* 2003; 28 (5): 749–756.
2. *Edelman GM.* Modulation of cell-adhesion during induction, histogenesis, and perinatal-development of the nervous-systemreceptors. *J. Ann. Rev. of neuroscience.* 1997; 7: 339–377.
3. *Bennett DL.* Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function. *Neuroscientist.* 2000; 7 (1): 13–17.
4. *Крыжановский Г.Н., Луценко В.К.* Значение нейротрофических факторов для патологии нервной системы. *Успехи совр. биол.* 1995; 1: 31–49.
5. *Деметьева Г.М.* Профилактическая и превентивная неонатология. Низкая масса тела при рождении. Гипоксия плода и новорожденного. Лекция для врачей. *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии*, 1999; приложение: 70.
6. *Гомазков О.А.* Апоптоз нейрональных структур и роль нейротрофических ростовых факторов. Биохимические механизмы эффективности пептидных препаратов мозга. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2002; 7 (приложение): 17–21.
7. *Гомазков О.А.* Нейропептиды и ростовые факторы мозга. М.: Информационно-справочное издание, 2002.
8. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. М: Медицина, 2001.
9. *Alvarado-Kristensson M.* Regulation of neutrophil apoptosis. Doctoral dissertation, Lund University, Malmu university hospital, 2004.
10. *Brummendorf T, Rathjen FG.* Cell-adhesion molecules.1. Immunoglobulin superfamily. *J. Introduction protein profile.* 1995; 1 (9): 951–1058.
11. *Chamnanvanakij S, Margraf LR, Burns D, Perlman JM.* Apoptosis and white matter injury in preterm infants. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2002; 5 (2): 184–189.
12. *Блинов Д.В.* Иммуноферментный анализ нейроспецифических антигенов в оценке проницаемости гематоэнцефалического барьера при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2004.