

## **Современные методы лабораторной диагностики перинатальных поражений нервной системы у новорожденных путем определения нейроспецифической енолазы в пуповинной крови**

**С.Ф. Адамян**

*Национальный институт здравоохранения  
им. С.Х. Авдалбекяна МЗ РА  
Научно-исследовательский центр охраны здоровья  
матери и ребенка  
0051, Ереван, пр. Комитаса, 49/4*

**Ключевые слова:** новорожденный, психомоторное развитие, нейроспецифическая енолаза, пуповинная кровь

Современные подходы к оценке эффективности различных методов комплексной профилактики и терапии перинатальных поражений нервной системы включают два основных направления: динамическое клинико-инструментальное и лабораторное обследование с первых часов после рождения и до окончания неонатального периода; проспективное пролонгированное наблюдение за темпами психомоторного развития этих детей до препубертатного периода. Динамическое клинико-лабораторное наблюдение позволяет еще до появления различных изменений, выявляемых современными нейровизуализирующими методами (НСГ, КТГМ, МРТ), оценить объем и тяжесть церебральных повреждений.

Современные диагностические технологии (эхо-, электроэнцефалография, доплерометрия и др.) доказали свою эффективность для оценки состояния центральной нервной системы (ЦНС) человека [13,19,20,23]. Однако у новорожденных детей не всегда возможно объективно оценить состояние ЦНС, так как часто тяжесть поражения не соответствует клинической симптоматике, особенно у недоношенных, а проведение функциональной диагностики невозможно из-за необходимости соблюдения щадящего режима. Отсутствие четких критериев оценки тяжести поражения ЦНС затрудняет составление программ

восстановительного лечения. Поэтому у новорожденных детей актуальна проблема разработки диагностических методов, основанных на результатах лабораторных исследований. Согласно современным представлениям, в основе гипоксической энцефалопатии лежат метаболические расстройства (метаболическая катастрофа), приводящие к нарушениям фетоплацентарного кровообращения, а затем к изменениям церебрального кровотока плода.

Исследователи утверждают, что в мозгу новорожденных после перенесенной гипоксии и в силу метаболических расстройств происходит накопление, реже – дефицит тех или иных биохимических субстратов. В течение последних лет выявлены биохимические маркеры, свидетельствующие о повреждениях нервной ткани: молочная кислота, глюкоза, гормон роста, глутамат, глутаминовая кислота, N-метил- D-аспартат, аспартат-аминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, гидроксibuтиратдегидрогеназа, холин, лактат- N-ацетил-аспартат, таурин, арахидоновая кислота и ее метаболиты (6-кето-PGFO-альфа) и другие, интерлейкин-6, метаболиты пурина – гипоксантин, ксантин, неспецифическая креатининкиназа и енолаза, окись азота, нейроспецифические белки и др.

Однако такое обилие маркеров не позволяет отдать предпочтение какому-либо одному. За последние пять лет получили новый импульс исследования молекулярных механизмов гипоксических и цитотоксических повреждений головного мозга в клеточных культурах, а также пароксизмальных и нейродегенеративных форм патологии у детей [1, 6, 8, 11, 14, 17, 18, 26, 29].

Из практики медицины известны способы прогнозирования перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии. Один из них основан на определении соотношения аденозинтрифосфата (АТФ) к аденозинмонофосфату (АМФ) в крови (А.А. Афонин, Т. С. Длужевская, Т.А. Гогорян, Т.Н. Погорелова, О.Т. Пчельникова «Способ выявления детей с неврологическими нарушениями», авторское свидетельство на изобретение N 1827629, 5 G 01 N 33/52, 1993, N 26). Недостатком упомянутого способа является то, что он базируется на определении количественных показателей, подверженных индивидуальным колебаниям, кроме того, выявление неврологических осложнений осуществляется лишь у контингента детей, родившихся от женщин с индуцированной беременностью. Способ не позволяет провести дифференцировку, какое именно неврологическое нарушение развилось у ребенка, и представляет собой травматичное вмешательство, потенциально опасное инфицированием ВИЧ и вирусом гепатита В, так как сопряжен с забором венозной крови.

Другой способ состоит в оценке газового состава артериальной и венозной крови пуповины (Belay L., Goodwin T.M. et al., 1998) [37]. Недостатком этого способа также является лабильность определяемых

показателей, которые могут колебаться в зависимости от особенностей течения эмбрио-, фетогенеза и родов. Способ позволяет прогнозировать развитие перинатальных поражений ЦНС у новорожденных, перенесших интранатальную асфиксию, но при этом из поля зрения выпадает достаточно обширный контингент с относительно благоприятным течением интранатального периода и удовлетворительной оценкой по шкале Апгар.

Наиболее близким к предлагаемому способу является: «Способ диагностики неврологических осложнений у новорожденных» (В.А. Качан, авторское свидетельство на изобретение N 1830483, 5 G 01 N 33/92, 1993, N 28), состоящий в том, что у детей с перинатальной энцефалопатией с целью раннего прогнозирования определяют содержание общих фосфолипидов в плазме крови в динамике патологического процесса и при нарастании их уровня относительно исходного к месячному возрасту судят о формировании неврологических осложнений.

Однако известный способ имеет следующие недостатки: возможны индивидуальные колебания количественных показателей фосфолипидного спектра организма, зависящие от особенностей течения эмбрио-, фетогенеза, наличия сопутствующей патологии у новорожденного; неврологические нарушения прогнозируются на фоне уже имеющейся перинатальной энцефалопатии; необходимость повторного исследования общих фосфолипидов для оценки их динамики; завершение построения прогноза в отношении неврологических осложнений возможно лишь к окончанию позднего неонатального периода; необходимость нарушения целостности кожных покровов, когда для оценки фосфолипидного спектра приходится брать венозную или капиллярную кровь, что связано с травматичностью и не исключает возможности инфицирования ребенка гепатитом В, ВИЧ-инфекцией.

Изучение роли антигенов системы HLA в развитии перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии представляет определенный интерес, поскольку проливает свет на участие генетических факторов в формировании данной патологии. Направление подобных исследований оправдано, так как в литературе уже имеются упоминания об ассоциативной связи HLA-антигенов с церебральной патологией у новорожденных, в частности, с врожденными пороками ЦНС.

HLA-система является самым полиморфным комплексом из всех известных в настоящее время. Это разнообразие строения главного комплекса гистосовместимости позволяет изучить индивидуальные особенности течения, степени тяжести хронической внутриутробной гипоксии, реализация которой происходит при контакте генетически детерминированных тканевых структур организма плода с многофакторным высокодинамичным воздействием окружающей среды. В качестве такого, порой неблагоприятного, окружения или фона могут рассмат-

риваться самые разнообразные социальные, биологические, генеалогические факторы риска (курение, алкоголизм родителей, отягощенный акушерский анамнез, патологическое течение беременности и родов, наследственные заболевания в роду и др.) [12,15,22,27,32,35].

В отличие от многих клеточных антигенов других систем, именно HLA-антигены в достаточном количестве обнаруживаются в крови, что делает удобным их изучение в пуповинной крови новорожденных с предполагаемым риском развития гипоксически-ишемической энцефалопатии.

С другой стороны, согласно современным представлениям, в основе перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии лежат процессы нарушения перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности крови с развитием структурно-функциональных изменений клеточных мембран. Важнейшим последствием мембранных расстройств является патологическая проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для нейроспецифических белков (НСБ), синтезируемых в астроцитах и обладающих антигенными свойствами. В ответ на их циркуляцию в крови вырабатываются антитела, которые в последующем могут привести к аутоиммунному поражению головного мозга у новорожденных, что может проявиться позднее в виде серьезных нарушений ЦНС, вплоть до инвалидизации.

Перспективным направлением в ранней диагностике церебральных повреждений является иммунохимическое определение НСБ в различных биологических жидкостях [4,10,16,24,31].

Как уже было сказано, наиболее перспективным направлением в ранней диагностике церебральных поражений в настоящее время считают иммунохимическое определение НСБ.

НСБ тканеспецифичны для нервной системы и гистогенетически относятся к нейроэпителиальной ткани. Изучение и использование НСБ в качестве маркеров различных физиологических и патологических состояний в нейробиологии, нейрпатологии и медицине имеют важное практическое значение. Современные иммунохимические методы, используемые для выделения НСБ, их молекулярной идентификации, позволяют с высокой степенью достоверности фиксировать не только факт появления в различных биологических жидкостях тех или иных НСБ, но и отслеживать колебания их концентрации, фиксировать время и динамику изменения титров специфических аутоантител к НСБ. Одним из преимуществ иммунохимического определения НСБ в биологических жидкостях, по сравнению с другими методами диагностики, являются высокая чувствительность, диагностическая точность и малые количества (0,2 – 0,5 мкл) исследуемого материала. В целом ряде исследований [2,21,33,36], выполненных за последние годы, показано, что диагностически значимые изменения уровней НСБ

в ликворе и плазме наступают значительно раньше, чем те повреждения, которые можно выявить другими доступными методами инструментального обследования (ЭЭГ, НСГ, КТГМ, ПЭТ, доплерометрия и др.).

В исследованиях последних лет появились сообщения об информативности раннего определения комплекса биохимических (нейроспецифическая енолаза (НСЕ), основной белок миелина, глиофибрилярный кислый протеин) и иммунологических (неоптерин и интерлейкин-6) показателей в биологических жидкостях детей, перенесших перинатальную гипоксию.

Среди НСБ наиболее изученными с точки зрения биохимии и иммунологии являются глиофибрилярный кислый протеин (GFAP) – белок глиальных филаментов дифференцированных астроцитов и НСЕ – белок, специфичный для «зрелых» нейронов.

НСЕ – внутриклеточный фермент ЦНС, присутствующий в клетках нейроэктодермального происхождения (нейронах головного мозга и периферической нервной ткани). Как известно, НСЕ существует в виде пяти изоферментов –  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\alpha\gamma$  и  $\gamma\gamma$ ; считается, что наиболее информативным показателем в аспекте повреждения головного мозга является  $\gamma\gamma$ -енолаза. В настоящее время НСЕ рассматривается как один из наиболее специфичных маркеров повреждения нейронов и служит индикатором для выявления степени дифференцированности ЦНС (НСЕ обнаруживается на относительно поздних стадиях нейрональной дифференцировки, с началом синаптогенеза, т.е. после 22 нед. беременности) [3,7,28] и является фактически единственно известным в настоящее время общим маркером всех дифференцированных нейронов. Количество НСЕ возрастает параллельно с функциональным созреванием нейронов. Так как НСЕ является цитоплазматическим белком, отделенным от крови собственной мембраной нейрона и мембранами, формирующими ГЭБ, то появление его в сыворотке крови при нарушенной резистентности ГЭБ приводит к появлению анти-НСЕ-антител. При заболеваниях, сопряженных с непосредственным вовлечением нервной ткани в патологический процесс, качественные и количественные определения этого белка в спинномозговой жидкости или сыворотке крови дают ценную информацию о степени выраженности повреждений нейронов и нарушениях общей целостности ГЭБ. НСЕ также характеризует степень постишемического повреждения мозга. Установлено, что НСЕ может повышаться и при некоторых других неврологических процессах (эпилепсия, субарахноидальное кровоизлияние). По данным ряда авторов, по сравнению с уровнем НСЕ в нормальной ткани отмечалось повышение ее концентрации в тканях карциномы из островковых клеток поджелудочной железы, карциноидных опухолей, медуллярной карциномы щитовидной железы,

нейробластомы и мелкоклеточных карцином. Возможность определения уровня НСЕ в работе практического врача позволит диагностировать мелкоклеточный рак легкого, который относится к категории наиболее злокачественных опухолей и характеризуется скрытым течением, быстрым развитием, ранним метастазированием и плохим прогнозом. Экспериментальными исследованиями Siciak и Kohler [9,32,36] было показано, что повышение уровня НСЕ зависит от степени тяжести повреждения головного мозга. Этими же авторами при обследовании детей с менингитом и менингэнцефалитом была выявлена корреляционная зависимость между тяжестью патологического процесса мозга и уровнем енолазы в сыворотке крови.

Согласно данным Назаренко Г.И. [19], нормативными показателями при лабораторном определении НСЕ являются:

| мужчины   | женщины    | беременные | дети       |
|-----------|------------|------------|------------|
| <15 мкг/л | < 15 мкг/л | < 15 мкг/л | <7,39мкг/л |

Согласно экспериментальным исследованиям, мозг новорожденного ребенка в ответ на повреждение способен образовывать новые нейроны. Ранняя диагностика и своевременное лечение – это залог восстановления функций пораженных органов и систем, так как патологические изменения у маленьких детей лучше поддаются обратному развитию, коррекции; анатомо-функциональное восстановление происходит полнее, чем при запущенных изменениях с необратимыми структурными изменениями. Восстановление функций ЦНС зависит от степени тяжести первичного повреждения. Согласно исследованиям, проведенным в лаборатории клинической биохимии Научного центра здоровья детей РАМН [5], для лабораторной диагностики степени тяжести перинатальных поражений нервной системы у детей в сыворотке крови можно определять содержание особых веществ – «маркеров поражения нервной ткани» – НСЕ, которая содержится в основном в нейронах и нейроэндокринных клетках, и миелин-основного белка, входящего в состав оболочки, окружающей отростки нейронов. Увеличение их концентрации в крови у новорожденных при тяжелых перинатальных поражениях нервной системы объясняется поступлением этих веществ в ток крови в результате процессов разрушения в клетках мозга. Поэтому, с одной стороны, появление НСЕ в крови позволяет подтвердить диагноз «перинатального поражения ЦНС», а с другой – установить степень тяжести этого поражения: чем больше концентрация НСЕ и миелин-основного белка в крови малыша, тем о более тяжелом поражении идет речь.

Таким образом, наиболее перспективным направлением в ранней диагностике церебральных поражений в настоящее время считают иммунохимическое определение НСЕ, строго локализующейся в нейронах и нейроэндокринных клетках и катализирующей одну из ключевых

реакций гликолиза [3,25, 29,34]. По мнению некоторых авторов [5,30, 38], определение нейроспецифической енолазы позволит объективно оценить резервные возможности центральной нервной системы и составить адекватные восстановительные программы, что значительно сократит расходы на лечение.

*Поступила 02.12.09*

**Նորածինների նյարդային համակարգի պերինատալ ախտահարումների ախտորոշման ժամանակակից մեթոդները պորտալարային արյան մեջ նեյրոսպեցիֆիկ էնոլազայի որոշման միջոցով**

**Ս.Ֆ. Ադամյան**

Ուղեղային ախտահարումների վաղ ախտորոշման առավել հեռանկարային ուղղություն է համարվում նեյրոսպեցիֆիկ էնոլազայի իմունաքիմիական որոշումը: Վերջինիս առավելությունը ախտորոշման այլ մեթոդների նկատմամբ կայանում է բարձր զգայունության, ախտորոշիչ ճշգրտության և հետազոտվող նյութի քիչ քանակության (0,2-0,5 մլ) մեջ:

Ախտաբանական պրոցեսի մեջ նյարդային հյուսվածքի անմիջական ներգրավմամբ ուղեկցվող հիվանդությունների ժամանակ նեյրոսպեցիֆիկ էնոլազայի որոշումը ողնուղեղային հեղուկում և արյան շիճուկում տալիս են արժեքավոր տեղեկատվություն հեմատոէնցեֆալիկ բարյերի ամբողջականության խախտման և նեյրոնների ախտահարման արտահայտվածության մակարդակի մասին: Նորածինների մոտ նյարդային համակարգի պերինատալ ծանր ախտահարումների ժամանակ այս սպիտակուցի մակարդակի բարձրացումը բացատրվում է ուղեղային բջիջների քայքայմամբ և հեմատոէնցեֆալիկ բարյերի խախտմամբ:

**Modern methods of perinatal pathology diagnostics of the nervous system of newborns with the help of the neurospecific enolase definition in the umbilical blood**

**S.F. Adamyan**

The prospective direction of the early diagnosis of cerebral pathologies in newborns is the immunochemical definition of the neurospecific enolase. Compared with other diagnostic methods, its advantage lies in the heightened sensibility, diagnostic accuracy and low quantity of the researched material (0,2-0,5ml). During the diseases accompanied by a direct involvement of the neural tissue in the pathologic process, the quantity and quality definition of the neurospecific enolase

in cerebrospinal fluid and blood plasma give valuable data on the entire violation of the hematoencephalic barrier and the level of expression of the neurons pathology. In heavy perinatal pathologies of the nervous system of newborns the increase in protein level is explained by the decay of the brain cells and the violation of the hematoencephalic barrier.

### Литература

1. *Бабич Г.Н., Белопасов В.В.* Нейроиммунология, 2003, т.1, 1, с. 51-56.
2. *Баканов М.И., Алатырцев В.В., Подкопаев В.Н., Яцык Г.В.* Диагностическое и прогностическое значение нейроспецифических изоферментов креатининкиназы и енолазы при гипоксически - ишемических поражениях мозга у новорожденных детей. Медицинский научный и учебно - методический журнал, 2003, 15, с. 129-131.
3. *Березин В.А., Белик Я.В.* Специфические белки нервной ткани. Киев, 1990, с.17-19.
4. *Гончарова О. В., Баканов М. И., Муталов А. Г., Грешилов А. А., Джумагазиев А. А., Юсупова Э. С.* Современные биохимические критерии диагностики перинатальных гипоксических поражений ЦНС у новорожденных детей. Российский педиатрический журнал, 2007, 4, с. 12-16.
5. *Гончарова О.В.* Система диагностических и корригирующих технологий у детей с последствиями перинатальных гипоксических поражений ЦНС. Автореф. дис.... докт. мед.наук. М., 2008, с. 48.
6. *Горбенко Е.В., Кореновский Ю.В.* Маркеры оксидативного стресса в околоплодных водах при перинатальной гипоксии новорожденных. Мат. IV Всероссийской унив. научно-практ. конф. молодых ученых и студентов. Тула, 2005, с. 35-36.
7. *Гребенкин Б.Е., Митенькина Е.В., Ширинкина Е.В.* Диагностические критерии тяжелого гестоза у беременных с дефицитом йода. Мат. IV Рос. форума «Мать и дитя», ч.1, М., 2002, с. 244-245.
8. *Зыков В.П., Ширеторова, Д.Ч., Шадрин В.Н. и др.* Методы исследования в детской неврологии. М., 2004, с. 127.
9. *Кира Е.Ф., Гайворонских Д.И., Рябинин Г.Б.* Автоматизированный мониторинг гемодинамических показателей у беременных с гестозами. Мат. IV Рос. форума «Мать и дитя», ч.1, М., 2002, с. 50.
10. *Кореновский Ю. В. и др.* Способ ранней диагностики перинатального поражения центральной нервной системы у новорожденных. Патент Российской Федерации RU2289136. 2006.12.10.
11. *Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В., Сепиашвили Р.И.* Нейроиммунопатология: Руководство. М., 2003, с.48-50.
12. *Кулаков В.И., Серов В.Н., Демидов В.Н., Бахарев В.А.* Алгоритм перинатального мониторинга. Акуш. и гинек., 2000, 5, с.56-59.
13. *Кулаков В.И., Барашнев Ю.И.* Новорожденные высокого риска (новые диагностические и лечебные технологии). М., 2006, с. 44- 151.
14. *Манелис Э.С., Калакутский Л.И., Родкина Ю.М.* Фетальная экспресс-пульсоксиметрия. Мат. 4-го Российского научного форума "Охрана здоровья матери и ребенка, 2002", М., 2002, с. 233-234.
15. *Макацария А.Д., Бицадзе В.О.* Тромбофилические состояния в акушерской практике. М., 2001, с.499-544.
16. *Марков И.О.* Лабораторный скрининг нарушения развития плода во время беременности. <http://www.art-med.ru/>.
17. *Маршал Б.Д.* Клиническая биохимия. Пер. с англ. СПб., 2000, с. 368-370.
18. *Мурашко Л.Е., Серов В.Н., Ахмедова Е.М. и др.* Динамика уровня гомоцистеина у беременных с гестозом различной степени тяжести. Мат. V Рос. форума «Мать и дитя». М., 2003, с.143-144.

19. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М., 2006, с.345.
20. Озерова О.Е., Кудашов Н.И., Орловская И.В. и др. Роль эхоэнцефалографии в оценке структурных изменений головного мозга у новорожденных с внутриутробной герпес-цитомегаловирусной инфекцией. Ультразвуковая диагностика в акуш., гинекологии и педиатрии, 2000, 3, с. 201-211.
21. Павлова Н.Г. Антенатальная диагностика, профилактика и лечение функциональных нарушений развития ЦНС плода. Автореф. дис... докт. мед. наук. СПб., 2000, с. 36.
22. Павлова Н.Г., Фоменко Б.А., Русина Е.И. Значение функциональных и биохимических маркеров развития центральной нервной системы в антенатальном периоде для прогноза тяжести неврологических нарушений у новорожденного. Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1999, 6, с.4-9.
23. Пантюхина Г.В., Печора К.Л., Фрухт Э.Л. Диагностика нервно-психического развития детей раннего возраста. Под ред. Доскина В.А. М., 1995, с.36-44.
24. Рогаткин С.О., Турина О.Н., Володин Н.Н. Перспективы иммунологического определения нейроспецифических белков для диагностики перинатальных поражений ЦНС у новорожденных. Педиатрия, 2001, 4, с.35-43.
25. Смирнов И.Е. Современные лабораторные технологии в фундаментальных и прикладных исследованиях в педиатрии. Доклад на итоговой научной конференции, посвященной юбилею ГУ НЦЗД РАМН. М., 2005.
26. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Жирков Ю.А. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. М., 2000, с. 93.
27. Шифман Е.М., Гуменюк Е.Г., Ившин А.А. Диагностика поражений головного мозга у беременных с преэклампсией и эклампсией. Акуш. и гинек. 2004, 6, с. 6-8.
28. Эдокова А.Б. Функциональное состояние плода в родах при фетоплацентарной недостаточности. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2001, с. 46.
29. Abdel-Mageed A., Agrawal K.C. Artisan down-regulation of metallothionein increases growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Care Ther.*, 1997 4:3; p.199-207.
30. Andersen M. H., Scrama D., Thorstraten P., Becker J.C. Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2006, 126:1: p. 32 -41.
31. Beyaert R., Van Loo G., Heynink K., Vandeenabeel P. Signaling to gene activation and cell death by tumor necrosis factor receptors and FAS. *Int. Rev. Cytol.*, 2002., 214: p.225 -272 .
32. Kohler L.B., Berezin V., Bock E., Penkova M. The role of metallothionein in neuronal differentiation and survival. *Brain Res.*, 2003; 992:1: p. 128 - 136.
33. Norwitz E.R. et al. A systematic approach to the management of preterm labor. *Semin. Perinatol.*, 2001, vol. 25(4), p.223-235.
34. Noshita N., Sugawara T., Hayashi T. et al. Cooper / zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preoxygenating extracellular signal – regulated Kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci.*, 2002; 22: p. 7923 - 7930.
35. Oberhansli J., Extermann P., Jaggi E., Pfizenmaier M. Fetal echocardiography in pregnancies of women with congenital heart disease - clinical utility and limitations. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2000, vol.48, 6, p.323 - 327.
36. Siciak A. et al Urinary thiobarbituric acid- reacting substances as potential biomarkers of intrauterine hypoxia. *Arch. Pediat. Adolesc. Med.*, 2001; 155: p. 718-722.
37. Vogl M., Muller M. Tumor Markers: Review and Clinical Application (IFCC Series), 2002,
38. Wu A. Tietz Clinical guide to laboratory tests. Saunders, 2006, p.358-359.