



# ОЦЕНКА ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЭБ ДЛЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЕНОЛАЗЫ ПРИ ПЕРИНАТАЛЬНОМ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ЦНС

Блинов Д.В.

ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва

*Резюме: сохраняющийся интерес к оценке резистентности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), прогнозированию тяжести и исходов перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС путем анализа содержания нейроспецифических белков в биологических жидкостях определяет цель данной работы – оценить динамику концентрации нейроспецифической енолазы, НСЕ (neuron specific enolase, NSE) в сыворотке крови в течение 6 месяцев жизни у детей с церебральной ишемией, включая стратификацию по гестационному возрасту. Материалы и методы. На 1-24-й неделях жизни было обследовано 49 детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС со сроком гестации 32-41 неделя. Контрольную группу составили 28 здоровых доношенных детей. Были сформированы следующие группы сравнения: дети с оценкой по шкале Апгар на 1-й минуте 1-3 балла (группа А 1-3), 4-6 баллов (группа А 4-6) и 7-9 баллов (группа А 7-9); дети с гестационным возрастом (ГВ) ГВ 32-33 недели, ГВ 34-36 недель и ГВ 37-40 недель; дети с внутрижелудочковыми кровоизлияниями (группа ВЖК) и перивентрикулярными лейкомаляциями (группа ПВЛ). Количественный анализ НСЕ в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Результаты. В группах А 1-3, А 4-6, А 7-9 зарегистрировано достоверное увеличение содержания НСЕ на 1-й неделе по сравнению с контрольной группой. В течение всего срока наблюдения концентрация НСЕ тем выше, чем выше тяжесть, что отражает оценка по шкале Апгар. Как на 1-й неделе жизни, так и в дальнейшем содержание НСЕ в группе ГВ*

*32-33 существенно превышало таковое в группах ГВ 34-36 и ГВ 37-41, а также содержание НСЕ в группе контроля. Уровень НСЕ в группе ПВЛ, начиная с 1-й недели, достоверно меньше, чем в группе ВЖК. Зафиксировано отсроченное повышение сывороточного уровня НСЕ на 4-й неделе. Заключение. Полученные данные подтверждают наличие продолжающегося в течение длительного периода после перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС нарушения проницаемости ГЭБ для НСЕ, отражающего хронизацию патологического процесса. В большей степени это выражено у детей с меньшим гестационным возрастом.*

*Ключевые слова: ЦНС, гипоксия, ишемия, ГЭБ, нейроспецифические белки, НСБ, нейроспецифическая енолаза, НСЕ.*

## Введение

Сегодня сохраняется интерес к количественному анализу нейробиохимических маркеров повреждения центральной нервной системы (ЦНС). Определение нейроспецифических антигенов целесообразно использовать в целях мониторинга течения заболеваний ЦНС и прогнозирования их исходов при различных повреждениях мозга, в частности, при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС [1,6,7,9,11].

Известно, что определение нейроспецифических белков (НСБ) в образцах сыворотки крови может характеризовать тяжесть и исход повреждения ЦНС [10,11]. Однако эти исследования в основном проводились в остром периоде нарушения мозгового кровообращения и последующего гипоксически-ишемического поражения ЦНС [9,11]. Состояние ГЭБ при пери-

натальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС в относительно отдаленном периоде патологического процесса продолжает быть предметом изучения. Неизвестными остаются и причины хронизации нейродегенеративного процесса [4,6].

Нейроспецифическая енолаза, HSE (neuron specific enolase, NSE) –  $\gamma$ -субъединица енолазы, гликоцил-энзим, превращающий 2-фосфо-глицерат в фосфоенолпируват. HSE содержится в большинстве нейронов. Повреждение нейронов, в т.ч. на фоне гипоксически-ишемического поражения ЦНС, приводит к высвобождению данного антигена в периферический кровоток. Определение уровня HSE в сыворотке крови является диагностически значимым и дает возможность рассматривать данный антиген в качестве биологического маркера повреждения нервной системы [4,10].

Ранее мы провели оценку содержания HSE в периферической крови новорожденных после перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС [3]. Было показано достоверное увеличение содержания HSE в сыворотке крови на 1-й неделе жизни, а также повторное повышение концентрации HSE на 4-й неделе. Однако включенные в исследование пациенты не были стратифицированы по гестационному возрасту (ГВ). Между тем в более поздних научных работах была подтверждена разница в концентрации некоторых HCB у недоношенных детей различного гестационного возраста в сравнении с контрольной группой до трех недель жизни [2]. Однако данных о содержании HSE в сыворотке крови новорожденных различного гестационного возраста в течение продолжительного периода времени в доступных для анализа публикациях не приводится. Поэтому с научной и практической точек зрения такая стратификация представляется важной в оценке полученных результатов.

Исходя из этого, **целью данной работы** явилось исследование динамики концентрации HSE в сыворотке крови в течение 24 недель жизни у детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС с ретроспективным пересчетом результатов включая стратификацию по гестационному возрасту.

## Материалы и методы

### Клинические группы наблюдения

Всего было обследовано 77 детей, находившихся на стационарном лечении и амбулаторном наблюдении в реанимационном и детском отделениях родильного дома № 17 г. Москвы, отделениях патологии новорожденных и катамнеза детской клинической больницы № 13 им. Н.Ф. Филатова и психоневрологического отделения детской городской больницы № 6 г. Москвы.

В группу с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС вошли 49 детей со сроком гестации 32-41 неделя. При рождении состояние было оценено как тяжелое у 23 (46,9%) новорожденных, среднетяжелое – у 18 (36,7%) детей, удовлетворительное – у 8 (16,3%) детей. Тяжесть состояния новорож-

денных в раннем неонатальном периоде была обусловлена как отдельными синдромами дезадаптации, так и их сочетаниями: у всех детей наблюдались проявления перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС различной степеней тяжести. При этом поражение I степени отмечалось у 10 (20,4%) новорожденных, II степени – у 32 (65,3%), а III степени – у 7 (14,3%) детей [1]. У части детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС были диагностированы синдром дыхательных расстройств (СДР), внутриутробная пневмония, конъюгационная гипербилирубинемия I-II степени, общий отечный синдром I-II степени, а также проявления внутриутробной гипотрофии I-II степени.

На основании оценки по шкале Апгар 47 детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС были разделены на следующие группы: дети с оценкой по шкале Апгар на 1-й минуте 1-3 балла (группа А 1-3) – 6 новорожденных; 4-6 баллов (группа А 4-6) – 22 новорожденных и 7-9 баллов (группа А 7-9) – 19 пациентов.

По массе тела и гестационному возрасту (ГВ) дети были разделены на следующие группы: 12 (24,5%) детей имели ГВ 32-33 недели, средний вес при рождении  $1468,3 \pm 36,6$  г, диапазон составил от 1300 до 1650 г (группа ГВ 32-33); 15 (30,6%) детей имели ГВ от 34 до 36 недель и среднюю массу  $2541,3 \pm 106,2$  г, диапазон от 1800 до 3180 г (группа ГВ 34-36); 22 (44,9%) новорожденных имели ГВ 38-40 недель и среднюю массу  $3329,4 \pm 136,9$  г, диапазон составил от 2080 до 4600 г (группа ГВ 38-40). Средняя оценка по шкале Апгар, отражающая тяжесть состояния, была сходна во всех этих группах и составила на 1-й минуте 5,5-6,7 баллов, на 5-й минуте – 6,8-7,4 балла.

Всем детям проводилась комплексная посиндромная терапия в условиях родильного дома. Все дети, родившиеся в тяжелом состоянии, нуждались в проведении интенсивной терапии в условиях отделения реанимации, включавшей в себя искусственную вентиляцию легких (ИВЛ), а также инфузионную, антибактериальную терапию, поддерживающую или заместительную терапию глюкокортикоидными гормонами.

Лечение осуществлялось под постоянным контролем кислотно-щелочного и электролитного состава сыворотки крови. Проводился динамический мониторинг уровней гематокрита, гемоглобина, общего белка, билирубина, глюкозы, мочевины.

Интравентрикулярные кровоизлияния (внутрижелудочковые кровоизлияния, ВЖК) и перивентрикулярные лейкомаляции (ПВЛ) были выявлены и подтверждены у 21 ребенка с помощью чрезродничковой нейросонографии (НСГ), общего анализа крови и исследований люмбального ликвора. На основании полученных данных были сформированы соответствующие группы: группу с преимущественно геморрагическими поражениями ЦНС (группа ВЖК) составили 14 детей, группу с преимущественно ишемическими поражениями ЦНС (группа ПВЛ) – 7 детей.

Контрольная группа была представлена 28 здоровыми доношенными детьми, рожденными в условиях физиологического родильного дома. Дети родились от здоровых матерей с физиологически протекающей беременностью и родами. Срок гестации у детей этой группы составил 38-41 неделю. Средняя масса при рождении составляла  $3510,4 \pm 140,2$  г, средняя длина тела –  $49,4 \pm 0,4$  см. У всех детей состояние при рождении расценено как удовлетворительное. Оценка по шкале Апгар на первой минуте составила 8-10 баллов. Период ранней постнатальной адаптации у всех детей этой группы протекал удовлетворительно. Выписка домой происходила на 4-5-е сутки жизни в удовлетворительном состоянии.

#### Количественный иммуферментный анализ НСЕ

Количественный анализ НСЕ в сыворотке крови осуществляли иммуферментным методом [4], с помощью специфических тест-систем, разработанных на основе соответствующих моноклональных антител в лаборатории иммунохимии ГНЦССП им. В.П. Сербского. Регистрацию результатов иммуферментного анализа проводили на одноканальном фотометре Bio-Teck Instruments (США) при длине волны 450 нм.

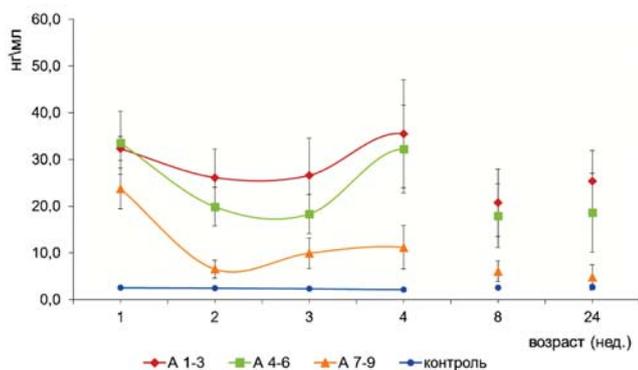
Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента, U-критерия с использованием функции Фишера и коэффициента корреляции Пирсона. Расчеты проводили с помощью программного пакета для работы с электронными таблицами Excel 2013 (Microsoft, США).

#### Результаты

Во всех исследуемых группах была изучена динамика уровня НСЕ в сравнении с изменением концентраций данного антигена в сыворотке крови детей контрольной группы.

У детей из группы контроля колебания уровня НСЕ были незначительными: максимальные значения не превышали  $2,7 \pm 0,5$  нг/мл.

Различия с контрольной группой у пациентов групп А 1-3, А 4-6 и А 7-9 в течение всего исследования были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ) за исключением

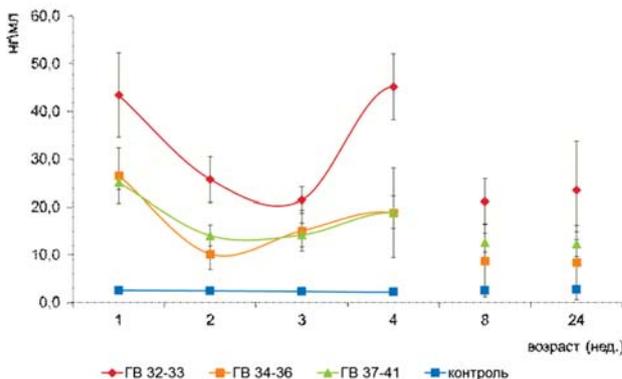


**Рисунок 1.** Динамика уровней нейроспецифической енолазы, НСЕ (neuron specific enolase, NSE), у детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением центральной нервной системы с различной оценкой по шкале Апгар на 1-й минуте после рождения.

группы А 7-9 на последнем сроке наблюдения – 24 недели. Достоверные различия между группами А 1-3 и А 4-6 наблюдались на 2-й и 3-й неделях исследования.

При динамическом наблюдении концентрация НСЕ в сыворотке крови у детей из групп А 1-3 и А 4-6 после некоторого снижения на 4-й неделе жизни вновь возвращалась к прежним значениям и составляла  $35,5 \pm 5,9$  нг/мл и  $32,2 \pm 4,8$  нг/мл соответственно (см. рис. 1). Тенденция к повышению содержания НСЕ наблюдалась и у детей группы А 7-9, хотя и гораздо менее выражено, чем в остальных опытных группах. В дальнейшем концентрация НСЕ в этой группе постепенно снижалась до нормальных значений, а в группах А 1-3 и А 4-6 она оставалась увеличенной, по крайней мере, до 24-й недели жизни.

Средний уровень НСЕ у детей с перинатальными гипоксически-ишемическими поражениями ЦНС с гестационным возрастом 32-33 недели (группа ГВ 32-33) на 1-й неделе был  $43,4 \pm 45$  нг/мл, у детей из группы ГВ 34-36 –  $26,6 \pm 3,0$  нг/мл и у детей из группы ГВ 37-41 –  $25,1 \pm 1,5$  нг/мл, в то время как в группе контроля он составил  $2,5 \pm 0,5$  нг/мл. В течение всего периода наблюдения концентрация НСЕ в группе ГВ 32-33 была достоверно выше, чем у детей контрольной группы, а также у детей из групп ГВ 34-36 и ГВ 37-41. В группах ГВ 34-36 и ГВ 37-40 к концу исследования (возраст 24 недели) различия с контрольной группой были уже статистически недостоверными. При динамическом наблюдении содержание НСЕ в исследуемых группах постепенно снижалось. Однако начиная с 3-й недели в группе ГВ 32-33 и со 2-й недели в группах ГВ 34-36 и ГВ 37-40 концентрация НСЕ в сыворотке крови вновь повышалась, достигая пика на 4-й неделе, причем более выраженное повышение наблюдалось в группе ГВ 32-33, где среднее значение концентрации НСЕ даже превысило первоначальный уровень и составило  $45,1 \pm 3,5$  нг/мл. В дальнейшем во всех группах сравнения концентрация НСЕ в сыворотке крови вновь уменьшалась, однако в группе ГВ 32-33 на 24-й неделе она продолжала оставаться на достоверно повышенном уровне (см. рис. 2).



**Рисунок 2.** Динамика уровня нейроспецифической енолазы, НСЕ (neuron specific enolase, NSE), в сыворотке крови у детей различного гестационного возраста с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением центральной нервной системы (ГВ – гестационный возраст).

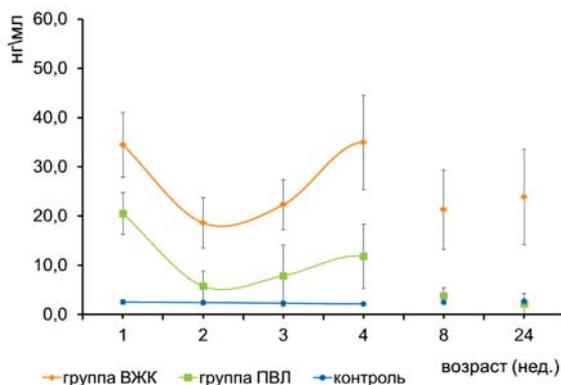
Различия концентрации НСЕ в группе ВЖК по сравнению с группой ПВЛ, а также с контрольной группой оставались статистически значимыми в течение всего исследования ( $p < 0,05$ ). Различия в содержании НСЕ в группе ПВЛ по сравнению с контролем были статистически недостоверны на 2-й неделе, а также в конце исследования, на 8-й и 24-й неделях (см. рис. 3).

При динамическом наблюдении как в группе ВЖК, так и в группе ПВЛ после уменьшения содержания НСЕ ко 2-й неделе жизни, начиная с 3-й недели, уровень данного антигена в сыворотке крови вновь возрастал, достигая пика на 4-й неделе. Уровень НСЕ в группе ВЖК при этом достиг первоначальных величин и составил  $35,0 \pm 4,9$  нг/мл. Пик содержания НСЕ в группе ПВЛ был менее выраженным, среднее значение концентрации составило  $11,8 \pm 2,2$  нг/мл. При дальнейшем наблюдении концентрация НСЕ в сыворотке крови в группе ПВЛ постепенно снижалась и к концу исследования достигла нормального уровня. В группе ВЖК при этом, напротив, сохранялись статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) в концентрации НСЕ по сравнению с контрольной группой (см. рис. 3).

### Обсуждение

Во всех группах А 1-3, А 4-6, А 7-9 мы зарегистрировали достоверное увеличение содержания НСЕ в сыворотке крови на 1-й неделе после перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС по сравнению с контрольной. Более того, на графиках видно, что в течение всего срока наблюдения концентрация НСЕ тем выше, чем выше тяжесть перинатального гипоксически-ишемического поражения, что отражает оценка новорожденного по шкале Апгар на 1-й минуте (см. рис. 1).

Закономерно, что частота перинатальных поражений ЦНС обратно пропорциональна гестационному возрасту. Это обусловлено, с одной стороны, морфофункциональной незрелостью органов и систем, обеспечивающих успешность адаптации недоношенного новорожденного в постнатальном периоде, а с



**Рисунок 3.** Динамика уровня нейроспецифической енолазы, НСЕ (neuron specific enolase, NSE), у детей с геморрагическими и ишемическими поражениями центральной нервной системы (ВЖК – внутрижелудочковые кровоизлияния; ПВЛ – перивентрикулярные лейкомаляции).

другой стороны – высокой частотой осложнений в течение внутриутробного периода развития. Оправданно предположить, что резистентность ГЭБ при воздействии повреждающих факторов у недоношенных ниже, чем у детей с нормальным сроком гестации. С целью подтвердить данное положение были сформированы группы детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС на основе их срока гестации. Как на 1-й неделе жизни, так и в дальнейшем содержание НСЕ в группе детей со сроком гестации 32-33 недели существенно превышало таковое в группах со сроком гестации 34-36 и 37-41 неделя, а также содержание НСЕ в группе контроля. Данный факт свидетельствует в пользу того, что у недоношенных детей при тех же факторах поражения и одинаковой тяжести состояния, выраженной в оценке по шкале Апгар, резистентность ГЭБ снижена вследствие морфофункциональной незрелости его структур, а также гибель части нейронов в зонах повреждения (апоптоз) выражена в большей мере, нежели у доношенных.

Elimian с соавт. [8], исследовавшие уровень НСЕ в амниотической жидкости, взятой у беременных женщин на 24-32-й неделях гестации, показали, что определение данного антигена может использоваться в качестве маркера повреждения нейронов и коррелирует с развитием таких расстройств, как внутрижелудочковое кровоизлияние и перивентрикулярная лейкомаляция. В нашем исследовании уровень НСЕ в сыворотке крови в группе ПВЛ начиная с 1-й недели достоверно меньше, чем в группе ВЖК. Во многих случаях выраженной нейрональной патологии, проявляющейся в повышенных уровнях НСЕ в СМЖ, функциональная целостность ГЭБ (хотя бы неполная) все-таки сохраняется [4]. Кроме этого, вследствие апоптоза процесс высвобождения НСЕ может быть пролонгирован по времени. Определенную клиническую значимость могут представлять и различия в профилях высвобождения при ПВЛ и ВЖК. Так, значения концентрации НСЕ в течение всего срока наблюдения в группе с ВЖК достоверно в 2-3 раза выше, чем в группе с ПВЛ, где начиная с 8-й недели они уже приближены к контрольным.

Также представляет интерес установленный феномен повторного повышения проницаемости ГЭБ для НСЕ на 4-й неделе наблюдения после массивного выхода в периферический кровоток НСЕ на 1-й неделе, обусловленного первичным повреждением структур ГЭБ. Возможно, при более частом взятии проб крови на 4-24-й неделях наблюдения можно было бы выявить и другие пики концентрации НСЕ, как это было установлено в экспериментальных исследованиях [5]. Данный феномен можно объяснить проникновением аутоантител к НСЕ через поврежденный ГЭБ к нейронам и поддержанием хронически протекающего нейродегенеративного процесса.

## Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии продолжающегося в течение достаточно длительного периода после перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера для НСЕ,

являющегося маркером повреждения нейронов. Данный метод может быть использован для дополнительной верификации тяжести и типа поражения, а также в качестве критерия оценки действия различных методов терапии в постишемический период, в частности, нейропротективных лекарственных средств.

## Литература:

1. Классификация перинатальных поражений нервной системы у новорожденных. Методические рекомендации. М. 2000; 40 с.
2. Голосная Г.С. Нейрохимические аспекты патогенеза гипоксических поражений мозга у новорожденных. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. 2005; 48 с.
3. Рогаткин С.О., Блинов Д.В., Володин Н.Н., Гурина О.И., Семенова А.В., Лебедев С.В., Петров С.В., Чехонин В.П. Перспективы применения иммуноферментного анализа нейроспецифических антигенов в перинатальной неврологии (клинико-экспериментальное исследование). Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2003; 2 (4); 8-15.
4. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Жирков Ю.А. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. М., 2000.
5. Чехонин В.П., Лебедев С.В., Блинов Д.В., Гурина О.И., Семенова А.В., Лазаренко И.П., Петров С.В., Рябухин И.А., Рогаткин С.О., Володин Н.Н. Патогенетическая роль нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера для нейроспецифических белков при перинатальных гипоксически-ишемических поражениях ЦНС. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2004; 3 (2): 50-56.
6. Berger R., Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. Brain Res Rev. 1999; 30: 107-134.
7. Blennow M., Savman K., Ilves P., Thoresen M., Rosengren L. Brain-specific proteins in the cerebrospinal fluid of severely asphyxiated newborn infants. Acta Paediatr. 2001; 90: 1171-1175.
8. Elimian A., Figueroa R., Verma U., Visintainer P., Sehgal P., Tejani N. Amniotic fluid neuron-specific enolase: a role in predicting neonatal neurologic injury? Obst. Gynecol. 1998; 92 (1): 546-550.
9. Herrmann M., Curio N., Jost S., Wunderlich M.T., Synowitz H., Wallesch C.W.. Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobio-chemical markers of the severity of traumatic brain injury. Restor. Neurol. Neurosci. 1999; 14: 109-114.
10. Missler U., Wiesmann M., Friedrich C., Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. Stroke. 1997; 28: 1956-1960.
11. Nagdyman N., Kömen W., Ko H., Muller C., Obladen M. Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy after Birth Asphyxia. Pediatric. Research. 2001; 49 (4).

## EVALUATION OF BRAIN-BLOOD BARRIER PERMEABILITY FOR NEURON-SPECIFIC ENOLASE DURING PERINATAL HYPOXIC-ISCHEMIC LESION OF THE CNS

Blinov D.V.

The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow)

**Abstract:** there is a non-diminishing interest in the assessment of the blood-brain barrier (BBB) resistance and prediction of the severity and outcomes of the perinatal hypoxic-ischemic lesion of the CNS using the analysis of concentration of neuron-specific proteins in biological fluids. This defines the objective of our study – to evaluate the dynamics of serum neuron-specific enolase (NSE) concentration over a 6-month period of life in infants with cerebral ischemia using patient stratification according to their gestational age. **Materials and Methods.** 49 infants with the perinatal hypoxic-ischemic lesion of the CNS and gestational age between 32 and 41 weeks have been examined. 28 healthy term babies comprised the control group. For comparison patients were divided into the following groups: based on the 1-minute Apgar score: 1-3 scores (group A, 1-3), 4-6 scores (group A, 4-6) and 7-9 scores (group A, 7-9); based on their gestational age (GA): GA of 32-33 weeks, GA of 34-36 weeks and GA of 37-40 weeks; babies with the intra-ventricular hemorrhages (IVH group) and periventricular leukomalacia (PVL). Serum NSE levels were measured quantitatively using the enzyme immunoassay (EIA). **Results.** A significant increase of serum NSE levels was found in groups A 1-3, A 4-6 and A 7-9 one week postpartum as compared to the control group. Over the whole observation period serum NSE concentration showed strong correlation with the severity of perinatal hypoxic-ischemic lesion of the CNS which was reflected in the Apgar score. Both during postpartum week one and further on the serum NSE levels were significantly higher in group GA 32-33 as compared to groups GA 34-36 and GA 37-41, as well as the control group. Starting from postpartum week one, serum NSE levels in the PVL group were significantly lower than in the IVH group. There was a delayed increase of serum NSE levels at postpartum week 4. **Conclusion.** The results obtained confirm the ongoing long-term abnormal BBB permeability for NSE after the perinatal hypoxic-ischemic lesion of the CNS which reflects the chronic course of a given pathology. These changes are more pronounced in babies of lower gestational age.

**Key words:** CNS, hypoxia, ischemia, blood-brain barrier, BBB, neuron-specific proteins, NSP, neuron-specific enolase, NSE.