

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»**

На правах рукописи

**Маноченко Геннадий Викторович
«Бета-амилоид как маркер гипоксически-
ишемической энцефалопатии в раннем неонатальном
периоде у доношенных новорожденных»**

**3.1.12 – анестезиология и реаниматология
диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Колесников А.Н.**

Донецк – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
РАЗДЕЛ 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГИПОКСИЧЕСКИ- ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	10
1.1. Особенности терминологии, этиология и патогенез ГИЭ.....	10
1.2. Основные патоморфологические изменения в нервной системе при ГИЭ у доношенных новорожденных. Классификация перинатального поражения ЦНС у новорожденных.....	18
1.3. Диагностика гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных.....	25
1.4. Биомаркеры при ГИЭ у новорожденных.....	29
1.5. Белки бета-амилоида (А β) как возможный маркер при ГИЭ.....	33
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1. Характеристика клинического материала.....	48
2.2. Лабораторные методы исследования.....	52
2.3. Статистические методы анализа полученных результатов.....	53
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ..	54
3.1. Исследование концентрации бета-амилоида 1-42 и его динамики в раннем неонатальном периоде в сыворотке крови у здоровых новорожденных и у детей с ГИЭ.....	54
3.2. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе контроля.....	56
3.3. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ I.....	58
3.4. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ II.....	59

3.5. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ III.....	61
РАЗДЕЛ 4. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У НОВОРОЖДЕННОГО НА ОСНОВАНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕТА-АМИЛОИДА 1-42 В ПЕРВЫЕ 6 ЧАСОВ ЖИЗНИ.....	64
РАЗДЕЛ 5.ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ...	73
ВЫВОДЫ.....	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) остается одной из самых актуальных проблем в неонатальной интенсивной терапии ввиду высокого риска развития тяжелых неврологических нарушений и летального исхода. По данным мировой статистики, частота тяжелой ГИЭ в популяции новорожденных составляет от 0,37 до 3 на 1000 родившихся живыми [Nayakawa M.; 2014]. По оценкам, каждый год во всем мире у 1,15 миллиона младенцев развивается гипоксически-ишемическая энцефалопатия [Lee A. C.; 2013]. ГИЭ до настоящего времени определяется совокупностью симптомов у новорожденного, и окончательного способа диагностики нет. [D'Alton M. E.; 2014]. Присутствие мекония в околоплодных водах, отслеживание патологических паттернов сердечного ритма плода на кардиотокографии, оценка по шкале Апгар, газы крови в пупочной артерии и физикальное обследование – это инструменты, которые в настоящее время используются для выявления неонатальной энцефалопатии у плода и новорожденного, но все они как по отдельности, так и в совокупности не имеют достаточной точности. Амплитудно-интегрированная электроэнцефалография (аЭЭГ) может обнаруживать ранние изменения, связанные с повреждением головного мозга, и используется для прогнозирования кратко- и долгосрочных результатов, однако терапевтическая гипотермия может снизить тяжесть прогноза ГИЭ, магнито-резонансная томография (МРТ) требует седации пациента и его транспортировку к месту диагностики, а ее данные, хотя и достаточно информативны, позволяя осуществлять долговременный прогноз, не достоверны в первые 4-5 дней жизни новорожденного. Еще одной из основных проблем, которую необходимо решить, остается раннее выявление

и сортировка детей с ГИЭ легкой от средней степени тяжести и тяжелой. Доступность таких методов лечения, как общая гипотермия, которая должна быть начата в течение 6 часов после рождения, делает критически важным быстрое выявление ребенка с неврологическим повреждением. Как объективно и количественно идентифицировать новорожденного с перинатальным поражением головного мозга, можно решить, заимствуя подход из исследования черепно-мозговой травмы у детей старшего возраста и взрослых, у которых для этих целей были использованы различные биомаркеры. Таким образом, разработка маркеров диагностики гипоксически-ишемической энцефалопатии для оценки динамики и выраженности данного процесса, имеет на настоящий момент большое значение как для уточнения патогенеза заболевания, выявления новых мишеней терапии, так и для клинического представления о природе неврологического дефицита конкретного больного, прогнозирования темпа прогрессирования болезни. В настоящее время накоплено достаточно много данных указывающих на то, что протеины бета-амилоида участвуют в процессах активации глутаматно-кальциевого стресса, цитотоксичной активности, активации апоптоза, проявляют свое участие в системе врожденного иммунитета, регулируют процессы нейровоспаления и нейродегенерации. Эти же механизмы участвуют в патогенезе неонатальной ГИЭ. Трехмерная структура остатков Аβ 1-42 принимает двойной подковообразный перекрестный β-лист с максимально скрытыми гидрофобными боковыми цепями, в котором остатки 1-14 частично упорядочены и находятся в конформации β-цепи, которая является более нейротоксичным видом среди иных вариантов бета-амилоида [Chen G. ; 2017]. В экспериментальном исследовании [Benterud T. ; 2015] установлено, что уровень бета-амилоида 1-42 в цереброспинальной жидкости был значительно ниже у свиней, подвергнутых сильной гипоксии, по сравнению с контрольной группой, соответственно. В единственном найденном нами по данной теме клиническом исследовании [Benavente-

Fernandez I.; 2018] было отмечено, что уровни $A\beta$ 1-42 были ниже у пациентов с ГИЭ и говорится о необходимости дальнейших исследований для изучения его роли в неонатальной ГИЭ. Закономерно, что на основании этого мы предположили что $A\beta$ 1-42 может быть возможными прогностическими биомаркером ГИЭ у новорожденных, чему и посвящено настоящее исследование.

Цель: разработать новый способ диагностики тяжести гипоксически-ишемической энцефалопатии у доношенных новорожденных в отделении интенсивной терапии путем изучения маркера бета-амилоида 1-42 для усовершенствования интенсивной терапии.

Задачи:

1. Определить уровень бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови доношенных новорожденных с явлениями ГИЭ в раннем неонатальном периоде.

2. Изучить корреляции полученных данных о средней концентрации бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови в зависимости от степени тяжести ГИЭ в группах пациентов.

3. На основании полученных данных определить диагностическую значимость исследованного маркера, а также возможность применения его в качестве экспресс диагностики ГИЭ.

4. Разработать на основе определения концентрации бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови математическую модель раннего прогнозирования развития у новорожденных ГИЭ и направления интенсивной терапии.

Научная новизна. Впервые получены данные о содержании бета-амилоида 1-42 при гипоксически-ишемической энцефалопатии в раннем неонатальном периоде у новорожденных. Впервые определены референтные значения бета-амилоида 1-42 в раннем неонатальном периоде у здоровых новорожденных. Впервые определена диагностическая значимость исследованного маркера в качестве экспресс диагностики развития ГИЭ у новорожденных. Впервые выявлена достоверная разница

показателей в зависимости от степени тяжести ГИЭ. Впервые определена динамика бета-амилоида 1-42 в раннем неонатальном периоде у здоровых доношенных и у новорожденных с проявлениями ГИЭ. Впервые на основании полученных данных о концентрации бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови определены возможные направления усовершенствования интенсивной терапии ГИЭ у новорожденных в раннем неонатальном периоде в виде: уточнения категории пациентов для гипотермии; применения иммуноглобулина и мелатонина для модификации уровня бета-амилоида 1-42.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что:

1. Установлено статистически значимое отличие по уровню в сыворотке крови бета-амилоида 1-42 при ГИЭ легкой, умеренной и тяжелой степени тяжести.

2. Определены референтные значения в сыворотке крови бета-амилоида 1-42 в раннем неонатальном периоде у здоровых новорожденных.

3. На основе определения концентрации в сыворотке крови бета-амилоида 1-42 предложена математическая модель раннего прогнозирования развития у новорожденных ГИЭ.

4. На основании полученных данных предложены возможные изменения в направлениях интенсивной терапии, в зависимости от показателей бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови.

Дизайн исследования: моноцентровое, контролируемое, проспективное, динамическое клиническое исследование от момента рождения ребенка до 7 суток жизни.

Объект исследования: ГИЭ в раннем неонатальном периоде у доношенных новорожденных.

Предмет исследования: уровни бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови у доношенных новорожденных с ГИЭ в раннем неонатальном

периоде.

Методы исследования: клинический, биохимический, статистический, аналитический.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Установлено, что референтные значения в сыворотке крови бета-амилоида 1-42 у здоровых новорожденных в раннем неонатальном периоде составили: через 6 часов после рождения $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; $Me=247,6$; (187,3- 300), через 72 ч. – $211,1 \pm 63,4$ пг/мл; $Me=221,3$; (80,6-299,2), а через 168 ч. $179,1 \pm 85,8$ пг/мл; $Me=174,1$; (56,4-298,6).

2. Концентрация бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови имеет обратную корреляцию со степенью тяжести гипоксически-ишемической энцефалопатии.

3. Концентрация бета амилоида 1-42 в сыворотке крови у здоровых новорожденных и детей с легкой степенью ГИЭ во все периоды до 72 часов жизни наблюдения оказалась достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у детей с умеренной и тяжелой степенью ГИЭ. Достоверно ($p < 0,001$) более высокая концентрация маркера сохраняется до конца 168 часов жизни у здоровых детей, по сравнению с группой новорожденных с любой степенью ГИЭ.

4. Разработанная математическая модель раннего прогнозирования развития у новорожденных ГИЭ на основании средней концентрации бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови может быть использована в качестве метода экспресс диагностики развития ГИЭ у новорожденных в первые 6 часов жизни с диагностическими характеристиками: чувствительность – 63,6%; специфичность – 94,7%; эффективность – 79,2%; прогностическая ценность положительного результата – 70,0%; прогностическая ценность отрицательного результата – 93,1%.

Степень достоверности и апробация результатов и личный вклад автора. Совместно с научным руководителем, автором была составлена идеология исследования, проводилась обработка данных, обобщение и

анализ материалов. Клинические этапы исследований проводились автором лично. Выбор групп исследования, методы обследования, литературный обзор, анализ материала, выводы и практические рекомендации проводилось автором, под руководством д.м.н., доцента, зав. кафедрой анестезиологии, реанимации и неонатологии ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО Колесникова А.Н. Лабораторная часть исследования проводилась в ЦНИИЛ ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО (г. Донецк), под руководством к.хим.н., доцента, зав. ЦНИИЛ Хомутова Е.В.

Апробация и реализация результатов диссертации. Научные разработки о роли бета-амилоида 1-42 как возможного маркера при гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных и возможных путях усовершенствования проводимой интенсивной терапии ГИЭ используются в курсах лекций на кафедре анестезиологии, реаниматологии и неонатологии ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО. Результаты работы представлены на XXII Всероссийском научно-образовательном форуме "Мать и Дитя - 2021". Практические разработки настоящего исследования: использование бета-амилоида 1-42 в качестве метода экспресс диагностики риска развития ГИЭ у новорожденных в первые 6 часов жизни используются в акушерском отделении МБУЗ «ЦРБ» зерноградского района Ростовской области (г. Зерноград).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК ДНР – 3.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», раздела собственных исследований и математического моделирования, анализа и заключения в виде выводов и практических рекомендаций, списка использованной литературы, списка сокращений, приложения. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 7 рисунками, 3 диаграммами. Список использованной литературы изложен на 20 страницах и включает 173 источника, из которых 156 – латиницей, 17 – кириллицей.

РАЗДЕЛ 1.СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Особенности терминологии, этиология и патогенез ГИЭ

Единая терминология перинатальных поражений нервной системы отсутствует. Отечественные и зарубежные исследователи обычно применяют термины «перинатальная энцефалопатия», «нарушение мозгового кровообращения», «церебральная дисфункция», «гипоксически-ишемическая энцефалопатия» и т.д. Отсутствие единой терминологии связано с однотипностью клинической картины при различных механизмах поражения головного мозга, что обусловлено незрелостью нервной ткани новорождённого и её склонностью к генерализованным реакциям в виде отёчно-геморрагических и ишемических явлений, проявляющихся симптоматикой общемозговых расстройств.

Чтобы избежать терминологической путаницы, говоря о перинатальном поражении центральной нервной системы (ЦНС), мы понимаем следующее - перинатальное поражение центральной нервной системы (ПП ЦНС) – группа патологических состояний, обусловленных воздействием на плод (новорождённого) неблагоприятных факторов в антенатальном периоде, во время родов и в первые 7 дней жизни после рождения.

Основным проявлением перинатального поражения ЦНС является неонатальная энцефалопатия (НЭ). Неонатальная энцефалопатия – это комплексное заболевание, характеризующееся изменением уровня сознания, судорогами, нарушением мышечного тонуса и возможности инициировать или поддерживать дыхание, которое связано с

полиорганными нарушениями [165, 150]. Заболеваемость НЭ составляет 3 на 1000 живорожденных [105].

Энцефалопатия может развиваться вследствие широкого спектра причин, клинический термин не определяет ее этиологию. Единственно доступным методом лечения с доказанной эффективностью является терапевтическая гипотермия (ТГ), которая наиболее эффективна при применении в первые 6 ч. жизни [54]. Этиология НЭ многообразна, и ее можно классифицировать следующим образом [36]:

- прегравидарные факторы риска;
- судороги в семейном анамнезе;
- неврологические заболевания;
- лечение бесплодия;
- социально-экономический статус;
- материнские факторы риска: антенатальные: гипертензия, сахарный диабет, гипотиреоз, задержка внутриутробного развития, преэклампсия, переносимость, материнские кровотечения, многоплодная беременность; и интранатальные: преждевременный разрыв плодных оболочек, гипоксия, отслойка плаценты;
- патология плаценты: фунизит, хориоамнионит, васкулит и тромботическая васкулопатия у плода, хронический виллит, преждевременное созревание плаценты, присутствие ядросодержащих эритроцитов;
- гипоксия-ишемия: интранатальная асфиксия, острое событие (отслойка плаценты);
- перинатальная инфекция: бактериальная инфекция, TORCH-инфекции;
- неонатальный инсульт/тромбофилия. Нарушения коагуляции: полицитемия, фактор V Лейдена, патология гемоглобина, мутации протромбина;

- метаболические нарушения: митохондриальные болезни; органические ацидемии, дефект цикла мочевины, некетоацидотическая гиперглицинемия;

- врожденные болезни обмена веществ (сульфитоксидаза, цитохром С, ГАМТ- и ГЛУТ 1 дефицит, ГАМК трансаминаза, фактор молибдена, дигидропиримидин дегидрогеназа);

- генетические и эпигенетические: врожденные пороки сердца, полиморфизм генов MTHFR, фактора некроза опухоли (ФНО), интерлейкина 6 (ИЛ-6); наследственные неонатальные миопатии, ассоциированные с энцефалопатией; DMPK мутация;

- сочетание вышеприведенных факторов.

Эта классификация, предложенная Aslam S., Strickland T., Molloy E.J. [36] в обзоре, посвященном неонатальной энцефалопатии, достаточно хорошо перекликается и с отечественными данными. Так в Федеральных клинических рекомендациях по оказанию медицинской помощи детям с последствиями перинатального поражения ЦНС [12] говорится, что среди причин перинатальных поражений мозга ведущее место занимает внутриутробная и интранатальная гипоксия плода, второе по значимости место принадлежит фактору механической травматизации ребенка в процессе родов – как правило, в сочетании с той или иной выраженностью, предшествующей внутриутробной гипоксии. Также в структуру этиопатогенетических факторов перинатальной патологии включают инфекционные (в том числе вирусные) и токсико-метаболические варианты поражения нервной системы.

Таким образом, среди факторов, обуславливающих перинатальное поражение ЦНС, выделяют следующие:

1. Внутриутробная гипоксия плода.
2. Интранатальная гипоксия плода.
3. Механическая травматизация в процессе родов.
4. Инфекционные (вирусные) факторы.

5. Токсические факторы.
6. Наследственные факторы.
7. Сочетание перечисленных факторов.

При неонатальной энцефалопатии, вне зависимости от причин, приведших к ее возникновению, обязательным звеном патогенеза является гипоксия-ишемия.

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия — это тип энцефалопатии, вызванный системной гипоксемией и / или снижением церебрального кровотока в результате острой послеродовой или интранатальной патологии.

ГИЭ — это широкий термин, используемый для обозначения любого вреда, который ребенок испытывает вовремя или незадолго до рождения. Другие термины, используемые для ГИЭ, включают асфиксию при рождении, перинатальную асфиксию и неонатальную энцефалопатию.

В целом, говоря о патогенезе гипоксически-ишемической энцефалопатии, можно выделить несколько цепочек:

внутриутробная гипоксия → снижение насыщения кислородом и повышение насыщения углекислотой, ацидоз у плода → внутриклеточный отек → набухание мозговой ткани → локальное снижение мозгового кровотока → генерализованный отек мозга → повышение внутричерепного давления → генерализованное снижение мозгового кровотока → некроз мозгового вещества;

внутриутробная гипоксия → снижение насыщения кислородом и повышение насыщения углекислотой, ацидоз у плода → снижение сосудистой ауторегуляции → снижение мозгового кровотока → некроз мозгового вещества → отек головного мозга [11].

В патогенезе ГИЭ выделяют фазы первичного и вторичного повреждения нервной ткани. Первичное повреждение развивается в момент воздействия ведущего этиологического фактора (или их совокупности) НЭ и характеризуется необратимой гибелью клеток

головного мозга, объем которой зависит от глубины и длительности возникающей при этом гипоксии. Вторичное (отсроченное) активизируется в фазу реоксигенации-реперфузии спустя 2-12 ч после первичного повреждения и вызывается активизацией ряда патогенетических механизмов, приводящих к гибели уцелевших тканей мозга, увеличению объема нейронального повреждения и ухудшению прогноза для жизни и здоровья [60, 118].

Механизмы вторичного повреждения нейрональной ткани:

1. Гипоксия и энергодефицит.
2. Глутамино-кальциевый стресс.
3. Цитокиновая активность.
4. Свободнорадикальное повреждение.
5. Активация апоптоза.

Рассмотрим их немного подробнее:

Гипоксия и энергодефицит. Гипоксическое повреждение заключается в снижении поступления кислорода в мозговую ткань с резким снижением синтеза высокоэнергетических фосфатов, в частности аденозин трифосфата (АТФ). Для сохранения синтеза энергии активируется анаэробный путь гликолиза, но ввиду 19-кратно меньшей энергоэффективности быстро развивается внутриклеточный энергодефицит. Нейроцит в условии энергодефицита не способен обеспечить поддержание нормальной работы K^+/Na^+ -АТФазы с развитием гипернатригистии, набуханием и гибелью нейроцитов и глиальных элементов. На фоне развившегося отека головного мозга происходит снижение церебрального кровотока (вторичная ишемия), усиливающее гипоксию. Нейрональная ткань частично компенсирует это 10-кратным ускорением анаэробного гликолиза с повышением захвата глюкозы, синтеза лактата и развитием внутриклеточного ацидоза, критические значения которого также ведут к клеточной гибели [166].

Глутаминовый стресс. В условиях гипоксического стресса, а также при гибели нейроцитов происходит массивное выделение возбуждающих нейромедиаторов, в частности аминокислоты глутамата с повышением его концентрации во внеклеточной среде. При этом ситуация усугубляется нарушением АТФ-зависимого обратного захвата глутамата. В сером веществе головного мозга источником глутамата являются нейроны, в белом веществе – олигодендроциты и аксоны, астроциты, а также, возможно, микроглия. При высвобождении глутамат активирует специфические рецепторы, в частности NMDA и AMPA, действующие как ионные каналы. NMDA-рецептор при возбуждении функционирует как кальциевый канал, AMPA – как натриевый, но вследствие незрелости субъединицы GluR2 у новорожденных он проницаем и для ионов кальция. В незрелом мозге экспрессия рецепторов NMDA и AMPA выше, чем у взрослых, что обуславливает более высокую чувствительность головного мозга новорожденного к высвобождению глутамата. Ряд работ также предполагает повышенную экспрессию глутаматных рецепторов в коре головного мозга, гиппокампе, базальных ганглиях, таламусе, а также в некоторых стволовых ядрах незрелого мозга человека, что обуславливает региональную чувствительность этих структур к перенесенной гипоксии-ишемии. Механизм глутамин-опосредованной нейрональной гибели заключается в стойкой активации рецепторов NMDA и AMPA с нарушением натриевого градиента и последующим лизисом (первичное повреждение), а также с нарушением кальциевого градиента, накоплением внутриклеточного кальция и запуском кальциевого стресса (вторичное, отсроченное повреждение) [75, 114, 40, 61, 113, 143, 64].

Кальциевый стресс. Глутамат-ассоциированная активизация кальциевых каналов и энергодефицит с нарушением работы АТФ-зависимых кальциевых каналов, поддерживающих мембранный кальциевый градиент, ведут к массивному поступлению кальция в нейрональные клетки. Неблагоприятное действие кальция опосредовано

активацией кальцийзависимых ферментных систем, в результате которой происходит разрушение фосфолипидов мембран клетки, белковых структур, ДНК и РНК, а также разобщение окислительного фосфорилирования, что вкуче приводит к гибели клетки [152].

Цитокиновый стресс. Вследствие воздействия гипоксии-ишемии в ткани головного мозга развивается асептическое воспаление, сопровождаемое активацией микроглии в нейрональной ткани и нейтрофилов в сосудах головного мозга. Следствие этой активации – выделение ряда нейротоксичных факторов (цитокины, NO, кислородные свободнорадикальные частицы) в первые 4-8 ч. после перенесенной гипоксии-ишемии, потенцирующих нейрональное повреждение [116, 100].

Свободнорадикальное повреждение. В условиях гипоксии-ишемии нарушается работа митохондриальной электрон-транспортной системы и в стадию реоксигенации-реперфузии начинает образовываться большое количество кислородных свободнорадикальных частиц с последующим выделением промежуточных продуктов, в частности супероксид-аниона. Также источником свободнорадикальных частиц являются активированные клетки иммунной системы. Лавинообразный синтез свободных радикалов приводит к повреждению клеточных структур (липиды, белки, ДНК) и к гибели клетки по некротическому или апоптозному пути. В ответ на оксидативный стресс в зрелом головном мозге активируется ферментная защитная система, нейтрализующая кислородные свободнорадикальные частицы: супероксид-дисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза. Незрелая мозговая ткань менее устойчива к воздействию свободных радикалов вследствие незрелости каталазы и глутатионпероксидазы, а также снижения их активации, богатого содержания полиненасыщенных жирных кислот и более высокой по сравнению со зрелой мозговой тканью концентрации свободного железа. Еще один источник свободных радикалов – оксид азота (NO), в норме являющийся важным сигнальным агентом и нейротрансмиттером. В

условиях гипоксии-ишемии происходит увеличение экспрессии эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS) NO-синтазы. В поздний период гипоксии-ишемии-реперфузии происходит активация третьей формы (индуцируемой) NO-синтазы (iNOS). В первые минуты и часы воздействия массивно синтезируемый оксид азота обладает положительным эффектом, в первую очередь за счет вазодилатации и улучшения церебральной микроциркуляции, а также, возможно, за счет нитролиза и ингибирования NMDA-каналов. Отрицательный эффект проявляется в фазу реперфузии-реоксигенации, когда оксид азота взаимодействует с супероксид-анионом (O_2^-) с образованием пероксинитрита, токсичной реактивной азотной частицы ($ONOO^-$), вызывающей повреждение мембран, ингибирование цитохромоксидазы и нейрональную гибель (некроз). Кроме того, оксид азота обладает генотоксичностью, вызывая активацию апоптоза [47, 44, 172, 80, 99, 20, 55, 111].

Активация апоптоза. Апоптоз – одна из форм программированной гибели клетки, возникает вследствие активации специфических генов и синтеза продуктов их транскрипции. В отличие от некроза, апоптоз характеризуется отсутствием лизиса мембран, сморщиванием клетки и всех ее органелл, концентрацией хроматина. Сморщенная, погибшая клетка, подвергнутая апоптозу, быстро подвергается фагоцитозу, внутриклеточные компоненты не попадают в окружающий интерстиций, не развивается воспалительного ответа. Время гибели, в отличие от некроза, варьирует от нескольких часов до нескольких дней после воздействия неблагоприятного фактора, являясь отсроченной формой гибели. Как и некроз, апоптоз встречается практически во всех областях ЦНС – в кортикальных нейронах и базальных ядрах, нейронах понтосубикулярной области, премиелинизирующих олигодендроцитах, нейронах мозжечка, спинного мозга. В ряде исследований, проведенных *in vivo* и *in vitro*, выявлена большая предрасположенность незрелой ткани к

апоптозной модели нейрональной гибели, при созревании же модель нейрональной гибели смещается от апоптоза к некрозу. Инициаторами апоптоза служат активные формы кислорода, оксид азота, глутамат-кальциевый стресс. Центральную роль в механизме апоптоза играет ряд цистеиновых ферментов, носящих название «каспазы», которые являются маркерами активации апоптоза [129, 159, 163, 56]. Таким образом, ГИЭ это вид неонатальной энцефалопатии, в основе которой лежит гипоксия-ишемия, а в патогенезе важнейшее значение имеет взаимодействие процессов нейровоспаления и нейродегенерации. Повреждение аксона и нейрона может являться прямым и опосредованным следствием воспалительного процесса.

1.2. Основные патоморфологические изменения в нервной системе при ГИЭ у доношенных новорожденных. Классификация перинатального поражения ЦНС у новорожденных.

Патогенез гипоксически-ишемической энцефалопатии нашел свое отражение в выявляемых патоморфологических изменениях в нервной системе при ГИЭ [86]. Для доношенных основные нейроморфологические паттерны при ишемически-гипоксических поражениях головного мозга систематизированы в Таблице 1.1. [11].

Таблица 1.1. Основные нейроморфологические паттерны при ишемически-гипоксических поражениях головного мозга у доношенных новорожденных

Паттерн поражения	Локализация	Долгосрочный прогноз
Селективный или диффузный некроз нейронов	Кора головного мозга Таламус Мозжечок Ствол головного мозга Спинной мозг	Спастическая квадриплегия Интеллектуальная недостаточность Стволовая дисфункция Судороги
Парасагитальное поражение мозга	Парасагитальное корковое вещество и подкорковое белое вещество	Спастическая квадриплегия Интеллектуальная недостаточность

<i>Продолжение Таблицы 1.1.</i>		
Фокальный или мультифокальный церебральный некроз	Кора головного мозга подкорковое белое вещество по зонам кровоснабжения	Гемипарез Фокальные припадки
Status marmoratus базальных ганглиев	Базальные ганглии Таламус	Хореоатетоз Задержка психического развития

Представления о клинической картине гипоксически-ишемических поражений головного мозга новорожденных, несмотря на очевидность их основных проявлений, достаточно противоречивы.

Эта противоречивость заключается, в основном, в сложности определения границ между физиологическими адаптационными состояниями периода новорожденности, которые могут проявляться так же, как и гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) (например, тремором, скованностью или угнетением). Кроме того, нет единства в представлениях о длительности течения и периодах ГИЭ. В настоящее время сформировались 2 основных принципа в подходе к клинической картине гипоксических поражений головного мозга: стадийный (фазовый) и синдромологический. Первый из этих подходов преобладает за рубежом, второй – в странах СНГ. Эти различия нашли свое отражение и в классификации перинатального поражения ЦНС у новорожденных [11].

Первая и наиболее популярная у неонатологов классификация гипоксической энцефалопатии была предложена Н. В. Sarnat и М. S. Sarnat в 1976 г. [147].

Необходимо, подчеркнуть следующие особенности этой классификации:

1. Рассматривается ряд основных показателей новорожденного (уровень сознания, нервно-мышечный контроль, комплексные рефлексy,

вегетативная функция, наличие судорог, данные электроэнцефалографии (ЭЭГ), который проходит определенную динамику во времени.

2. Авторами выбраны несколько наиболее информативных показателей в каждой рубрике, что в значительной степени упрощает диагностику энцефалопатии и дает ей четкие диагностические критерии.

3. В рамках каждой из стадий энцефалопатии отмечается сочетание явлений, которые подчеркивают разнонаправленность и противоречивость клинической картины postanоксической энцефалопатии.

4. Значительное место в клинической картине придается вегетативной дисфункции.

5. ЭЭГ является неотъемлемой составной частью диагноза.

Позднее канадские неонатологи N. N. Finer и соавт. [91] предложили модификацию этой классификации: сохраняя черты классификации Н. В. Sarnat и соавт., эта классификация еще более проста, в ней появляются расстройства терморегуляции, уменьшено количество рассматриваемых показателей, исключены ЭЭГ и временные показатели течения болезни.

В Великобритании широко используется классификация гипоксически-ишемической энцефалопатии L. M. S. Dubowitz и соавт. [65]. Данная классификация отличается от предыдущих, следующими особенностями:

1. Данная классификация состоит из четырех стадий.

2. В ней отсутствует понятие сознания новорожденного, существование которого отрицают британские неонатологи, и появляется понятие *habituation* (привыкание, адаптация), означающее изменение реакции ребенка на повторные однородные стимулы одинаковой интенсивности. Таким образом, термин «адаптация» можно расценить как синоним стресса.

3. В различных стадиях энцефалопатии отсутствует универсальная рубрикация и эти стадии имеют разное количество клинических признаков.

4. Особое значение придается отдельным клиническим феноменам, в частности, динамике положения большого пальца руки.

J. J. Volpe [167] классифицирует гипоксически-ишемическую энцефалопатию в зависимости от времени, прошедшего с момента рождения. В первые 12 часов после рождения отмечается глубокий ступор или кома, периодическое дыхание, сохранение зрачковых реакций и движения глаз, мышечная гипотония и минимальные движения, судороги; в период от 12 до 24 ч выявляется очевидное восстановление уровня сознания, чаще встречаются судороги, возникают приступы апноэ, повышенная возбудимость и тремор со скованностью (jitteriness), мышечная слабость, преимущественно проксимальная и в верхних конечностях, гемипарез (у доношенных детей) или нижний парепарез (у недоношенных детей). От 24 до 72 ч. у ребенка снова отмечается ступор или кома, возникают остановка дыхания, стволовые глазодвигательные и зрачковые нарушения, у недоношенных детей отмечается катастрофическое ухудшение состояния вследствие интравентрикулярного кровоизлияния. После 72 ч. возникают постоянный или даже уменьшающийся ступор, нарушение сосания, глотания, движений языка, отсутствие крика, преобладание мышечной гипотонии над гипертонией, мышечная слабость с распределением, характерным для периода 12-24 ч. По мнению автора этой периодизации, темпы выхода из описанных состояний крайне вариабельны и трудно прогнозируемы.

G. M. Fenichel [76] сопоставляет стадии первой классификации и временные рамки течения энцефалопатии, выделяя легкую энцефалопатию, умеренную и тяжелую. Наряду ЭЭГ-признаками тяжести ГИЭ, G. M. Fenichel включает в диагностическую схему

вызванные потенциалы головного мозга, диагностическая и прогностическая значимость которых приобретает решающее значение при умеренной энцефалопатии. Автор подчеркивает, что явление jitteriness, характерное для легкой энцефалопатии, не имеет никакой связи с явлениями гиперактивности и проблемами обучения у детей старшего возраста.

J. L. Wayenberg и соавт. [62] оценивают неврологический статус новорожденного после асфиксии по уровню сознания, дыхательному паттерну, состоянию рефлекса Моро и хватания.

На территории стран СНГ наиболее распространена классификация поражений нервной системы у новорожденных и детей раннего возраста Ю. А. Якунина и соавт. [2, 10, 4].

В рамках этой классификации как частное проявление патологии нервной системы этого периода рассматривается гипоксическая энцефалопатия. В классификации Ю. А. Якунина и соавт. рассматривают периоды действия вредного фактора, этиология (доминирующий фактор), в которой, кроме гипоксии, упоминаются травма, инфекция, интоксикация, врожденные нарушения метаболизма, хромосомные aberrации, неуточненные и неклассифицируемые состояния. Далее оценивается форма энцефалопатии по степени тяжести с расшифровкой патоморфологических и патогенетических механизмов, лежащих в основе этих нарушений. Затем рассматривают периодизацию болезни, начиная с острого периода (от 7-10 дней до 1 месяца), затем оценивают подострый период, или ранний восстановительный период (до 3 месяцев), и, наконец, поздний восстановительный период (от 4 месяцев до 1 года, иногда до 2 лет). Среди уровней поражения указываются оболочки мозга, кора головного мозга, подкорковые структуры, ствол, спинной мозг, периферические нервы, сочетанные формы. В последней рубрике оцениваются клинические синдромы основных периодов энцефалопатии: к синдромам острого периода относятся повышенная

нейрорефлекторная возбудимость, синдромы общего угнетения ЦНС, вегетативно-висцеральных дисфункций, гидроцефально-гипертензионный, судорожный, коматозное состояние.

Комментируя эту классификацию, необходимо отметить следующие ее особенности:

1. Данная классификация является классификацией негипоксической энцефалопатии и негипоксических поражений головного мозга, а классификацией поражений нервной системы у новорожденных и детей раннего возраста.

2. По сути дела, данная классификация представляет собой перечень или систематику всех возможных состояний нервной системы этого возрастного периода.

3. В настоящей классификации проведены жесткие параллели между звеньями патогенеза, особенностями морфологических изменений, клинической картиной и результатами дополнительных методов исследований (в описательном приложении к классификации).

4. В данной классификации гипоксическая энцефалопатия, как и большинство других перинатальных поражений нервной системы, рассматривается как длительный (лонгитудинальный) процесс.

В классификации отсутствуют и даже не обсуждаются границы между физиологическими адаптационными состояниями нервной системы и клиническими синдромами. Рассматриваемая классификация не позволяет, даже в описательной части, провести четкое различие некоторых синдромов как острого, так и восстановительного периодов. В настоящее время наибольшее признание среди специалистов в области неонатологии РФ получила классификация перинатальных поражений нервной системы у новорожденных, предложенная сотрудниками кафедр детской неврологии и неонатологии факультета усовершенствования врачей Российского государственного медицинского университета [8]. В соответствии с рассматриваемой в

настоящей работе проблемой ГИЭ данная классификация выглядит следующим образом (Таблица 1.2). Данная классификация явилась шагом вперед в систематике перинатальных поражений ЦНС. В ней отражены современные представления о патогенезе, клинической картине и диагностических возможностях при перинатальном поражении центральной нервной системы у новорожденных, а ее основные клинические показатели сопоставлены с МКБ -10.

Таблица 1.2. Гипоксические поражения нервной системы

Патогенетическая характеристика	Нозологическая форма	Основные клинические симптомы и синдромы
I. A) P 91.0 Церебральная ишемия	Церебральная ишемия I степени (легкая)	Возбуждение и/или угнетение ЦНС (не более 5-7 суток)
	Церебральная ишемия II степени (средней тяжести)	1. Угнетение ЦНС и/или возбуждение (более 7 дней) 2. Судороги 3. Внутричерепная гипертензия 4. Вегетативно-висцеральные нарушения
	Церебральная ишемия III степени (тяжелая)	1. Прогрессирующая потеря церебральной активности свыше 10 дней Угнетение → кома Угнетение → возбуждение → судороги Угнетение → судороги → кома 2. Судороги (возможен эписетус) 3. Дисфункция стволовых отделов мозга 4. Декортикация 5. Децеребрация 6. Вегетативно-висцеральные нарушения 7. Прогрессирующая внутричерепная гипертензия

1.3. Диагностика гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных

Диагностика гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных основывается на данных изучения течения беременности и родов, неврологического обследования, изучения метаболических показателей новорожденных, а также ряда дополнительных методов исследования (ультразвуковых – нейросонография (НСГ), доплерография; различных видов томографии – компьютерная томография (КТ), магнито-резонансная томография (МРТ); нейрофизиологических – ЭЭГ, полиграфия вызванных потенциалов; данных диагностических пункций – люмбальной, субокципитальной и т.д.) [11].

Для определения интранатальной асфиксии существуют критерии, предложенные Американской коллегией акушеров и гинекологов:

1. Обязательные критерии: метаболический ацидоз; $\text{pH} < 7.0$ и $\text{Be} < 16$ ммоль/л; ранние неврологические осложнения; церебральный паралич; исключение другой патологии (травма, патология свёртывающей системы крови, инфекция, генетические заболевания).

2. Дополнительные критерии: эпизод гипоксии перед или во время родов; внезапная и продолжающаяся брадикардия или отсутствие variability ритма плода при продолжающейся гипоксии; 0–3 балла по шкале Апгар более 5 минут. Низкая оценка по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах используется как индикатор ГИЭ [173].

Эта оценка является показателем для объективизации состояния ребёнка и проверкой эффективности реанимационных мероприятий. Была оценена взаимосвязь баллов по шкале Апгар на 10-й минуте с исходом: смерть или инвалидность наступала в 75% (64/85 детей) случаев с 10-минутной шкалой Апгар ниже 3 баллов и в 45 % (40/89 детей) случаев с 3 баллами и выше. 5 из 24 детей с 10-минутной оценкой по шкале Апгар 0 выжили без какой-либо потери трудоспособности [34].

Всем детям с ГИЭ II и III степеней тяжести требуется проведение амплитудно-интегрированной ЭЭГ (аЭЭГ). АЭЭГ новорождённых с ГИЭ, у которых в первые 6 часов жизни регистрируется постоянный фоновый паттерн с нормальным вольтажем, может свидетельствовать о благоприятном неврологическом исходе. Если аЭЭГ представлена паттерном вспышка – угнетение, паттерном с низким вольтажем, присутствуют вспышки эпилептической активности в первые 24-48 часов жизни, что связано с высоким риском смерти или серьёзных неврологических отклонений [70, 27, 136, 69].

Данные аЭЭГ используются в качестве критериев для начала лечебной гипотермии. Многоканальная ЭЭГ применяется для оценки степени тяжести ГИЭ, диагностирования субклинических судорог и прогнозирования исхода, особенно при проведении серийных исследований [66, 68].

Положительная динамика результатов ЭЭГ в течение первой недели является хорошим прогностическим признаком и может свидетельствовать о благоприятном неврологическом исходе, и, наоборот, отсутствие динамики или отрицательная динамика ЭЭГ за неделю – плохой прогностический признак [39, 66].

Дефицит оснований и уровень лактата в крови также могут использоваться в качестве прогностических критериев. Уровень лактата меньше 5 ммоль/л и/или дефицит оснований менее 10 ммоль/л не приводят к неврологическим осложнениям. Повышение лактата более 9 ммоль/л прогностически связано с умеренной или тяжёлой энцефалопатией [15, 51].

Магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга является методом для получения более подробной и точной информации [87].

Три рандомизированных исследования показали значимую корреляцию между риском смерти или тяжёлым поражением нервной системы в 18-24 месяцев с данными МРТ, выполненной у новорождённых с ГИЭ [139, 37, 46].

Использование диффузионно-взвешенного изображения (DWI) значительно улучшает возможность ранней структурной диагностики повреждений мозга в первые 24-48 часов жизни [87].

При проведении DWI проявления ишемического повреждения выявляются через 5-10 мин. после перенесённого эпизода ишемии и визуализируются в течение двух недель. Магнитно-резонансная спектроскопия выявляет изменения концентрации лактата, холина, креатина и глутамината и таким образом обеспечивает биохимический анализ церебральной ткани [57, 59].

Метод транскраниальной церебральной оксиметрии отражает региональное насыщение кислородом головного мозга. Метод обеспечивает круглосуточное и непрерывное мониторное наблюдение за состоянием региональной сатурации мозга кислородом [135].

Ультразвуковой метод исследования головного мозга (НСГ и доплерография) на ранних этапах внедрения применялся в основном с целью диагностики перинатальных кровоизлияний и их осложнений. Широкое использование нейросонографии в неонатологии позволило накопить богатый практический материал не только по геморрагическим, но и по ишемическим поражениям головного мозга у детей [3, 13, 79, 164].

И, в настоящее время, ультразвуковой метод исследования позволяет выявить структурные изменения головного мозга у новорожденных при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении центральной нервной системы. Анализ ультразвуковых и патоморфологических данных свидетельствует о том, что характер ишемического поражения головного мозга зависит не только от тяжести перинатальной гипоксии, но и от степени зрелости ребенка. У доношенных новорожденных перинатальная ишемия приводит к возникновению избирательного нейронального некроза, субкортикальной и мультикистозной энцефаломалии, к инфарктам

мозга. Тяжелая перинатальная гипоксия у недоношенных 34-37 нед гестации может привести к развитию перивентрикулярной лейкомаляции [16]. В заключении хочется сказать, что несмотря на успехи в диагностике ГИЭ, по-прежнему актуальной остается одна из самых серьезных проблем в перинатальной медицине – это оценка состояния плода во время родов и новорожденного вскоре после рождения на предмет наличия повреждений головного мозга. Присутствие мекония в околоплодных водах, отслеживание патологических паттернов сердечного ритма плода на кардиотокографии, оценка по шкале Апгар, газы крови в пупочной артерии и физикальное обследование – это инструменты, которые в настоящее время используются для выявления неонатальной энцефалопатии у плода и новорожденного, но все они как по отдельности, так и в совокупности не имеют достаточной точности. Интегрированная по амплитуде ЭЭГ может обнаруживать ранние изменения, связанные с повреждением головного мозга, и используется для прогнозирования кратко- и долгосрочных результатов, однако терапевтическая гипотермия может снизить тяжесть прогноза ГИЭ, МРТ диагностика требует седации пациента и его транспортировку к месту диагностики, а ее данные, хотя и достаточно информативны, позволяя осуществлять долговременный прогноз, не достоверны в первые 4-5 дней жизни новорожденного. Еще одной из основных проблем, которую необходимо решить, остается раннее выявление и сортировка детей с ГИЭ легкой от средней степени тяжести и тяжелой. Доступность таких методов лечения, как общая гипотермия, которая должна быть начата в течение 6 часов после рождения, делает критически важным быстрое выявление ребенка с неврологическим повреждением. Как объективно и количественно идентифицировать плод и новорожденного с перинатальным поражением головного мозга, можно решить, заимствуя подход из исследования черепно-мозговой травмы у детей старшего возраста и

взрослых, у которых для этих целей были использованы различные биомаркеры.

1.4. Биомаркеры при ГИЭ у новорожденных

Биомаркерами называют поддающиеся количественному определению параметры (например, концентрация фермента, присутствие в биологических жидкостях определенных веществ), которые служат для оценки физиологических и патологических процессов в организме, таких как риск возникновения заболевания, воздействие внешних факторов и др. В настоящее время продолжается активный поиск биомаркеров перинатального поражения ЦНС, способных предсказать и оценить темп прогрессирования заболевания, помочь в определении тактики лечения и оценить его эффективность, прояснить во многом еще неизученный патогенез заболевания и, наконец, выявить новые мишени для терапии [6].

Некоторые из них в той или иной степени изучены в неонатологии (Таблица 1.3).

Таблица 1.3. Изучаемые нейромаркеры у новорожденных

Нейроцитарные	Глиальные
Креатинкиназа ВВ-фракции (КК-ВВ)	Креатинкиназа ВВ-фракции (КК-ВВ)
Нейронспецифическая енолаза (HCE, Neuron-specific enolase, NSE)	Протеин S-100 В
Убиквитин карбоксил-терминальная гидролаза L1 (Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1, UCHL-1)	Основной белок миелина (ОБМ, myelin basic protein, MBP)
Фосфорилированный аксональный нейрофиламент, тяжелая цепь (phosphorylated neurofilament heavy chain, pNF-H, neurofilament-200)	Глиальный фибриллярный кислый протеин (Glial fibrillar acid protein, GFAP)
Тау-протеин (тепловой протеин, tau-protein)	

Креатинкиназа. Креатинкиназа ВВ-фракции (КК-ВВ) – исторически первый детально изученный нейромаркер у новорожденных [103] фермент, принимающий участие в клеточных энергетических процессах. Изофермент ВВ содержится преимущественно в тканях головного мозга, а также в скудном количестве в прочих тканях организма. В нейрональной ткани КК-ВВ содержится и в нейронах, и в глиальных (преимущественно в астроцитах) клетках.

Известно, что уровень КК-ВВ повышается при развитии неонатальной энцефалопатии [103, 137], а также у умерших новорожденных [138].

Однако следует помнить, что особенностью постнатальной кинетики КК-ВВ является повышение ее уровня после родов даже у здоровых новорожденных не зависящее от режима родов, обусловленное, вероятно, высвобождением из плаценты и пупочных сосудов, имеющих обильные ее запасы [106]. Это снижает специфичность данного маркера у новорожденных в диагностике поражения ЦНС.

Нейронспецифическая енолаза. Енолазы (2-фосфо-D-глицератгидролаза, 80 кДа) – семейство ферментов гликолитической системы клетки. Гамма-форма (содержащая γ -субъединицу – $\alpha\gamma$ и $\gamma\gamma$) известна как нейронспецифическая енолаза (НСЕ, Neuron-specific enolase, NSE), гамма-енолаза, енолаза-2), так как впервые она была обнаружена в нейронах и нейроэндокринных клетках. Уровень НСЕ повышается в крови и ликворе при поражении ЦНС, а также при нейроэндокринных опухолях. Уровень НСЕ в крови и ликворе у новорожденных, перенесших ГИЭ, поднимается >25 нг/мл, при этом отмечается прямая зависимость между тяжестью гипоксически-ишемической энцефалопатии и уровнем НСЕ у доношенных [127].

У детей, перенесших ГИЭ, уровень НСЕ после рождения

постепенно снижается, причем при терапевтической гипотермии уровень НСЕ снижается интенсивнее [71].

Протеин S-100. S100 – семейство низкомолекулярных (9-13 кДа) кальцийсвязывающих белков, насчитывающих 25 различных белков, распространенных в различных тканях. S100 расценивался как нейроспецифический глиальный протеин, но в 1981 г. было доказано, что его распространение не ограничено мозговой тканью. По мере выявления отдельных белков данного семейства был выделен белок S100B, обладающий самой высокой нейроспецифичностью, так как у млекопитающих он наиболее распространен в глиальных клетках центральной (астроциты) и периферической (шванновские клетки) нервной системы, а также в меланоцитах, хондроцитах и адипоцитах. Наблюдается корреляция уровней S100 и S100B с тяжестью ГИЭ. При наличии ГИЭ у доношенных новорожденных уровень S100, повышенный в 1-е сутки, снижается с достижением нормы к 14-м суткам [71, 45].

Основной белок миелина. Основной белок миелина (ОБМ, myelin basic protein, MBP) – один из белков миелиновой оболочки ЦНС. В формировании и поддержании миелинового слоя принимает участие олигодендроцит, на основании этого ОБМ относят к глиальным маркерам. При фокальном инфаркте мозга ОБП может служить маркером субкортикального поражения ЦНС.

Уровень ОБМ крови повышается при внутричерепных кровоизлияниях, опухолях ЦНС, ишемическом инсульте, травмах [126]. На основании ограниченного количества работ известно, что уровень ОБМ в крови и ликворе у новорожденных с НЭК повышается в течение первых 24 ч жизни и коррелирует с тяжестью последнего.

В динамике к концу периода новорожденности уровень ОБМ снижается, кроме недоношенных и новорожденных детей с текущим инфекционным процессом [128, 5, 9].

Глиальный фибриллярный кислый протеин. Глиальный фибриллярный кислый протеин (Glial fibrillar acid protein, GFAP) относится к промежуточным филаментам цитоскелета, характерен только для астроцитов, в большей степени фибриллярных, известен еще как астроцитспецифичный церебропротеин (астропротеин). Уровень GFAP повышается в крови и ликворе при черепно-мозговых травмах, посттравматическом повреждении мозга, ишемическом инсульте, а также ГИЭ у новорожденных [77, 78, 42].

Убиквитин С-терминальная гидролаза L1. Убиквитин карбоксил-терминальная гидролаза L1 (Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1, UCHL-1) – один из ферментов деубиквитинизирующей системы, участвующей в регуляции внутриклеточных белков путем отщепления сигнального протеина убиквитина. UCH-L1 – нейронспецифичный белок, концентрируется в дендритах, составляет 1-5% от тотального растворимого протеина клетки, известен еще как протеиновый генный продукт 9,5 (PGP 9.5). При мутации гена, кодирующего убиквитингидролазы, в клетке происходит накопление дефектных белков с последующим развитием нейродегенеративного состояния. Выявлено повышение его уровня при черепно-мозговой травме, нейроэктодермальных и прочих опухолях, а также при ГИЭ [148, 19, 41].

Фосфорилированный аксональный нейрофиламент, тяжелая цепь (pNF-H). Фосфорилированный аксональный нейрофиламент, тяжелая цепь (phosphorylated neurofilament heavy chain, pNF-H, neurofilament-200) – один из белков цитоскелета, относящийся к IV типу промежуточных филаментов. Фосфорилированная форма тяжелого белка нейрофиламентов (pNF-H) находится только в аксонах нейроцитов в связи, с чем его используют как маркер аксонального повреждения.

Имеются данные о повышении уровня pNF-H у больных с наследственной оптической нейропатией Лебера, при рассеянном склерозе, спинальной травме, субарахноидальном кровоизлиянии,

болезни Альцгеймера, а также черепно-мозговой травме у детей и взрослых.

Пилотное исследование у новорожденных, перенесших асфиксию, выявило повышение уровня pNF-H в крови и корреляцию с тяжестью ГИЭ и изменениями на магнитно-резонансной томографии (МРТ) [19].

Тау-протеин (тепловой протеин). Тау-протеин – нейрональный протеин, относящийся к классу белков, ассоциированных с микротрубочками (БМ, microtubule-associated proteins, MAPs), играющий важную роль в их стабилизации, процессах нейронального роста и развития, а также проведения нервного импульса. Считается, что тау-протеин – аксонспецифичный белок, хотя имеются данные о выявлении фосфорилированных форм в соматодендритном пространстве.

При патологии ЦНС с разрушением белого вещества происходит выделение тау-протеина с повышением его уровня в сыворотке. Известно, что уровень тау-протеина повышен у пациентов, имеющих неблагоприятный неврологический исход после перенесенного ишемического инсульта и черепно-мозговой травмы [156].

Исследования, касающиеся изменение уровня тау-протеина у новорожденных, дают противоречивые данные. Одни исследования не выявляют повышения уровня тау-протеина при развитии энцефалопатии по сравнению с контрольной группой [108] в то время как другие отмечают повышение, а также корреляцию его уровня на 3-й и 7-й день жизни с неблагоприятным неврологическим исходом [108, 140, 149].

1.5. Белки бета-амилоида (A β) как возможный маркер при ГИЭ

Одним из перспективных и практически не изученных маркеров нейродегенерации при ГИЭ в неонатальный период, по нашему мнению, представляются протеины бета-амилоиды.

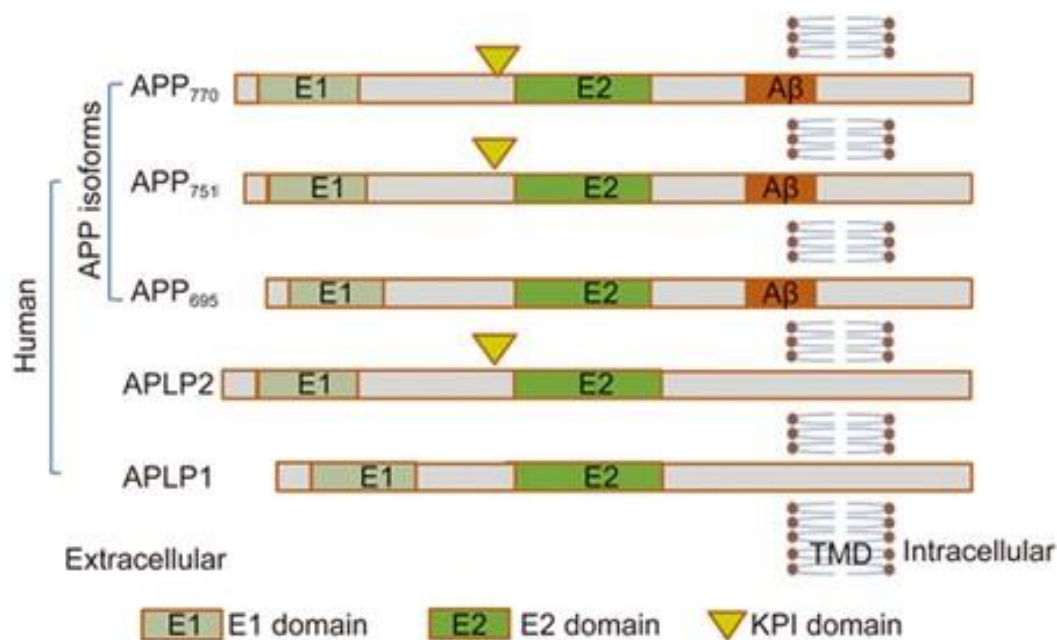
Пептиды A β отщепляются от более крупного белка предшественника амилоида (APP), ген которого локализован на длинном

плече 21-ой хромосомы. APP представляет собой интегральный мембранный белок, экспрессируемый во многих тканях, особенно в синапсах нейронов, который играет центральную роль в патогенезе болезни Альцгеймера (БА) [168].

Он производится в виде нескольких различных изоформ, размером от 695 до 770 аминокислот.

Наиболее распространенная форма в головном мозге (APP695) продуцируется в основном нейронами и отличается от более длинных форм APP тем, что в ее эктодомене отсутствует последовательность ингибитора протеазы типа Kunitz10 (Рисунок 1).

Рисунок 1. Изоформы APP

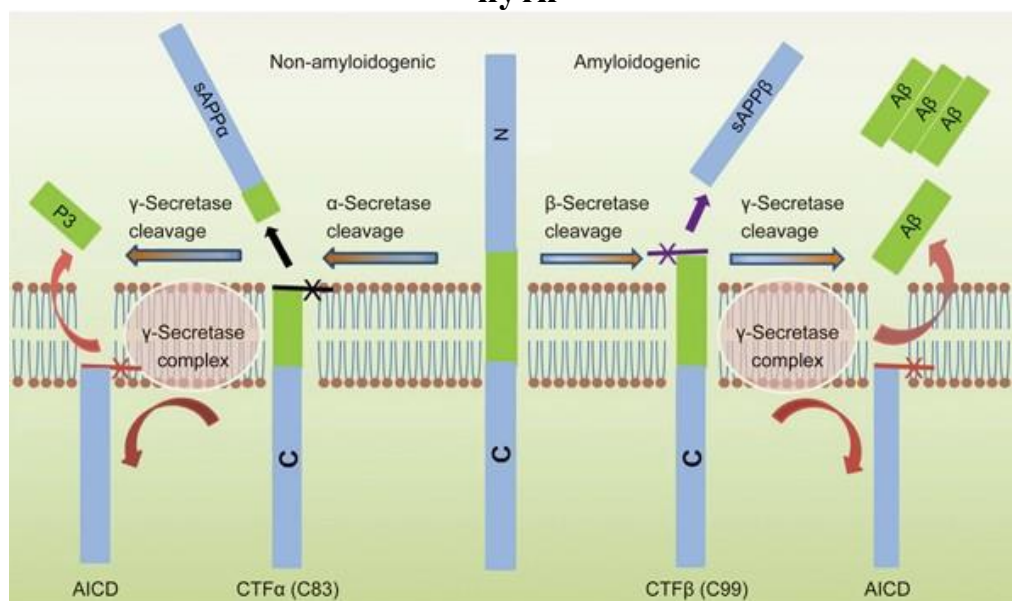


Изоформа 695 APP в основном экспрессируется в нейронах, тогда как APP₇₅₁ и APP₇₇₀, которые содержат KPI ингибиторного домена сериновой протеазы типа Кунитца, в основном экспрессируются на периферических клетках и тромбоцитах [30, 81].

Человеческий APP может обрабатываться двумя альтернативными путями: амилоидогенным и не амилоидогенным. APP сначала расщепляется α-секретазой (не амилоидогенный путь) или β-секретазой (амилоидогенный путь), образуя связанные с мембраной α- или β-С

концевые фрагменты (CTF) (Рисунок 2).

Рисунок 2. Протеолиз APP в амилоидогенном и не амилоидогенном пути



Амилоидогенный процессинг APP включает последовательное расщепление β- и γ-секретазой на N- и C-концах Aβ, соответственно. 99-аминокислотный C-концевой фрагмент APP (C99), образованный в результате расщепления β-секретазой, может быть интернализован и далее обработан γ-секретазой в нескольких сайтах с образованием фрагментов расщепления 43, 45, 46, 48, 49 и 51 аминокислоты, которые далее расщепляются до основных конечных форм Aβ, 40-аминокислотного Aβ40 и 42-аминокислотного Aβ42 в эндоцитарных компартментах [50].

Расщепление C99 γ-секретазой высвобождает внутриклеточный домен APP (AICD), который может перемещаться в ядро, где он может регулировать экспрессию генов, включая индукцию апоптозных генов. Расщепление APP / C99 каспазами дает нейротоксический пептид (C31) [21].

Фермент, расщепляющий бета-сайт APP, в избытке присутствует в нейронах, что может ускорить амилоидогенный процессинг в головном мозге и ухудшить выживаемость нейронов.

После образования мономеры A β собираются в различные типы сборок, включая олигомеры, протофибриллы и амилоидные фибриллы.

Ранние предположения поддерживали так называемую «гипотезу амилоидного каскада», которая предполагала, что агрегация A β в бляшки приводит к нейротоксичности и деменции через общие цитопатические эффекты, которые вносят вклад в патогенез болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний [18].

Хотя пептид A β может быстро агрегировать с образованием фибрилл, которые откладываются в амилоидных бляшках, которые, как было установлено, связаны с болезнью Альцгеймера, более поздние исследования продемонстрировали, что нет прямой корреляции между амилоидными бляшками и потерей синапсов и нейронов в мозге с болезнью Альцгеймера [134].

Неясно, являются ли небольшие различия в структуре фибрилл патологически значимыми; однако небольшая разница в два остатка в A β 1-40 и A β 1-42 приводит к большим различиям в их биофизическом, биологическом и клиническом поведении. Трехмерная структура остатков A β 1-42 принимает двойной подковообразный перекрестный β -лист с максимально скрытыми гидрофобными боковыми цепями, в котором остатки 1-14 частично упорядочены и находятся в конформации β -цепи, которая является более нейротоксичным видом, агрегируется намного быстрее и доминирует в старческих бляшках у пациентов с болезнью Альцгеймера [29].

Дальнейшие исследования показали, что когнитивный дефицит появился до отложения бляшек или обнаружения нерастворимых амилоидных фибрилл [85].

Напротив, количество олигомерного A β увеличивается в экстрактах головного мозга при болезни Альцгеймера, что является основой для гипотезы об олигомере A β [104, 82, 32], которая утверждает, что растворимые олигомеры A β , а не нерастворимые фибриллы или бляшки

вызывают синаптическую недостаточность и ухудшение памяти [123], что приводит к нарушению функции головного мозга на последних стадиях заболевания. Таким образом А β является нормальным продуктом клеточного метаболизма, происходящим из белка-предшественника амилоида (APP).

APP синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме, а затем транспортируется в комплекс Гольджи, где завершает созревание и, наконец, транспортируется к плазматической мембране. Зрелый APP на плазматической мембране расщепляется за счет последовательного действия β -secretase и γ -secretase с образованием А β (Рисунок 2).

Вновь образованный А β либо высвобождается во внеклеточное пространство, либо остается связанным с плазматической мембраной и структурами липидного раstra. Более ранние исследования указали на фибриллы А β как на нейротоксический агент, приводящий к гибели клеток, потере памяти и другим характеристикам БА.

За последние два десятилетия дальнейшие исследования показали, что олигомерные или префибриллярные разновидности пептида А β являются наиболее разрушительными для нейронных клеток.

Растворимый А β может связываться с многочисленными молекулами внеклеточного пространства, включая рецепторы клеточной поверхности, металлы и клеточные мембраны. Связывание А β с множеством рецепторов было предложено в качестве причины нейрональной токсичности: олигомеры А β были предложены для индукции митохондриальной дисфункции и окислительного стресса в нейронах при болезни Альцгеймера (БА), что приводит к массивному притоку кальция и токсичности в нейронах [49].

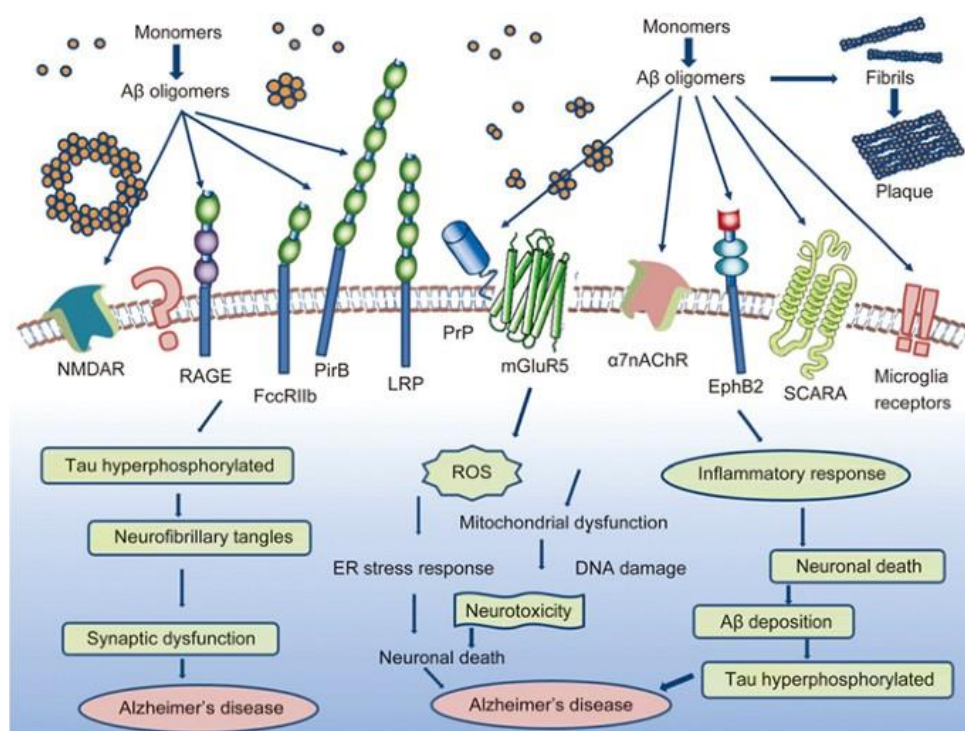
Кроме того, растворимый олигомерный А β был предположительно токсичен из-за связывания с различными рецепторами, включая липиды, протеогликаны и белки [90, 29].

Предполагается, что взаимодействия рецепторов А β генерируют и

передают нейротоксические сигналы в нейроны, вызывая клеточные дефекты, такие как митохондриальная дисфункция и стрессовая реакция эндоплазматического ретикулула.

Кроме того, некоторые рецепторы $A\beta$, скорее всего, интернализируют $A\beta$ в нейроны, демонстрируя отчетливые клеточные дефекты (Рисунок 3).

Рисунок 3. Рецепторы связывания $A\beta$



Рецептор N-метил-D-аспарагиновой кислоты (NMDAR) и α -субъединица, содержащая никотиновый ацетилхолиновый рецептор ($\alpha 7nAChR$) являются рецепторами ионных каналов. $A\beta$ прямо или косвенно связывается с субъединицами NMDAR для активации NMDAR, и, таким образом, олигомеры $A\beta$ вызывают дисрегуляцию кальция, гибель нейронов и синаптическую дисфункцию [28, 122, 67].

Рецептор $\alpha 7nAChR$ является еще одним кандидатом на связывание $A\beta$ рецептором и связывается с растворимым $A\beta$ с высоким сродством [31].

Клетки, экспрессирующие $\alpha 7nAChR$, чувствительны к $A\beta$ -

индуцированной токсичности *in vitro* и опосредуют индуцированное A β фосфорилирование тау-белка. В модели БА у мышей $\alpha 7nAChR$ может усугублять патологию БА у модели мышей, в то время как его дефицит может улучшать когнитивные дефициты и синаптическую патологию [109].

Рецептор p75NTR представляет собой низкоаффинный рецептор семейства TNF для нейротрофинов. p75NTR связывается с A β через свой внеклеточный домен, который напрямую сигнализирует о гибели клетки через его домен смерти. Фактически, эта передача сигналов приводит к активации каспазы 8 и каспазы 3 и к продукции активных форм кислорода (АФК) и клеточному окислительному стрессу [121].

Кроме того, A β может взаимодействовать синергетически с цитокинами TNF α и IL1 β , что заметно усиливает нейротоксическое действие передачи сигналов A β /p75NTR и потенцирует повреждение нейронов. Связанный с A β p75NTR вызывает гибель клеток в гиппокампе головного мозга человека при болезни Альцгеймера.

Различные рецепторы микроглии участвуют в клиренсе A β и в запуске воспалительной реакции. Некоторые рецепторы, включая RAGE и NLRP3, в основном участвуют в генерации воспалительного ответа, запуская сигнальный каскад, который приводит к продукции провоспалительных медиаторов [117].

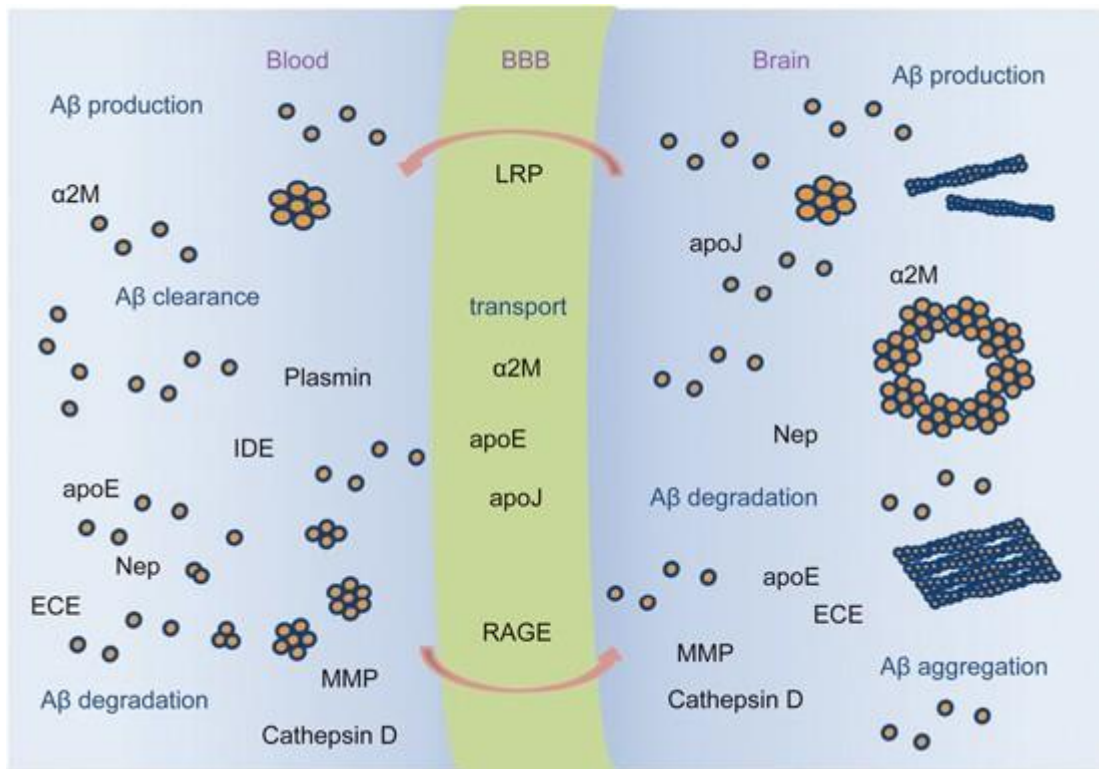
Рецепторы комплемента, рецепторы Fc, FPRL1 / FPR2, CD36 и TLR участвуют как в клиренсе A β , так и в генерации воспалительных реакций.

A β , высвобождаемый во внеклеточное пространство, может переноситься между различными отделами, такими как из мозга в кровь или из крови в мозг, а также может выводиться с помощью шаперонов, таких как апоЕ, которые могут влиять на метаболизм A β после того, как он высвобождается клетками, и влияет на агрегацию, клиренс и транспорт A β [35] (Рисунок 4).

Многие рецепторы участвуют в индукции транспорта и клиренса А β . Среди них RAGE представляет собой рецептор переноса притока, который связывает растворимый А β и опосредует патофизиологические клеточные ответы [89, 142, 115].

RAGE также опосредует транспорт плазменного А β через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). LRP-1 действует как рецептор клиренса А β через ГЭБ [110, 158].

Рисунок 4. Гомеостаз А β



Гомеостаз А β включает продукцию, агрегацию, транспорт, деградацию и клиренс. А β продуцируется в периферических тканях и ЦНС, где он может агрегировать и образовывать нерастворимые фибриллы. Растворимый А β может транспортироваться через ГЭБ из крови в мозг через RAGE и из мозга в кровь через LRP. А β также может связываться с транспортными белками, например, apoE, apoJ, α 2-макроглобулином (α 2M), что может влиять на секвестрацию А β , а также на форму его накопления в головном мозге. А β может протеолитически расщепляться протеазами Неприлизин (Nep), ферментами,

превращающими эндотелин (ECE), расщепляющим инсулин ферментом (IDE), плазмином и другими расщепляющими A β протеазами (ММР, Катепсин D), а также посредством деградации, опосредованной микроглией [29].

Производство A β обычно уравнивается несколькими процессами, включая протеолитическую деградацию, клеточный клиренс (который сам может включать протеолитическую деградацию), активный транспорт из мозга и отложение в нерастворимые агрегаты. Все больше данных свидетельствует о том, что протеолитическая деградация является особенно важной детерминантой церебральных уровней A β и, как следствие, патологии, связанной с A β [93].

Изменение уровня A β и непрерывная агрегация могут способствовать хроническому ответу врожденной иммунной системы за счет активации микроглии, что может привести к потере нейронов из-за прямого фагоцитоза. Иммунологические рецепторы, которые активируются A β , включают толл-подобный рецептор 2 (TLR2), TLR4, TLR6 и их корецепторы CD14, CD36 и CD47 [22, 124].

Кроме того, агрегация A β также вызывает воспалительные реакции и высвобождение медиаторов, связанных с воспалением, таких как эйкозаноиды, хемокины, провоспалительные цитокины и факторы комплемента, которые могут увеличивать гибель нейронов и потерю нейронных синапсов. В дополнение к нейровоспалительной реакции, управляемой микроглией [84], этот процесс, вероятно, также опосредуется через регуляцию активности киназы/фосфатазы.

Более того, когда предшественник A β , APP, накапливается на митохондриальной мембране, он блокирует транслокацию внутренних метаболитов и белков митохондрий, что приводит к нарушению цепи переноса электронов и дисфункции митохондрий, что, в свою очередь, может увеличивать избыточное образование A β и приводить к большей токсичности [119, 24].

Избыточные уровни A β также активируют белки деления митохондрий Fis1 и Drp1, тем самым вызывая фрагментацию митохондрий [130].

A β , локализованный в митохондриях, может взаимодействовать с проапоптотическими факторами, A β -связывающей алкогольдегидрогеназой (ABAD) и циклофилином D (CypD), что приводит к повышенной гибели нейрональных клеток [23].

Следовательно, может существовать порочная петля обратной связи между увеличением продукции A β и митохондриальной дисфункцией.

Внеклеточные отложения фибрилл или аморфных агрегатов пептида A β образуют бляшки и диффузные отложения, в то время как внутриклеточные фибриллярные агрегаты гиперфосфорилированного и окисленного тау могут образовывать нейрофибриллярные клубки. Эти бляшки и нейрофибриллярные клубки откладываются в основном в областях мозга, таких как гиппокамп, миндалевидное тело, энторинальная кора и базальная часть переднего мозга, которые влияют на память, обучение и эмоциональное поведение. A β может повреждать синапсы и нейриты, а отложения бляшек в областях мозга уменьшают количество синапсов. A β специфически повреждает нейроны, вырабатывающие серотонин и норэпинефрин или использующие глутамат или ацетилхолин в качестве нейротрансмиттеров. После того, как было обнаружено, что синтетические фрагменты A β убивают культивируемые нейроны [171], в серии исследований было сообщено о химических и клеточных биологических основах синаптической дисфункции и гибели нейронов при болезни Альцгеймера. A β , особенно в его агрегированных формах, может нарушать синаптический перенос ионов и глюкозы, а электрофизиологические исследования показали, что A β снижает синаптическую пластичность. Дефицит памяти коррелирует с образованием олигомеров A β , которые появляются относительно рано в

процессе отложения A β [154].

Примечательно, что иммунизация мутантных мышей по APP человеческим A β 1-42 привела к удалению отложений A β из головного мозга и устранению когнитивных нарушений, добавляя доказательства того, что отложение A β является ключевым событием в болезни Альцгеймера [17].

Пептиды A β являются основными компонентами сенильных бляшек, присутствующих при болезни Альцгеймера. Недавние исследования показали, что растворимые ансамбли A β также стимулируют дисфункцию нейронов и могут играть важную роль в стимуляции провоспалительной активации первичной микроглии и астроцитов [153, 58, 38].

В контексте воспаления, по сравнению с фибриллярными скоплениями, препараты олигомера A β индуцируют большее или дифференцированное производство провоспалительных цитокинов микроглией *in vitro* [83].

Действительно, исследования первичной глии и астроцитов демонстрируют, что индуцированное олигомером A β увеличение провоспалительных цитокинов, таких как секреция оксида азота, NO, TNF α и TNF β , происходит раньше и больше, чем увеличение, индуцированное фибриллярными сборками A β [63, 25].

Таким образом, для различных форм A β определение их уровней на разных стадиях, вызываемого ими воспалительного ответа и лежащих в их основе механизмов (например, опосредованных рецептором) может предоставить важную информацию для поисков терапевтического вмешательства.

Помимо ключевой роли в патологии БА, A β , образующийся в головном мозге и периферических тканях, также действует во многих других аспектах биологии. Было показано, что A β является лигандом с различными рецепторами, как упоминалось выше. Он также может

переноситься между тканями и через гематоэнцефалический барьер по сложным путям доставки [155] к пунктам назначения, где он может индуцировать и модулировать провоспалительную активность в ответ на различные стрессоры окружающей среды [97, 94].

A β также функционирует аналогично группе биомолекул, известных под общим названием «антимикробные пептиды» (AMP), которые действуют в системе врожденного иммунитета. Он подавляет рост восьми из 12 клинически важных патогенов, подвергнутых скринингу [157], и действует как антимикробный пептид в нескольких моделях инфекции, включая мышей, *C. elegans* и моделях клеточных культур [33]. Эта новая функция резко контрастирует с существующими моделями A β -зависимой патологии и будет играть важную роль в разработке будущих стратегий лечения БА и иных нейродегенеративных заболеваний.

Что касается роли бета-амилоида при ГИЭ у новорожденных, то на момент планирования и начала нашей работы нами было найдено лишь 1 экспериментальное исследование. В данном исследовании [132] на новорожденных свиньях было продемонстрировано, что перинатальная асфиксия может влиять на уровень бета-амилоида 1-42 в цереброспинальной жидкости. В результате данного исследования было установлено, что уровень бета-амилоида 1-42 в цереброспинальной жидкости был значительно ниже у свиней, подвергнутых сильной гипоксии, по сравнению с контрольной группой, соответственно. Кроме того, незначительное снижение уровня бета-амилоида 1-42 наблюдалось в группе, подверженной умеренной гипоксии. Кроме того, наблюдалась умеренная отрицательная корреляция между уровнями бета-амилоида 1-42 и S100B в цереброспинальной жидкости, а также умеренная отрицательная корреляция между лактатом в крови в конце гипоксии и уровень бета-амилоида 1-42 в цереброспинальной жидкости.

Позже появилось еще одно клиническое исследование, касающееся

возможной связи амилоида, бета 1- 42 и ГИЭ у новорожденных, получивших лечение терапевтической гипотермией [26].

В данной работе были, проанализировали плазменные Аβ 1-42 у 55 новорожденных в течение 72 часов терапевтической гипотермии, золотого стандарта лечения ГИЭ и через 24 часа после гипотермии. Было отмечено, что уровни Аβ были ниже у пациентов с ГИЭ и говорится о необходимости дальнейших исследований для изучения его роли в неонатальной ГИЭ.

Из обзора литературы видно, что, несмотря на растущие знания о патофизиологии и факторах риска ГИЭ, а также бум молекулярных методов диагностики, в настоящее время доступно лишь ограниченное количество методов диагностики и профилактических стратегий ПП ЦНС. Несмотря на это, когда подозревается возможность развития гипоксически-ишемической энцефалопатии, подвергающей опасности новорожденного, следует немедленно использовать соответствующие методы для диагностики. Данное заключение логически вытекает из идеи, что лечение эффективно только в течение относительно короткого периода времени после появления клеточных каскадов, вызывающих повреждение головного мозга. К сожалению, классические молекулярные биомаркеры повреждения головного мозга лишены необходимой селективности, и поэтому клинически неактуальны в остром периоде ГИЭ. Таким образом, подозрение на ПП ЦНС в клинической практике основывается главным образом на всей клинической картине (включая наличие факторов риска, проблемные роды, признаки дисфункции органов и ранние судороги). Система оценок Sarnat оценивает различные клинические критерии, позволяющие классифицировать новорожденных по категориям легкой, средней и тяжелой степени, которые помогают в прогнозировании их исхода. Как только ГИЭ заподозрена, только амплитудная интегрированная электроэнцефалография или методы

нейровизуализации, такие как МРТ, могут подтвердить диагноз. Тем не менее, такие тесты становятся неактуальными у нестабильных пациентов или во время лечения гипотермией. Все это делает необходимым дальнейшее пополнение имеющихся знаний о патофизиологии и диагностики ГИЭ, особенно в отношении поиска новых, мало или вовсе не изученных, биомаркеров, которые могут улучшить раннее выявление этого расстройства и, таким образом, улучшить общий исход пациентов. Такие биомаркеры могут помочь распознать и количественно оценить серьезность перинатального поражения ЦНС в повседневной практике, выявить тех, кто нуждается в терапии гипотермией, и могут помочь другим пациентам избежать ненужного лечения или оказаться полезными для поиска новых стратегий терапии.

Протеины бета амилоида участвуют в процессах активации глутаматно-кальциевого стресса, цитотоксичной активности, активации апоптоза, проявляют свое участие в системе врожденного иммунитета, регулируют процессы нейровоспаления и нейродегенерации. Эти же механизмы участвуют в патогенезе неонатальной ГИЭ.

Трехмерная структура остатков $A\beta$ 1-42 принимает двойной подковообразный перекрестный β -лист с максимально скрытыми гидрофобными боковыми цепями, в котором остатки 1-14 частично упорядочены и находятся в конформации β -цепи, которая является более нейротоксичным видом среди иных вариантов бета-амилоида.

В экспериментальном исследовании [132] установлено, что уровень бета-амилоида 1-42 в цереброспинальной жидкости был значительно ниже у свиней, подвергнутых сильной гипоксии, по сравнению с контрольной группой, соответственно. В единственном найденном нами по данной теме клиническом исследовании [26], было отмечено, что уровни $A\beta$ 1-42 были ниже у пациентов с ГИЭ и говорится о необходимости дальнейших исследований для изучения его роли в

неонатальной ГИЭ.

Закономерно, что на основании этого мы предположили что A β 1-42 может быть возможными прогностическими биомаркером ГИЭ у новорожденных, чему и посвящено настоящее исследование.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика клинического материала

Работа выполнена в период с 2017 по 2021 гг. на кафедре анестезиологии, реаниматологии и неонатологии ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО на базе отделения неонатологии и интенсивной терапии новорожденных Донецкого клинического территориального медицинского объединения (ДОКТМО).

Вид исследования: контролируемое, проспективное, динамическое клиническое исследование от момента рождения ребенка до 7 суток жизни.

Критерии включения в исследование: новорожденные со сроком гестации 37 недель и более, масса тела более 2200 г, на момент рождения имеющие оценку по шкале Апгар 6 баллов и менее, соответствующие I- II- III стадии/степени ГИЭ по Sarnat H., Sarnat M. в модификации Stoll B., Kliegman R., согласие на участие в исследовании законных представителей ребенка (приложение 1).

Условия исключения из исследования – гемолитическая болезнь новорожденных; врожденная эндокринная патология; дети, которым проводили переливание компонентов крови до забора крови на исследование бета-амилоида 1-42; тяжелые врожденные пороки или генетическая аномалия не совместимые с жизнью; отказ от проведения процедуры исследования законных представителей ребенка.

Для решения поставленных задач было обследовано 58 доношенных новорожденных, рожденных в тяжелой, средней и умеренной асфиксии, которые были распределены в зависимости от степени ГИЭ на 3 группы – ГИЭ I, ГИЭ II и ГИЭ III в течении первых 6 часов жизни. Для определения степени ГИЭ использовалась классификация гипоксически-ишемической

энцефалопатии у доношенных детей по Н. Sarnat, M. Sarnat, 1976 в модификации В. Stoll, R. Kliegman, 2004 (приложение 1).

С целью определение референтных значений бета-амилоида 1-42 в сыворотке, дополнительно были обследованы 10 здоровых доношенных вошедших в группу контроля.

Сравнительная характеристика детей представлена в Таблице 2.1. и Таблице 2.2.

Таблица 2.1. Сравнительная характеристика обследованных новорожденных

Новорожденные, абс.	Срок гестации, нед.	Масса тела, гр	Пол	
			М, %	Д, %
Доношенные, n=58	38,7±1,3	3195,6± 422,3	32, 55,2%	26, 44,8%
Контроль I, n=10	40,1±0,7	3392,± 248,9	6, 60%	4, 40%

Возраст матерей всех исследуемых групп значимо не отличался, составил в среднем 27,8±3,2 года. Первобеременные составили 32,5%. Патологическое течение беременности выявлено в 97,6% случаев – преэклампсии различной степени тяжести, анемия, перенесенные ОРВИ, урогенитальные инфекции.

Дети группы контроля при рождении оценены по шкале Апгар в пределах 7-10 баллов. У детей этой группы течение неонатального периода было физиологическим. Все новорожденные были приложены к груди матери в родильном зале, находились на грудном вскармливании, выписаны домой на 3-4-е сутки жизни с диагнозом «здоров».

Все дети группы контроля наблюдались с момента рождения до окончания раннего неонатального периода (168 ч. жизни) и получали помощь согласно утвержденным в РФ клиническим рекомендациям [1].

Таблица 2.2. Сравнительная характеристика основных групп исследования

Группы ГИЭ	Срок гестации, нед	Масса тела, гр	Пол	
			М абс, %	Д абс, %
I, n=26	38,6±1,3	3234±470,0	14, 53,8	12, 46,2
II, n=20	39,0±1,3	3210±259,4	11, 55	9, 45
III n=12	38,2±1,0	3090±538,0	7, 58,3	5, 41,7

Антропометрические показатели включенных в исследование детей в 96,4% соответствовали средним значениям по данному гестационному сроку (от 25 до 75 центиля). Дети с задержкой внутриутробного развития составили 3,4% (гипотрофический вариант I ст.).

После рождения всем детям, рожденным в асфиксии, в родильном зале, при необходимости проводились реанимационные мероприятия согласно методическому письму МЗ РФ «Реанимация и стабилизация состояния новорожденных детей в родильном зале» №15-4/10/2-3204 от 21.04.2010 и от 04.03 2020 г. [14].

Все новорожденные после оказания реанимационных мероприятий в родильном зале переводились в отделение интенсивной терапии новорожденных ДОКТМО.

На протяжении всего периода наблюдения интенсивная терапия проводилась всем пациентам основных групп исследования согласно

общепринятым в РФ и ДНР порядкам оказания медицинской помощи по профилю неонатология и утвержденным, действующим клиническим рекомендациям.

Новорожденным основной группы исследования обеспечивали оптимальные условия выхаживания (температурный режим, влажность, защита от внешних раздражителей) в сочетании с минимальной агрессивностью терапии.

Все дети выхаживались в условиях реанимационного стола. При наличии дыхательных расстройств любой степени тяжести применялась респираторная терапия, соответствующая тяжести дыхательной недостаточности (неинвазивная искусственная вентиляция легких, искусственная вентиляция легких).

Выбор метода респираторной поддержки у больных обосновывался степенью поражения легких и наличия дисфункции со стороны других органов и систем организма пациента. Для проведения респираторной терапии использовали респираторы: «Leoni-2», «Intermed-Neo» «Millennium».

В случае нестабильной гемодинамики по показаниям использовались средства инотропной поддержки (добутамин 1-5 мкг/кг/мин, дофамин 1-10 мкг/кг/мин, адреналин 0,5-1 мкг/кг/мин).

Осуществлялся динамический мониторинг функционального состояния жизненно важных систем, уровней гематокрита, гемоглобина, билирубина, глюкозы, определение суточного диуреза.

Вскармливание новорожденных осуществлялось сцеженным грудным молоком.

В случае отсутствия или недостаточного объема материнского молока вскармливание осуществляли адаптированными искусственными смесями.

В связи с сохраняющейся неврологической симптоматикой, больные с ГИЭ средней и тяжелой степени тяжести продолжали лечение после 7 суток в случае стабилизации состояния в отделениях патологии новорожденных.

2.2. Лабораторные методы исследования

Программа исследования включала в себя количественное определение бета-амилоида 1-42 (Ab1-42) в крови методом конкурентного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). С этой целью была использована тест-система «Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit for Amyloid Beta Peptide 1-42» (Cloud-Clone Corp., США).

Оценку уровня Ab1-42 производили через 6 ч после рождения, далее в конце 3-х и 7-х суток жизни. Анализы проводились в ЦНИИЛ ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО (г. Донецк).

Кровь для исследования забирали у пациентов натошак из локтевой вены с использованием одноразовых вакуумных систем типа «Vacutainer» без консерванта. После забора кровь центрифугировали в течение 30 минут на рефрижераторной центрифуге «К-23» (Германия) при 1500 g и температуре +4°C. Сыворотку крови сохраняли до исследования в пластиковых маркированных тубах типа «Eppendorf» при температуре -70°C.

При выполнении анализа использовался принцип конкурентного иммуноферментного анализа. Концентрацию рассчитывали по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания Ab1-42 в стандартных пробах. Интенсивность окраски продуктов иммуноферментной реакции измеряли на планшетном ридере «Multiscan EX» (Thermo Electron Corp., Финляндия) при длине волны 450 нм.

При этом были определены референтные значения (группа нормы) в сыворотке крови Ab1-42 через 6 ч., 72 ч. и 168 ч. жизни здоровых новорожденных.

Так, через 6 часов после рождения средняя концентрация в сыворотке крови Ab 1-42 составила $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; Me=247,6; (187,3-300), через 72 ч. – $211,1 \pm 63,4$ пг/мл; Me=221,3; (80,6-299,2), а через 168 ч. $179,1 \pm 85,8$ пг/мл; Me=174,1; (56,4-298,6)

Референтные значения для содержания Ab 1-42 в сыворотке крови новорожденных ранее установлены не были.

2.3. Статистические методы анализа полученных результатов

Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием программы STATISTICA 10.0. Количественные показатели представлены в виде $M \pm sd$, где M – среднее арифметическое значение, а sd – стандартное отклонение, также определяли медиану (Me), минимум и максимум значения.

В случае распределения, отличного от нормального, для множественных сравнений с контрольной группой применялся ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Для парных сравнений использовался критерий Вилкоксона для сопряженных групп, а для несопряженных групп рассчитывали U-критерий Манна-Уитни.

Проводили логистический регрессионный анализ, а также ROC анализ.

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование концентрации бета-амилоида 1-42 и его динамики в раннем неонатальном периоде в сыворотке крови у здоровых новорожденных и у детей с ГИЭ

В литературе отсутствуют данные о референтных значениях бета-амилоида 1-42, а также о его динамике в раннем неонатальном периоде у здоровых новорожденных и у детей с гипоксически-ишемической энцефалопатией.

При анализе полученных результатов, был выявлен ряд закономерностей (Табл. 3.1). Так, через 6 часов после рождения, средняя концентрация в сыворотке крови $A\beta$ 1-42 составила в контрольной группе $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; $Me=247,6$; (187,3-300), что оказалось в 25 раз выше ($p < 0,001$) чем у детей с проявлениями ГИЭ III ст. ($10,6 \pm 5,8$ пг/мл; $Me=8,6$; (2,6-22,1)). У новорожденных с ГИЭ II ст. аналогичные показатели ($25,7 \pm 2,5$ пг/мл; $Me=26,2$; (22,0-31,1)), оказались в 10 раз меньше ($p < 0,001$) чем в группе контроля, но выше, чем при ГИЭ III.

У новорожденных с ГИЭ I ст., концентрация $A\beta$ 1-42 составила $99,3 \pm 69,0$ пг/мл; $Me=65,1$; (42,1-248,1), что статистически значимо отличается от показателей у детей с ГИЭ II-III ст. ($p < 0,001$).

Таким образом, нами не было выявлено различий между концентрацией бета-амилоида 1-42 между группой контроля и у детей, имеющих легкую степень поражения ЦНС (ГИЭ I степени) в течении первых 6 часов жизни.

Напротив, уровень бета амилоида 1-42, определяемый в первые 6 ч. жизни в группе контроля и группе детей с явлениями ГИЭ I, статистически

значимо ($p < 0,001$) отличался от группы новорожденных с явлениями более тяжелого течения ГИЭ II-III ст.

Таблица 3.1. Концентрация Аβ 1-42 (пг/мл) в исследуемых группах

Концентрация Аβ 1-42 (пг/мл)	Контроль	Степень ГИЭ		
		I	II	III
Через 6 ч после рождения	250,7±46,1 ^{1,2,3} Me=247,6 (187,3-300)	99,3±69,0 ^{2,3} Me=65,1 (42,1-248,1)	25,7±2,5 Me=26,2 (22,0-31,1)	10,6±5,8 Me=8,6 (2,6-22,1)
Через 72 ч после рождения	211,1±63,4 ^{1,2,3} Me=221,3 (80,6-299,2)	74,3±62,2 ^{2,3} Me=50,1 (27,8-240,1)	28,7±26,6 Me=15,9 (4,97-80,6)	29,2±26,7 Me=21,3 (2,14-74,2)
Через 168 ч после рождения	179,1±85,8 ^{1,2,3} Me=174,1 (56,4-298,6)	68,9±53,3 Me=54,2 (4,0-230,10)	33,4±26,9 Me=28,8 (6,96-92,7)	24,99±18,5 Me=18,02 (2,6-59,4)

Примечание: 1,2,3 – статистически значимое различие между собой ($p < 0,05$).

Анализ средней концентрации через 72 часа после рождения показал, что с увеличением степени тяжести ГИЭ происходит снижение концентрации Аβ 1-42. Об этом свидетельствуют следующие данные – при ГИЭ I, значение Аβ 1-42 составило 74,3±62,2 пг/мл; Me=50,1; (27,8-240,1), при ГИЭ II – 28,7±26,6 пг/мл; Me=15,9; (4,97-80,6), а у новорожденных с ГИЭ III – 29,2±26,7 пг/мл; Me=21,3; (2,14-74,2).

Нами было выявлено статистически значимое различие ($p < 0,05$) концентрации Аβ 1-42 в группе здоровых детей (211,1±63,4 пг/мл; Me=221,3; (80,6-299,2)) от новорожденных, имеющих гипоксически-ишемическую энцефалопатию, независимо от ее степени тяжести.

При этом значения Аβ 1-42 в группе ГИЭ I статистически значимо отличается ($p < 0,05$) от группы детей с ГИЭ II-III.

При анализе средней концентрации Аβ 1-42 через 168 часов после

рождения видно, что тенденции, установленные в отношении концентрации, бета амилоида 1-42, на 3 сутки жизни новорожденных, не сохраняются. Так, при ГИЭ I, значение $A\beta$ 1-42 $68,9 \pm 53,3$ пг/мл; $Me=54,2$; (4,0-230,10) статистически не выше, чем в группе детей с ГИЭ II ($33,4 \pm 26,9$ пг/мл; $Me=28,8$; (6,96-92,7)) и с ГИЭ III ($24,99 \pm 18,5$ пг/мл; $Me=18,02$; (2,6-59,4)). Однако у всех новорожденных с проявлениями ГИЭ, вне зависимости от ее степени тяжести, концентрация бета амилоида 1-42 оказалась ниже, чем в группе контроля ($179,1 \pm 85,8$ пг/мл; $Me=174,1$; (56,4-298,6)). Таким образом и к концу 7 суток жизни нами было выявлено статистически значимое различие ($p < 0,05$) концентрации $A\beta$ 1-42 в группе здоровых детей от новорожденных, имеющих гипоксически-ишемическую энцефалопатию, независимо от ее степени тяжести.

Полученные результаты говорили о следующем:

а) через 6 часов после рождения, средняя концентрация в сыворотке крови $A\beta$ 1-42 в контрольной группе и группе детей с ГИЭ I статистически значимо ($p < 0,001$) выше, чем в группе детей с умеренной и тяжелой ГИЭ.

б) через 72 часа после рождения и к концу 7 суток жизни, средняя концентрация в сыворотке крови $A\beta$ 1-42 в контрольной группе здоровых новорожденных статистически выше ($p < 0,05$) концентрации исследуемого маркера чем в группе детей, имеющих гипоксически-ишемическую энцефалопатию, независимо от ее степени тяжести.

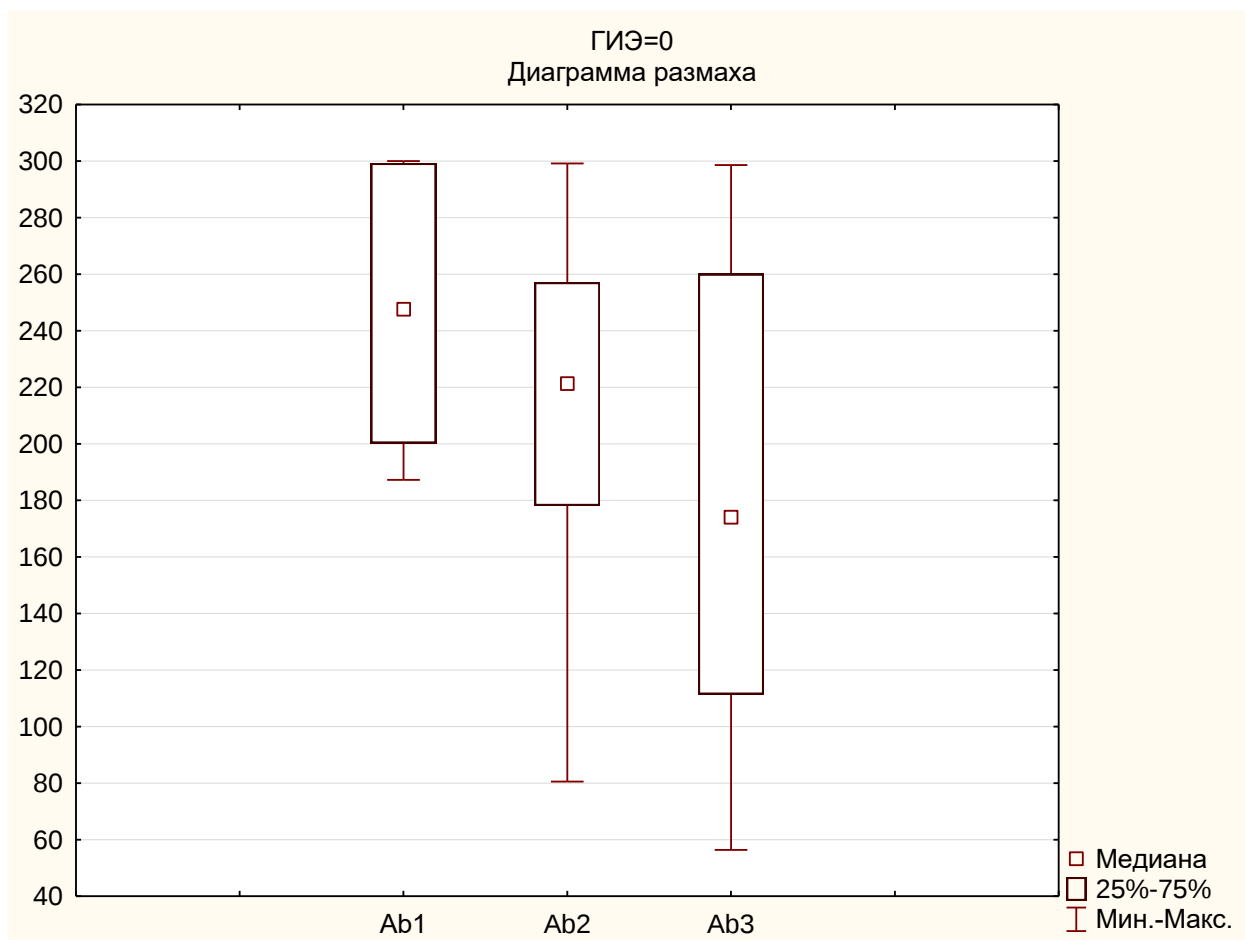
в) к концу 7 суток жизни отсутствует статистически достоверная разница в концентрации исследуемого маркера у детей с проявлениями гипоксически-ишемической энцефалопатии независимо от ее степени тяжести.

3.2. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе контроля

Как можно видеть из Рисунка 3.1, через 6 часов средняя

концентрация бета-амилоида 1-42 в группе здоровых новорожденных составила $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; Me=247,6; (187,3-330). В динамике через 72 часа она снизилась и составила $211,1 \pm 63,4$ пг/мл; Me=221,3; (80,6-299,2), однако данное снижение не было статистически значимым.

Рисунок 3.1. Динамика концентрации Аβ 1-42 в группе контроля



К 7 суткам жизни средняя концентрация бета-амилоида 1-42 продолжила снижаться и составила $179,1 \pm 85,8$ пг/мл; Me=174,1; (56,4-298,6). Данное снижение концентрации статистически значимо отличалось ($p < 0,05$) от концентрации Аβ 1-42 в первые 6 часов жизни новорождённых. Нами не было обнаружено различий в динамике изменения концентрации Аβ 1-42 в интервале между 72 ч. и 168 ч. Таким

образом, резюмируя полученные данные исследования динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе контроля, мы видим следующее:

а) в группе новорожденных без проявлений ГИЭ, наблюдается снижение средней концентрации бета амилоида 1-42 с 6 часов жизни и до 7 суток жизни;

б) динамика снижения концентрации не имеет статистически значимого различия в период с 6 часов жизни и до 3 суток жизни детей;

в) только к 7 суткам жизни динамика снижения концентрации Аβ 1-42 значимо отличалась ($p < 0,05$) от средней концентрации в первые 6 часов жизни.

3.3. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ I

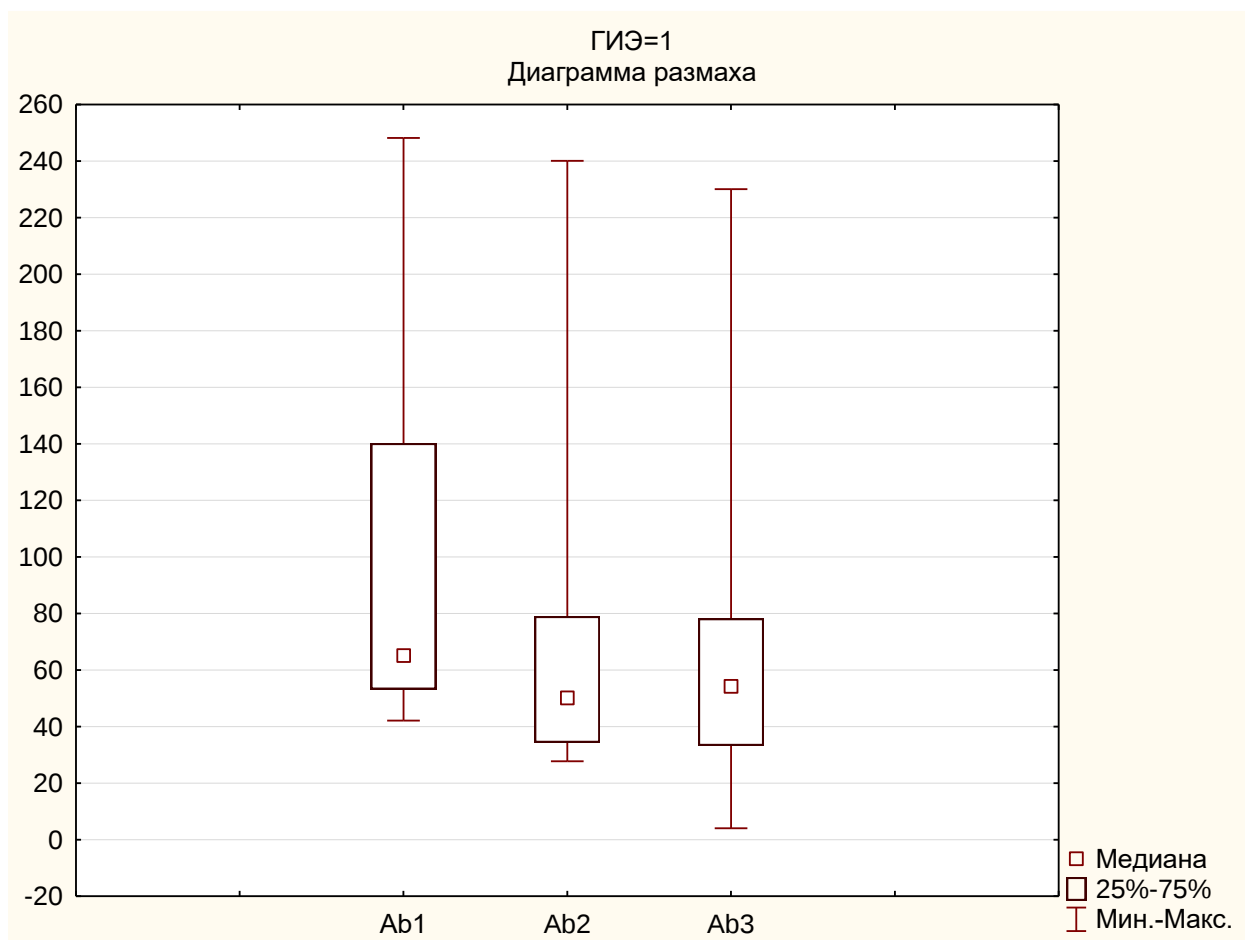
Анализируя динамику средней концентрации амилоида, бета 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ I можно отметить, что в период с 6 часов и до 7 суток жизни происходит снижение концентрации Аβ 1-42 (Рисунок 3.2). Так, в первые 6 часов жизни, значение Аβ 1-42 составило $99,3 \pm 69,0$ пг/мл; $Me = 65,1(42,1-248,1)$, которое к 3 суткам жизни снизилось до $74,3 \pm 62,2$ пг/мл; $Me = 50,1; (27,8-240,1)$ и к концу 7 суток жизни, продолжив свое снижение, достигло уровня $68,9 \pm 53,3$ пг/мл; $Me = 54,2; (4,0-230,10)$. Данное снижение средней концентрации в исследуемой группе детей с ГИЭ I имело статистически значимое различие ($p < 0,001$) через 6 часов и 72 ч, а также через 6 часов и 168 часов жизни. Сравнивая среднюю концентрацию Аβ 1-42 через 72 ч и 168 ч в группе детей с ГИЭ I можно также заметить ее снижение, которое не имело статистической значимости. Полученные результаты говорили о следующем:

а) в группе новорожденных с ГИЭ I, в период с 6 часов и до 7 суток жизни происходит снижение концентрации Аβ 1-42;

б) снижение средней концентрации в исследуемой группе детей с ГИЭ I имело статистически значимое различие ($p < 0,001$) через 6 часов и 72 ч, а также через 6 часов и 168 часов жизни;

в) снижение средней концентрации Аβ 1-42 через 72 ч и 168 ч в группе детей с ГИЭ I не имело статистической значимости.

Рисунок 3.2. Динамика концентрации Аβ 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ I

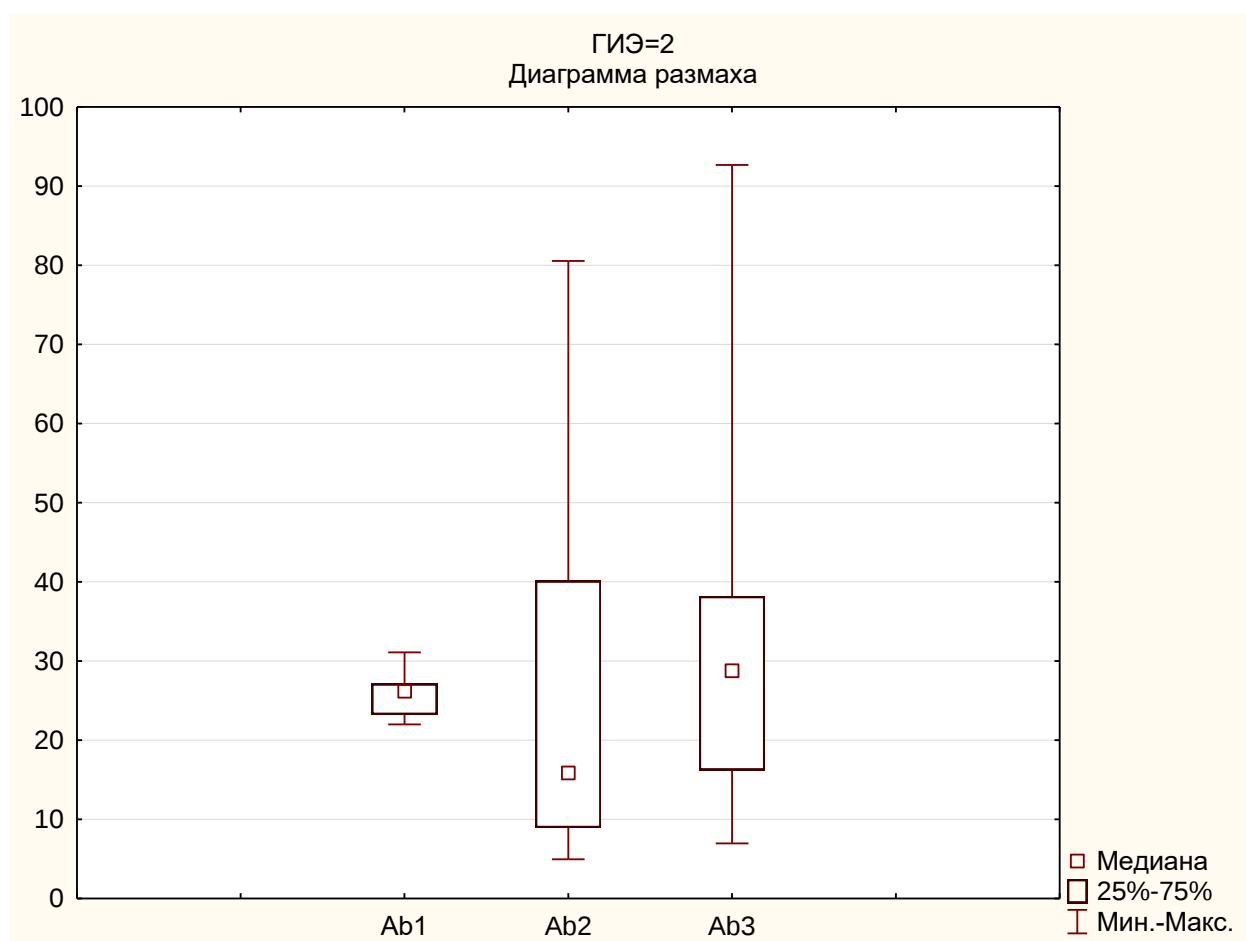


3.4. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ II

При рассмотрении динамики бета-амилоида 1-42 внутри группы новорожденных с ГИЭ II (Рисунок 3.3) нами было обнаружено, что в период с 6 часов и до 178 часов жизни происходит постепенное увеличение концентрации Аβ 1-42 от $25,7 \pm 2,5$ пг/мл; Ме=26,2; (22,0-31,1) в первые 6 часов до $28,7 \pm 26,6$ пг/мл; Ме=15,9(4,97-80,6) и

33,4±26,9 пг/мл; Me=28,8; (6,96- 92,7) к 3 и 7 суткам жизни соответственно. Данное повышение концентрации оказалась статистически значимо отличной ($p < 0,05$) между 72 ч. и 168 ч. жизни и не отличалась достоверно в остальные периоды.

Рисунок 3.3. Динамика концентрации Аβ 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ II



Как можно видеть, если при ГИЭ I и в группе контроля в течение периода от 6 ч. и до конца 7 суток жизни нами было выявлено снижение концентрации бета амилоида 1-42, то при ГИЭ II, напротив происходило некоторое увеличение концентрации изучаемого маркера в аналогичных периодах. Таким образом, полученные результаты этого этапа анализа говорили о следующем:

а) в группе новорожденных с ГИЭ II в период с 6 ч. и до 178 ч. жизни происходит постепенное увеличение концентрации Аβ 1-42 к 3 и 7

суткам жизни.

б) повышение концентрации оказалась статистически значимо отличной ($p < 0,05$) между 72 ч. и 168 ч. жизни и не отличалась достоверно в остальные периоды;

в) в группе новорожденных с проявлениями ГИЭ II, в отличие от группы контроля и детей с ГИЭ I происходило увеличение концентрации изучаемого маркера в течение периода от 6 ч. и до конца 7 суток жизни.

3.5. Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ III

Внутри группы новорожденных с ГИЭ III изучение динамики концентрации бета-амилоида 1-42 продемонстрировало схожую с группой детей ГИЭ II картину увеличения концентрации исследуемого маркера в период с 6 ч. до 3 суток жизни (Рисунок 3.4).

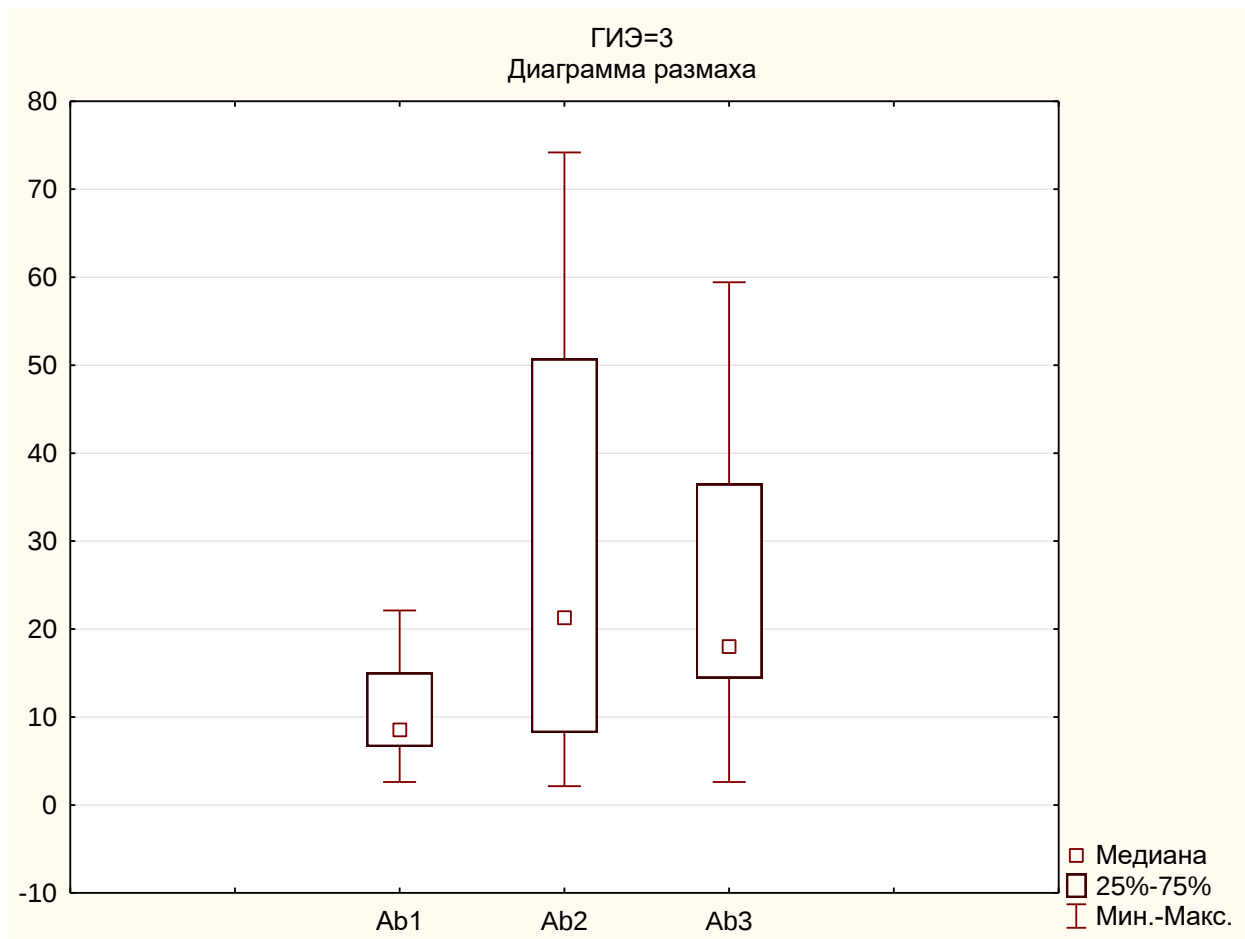
Так, в первые 6 ч. она составила $10,6 \pm 5,8$ пг/мл; $Me = 8,6$; (2,6-22,1), затем в 72 ч. увеличилась до $29,2 \pm 26,7$ пг/мл; $Me = 21,3$; (2,14-74,2). Это увеличение было статистически значимым ($p < 0,05$).

К концу 7 суток жизни средняя концентрация Аβ 1-42 составила $24,99 \pm 18,5$ пг/мл; $Me = 18,02$; (2,6-59,4). Она оказалась в 2,3 выше по сравнению со средней концентрацией в первые 6 ч. жизни. Данное отличие также было статистически значимо ($p < 0,05$).

Однако, сравнивая концентрации Аβ 1-42, к концу 3 суток и концу 7 суток жизни в исследуемой группе детей с ГИЭ III мы отмечаем, что в отличие от детей с ГИЭ II, происходит незначительное снижение средней концентрации бета-амилоида 1-42 (Таблица 3.1.).

Рисунок 3.4. Динамика концентрации Аβ 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ

III



Полученные результаты данного этапа анализа говорили о следующем:

а) в группе новорожденных с ГИЭ III выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение концентрации исследуемого маркера в период с 6 ч. до 3 суток жизни;

б) к концу 7 суток жизни средняя концентрация Аβ 1-42 оказалась в 2,3 раза выше по сравнению со средней концентрацией в первые 6 ч. жизни. Данное отличие было статистически значимо ($p < 0,05$).

в) динамика увеличения концентрации в группе новорожденных с

ГИЭ III оказалась схожей с группой детей ГИЭ II в период с 6 ч. до 3 суток жизни;

г) в группе новорожденных с проявлениями ГИЭ III, в отличие от группы детей с ГИЭ II происходило снижение концентрации изучаемого маркера в течение периода от 3 дней жизни и до конца 7 суток жизни. Данная закономерность не имела статистической значимости.

Подводя итоги данных изучения динамики концентрации Аβ 1-42 в группах новорожденных можно отметить, что внутри групп контроля и детей с явлениями ГИЭ I прослеживается схожая динамика снижения концентрации бета амилоида 1-42 с первых 6 часов и 168 ч. жизни.

Отсутствие статистически значимого различия в динамике снижения средней концентрации Аβ 1-42 с 6 часов до 72 ч жизни в группе контроля и наличие статистически значимого отличия в аналогичный период в группе детей ГИЭ I, а также в целом, более низкие абсолютные значения средней концентрации бета амилоида могут быть обусловлены тем, что уже начиная с периода 6 ч. и до 72 ч. жизни начинают формироваться нейродегенеративные процессы, которые в дальнейшем, в течение жизни, могут приводить к формированию различных патологических состояний в группе детей с ГИЭ I и отсутствуют в группе контроля, объясняя возникновение когнитивных и иных расстройств которые не имеют клинических проявлений в раннем неонатальном периоде вроде бы в благополучной по исходу группе детей с легкой ГИЭ.

Этот факт говорит о необходимости пристального внимания к данной группе детей и требует дальнейшего исследования возможности использования бета-амилоида 1-42 в качестве маркера для вычленения внутри данной группы детей угрожаемых по развитию патологии ЦНС и нейродегенеративных заболеваний в течение дальнейшей жизни.

РАЗДЕЛ 4. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У НОВОРОЖДЕННОГО НА ОСНОВАНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕТА-АМИЛОИДА 1-42 В ПЕРВЫЕ 6 ЧАСОВ ЖИЗНИ

С помощью полученных в исследовании данных, методом многомерной статистики (метод бинарной логистической регрессии), изучались причинно-следственные связи, и устанавливалась роль концентрации бета-амилоида 1-42, как прогностического фактора риска на исходы перинатального поражения ЦНС в виде гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных.

Как известно, регрессионный анализ служит для определения вида связи и дает возможность для прогнозирования значения одной (зависимой) переменной («отклик») отталкиваясь от значения другой (независимой) переменной («предиктора»). Бинарная логистическая регрессия представляет собой специальный вариант множественной линейной регрессии и отличается от нее тем, что в качестве зависимой переменной используется не количественная, а дихотомическая (бинарная) переменная, имеющая лишь два альтернативных значения «да» или «нет». Кроме того, при помощи индикаторной схемы кодирования допускается использование категориальных (номинативных) переменных. Таким бинарным переменным присваиваются значения 1 – «есть признак» или 0 – «нет признака» в зависимости от того, к какой категории относится субъект (больной, пациент).

Таким образом, с помощью бинарной логистической регрессии изучается зависимость дихотомических переменных от нескольких независимых переменных, имеющих любой вид статистической шкалы. Как правило, в случае с дихотомическими переменными речь идёт о некотором

событии, которое может произойти, или не произойти, т.е. существует альтернатива в наступлении события или исхода.

Как известно, вероятность может принимать значения в интервале от 0 (невозможное событие) до 1 (достоверное событие). В подавляющем числе случаев в реальной практике исследований вероятность событий находится в интервале между 0 и 1, исключая эти значения. Поскольку данные события не являются ни невозможными, ни достоверными, то их принято называть случайными.

В таком случае бинарная логистическая регрессия рассчитывает вероятность наступления события в зависимости от значений независимых переменных.

В общем виде вероятность (p) наступления события рассчитывается по формуле:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}} \quad \text{Формула (1.1)}$$

где e – экспонента, равная 2,718;

$Z = \text{Const.}a_0 + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots + b_n \times X_n$ (типичный пример уравнения множественной линейной регрессии);

X_1 – значения независимых переменных (факторов риска);

Const. a_0 и b – коэффициенты уравнения регрессии (расчёт этих коэффициентов и является задачей бинарной логистической регрессии).

Таким образом, если множественная линейная регрессия позволяет прогнозировать количественное значение зависимой переменной на основе известных значений независимых переменных, то бинарная логистическая регрессия прогнозирует вероятность события (исхода), находящуюся в пределах от 0 до 1. Если мы получаем p от 0 до 0,5, то событие не наступит (вероятность этого менее 50%); в противном случае (если $p > 0,5$) предполагается наступление события с вероятностью более 50%. Следовательно, в данном случае речь идет о создании такой математической

модели прогноза, которая позволяет оценивать степень риска наступления неблагоприятного исхода у индивидуума.

В нашем исследовании целью бинарной логистической регрессии являлось, во-первых, проверить гипотезу о влиянии факторов риска и антириска на развитие ГИЭ; во-вторых, используя уравнение бинарной логистической регрессии создать математическую модель для индивидуального прогноза развития гипоксически-ишемической энцефалопатии у конкретного пациента.

Построение прогностической модели проводили в два этапа. Первый этап – формирование базы данных анамнестических и клинических признаков и биохимических признаков детей и создание статистической матрицы для последующего расчета регрессионного уравнения. Второй этап – непосредственный расчет и оценка логической адекватности (математической и клинической) всех полученных прогностических моделей, с целью выбора одной оптимальной.

На первом этапе были изучены истории болезней $n=68$ новорождённых, родившихся в ДОКТМО с целью проведения одномерного анализа независимых переменных для идентификации наличия статистической связи с изучаемым клиническим исходом.

Для реализации модели были выбраны пациенты, у которых имелись проявления гипоксически-ишемической энцефалопатии ($n=58$).

В нашем случае основной задачей моделирования является прогноз развития гипоксически-ишемической энцефалопатии на основании данных концентрации бета амилоида 1-42 в первые 6 часов жизни. По сути, такая модель является экспресс-прогнозом, так как строится на основании минимально достаточного числа наиболее простых и всегда известных или легко определяемых фактов, не требующих высокой квалификации врачебного персонала и применения специальных дополнительных инструментальных методов исследования. Поэтому, в качестве прогнозируемого показателя-отклика определены исходы перинатального поражения ЦНС

(«благоприятный исход» – отсутствие у новорожденного ГИЭ и «неблагоприятный исход» – у ребенка развилась гипоксически-ишемическая энцефалопатия). В исходную обучающую матрицу включен 1 независимый признак, полученный иммунохимическим методом анализа – конкурентного ИФА (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Признаки, включенные в исходную обучающую матрицу для создания прогностической регрессионной модели

Переменная-предиктор (независимый признак)	Код признака	Градация признака	Число наблюдений (n)
Бета-амилоид 1-42	X ₁	от 2,6 до 300 пг/мл	68

На втором этапе мы получили коэффициенты регрессии (табл. 4.2.), методом обратной селекции используя процедуру «quasi-Newton оценивания» (максимальное количество итераций – 50). В качестве критерия проверки значимости использовали статистику Вальда (Wald), которая использует распределение χ^2 , и представляет собой квадрат отношения соответствующего коэффициента к его стандартной ошибке.

В целом статистическую (математическую) адекватность полученных моделей оценивали по величине критерия χ^2 максимум правдоподобия (критерий статистической значимости влияния на зависимую переменную всех предикторов заданной модели), а также использовали графический анализ (визуализировались гистограммы остатков и диаграммы рассеяния наблюдаемых и предсказанных значений).

Во всех процедурах бинарного логистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень принимался равным 0,05.

Решение задачи логистического регрессионного анализа нами было реализовано с помощью процедуры Logistic Regression Statistica 10.0. По итогам расчетов из нескольких вариантов моделей в окончательную

прогностическую модель бинарной логистической регрессии включен 1 признак – фактор риска для развития неблагоприятного исхода - развитие у ребенка ГИЭ. А именно – амилоид бета 1-42 в первые 6 часов жизни. Результаты оценки коэффициентов уравнения для этого признака приведены в табл. 4.2.

Таблица 4.2. Результаты бинарного логистического регрессионного анализа ($\chi^2=36,9$; $df=1$; $p < 0,0001$)

Переменная-предиктор	Оценка коэффициента	Стандартная ошибка	χ^2 Вальда	p-уровень значимости	Отношение шансов (ОШ)	95% доверительного интервала (ДИ) для ОШ
Константа (Const.a ₀)	6,63	2,1	10,04	0,002		
A β 1-42 (X ₁)	$b_1 = -0,031$	0,01	10,28	0,001	6,8	2,7 -20,4

Как видно из табл. 4.2, все коэффициенты логистического регрессионного уравнения и в целом модель статистически значимы (χ^2 максимум правдоподобия =36,9; $df=1$; $p < 0,001$). Графический анализ также показал, что именно данная прогностическая модель наиболее статистически адекватна. В полученной модели наблюдается согласование гистограммы остатков с нормальным распределением (рис. 4.1.), а диаграмма рассеяния показывает, что выбранная модель хорошо соответствует данным и точки наблюдаемых и предсказанных значений располагаются вдоль прямой линии (рис. 4.2).

Рисунок 4.1. Гистограмма согласованности остатков логистического регрессионного уравнения с нормальным распределением

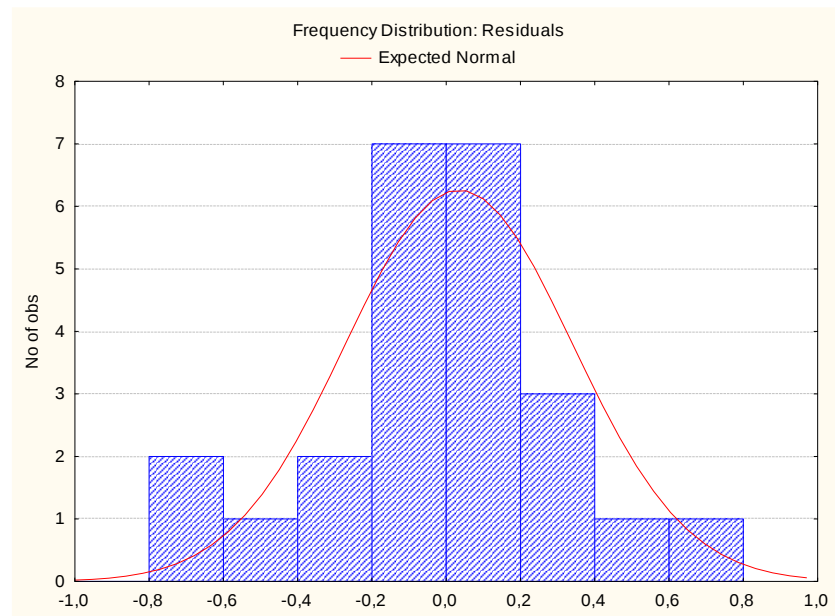
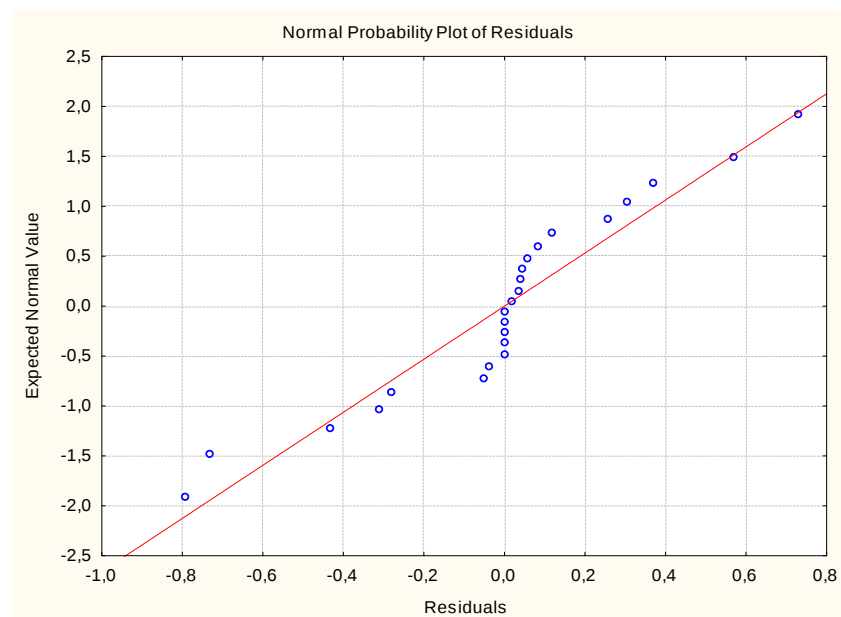


Рисунок 4.2. Нормальный вероятностный график рассеяния логистического регрессионного уравнения



Современные методы оценки уравнений логистической регрессии позволяют оценивать такой показатель, как отношение шансов и 95%-ный доверительный интервал для отношения шансов по предиктору Аβ 1-42. Для нашего случая установлено отношения шансов 6,8, а 95%-ный доверительный интервал для отношения шансов по изучаемому маркеру 2,7 -20,4.

Весьма важными показателями являются стандартизованные регрессионные коэффициенты в нашем случае регрессионный коэффициент предиктора амилоид бета 1-42 равен -0,031.

Таким образом, в окончательном виде уравнение бинарной логистической регрессии выглядит следующим образом:

$$p = \frac{1}{1 + 2,718^{6,63 - 0,031 X_1}} \quad \text{Формула (1.2)}$$

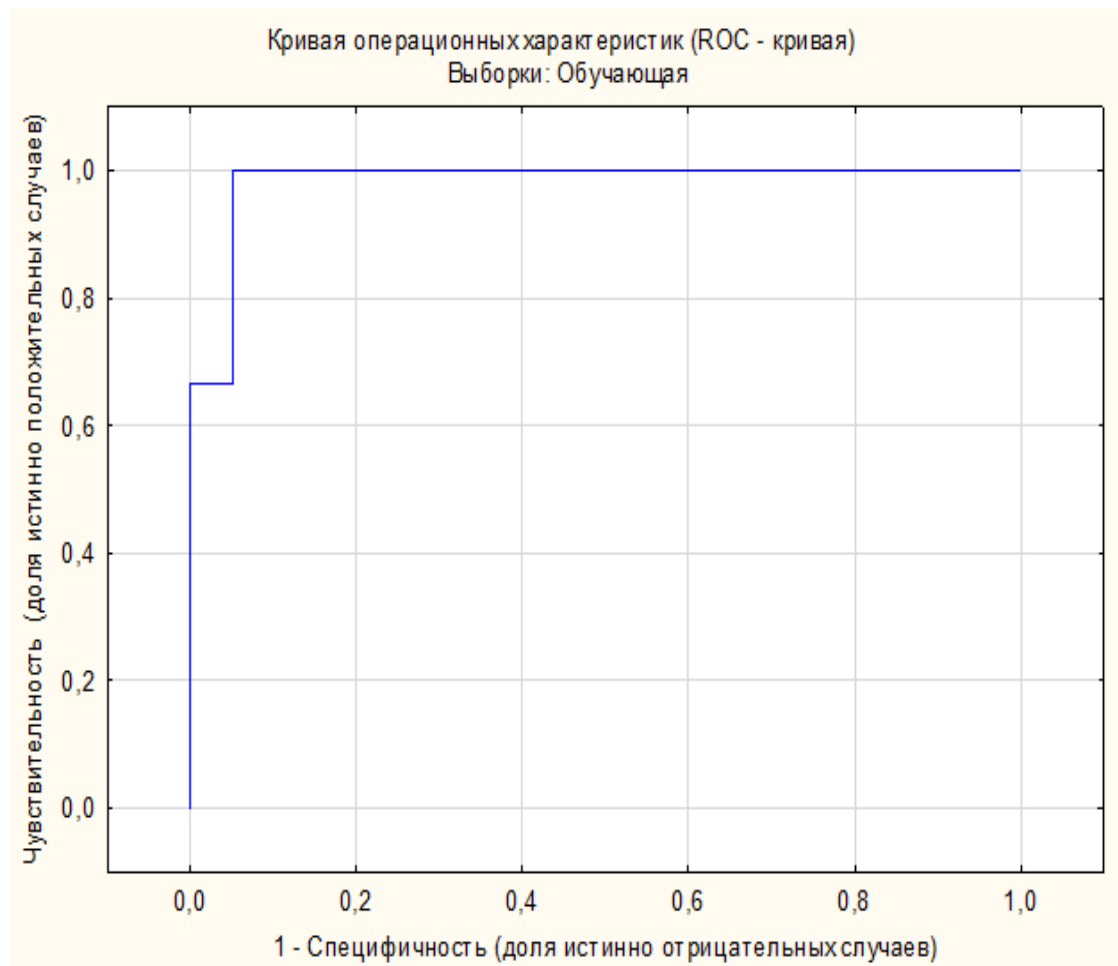
Полученные спецификационные таблицы позволили оценить дискриминирующую способность математической модели (диагностические характеристики): чувствительность – 63,6%; специфичность – 94,7%; эффективность – 79,2%; прогностическая ценность положительного результата – 70,0%; прогностическая ценность отрицательного результата – 93,1%.

Для оценки диагностической значимости и выявления оптимального разделяющего значения уровня Аβ 1-42 в первые 6 часов жизни нами был использован метод ROC-кривых (рис. 4.3). Площадь под ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи развития ГИЭ и уровня Аβ 1-42 составила $0,983 \pm 0,025$ с 95% ДИ: 2,7 -20,4. Полученная статистическая модель была статистически значимой ($p < 0,001$). Пороговое значение бета-амилоида 1-42 в точке отсечки равно 217 пг/мл. При уровне Аβ 1-42 ниже этого значения прогнозируемый риск превышает 50%, что свидетельствует о высоком риске развития ГИЭ у новорожденного.

Как видно, все полученные диагностические характеристики

достаточно высокие, поэтому эту модель можно использовать как диагностический тест.

Рисунок 4.3. Площадь под ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи развития ГИЭ и уровня Аβ 1-42.



Применение данной прогностической модели в реанимационной и неонатальной практике можно продемонстрировать на следующих клинических примерах.

Пример №1. Ребенок Ю., новорожденный мальчик, второй из двойни от 2 беременности, срок гестации 40 и 1/7 недели. Рожден с оценкой 7-8 баллов по шкале Апгар. Вес при рождении 3250 г, клинически здоров, находился на совместном пребывании с матерью, приложен к груди в родильном зале.

Уровень бета-амилоида 1-42 составил 299,82 пг/мл через 6 ч. после рождения. Тогда, подставив в уравнение (1.2.) это значение фактора риска, получаем $Z = -2,51$, и вероятность развития неблагоприятного исхода (развитие ГИЭ) в таком случае равна $p = 0,07$ (7 %). То есть, ожидать, что у такого ребенка будет исход в виде развития ГИЭ не следует.

Пример №2. Ребенок Б., новорожденный мальчик от 3 беременности, срок гестации 39 и 5/7 недели, рожден с оценкой 4-6-7 баллов по шкале Апгар. Вес при рождении 3300 г. Находился на лечении в ОРИТН в связи с явлениями асфиксии при рождении. Уровень бета-амилоида 1-42 составил 23,59 пг/мл через 6 ч. после рождения. Подставив в уравнение (1.2.) это значение фактора риска, получаем $Z = +5,91$, и вероятность развития неблагоприятного исхода в таком случае равна $p = 1,0$ (100 %), т. е. крайне высокий риск, что у больного исходом рождения будет ГИЭ, что и было подтверждено в дальнейшем клиническим течением ГИЭ у данного пациента.

Таким образом, полученная нами бинарная логистическая регрессия, является клинически адекватной и работоспособной математической моделью для индивидуального прогноза развития ГИЭ у новорожденного на основании концентрации в сыворотке крови изучаемого нами предиктора бета-амилоида 1-42 в первые 6 часов жизни.

РАЗДЕЛ 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном моноцентровом, контролируемом, проспективном, динамическом клиническом исследовании от момента рождения ребенка до 7 суток жизни была достигнута цель в виде разработки нового способа диагностики гипоксически-ишемической энцефалопатии у доношенных новорожденных в отделении интенсивной терапии новорожденных (ОИТН) путем изучения маркера бета-амилоида 1-42 для усовершенствования интенсивной терапии.

Клиническая часть исследования проведена в период с 2017 по 2021 гг. на кафедре анестезиологии, реаниматологии и неонатологии ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО на базе отделения неонатологии и интенсивной терапии новорожденных Донецкого клинического территориального медицинского объединения (ДОКТМО).

Всего обследовано 58 доношенных новорожденных пациентов в возрасте от 0 ч. жизни и до окончания раннего неонатального периода. Из них мальчиков – 32, что составило 55,2% обследованных и 26 новорожденных девочек, что составило 44,8% обследованных детей.

Обследовались дети, рожденные в тяжелой, средней и умеренной асфиксии.

Возраст матерей всех исследуемых групп значимо не отличался, составил в среднем $27,8 \pm 3,2$ года. Роженицы не имели экстрагенитальной патологии. Первобеременные составили 32,5%. Патологическое течение беременности выявлено в 97,6% случаев – преэклампсии различной степени тяжести, анемия, перенесенные ОРВИ, урогенитальные инфекции.

Антропометрические показатели включенных в исследование детей в 96,4% соответствовали средним значениям по данному гестационному

сроку (от 25 до 75 центиля). Дети с задержкой внутриутробного развития составили 3,4% (гипотрофический вариант I ст.).

После рождения всем детям, рожденным в асфиксии, в родильном зале, при необходимости, проводились реанимационные мероприятия согласно методическому письму МЗ РФ «Реанимация и стабилизация состояния новорожденных детей в родильном зале» [14]. Все новорожденные после оказания реанимационных мероприятий в родильном зале переводились в отделение интенсивной терапии новорожденных ДОКТМО.

На протяжении всего периода наблюдения интенсивная терапия проводилась всем пациентам основных групп исследования согласно общепринятым в РФ и ДНР порядкам оказания медицинской помощи по профилю неонатология и утвержденным, действующим клиническим рекомендациям.

У детей с ГИЭ средней и тяжелой стадии/степени применялась общая гипотермия с целевой ректальной температурой 33,5-34,0 градуса Цельсия. Охлаждение проводилось на протяжении 72 ч - общепринятого стандарта при данной процедуре. После 72 ч охлаждения проводилось согревание со скоростью 0,5 градуса в час.

Все дети выхаживались в условиях реанимационного стола. При наличии дыхательных расстройств любой степени тяжести применялась респираторная терапия соответствующая тяжести дыхательной недостаточности.

Выбор метода респираторной поддержки у больных обосновывался степенью поражения легких и наличия дисфункции со стороны других органов и систем организма пациента. Для проведения респираторной терапии использовали респираторы: «Leoni-2», «Intermed-Neo» «Millennium».

В случае нестабильной гемодинамики по показаниям использовались средства инотропной поддержки (добутамин 1-5 мкг/кг/мин, дофамин 1-10

мкг/кг/мин, адреналин 0,5-1мкг/кг/мин). Осуществлялся динамический мониторинг функционального состояния жизненно важных систем, уровней гематокрита, гемоглобина, билирубина, глюкозы, определение суточного диуреза.

Вскармливание новорожденных осуществлялось сцеженным грудным молоком.

В случае отсутствия или недостаточного объема материнского молока вскармливание осуществляли адаптированными искусственными смесями.

В связи с сохраняющейся неврологической симптоматикой, больные с ГИЭ средней и тяжелой степени тяжести продолжали лечение после 7 суток, в случае стабилизации состояния, в отделениях патологии новорожденных.

С целью определения референтных значений бета-амилоида 1-42 в сыворотке, дополнительно были обследованы 10 здоровых доношенных новорожденных, вошедших в группу контроля (6 мальчиков и 4 девочки).

Программа исследования включала в себя количественное определение бета-амилоида 1-42 (Ab 1-42) в крови методом конкурентного ИФА. С этой целью была использована тест-система «Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit for Amyloid Beta Peptide 1-42» (Cloud-Clone Corp., США).

Оценку уровня Ab 1-42 производили через 6 ч. после рождения, далее в конце 3-х и 7-х суток жизни. Анализы проводились в ЦНИИЛ ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО (г. Донецк).

При этом были определены референтные значения (группа нормы) Ab 1-42 через 6 ч., 72 ч. и 168 ч. жизни здоровых новорожденных.

Так, через 6 часов после рождения средняя концентрация в сыворотке крови A β 1-42 составила $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; Me=247,6; (187,3-300), через 72 ч. – $211,1 \pm 63,4$ пг/мл; Me=221,3; (80,6-299,2), а через 168 ч. $179,1 \pm 85,8$ пг/мл; Me=174,1; (56,4-298,6).

Референтные значения для содержания Ab 1-42 в сыворотке крови новорожденных в динамике ранее установлены не были.

Пациенты, находящиеся в отделении интенсивной терапии и реанимации были распределены, в зависимости от задач исследования, в соответствии с тяжестью их энцефалопатии по шкале по Sarnat H., Sarnat M., 1976 в модификации Stoll B., Kliegman R., 2004 (приложение 1) на 3 группы – ГИЭ I, ГИЭ II и ГИЭ III. Исследование бета-амилоида 1-42 в группах было проведено, как и в контрольной группе, через 6 часов после рождения, 72 часа и 168 часов.

Протеины бета амилоида участвуют в процессах активации глутаматно-кальциевого стресса, цитотоксичной активности, активации апоптоза, проявляют свое участие в системе врожденного иммунитета, регулируют процессы нейровоспаления и нейродегенерации.

По нашему мнению, все это, наряду с единственным клиническим исследованием по данной тематике [26], предварительно указывающим на возможную взаимосвязь ГИЭ и бета амилоида у новорожденных, получивших терапевтическую гипотермию, свидетельствует о актуальности и перспективности изучения в качестве одного из таких возможных биомаркеров бета амилоида 1-42, что и явилось целью нашего исследования.

В литературе практически отсутствуют данные о роли бета-амилоида 1-42 как возможного маркера гипоксически-ишемической энцефалопатии. Также, отсутствуют данные о динамике и взаимоотношениях уровней данного маркера у детей с ГИЭ и у здоровых новорожденных в раннем неонатальном периоде.

Нами было проведено исследование концентрации бета-амилоида 1-42 и его динамики в раннем неонатальном периоде в плазме крови у здоровых новорожденных и у детей с ГИЭ.

При анализе полученных результатов, был выявлен ряд закономерностей. Так, через 6 часов после рождения, средняя концентрация

в сыворотке крови Аβ 1-42 составила в контрольной группе $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; $Me=247,6$; (187,3-330), что оказалось в 25 раз выше ($p < 0,001$), чем у детей с проявлениями ГИЭ III ст. ($10,6 \pm 5,8$ пг/мл; $Me=8,6$; (2,6-22,1)). У новорожденных с ГИЭ II ст. аналогичные показатели ($25,7 \pm 2,5$ пг/мл; $Me=26,2$; (22,0-31,1)), оказались в 10 раз меньше ($p < 0,001$), чем в группе контроля, но выше, чем при ГИЭ III. У новорожденных с ГИЭ I ст., концентрация Аβ 1-42 составила $99,3 \pm 69,0$ пг/мл; $Me=65,1$; (42,1-248,1), что статистически значимо отличается от показателей у детей с ГИЭ II-III ст. ($p < 0,001$).

Таким образом, нами не было выявлено различий между концентрацией бета-амилоида 1-42 между группой контроля и у детей, имеющих легкую степень поражения ЦНС (ГИЭ I ст.) в течение первых 6 часов жизни. Напротив, уровень бета амилоида 1-42, определяемый в первые 6 ч. жизни в группе контроля и группе детей с явлениями ГИЭ I, статистически достоверно ($p < 0,001$) отличался от группы новорожденных с явлениями более тяжелого течения ГИЭ II-III ст.

Полученные данные свидетельствуют о следующем:

- 1) начиная с первых 6 часов жизни концентрация бета-амилоида 1-42 имеет обратную корреляцию с ГИЭ. Чем тяжелее гипоксически-ишемическая энцефалопатия, тем в большей степени выражено снижение бета-амилоида 1-42. Эти данные согласуются с ранее полученными данными в экспериментальном и клиническом исследовании [26, 132].
- 2) в группе здоровых новорожденных и детей с явлениями легкой гипоксически-ишемической энцефалопатии в первые 6 ч. жизни изучаемый маркер был достоверно ($p < 0,001$) выше, чем в группе детей с ГИЭ II-III.

Учитывая тот факт, что единственным утвержденным и официально используемым методом лечения ГИЭ средней и тяжелой степени в настоящее время у новорожденных является гипотермия, а отбор в группу

проведения гипотермии должен быть решен как можно раньше (не позднее 6 часов жизни новорожденного), то данные, полученные в отношении концентрации Аβ 1-42 менее 42 пг/мл через 6 часов жизни, могут быть использованы для верификации пациентов для этого метода лечения, дополнив уже существующие критерии отбора.

Анализ средней концентрации через 72 ч. после рождения показал, что с увеличением степени тяжести ГИЭ происходит снижение концентрации Аβ 1-42. Об этом свидетельствуют следующие данные – при ГИЭ I, значение Аβ 1-42 составило $74,3 \pm 62,2$ пг/мл; Me=50,1; (27,8-240,1), при ГИЭ II $28,7 \pm 26,6$ пг/мл; Me=15,9; (4,97-80,6), а у новорожденных с ГИЭ III – $29,2 \pm 26,7$ пг/мл; Me=21,3; (2,14-74,2).

Нами было выявлено статистически значимое различие ($p < 0,001$) концентрации Аβ 1-42 в группе здоровых детей ($211,1 \pm 63,4$ пг/мл; Me=221,3; (80,6-299,2)) от новорожденных, имеющих гипоксически-ишемическую энцефалопатию, независимо от ее степени тяжести.

При этом значения Аβ 1-42 в группе ГИЭ I статистически значимо отличается ($p < 0,05$) от группы детей с ГИЭ II-III.

Полученные данные свидетельствуют о следующем:

1) концентрация бета-амилоида 1-42 через 72 ч. имеет аналогичный профиль, как и в течение первых 6 часов после рождения, демонстрируя обратную корреляцию с тяжестью гипоксически ишемической энцефалопатии;

2) спустя 72 часа после развития перинатальной энцефалопатии значения Аβ 1-42 в группе ГИЭ I статистически значимо отличается ($p < 0,05$) от группы детей с ГИЭ II-III;

3) выявлено статистически значимое различие ($p < 0,001$) концентрации Аβ 1-42 в группе здоровых детей от новорожденных, имеющих гипоксически-ишемическую энцефалопатию, независимо от ее степени тяжести к концу 3 суток жизни.

Установленные закономерности спустя 72 ч. после рождения

помогают в идентификации группы детей с ГИЭ I от группы здоровых и новорожденных со среднетяжелым и тяжелым поражением ЦНС, отражая временную динамику развития патогенетических процессов в этой группе новорожденных.

Анализируя концентрации исследуемого маркера через 168 ч. после рождения, мы увидели, что тенденции, установленные в отношении концентрации, бета амилоида 1-42, на 3 сутки жизни новорожденных, не сохраняются. При ГИЭ I, значение $A\beta$ 1-42 $68,9 \pm 53,3$ пг/мл; $Me = 54,2$; (4,0-230,10) оказалось статистически не выше, чем в группе детей с ГИЭ II ($33,4 \pm 26,9$ пг/мл; $Me = 28,8$; (6,96-92,7)) и с ГИЭ III ($24,99 \pm 18,5$ пг/мл; $Me = 18,02$; (2,6-59,4)).

Однако у всех новорожденных с проявлениями ГИЭ, вне зависимости от ее степени тяжести, концентрация бета амилоида 1-42 оказалась ниже, чем в группе контроля ($179,1 \pm 85,8$ пг/мл; $Me = 174,1$; (56,4-298,6)), данное отличие было статистически достоверным ($p < 0,05$).

Эти результаты говорили о следующем:

1) в группе здоровых новорожденных к концу 7 суток жизни, средняя концентрация в сыворотке крови $A\beta$ 1-42, как и в конце 3 дней жизни, статистически выше ($p < 0,05$), чем в группе детей, имеющих гипоксически-ишемическую энцефалопатию, независимо от ее степени тяжести.

2) к концу 7 суток жизни отсутствует статистически достоверная разница в концентрации исследуемого маркера у детей с проявлениями гипоксически-ишемической энцефалопатии независимо от ее степени тяжести.

Таким образом, начиная с первых 6 часов жизни и до завершения раннего неонатального периода (168 ч. с момента рождения), концентрация бета амилоида 1-42 оставалась сниженной у пациентов с ГИЭ по сравнению со здоровыми детьми, проявляя обратную корреляцию.

Исследование динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе

контроля показало, что, спустя 6 часов средняя концентрация бета-амилоида 1-42 в группе здоровых новорожденных составила $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; $Me=247,6$; (187,3-330). В динамике через 72 ч. она снизилась и составила $211,1 \pm 63,4$ пг/мл; $Me=221,3$; (80,6-299,2), однако данное снижение не было статистически значимым.

К 7 суткам жизни средняя концентрация бета-амилоида 1-42 продолжила снижаться и составила $179,1 \pm 85,8$ пг/мл; $Me=174,1$; (56,4-298,6). Данное снижение концентрации статистически значимо отличалось ($p < 0,05$) от концентрации $A\beta$ 1-42 в первые 6 часов жизни новорождённых. Нами не было обнаружено различий в динамике изменения концентрации $A\beta$ 1-42 в интервале между 72 ч. и 168 ч.

Таким образом, резюмируя полученные данные исследования динамики концентрации бета-амилоида 1-42 в группе контроля, мы видим следующее:

а) в группе новорожденных без проявлений ГИЭ, наблюдается снижение средней концентрации бета амилоида 1-42 с 6 часов жизни и до 7 суток жизни;

б) динамика снижения концентрации не имеет статистически значимой достоверности в период с 6 часов жизни и до 3 суток жизни детей;

в) только к 7 суткам жизни динамика снижения концентрации значимо отличалась ($p < 0,05$) от средней концентрации в первые 6 часов жизни.

В литературе нами не было найдено ни одного исследования касающихся динамики исследуемого маркера в группе здоровых новорожденных в раннем неонатальном периоде.

Оценивая динамику средней концентрации бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ I можно отметить, что в период с 6 часов и до 7 суток жизни происходило снижение концентрации $A\beta$ 1-42.

Так, в первые 6 часов жизни, значение $A\beta$ 1-42 составило $99,3 \pm 69,0$

пг/мл; $Me=65,1(42,1-248,1)$, которое к 3 суткам жизни снизилось до $74,3\pm 62,2$ пг/мл; $Me=50,1; (27,8-240,1)$ и к концу 7 суток жизни, продолжив свое снижение, достигло уровня $68,9\pm 53,3$ пг/мл; $Me=54,2; (4,0-230,10)$.

Данное снижение концентрации в исследуемой группе детей с ГИЭ I имело статистически значимое различие ($p < 0,001$) через 6 часов и 72 ч., а также через 6 часов и 168 часов жизни.

Сравнивая среднюю концентрацию маркера через 72 ч. и 168 ч. в группе детей с ГИЭ I, можно также заметить ее снижение, которое не имело, однако, статистической значимости.

Полученные результаты говорили о следующем:

а) в группе новорожденных с ГИЭ I в период с 6 часов и до 7 суток жизни происходит снижение концентрации $A\beta$ 1-42;

б) снижение средней концентрации в исследуемой группе детей с ГИЭ I имело статистически значимое различие ($p < 0,001$) через 6 часов и 72 ч., а также через 6 часов и 168 часов жизни;

в) снижение средней концентрации $A\beta$ 1-42 через 72 ч. и 168 ч. в группе детей с ГИЭ I не имело статистической значимости.

Можно заметить, что в группе детей с легкой степенью гипоксически-ишемической энцефалопатии, изменение динамики концентрации маркера было аналогичным группе здоровых детей. В обеих этих группах происходило постепенное снижение средней концентрации $A\beta$ 1-42 к концу раннего неонатального периода.

При рассмотрении динамики бета-амилоида 1-42 в группе новорожденных с ГИЭ II нами было обнаружено, что в период с 6 ч. и до 178 ч. жизни происходит постепенное увеличение концентрации $A\beta$ 1-42 от $25,7\pm 2,5$ пг/мл; $Me=26,2; (22,0-31,1)$ в первые 6 ч. до $28,7\pm 26,6$ пг/мл; $Me=15,9(4,97-80,6)$ и $33,4\pm 26,9$ пг/мл; $Me=28,8; (6,96-92,7)$ к 3 и 7 суткам жизни соответственно. Данное повышение концентрации оказалась статистически достоверным ($p < 0,05$) между 72 ч. и 168 ч. жизни и не

отличалась достоверно в остальные периоды.

Как можно видеть, если при ГИЭ I и в группе контроля в течение периода от 6 ч. и до конца 7 суток жизни нами было выявлено снижение концентрации бета амилоида 1-42, то при ГИЭ II, напротив происходило некоторое увеличение концентрации изучаемого маркера в аналогичных периодах.

Таким образом, полученные результаты этого этапа анализа говорили о следующем:

1) в группе новорожденных с ГИЭ II в период с 6 ч. и до 178 ч. жизни происходит постепенное увеличение концентрации изучаемого маркера к 3 и 7 суткам жизни.

2) повышение концентрации оказалась статистически достоверно отличным ($p < 0,05$) между 72 ч. и 168 ч. жизни и не отличалась достоверно в остальные периоды;

3) в группе новорожденных с проявлениями ГИЭ II, в отличие от группы контроля и детей с ГИЭ I происходило увеличение концентрации изучаемого маркера в течение периода от 6 ч. и до конца 7 суток жизни.

В группе новорожденных с ГИЭ III изучение динамики концентрации бета-амилоида 1-42 продемонстрировало схожую с группой детей ГИЭ II картину увеличения концентрации исследуемого маркера в период с 6 ч. до 3 суток жизни. Так, в первые 6 ч. она составила $10,6 \pm 5,8$ пг/мл; $Me = 8,6$; (2,6-22,1), затем в 72 ч. увеличилась до $29,2 \pm 26,7$ пг/мл; $Me = 21,3$; (2,14-74,2). Это увеличение было статистически достоверным ($p < 0,05$).

К концу 7 суток жизни средняя концентрация Аβ 1-42 составила $24,99 \pm 18,5$ пг/мл; $Me = 18,02$; (2,6-59,4). Она оказалась в 2,3 выше по сравнению со средней концентрацией в первые 6 ч. жизни. Данное отличие также было статистически значимо ($p < 0,05$).

Однако, сравнивая концентрации Аβ 1-42, к концу 3 суток и концу 7 суток жизни в исследуемой группе детей с ГИЭ III мы отмечаем, что в

отличие от детей с ГИЭ II, происходит незначительное снижение средней концентрации бета-амилоида 1-42.

Полученные результаты данного этапа анализа говорили о следующем:

1) в группе новорожденных с ГИЭ III выявлено статистически значимое увеличение концентрации исследуемого маркера в период с 6 ч. до 3 суток жизни;

2) к концу 7 суток жизни средняя концентрация A β 1-42 оказалась в 2,3 раза выше по сравнению со средней концентрацией в первые 6 ч. жизни. Данное отличие было статистически значимо ($p < 0,05$).

3) динамика увеличения концентрации в группе новорожденных с ГИЭ III оказалась схожей с группой детей ГИЭ II в период с 6 ч. до 3 суток жизни;

4) в группе новорожденных с проявлениями ГИЭ III, в отличие от группы детей с ГИЭ II происходило снижение концентрации изучаемого маркера между 3 и 7 сутками жизни. Данная закономерность не имела статистической достоверности.

Резюмируя изложенные выше данные, мы наблюдаем обратную корреляцию концентрации бета-амилоида 1-42 со степенью тяжести ГИЭ. Нами установлена также тенденция к увеличению бета амилоида 1-42 у лиц с ГИЭ II-III, а у здоровых новорожденных и детей с легкой степенью гипоксически-ишемической энцефалопатии к снижению концентрации бета амилоида 1-42 в динамике к 7 суткам жизни внутри каждой из исследованных нами групп. При этом концентрация бета амилоида 1-42 у здоровых новорожденных и детей с легкой степенью ГИЭ во все периоды наблюдения оказалась выше, чем у детей с умеренной и тяжелой степенью ГИЭ.

Как говорилось ранее, многочисленные исследования свидетельствуют о том, что баланс A β , по-видимому, играет ключевую роль в болезни Альцгеймера. Было показано, что плазменные концентрации A β 1-42 снижаются по мере прогрессирования заболевания, и были показаны

отрицательные корреляции между плазменным A β 1-42 и отложением амилоида в неокортексе [160].

Кроме того, данные, приведенные в исследованиях [73, 72] говорили, что энцефалопатия и смерть младенцев с тяжелой травмой головы были связаны с гипоксически-ишемическим повреждением, сопровождающимся повышенными уровнями белка предшественника амилоида (APP) в стволе мозга и мозжечке.

Следовательно, возможно снижение уровня A β в плазме крови у пациентов с ГИЭ также может быть связано с усилением центрального амилоидоза и нейродегенерации, в то время как проводимая интенсивная терапия несколько уравнивает этот эффект, что и объясняет некоторое повышение уровня изучаемого маркера в динамике к 3 и 7 суткам жизни в группе детей с ГИЭ II-III.

Полученные нами данные, указывающие на снижение концентрации бета-амилоида 1-42 у новорожденных с ГИЭ, согласуются и с ранее опубликованными данными единственного экспериментального и единственного клинического исследования, затрагивающего данную тематику [26, 132].

Как было сказано нами выше, концентрация бета амилоида 1-42 у здоровых новорожденных и детей с легкой степенью ГИЭ во все периоды наблюдения оказалась выше, чем у детей с умеренной и тяжелой степенью ГИЭ.

Высокие уровни этого пептида у здоровых новорожденных без явлений ГИЭ подтверждают физиологическую роль этих пептидов в развитии мозга. В пользу данного утверждения говорят и данные экспериментальных исследований, в которых иммунизация мутантных мышей по APP человеческим A β 1- 42 приводила к повышению концентрации бета-амилоида и к удалению отложений A β из головного мозга и устранению когнитивных нарушений [17].

При реализации неонатальной энцефалопатии происходит активное

взаимодействие бета амилоида с различными рецепторами, а также его фиксация в различных структурах ЦНС, что в динамике и ведет к снижению его концентрации в крови, которое мы и отмечаем в группе детей с явлениями перинатального поражения ЦНС.

В ходе нашего исследования было установлено, что группе новорожденных с проявлениями ГИЭ III, в отличие от группы детей с ГИЭ II происходило снижение концентрации изучаемого маркера между 3 и 7 сутками жизни.

Хотя данная закономерность не выявила своей статистической значимости в периоде между 72 ч. и 168 ч. жизни в группе детей с ГИЭ III ($p < 0,67$), при этом следует учитывать имеющиеся сведения о том, что изменение уровня A β и непрерывная агрегация могут способствовать хроническому ответу врожденной иммунной системы за счет активации микроглии, что может привести к потере нейронов из-за прямого фагоцитоза. Следовательно, данный факт может говорить в пользу предположения о том, что и к концу 7 суток жизни продолжают и более выражены нейродегенеративные процессы в ЦНС новорожденных, приводя в последующем к формированию более тяжелой патологии у детей с тяжелой ГИЭ III по сравнению с группой детей с ГИЭ II. Более того, этот процесс может влиять и на всю последующую жизнь новорожденного даже без тяжелого поражения ЦНС, увеличивая, возможно, риск развития нейродегенеративных заболеваний во взрослом возрасте.

Данный факт требует дальнейшего исследования, изучаемого нами маркера.

Изучая динамику концентрации A β 1-42 в группах новорожденных нами было замечено, что внутри групп контроля и детей с явлениями ГИЭ I прослеживается схожая динамика снижения концентрации бета амилоида 1-42 с первых 6 часов и 168 часов жизни.

Отсутствие статистически значимого различия в динамике

снижения средней концентрации $A\beta$ 1-42 с 6 часов до 72 часов жизни в группе контроля и наличие статистически значимого отличия в аналогичный период в группе детей ГИЭ I, а также в целом, более низкие абсолютные значения средней концентрации бета амилоида могут быть обусловлены тем, что уже начиная с периода 6 ч. и до 72 ч. жизни начинают формироваться нейродегенеративные процессы, которые в дальнейшем, в течение жизни, могут приводить к формированию различных патологических состояний в группе детей с ГИЭ I и отсутствуют в группе контроля, объясняя возникновение когнитивных и иных расстройств которые не имеют клинических проявлений в неонатальном периоде вроде бы в благополучной по исходу группе детей с легкой неонатальной энцефалопатией.

Этот факт говорит о необходимости пристального внимания к данной группе детей и требует дальнейшего исследования возможности использования бета амилоида 1-42 в качестве маркера для вычленения внутри данной группы детей угрожаемых по развитию патологии ЦНС и нейродегенеративных заболеваний в течение дальнейшей жизни.

Внутри же групп с явлениями умеренной и тяжелой неонатальной ГИЭ II-III прослеживается отчетливая тенденция к увеличению концентрации $A\beta$ 1-42 в период с 6 ч. жизни и до 7 суток. Данная зависимость, возможно, отражает приспособительные, восстановительные процессы, происходящие в динамике в неонатальном периоде в группе детей с явлениями умеренной и тяжелой неонатальной энцефалопатии на фоне проводимой интенсивной терапии.

Но, следует учитывать, что, несмотря на увеличение средней концентрации $A\beta$ 1-42 у детей с тяжелыми проявлениями неонатальной энцефалопатии не происходит ее увеличение до минимального уровня детей в группе контроля и эта разница весьма существенна. И это свидетельствует в пользу гипотезы о том, что в данной группе новорожденных преобладают нейродегенеративные процессы, одним из

триггеров которых является амилоид бета 1-42.

Таким образом, полученные нами данные о динамике достоверного снижения уровня бета-амилоида 1-42 в группе детей с ГИЭ II-III по сравнению с группой ГИЭ I и здоровых новорожденных, могут дать возможность отличить легкую форму гипоксически-ишемической энцефалопатии от умеренной и тяжелой ГИЭ уже начиная с 6 часового интервала и отсортировать новорожденных с высоким риском развития тяжелого перинатального поражения ЦНС для дальнейшего лечения и наблюдения, а полученные сведения о динамике изучаемого маркера бета амилоида 1-42 могут позволить проводить скрининг новорожденных с ГИЭ, позволяя отслеживать прогрессирование повреждения мозга и реакцией на проводимую терапию с помощью серийных измерений и коррелировать полученные данные со степенью поражения головного мозга, позже наблюдаемого при НСГ или МРТ.

В настоящее время единственным утвержденным методом лечения гипоксически-ишемической энцефалопатии, как говорилось нами ранее, является терапевтическая гипотермия. Однако с момента открытия этого новаторского лечения был достигнут незначительный прогресс в определении аддитивных фармакологических методов лечения. Реанимация при комнатной температуре [144, 141] и использование ксенонового газа наряду с гипотермией [169, 53] – единственные методы лечения, которые имели какой-либо аддитивный эффект. Однако в более поздних публикациях ставится под сомнение эффективность ксенона в качестве аддитивной терапии наряду с гипотермией. Например, рандомизированные клинические испытания продемонстрировали, что хотя ксеноновый газ является безопасным лечением, терапевтический эффект комбинированной гипотермии и ксенонового газа в умеренных и тяжелых случаях неонатальной ГИЭ при 18-месячном наблюдении почти отсутствует или отсутствует [120, 170]. Барбитуратные противосудорожные препараты не влияют на долгосрочное неврологическое развитие при введении после

неонатальной ишемии-гипоксии [74].

Недавние клинические исследования показывают, что лечение высокими дозами эритропоэтина у доношенных новорожденных снижает инвалидность [112]. Однако даже сторонники этого потенциального лечения советуют с осторожностью интерпретировать эти ранние результаты, и терапевтический эффект отнюдь не полностью предотвращает инвалидность. Комбинированная терапия N-ацетилцистеином, поглотителем свободных радикалов и системной гипотермией уменьшает объем инфаркта после очагового повреждения гипоксии-ишемии [52]. Другой акцептор свободных радикалов, аллопуринол, уменьшает отек мозга и невропатологические повреждения [131]. Тем не менее, эти методы лечения были опробованы только на животных, и в этой области все еще ожидает кандидатная молекула нейропротектора, которая является безопасной и эффективной для новорожденных.

Другой терапевтический подход, разрабатываемый для лечения неонатальной энцефалопатии – это лечение стволовыми клетками [161, 146]. Эти методы лечения используют доказательства того, что трансплантация стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, в очаг поражения может способствовать пластичности мозга. Результаты этой терапии были многообещающими на животных моделях, однако методика нуждается в валидации в клинических условиях. Кроме того, применение стволовых клеток для лечения церебрального паралича у пациентов дало смешанные результаты [162, 151].

Следовательно, необходимы новые подходы для идентификации потенциальных мишеней, воздействие на которые может быть предложено в качестве методов лечения гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных. Опираясь на наши подробные, но неполные знания по физиологии неонатальной гипоксии-ишемии, в новой потенциальной терапии необходимо учесть несколько факторов. Все потенциальные

методы лечения должны быть безопасными для новорожденных и не мешать основным этапам их развития. Это ставит под сомнение стратегии ингибирования NMDA, поскольку глутаматная система необходима для установления нормальной синаптической пластичности в развивающемся мозге [43, 102].

Лечение также должно быть специфическим, чтобы избежать крайне неблагоприятных последствий у этих уязвимых детей. Идеальное лечение должно быть направлено на молекулы, общие для путей эксцитотоксичности, окислительного стресса и воспаления, что позволило бы эффективно проводить единую терапию против нескольких медиаторов повреждения головного мозга вместо того, чтобы просто перетасовать перестановки путей в пользу другого метода гибели клеток.

Ранее нами были приведены данные о том, что протеины бета амилоида участвуют в процессах активации глутаматно-кальциевого стресса, цитотоксичной активности, активации апоптоза, проявляют свое участие в системе врожденного иммунитета, регулируют процессы нейровоспаления и нейродегенерации. В ходе нашего исследования была продемонстрирована связь между снижением уровня бета-амилоида 1-42 и тяжестью гипоксически-ишемической энцефалопатии. Все эти факты позволяют рассматривать возможность терапии, направленной на модификацию уровня данного маркера, с целью улучшения результатов лечения ГИЭ либо в дополнении к имеющейся терапевтической гипотермии, либо как самостоятельной терапии.

Осуществить это можно, используя новейшие данные о терапии болезни Альцгеймера. В настоящее время исследуются несколько новых терапевтических подходов к лечению болезни Альцгеймера, которые направлены на снижение уровня амилоидных олигомеров. Методы, которые в настоящее время находятся в стадии разработки, включают ингибирование олигомеризации с использованием низкомолекулярных ингибиторов, нейтрализацию олигомерных видов с помощью

иммунотерапии, сверхэкспрессию ферментов, разлагающих А β , для контроля уровней олигомера А β в головном мозге, каталитические антитела к А β для гидролиза определенных агрегатов, блокаторы А β для блокирования амилоидных каналов. Все эти подходы находятся на стадии доклинических исследований, и их терапевтическая эффективность остается неизвестной.

Однако среди всего разнообразия можно выделить несколько групп препаратов и подходов, изучаемых для терапии БА и которые, по нашему мнению, можно использовать для терапии ГИЭ у новорожденных. Эти препараты, а также возможные пути модификации ими А β , нами были для удобства восприятия суммированы в таблице 5.1.

Таблица 5.1. Возможные препараты для терапии ГИЭ у новорожденных и вероятный механизм действия их на уровни бета амилоида.

Препарат	Возможный механизм действия	Достижимый эффект
Кумарин	Подавляет олигомеризацию А β	Предотвращает снижение когнитивных функций [48]
Ресвератрол	Ремоделирует растворимые олигомеры и амилоидные фибриллы в нетоксичные виды	Снижает когнитивные нарушения [145]
Фуросемид	Подавляет агрегацию А β	Увеличивает продолжительность жизни [92]
Гантенерумаб	Гуманизированное моноклональное антитело к А β	Связывается с агрегированным А β и уменьшает бляшки А β в головном мозге [101]

<i>Продолжение таблицы 5.1.</i>		
Соланезумаб	Гуманизированное моноклональное антитело к Аβ	Связывается с растворимым Аβ и снижает амилоидную нагрузку через механизм периферического поглощения [133]
Кренезумаб	Гуманизированное моноклональное антитело к Аβ	Ингибирует агрегацию и способствует дезагрегации [101]
IVIG - Внутривенный иммунный глобулин	Человеческое поликлональное антитело против Аβ	Связывается с Аβ и снижает нейротоксичность [107]
Препарат человеческого иммуноглобулина для внутривенного введения	Препарат человеческого иммуноглобулина, содержащий эндогенные поликлональные антитела к Аβ	В первую очередь связывается с растворимым Аβ и снижает амилоидную нагрузку через механизм периферического поглощения [88]
Гормон мелатонин	подавляет агрегацию Аβ	Обращает отложение амилоида [96]

Одна из возможных стратегий включает в себя использование низкомолекулярных ингибиторов амилоидных олигомеров для лечения ГИЭ. Описано порядка десятка возможных кандидатов для данного подхода, но на наш взгляд следует обратить внимание в первую очередь на наименее «экзотические» и используемые в медицинской практике препараты как ресвератрол, кумарин, фуросемид.

Еще одной из представляющихся стратегий является применение ингибиторов агрегации А β , где также можно выделить использующийся в медицинской практике гормон мелатонин.

Третья стратегия – иммунотерапевтический подход. Иммунотерапия стимулирует иммунную систему хозяина распознавать и атаковать А β или вырабатывает антитела, которые увеличивают клиренс олигомеров А β или бляшек, чтобы предотвратить отложение бляшек. Активная или пассивная иммунизация А β может предотвратить олигомеризацию А β , поэтому антитела к А β можно использовать для снижения уровня церебральных бляшек. Это уменьшение достигается за счет ускорения очистки микроглии и перераспределения пептида из мозга в системный кровоток. Некоторые эпитопы А β открыты и доступны для захвата растворимых пептидов антителами, в то время как другие доступны для связывания антител с олигомерами. Среди представителей данной стратегии можно отметить следующие препараты – антитела против А β (соланезумаб, гантенерумаб, IVIG), которые могут связывать растворимый А β и улучшать когнитивные функции. В настоящее время они проходят клинические испытания для лечения БА.

Соланезумаб вмещает в себя большой эпитоп А β , который образует обширные контакты и водородные связи с антителом, в основном через атомы А β в основной цепи и глубоко скрытое дипептидное ядро Phe19-Phe20 с эпитопом А β KLVFF286.

Человеческое моноклональное антитело против А β , гантенерумаб, связывает бляшки А β и нацелено на N-конец и центральную часть А β .

Внутривенный иммунный глобулин (IVIG), полученный из плазмы человека, содержит IgG, которые распознают конформационные эпитопы фибрилл и олигомеров А β .

Хотелось бы, отдельно остановиться на возможности применения внутривенного IgG с целью терапии ГИЭ у новорожденных. Это обусловлено тем, что уже существуют и используются различные

коммерческие препараты внутривенного IgG в неонатальной практике, правда, по иным показаниям. В работе [88] показано, что встречающиеся в природе антитела, направленные против бета амилоида, в том числе и против A β 1-42, были обнаружены в препаратах иммуноглобулинов для внутривенного введения. Было обнаружено, что антитела против A β увеличиваются в сыворотке и спинномозговой жидкости после внутривенного лечения иммуноглобулином. Это исследование предоставляет доказательства того, что внутривенный иммуноглобулин или очищенные антитела к амилоиду бета могут изменять уровни A β и A β 1-42, связываясь с растворимым A β и уменьшая агрегацию бета-амилоида .

В нашем исследовании было показано что ГИЭ умеренной и тяжелой степени ассоциировано со снижением уровня A β 1-42 уже начиная с момента 6 часов от рождения и остается сниженным по сравнению со здоровыми новорожденными и группой детей с ГИЭ легкой степени в течение всего раннего неонатального периода, что возможно объяснить повышенным связыванием и агрегацией бета-амилоида 1-42 с различными рецепторами и структурами в ЦНС. Учитывая, как было нами сказано выше, что внутривенный иммуноглобулин может изменять уровни A β и A β 1-42, связываясь с растворимым A β и уменьшать агрегацию бета-амилоида , логически предложить использование препарата человеческого иммуноглобулина для внутривенного введения начиная с периода первых 2-6 часов после рождения ребенка с ГИЭ II-III степени, отслеживать динамику уровня A β 1-42 и, при необходимости повторять его введение, пытаясь достичь нормализации динамики уровня A β .

Подводя итог, можно говорить, что возможные пути усовершенствования интенсивной терапии на основании полученных данных о концентрации бета-амилоида 1-42 нам видятся следующим образом:

1. Для повышения качества отбора пациентов в группу терапевтической гипотермии у новорожденных с явлениями ГИЭ

использовать построенную индивидуальную математическую модель прогнозирования риска развития ГИЭ согласно уравнению бинарной логистической регрессии:

$$p = \frac{1}{1 + 2,718^{6,63 - 0,031 X_1}}, \text{ где } X_1 \text{ значение концентрации } A\beta \text{ 1-42}$$

определенное в первые 6 часов жизни.

2. При уровне концентрации $A\beta$ 1-42 менее 42 пг/мл в первые 6 часов жизни на фоне симптоматики ГИЭ II-III необходимо начать проведение общей гипотермии, рассмотреть вопрос применения иммунотерапии препаратами в/в иммуноглобулинов в стандартной дозировке 2-4 мл/кг (100-200 мг/кг IgG) у новорожденных на фоне проведения гипотермии.
3. При сохранении уровня концентрации $A\beta$ 1-42 менее 28 пг/мл к третьим суткам жизни на фоне проведения гипотермии рассмотреть вопрос о повторном введении препаратов в/в иммуноглобулинов, а также о дополнении терапии препаратом гормона мелатонина в дозе 10 мг/кг в сутки курсом 5 дней.
4. В случае противопоказаний к проведению гипотермии рассмотреть терапию препаратами в/в иммуноглобулинов в стандартной дозировке 2-4 мл/кг в сутки (100-200 мг/кг/сут IgG) как варианта самостоятельной терапии.
5. В случае противопоказаний к проведению гипотермии или применению в/в иммуноглобулинов начать введение мелатонина в дозе 10 мг/кг в сутки курсом 5 дней как самостоятельной терапии.

Безусловно это требует дальнейшего изучения связи изучаемого маркера и его динамики при ГИЭ, а также возможности подобной терапии, что будет являться темой наших дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

В проведенном контролируемом, проспективном, динамическом клиническом исследовании была достигнута цель в виде разработки нового способа диагностики гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных путем изучения маркера бета-амилоида 1-42 для усовершенствования интенсивной терапии.

1. Впервые определены референтные значения бета-амилоида 1-42 через 6 ч., 72 ч. и 168 ч. жизни у здоровых новорожденных: через 6 часов после рождения средняя концентрация в сыворотке крови А β 1-42 составила $250,7 \pm 46,1$ пг/мл; Me=247,6; (187,3-300), через 72 ч. – $211,1 \pm 63,4$ пг/мл; Me=221,3; (80,6-299,2), а через 168 ч. $179,1 \pm 85,8$ пг/мл; Me=174,1; (56,4-298,6).

2. Впервые установлена достоверная ($p < 0,05$) обратная корреляция концентрации изучаемого маркера со степенью тяжести гипоксически-ишемической энцефалопатии.

3. Впервые определена динамика бета-амилоида 1-42 в раннем неонатальном периоде у здоровых доношенных и у новорожденных с проявлениями ГИЭ. Установлено что концентрация бета амилоида 1-42 у здоровых новорожденных и детей с легкой степенью ГИЭ во все периоды до 72 часов жизни наблюдения оказалась достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у детей с умеренной и тяжелой степенью ГИЭ. Достоверно ($p < 0,001$) более высокая концентрация маркера сохраняется до конца 168 часов жизни у здоровых детей, по сравнению с группой новорожденных с любой степенью ГИЭ.

4. Впервые разработана математическая модель раннего прогнозирования развития у новорожденных ГИЭ и показана возможность использования бета-амилоида 1-42 в качестве метода

экспресс диагностики развития ГИЭ у новорожденных в первые 6 часов жизни. На основании построенной модели прогнозирования получены диагностические характеристики: чувствительность – 63,6%; специфичность – 94,7%; эффективность – 79,2%; прогностическая ценность положительного результата – 70,0%; прогностическая ценность отрицательного результата – 93,1%.

5. Определены возможные пути усовершенствования интенсивной терапии на основании полученных данных о концентрации бета-амилоида 1-42: в группе новорожденных с явлениями ГИЭ II-III необходимо рассмотреть вопрос применения иммунотерапии препаратами в/в иммуноглобулинов в первые сутки жизни на фоне проведения гипотермии; при сохранении симптоматики ГИЭ на фоне терапевтической гипотермии к третьим суткам жизни рассмотреть вопрос о повторном введении препаратов в/в иммуноглобулинов, а также о дополнении терапии препаратом гормона мелатонина; в случае противопоказаний к проведению гипотермии или применению в/в иммуноглобулинов начать введение мелатонина как самостоятельной терапии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения качества отбора пациентов в группу терапевтической гипотермии у новорожденных с явлениями ГИЭ использовать построенную индивидуальную математическую модель прогнозирования риска развития ГИЭ согласно уравнению бинарной логистической регрессии $p = \frac{1}{1 + 2,718^{6,63 - 0,031 X_1}}$, где X_1 значение концентрации в сыворотке крови Аβ 1-42 определенное в первые 6 часов жизни.

2. При уровне концентрации Аβ 1-42 менее 42 пг/мл в первые 6 часов жизни на фоне симптоматики ГИЭ II-III необходимо начать проведение общей гипотермии, рассмотреть вопрос применения иммунотерапии препаратами в/в иммуноглобулинов в стандартной дозировке 2-4 мл/кг (100-200 мг/кг IgG) у новорожденных на фоне проведения гипотермии и/или мелатонина в дозе 10 мг/кг в сутки per os курсом 5 дней.

3. При сохранении уровня концентрации Аβ 1-42 менее 28 пг/мл к третьим суткам жизни на фоне проведения гипотермии рассмотреть вопрос о повторном введении препаратов в/в иммуноглобулинов на фоне продолжении терапии препаратом гормона мелатонина в дозе 10 мг/кг в сутки per os общим курсом 5 дней.

4. В случае противопоказаний к проведению гипотермии или применению мелатонина per os рассмотреть терапию препаратами в/в иммуноглобулинов в стандартной дозировке 2-4 мл/кг в сутки (100-200 мг/кг/сут IgG) как варианта самостоятельной терапии.

5. В случае противопоказаний к проведению гипотермии или применению в/в иммуноглобулинов начать введение мелатонина в дозе 10 мг/кг в сутки per os курсом 5 дней как самостоятельной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базовая медицинская помощь новорожденному в родильном зале и в послеродовом отделении: клинические рекомендации: год утверждения 2015 / Е. Н. Байбарина [и др.] // Российское общество неонатологов: [сайт].
2. Болезни нервной системы у новорожденных и детей раннего возраста [Текст] / Ю. А. Якунин, Э. И. Ямпольская, С. Л. Кипнис, И. М. Сысоева. – М.: Медицина, 1979. – 280 с.
3. Ватолин, К. В. Ультразвуковая диагностика заболеваний головного мозга у детей [Текст] / К. В. Ватолин. – 2-е изд., доп. – М.: Видар-М, 2000. – 136 с.
4. Володин, Н. Н. Перинатальная энцефалопатия и ее последствия – дискуссионные вопросы семиотики, ранней диагностики и терапии [Текст] / Н. Н. Володин, М. И. Медведев, С. О. Рогаткин // Российский педиатрический журнал – 2001. – № 1. – С. 4-8.
5. Дидманидзе, Т. Д. Динамика показателей нейрон-специфической енолазы и миелин-основного белка у детей с перинатальными поражениями ЦНС [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук. / Т. Д. Дидманидзе. – М., 2003. – 135 с.
6. Задворнов, А. А. Биомаркеры перинатального поражения центральной нервной системы [Текст] / А. А. Задворнов, А. В. Голомидов, Е. В. Григорьев // Неонатология: новости, мнения, обучение. – 2017. – № 1 (15). – С. 47-57.
7. Задворнов, А. А. Неонатальная терапевтическая гипотермия: как она работает? [Текст] / А. А. Задворнов, А. В. Голомидов, Е. В. Григорьев // Неонатология: новости, мнения, обучение. – 2016. – № 1 (11). – С. 49-54.
8. Классификация перинатальных поражений нервной системы у

новорожденных [Текст]: методические рекомендации. – Москва: Российская ассоциация специалистов перинатальной медицины, 2000. – 40 с.

9. Клинико-диагностическое значение енолазы и основного белка миелина у новорожденных с перинатальными гипоксическими поражениями ЦНС [Текст] / М. И. Баканов [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2003. – № 4. – С. 19-23.

10. О терминологии и классификации поражений центральной нервной системы у новорожденных и грудных детей / Ю. А. Якунин, Э. И. Ямпольская, С. Л. Кипнис, А. С. Буркова // Журнал невропатологии и психиатрии. – 1976. – Т. 76, № 10. – С. 1468-1474.

11. Пальчик, А. Б. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных [Текст] / А. Б. Пальчик, Н. П. Шабалов. – 4-е изд., испр. и доп. – М. : МЕДпресс-информ, 2013. – 288 с.: ил.

12. Последствия перинатального поражения центральной нервной системы с гидроцефальным и гипертензионным синдромами: клинические рекомендации: год утверждения 2016 / Мин-во здравоохранения Рос. Федерации, Союз педиатров России // Союз педиатров России: [сайт].

13. Пыков, М. И. Детская ультразвуковая диагностика [Текст]: учебник. В 5 т. Т. 3. Неврология. Сосуды головы и шеи. / М. И. Пыков, К. В. Ватолин, Ю. К. Быкова, О. А. Милованова; под ред. М. И. Пыкова. – М.: Видар-М, 2015. – 368 с.

14. Реанимация и стабилизация состояния детей в родильном зале: методическое письмо / под ред. проф. Е. Н. Барбариной // Российское общество неонатологов: [сайт].

15. Системная лечебная гипотермия в терапии тяжёлой асфиксии у новорождённых [Текст] / А. А. Зарубин [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2016. – № 4. – С. 269-272.

16. Структурные изменения головного мозга при гипоксически-

ишемическом поражении центральной нервной системы у новорожденных разного гестационного возраста. Сопоставление эхографической картины с данными морфологических исследований [Текст] / Ю. К. Быкова [и др.] // Неонатология: новости, мнения, обучение. – 2016. – № 3 (13). – С. 28-38.

17. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease [Text] / D. Morgan, D. M. Diamond, P. E. Gottschall [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 408. – P. 982-985.

18. A model for beta-Amyloid aggregation and neurotoxicity based on free-radical generation by the peptide–relevance to Alzheimer-disease [Text] / K. Hensley, J. M. Carney, M. P. Mattson [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – Vol. 91, N 8. – P. 3270-3274.

19. A pilot study of novel biomarkers in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [Text] / M. Douglas-Escobar, C. Yang, J. Bennett [et al.] // Pediatric research. – 2010. – Vol. 68, N 6. – P. 531-536.

20. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds [Text] / S. A. Lipton, Y. B. Choi, Z. H. Pan [et al.] // Nature. – 1993. – Vol. 364, N 6438. – P. 626-632.

21. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor [Text] / D. C. Lu, S. Rabizadeh, S. Chandra [et al.] // Nature medicine. – 2000. – Vol. 6, N 4. – P. 397-404.

22. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity [Text] / S. Weggen, J. L. Eriksen, P. Das [et al.] // Nature. – 2001. – Vol. 414, N 6860. – P. 212-216.

23. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease [Text] / J. W. Lustbader, M. Cirilli, C. Lin [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 304, N 5669. – P. 448-452.

24. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial

import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction [Text] / L. Devi, B. M. Prabhu, D. F. Galati [et al.] // Journal of Neuroscience. – 2006. – Vol. 26, N 35. – P. 9057-9068.

25. Accumulation of amyloid- β by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicle-induced apoptosis of neurons [Text] / S. Sölvander, E. Nikitidou, R. Brolin [et al.]. – DOI 10.1186/s13024-016-0098-z // Molecular Neurodegeneration. – 2016. – Vol. 11, N 38. – P. 1-19 (pag. var.).

26. Altered plasma-type gelsolin and amyloid- β in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy under therapeutic hypothermia [Text] / I. Benavente-Fernandez, J. Ramos-Rodriguez, C. Infante-Garcia [et al.] // Journal of cerebral blood flow and metabolism. – 2018. – Vol. 39, N 7. – 1349-1354.

27. Amplitude-integrated EEG classification and interpretation in preterm and term infants [Text] / L. Hellstrom-Westas, I. Rosén, L. S. de Vries [et al.] // NeoReviews. – 2006. – Vol. 7, N 2. – P. 76-87.

28. Amyloid beta oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors [Text] / E. Alberdi, M. Victoria Sanchez-Gomez, F. Cavaliere [et al.] // Cell Calcium. – 2010. – Vol. 47. – P. 264-272.

29. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development [Text] / G. Chen, T. Xu, Y. Yan [et al.] // Acta pharmacologica sinica. – 2017. – Vol. 38, N 9. – P. 1205-1235.

30. Amyloid beta-protein precursor in cultured leptomeningeal smooth muscle cells [Text] / W. E. Vannstrand, A. J. M. Rozemuller, R. Chung [et al.] // Amyloid. – 1994. – Vol. 1, N 1. – P. 1-7.

31. Amyloid peptide Abeta (1-42) binds selectively and with picomolar affinity to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors [Text] / H. Y. Wang, D. H. Lee, C. B. Davis, R. P. Shank // Journal of neurochemistry. – 2000. – Vol. 75, N 3. – P. 1155-1161.

32. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition [Text] / D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva [et al.] // Biochemical

Society transactions. – 2002. – Vol. 30, N 4. – P. 552-557.

33. Amyloid-beta peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease [Text] / D. K. Kumar, S. H. Choi, K. J. Washicosky [et al.]. – DOI 10.1126/scitranslmed. aaf1059 // Science translational medicine. – 2016. – Vol. 8, N 340. – P. 1-37 (pag. var.).

34. Apgar scores at 10 min and outcomes at 6-7 years following hypoxic-ischaemic encephalopathy [Text] / G. Natarajan, S. Shankaran, A. R. Laptook [et al.] // Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition. – 2013. – Vol. 98, N 6. – P. 473-479.

35. Apolipoprotein-E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease [Text] / W. J. Strittmatter, A. M. Saunders, D. Schmechel [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1993. – Vol. 90, N 5. – P. 1977-1981.

36. Aslam, S. Neonatal encephalopathy: need for recognition of multiple etiologies for optimal management [Text] / S. Aslam, T. Strickland, E. J. Molloy. – DOI 10.3389/fped.2019.00142 // Frontiers in pediatrics. – 2019. – Vol. 7. – P. 142 (pag. var.).

37. Assessment of brain tissue injury after moderate hypothermia in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy: a nested substudy of a randomised controlled trial [Text] / M. Rutherford, L. A. Ramenghi, A. D. Edwards [et al.] // The Lancet. Neurology. – 2010. – Vol. 9, N 1. – P. 39-45.

38. Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo [Text] / E. Damisah, R. Hill, A. Rai [et al.]. – DOI 10.1126/sciadv.aba3239 // Science Advances. – 2020. – Vol. 6, N 26. – P. 1-12 (pag. var.).

39. Azzopardi, D. Predictive value of the amplitude integrated EEG in infants with hypoxic ischaemic encephalopathy: data from a randomised trial of

therapeutic hypothermia [Text] / D. Azzopardi // Archives of disease in childhood – fetal and neonatal edition. – 2013. – Vol. 99, N 1. – P. 80-82.

40. Barger, S. W. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function [Text] / S. W. Barger, A. S. Basile // Journal of neurochemistry. – 2001. – Vol.76, N 3. – P. 846-854.

41. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy [Text] / L. Chalak, P. Sánchez, B. Adams-Huet [et al.] // The journal of pediatrics. – 2014. – Vol. 164, N 3. – P. 468-474.

42. Blennow, M. Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid: a possible indicator of prognosis in full-term asphyxiated newborn infants? [Text] / M. Blennow, H. Hagberg, L. Rosengren // Pediatric Research. – 1995. – Vol. 37, N 3. – P. 260-264.

43. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain [Text] / C. Ikonomidou, F. Bosch, M. Miksa [et al.] // Science. – 1999. – Vol. 283. – P. 70-74.

44. Blomgren, K. Free radicals, mitochondria, and hypoxiaischemia in the developing brain [Text] / K. Blomgren, H. Hagberg // Free radical biology and medicine. – Vol. 40, N 3. – P. 388-397.

45. Blood biomarkers for evaluation of perinatal encephalopathy [Text] / E. Graham, I. Burd, A. Everett, F. Northington // Frontiers in Pharmacology. – 2016. – Vol. 7. – P. 199-203.

46. Brain injury following trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy [Text] / S. Shankaran, P. D. Barnes, S. R. Hintz [et al.] // Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition. – 2012. – Vol. 97, N 6. – P. 398-404.

47. Brain lipid peroxidation and antioxidant levels in fetal lambs 72 hours after asphyxia by partial umbilical cord occlusion [Text] / T. Ikeda, Y. Murata,

E. J. Quilligan [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 1998. – Vol. 178, N 3. – P. 474-478.

48. Calpain inhibition prevents amyloid-beta-induced neurodegeneration and associated behavioral dysfunction in rats [Text] / I. Granic, C. Nyakas, P. G. M. Luiten [et al.] // Neuropharmacology. – 2010. – Vol. 59. – P. 334-342.

49. Canevari, L. Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress [Text] / L. Canevari, A. Abramov, M. Duchen // Neurochemical Research. – 2004. – Vol. 29, N 3. – P. 637-650.

50. Characterization of intermediate steps in amyloid beta (Ab) production under near-native conditions [Text] / F. Olsson, S. Schmidt, V. Althoff [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2014. – Vol. 289, N 3. – P. 1540-1550.

51. Clinical value of a single postnatal lactate measurement after intrapartum asphyxia [Text] / S. Da Silva, N. Hennebert, R. Denis, J-L. Wayenberg // Acta paediatrica. – 2000. – Vol. 89, N 3. – P. 320-223.

52. Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [Text] / M. Jatana [et al.] // Pediatric research. – 2006. – Vol. 59. – P. 684-689.

53. Cooling combined with immediate or delayed xenon inhalation provides equivalent long-term neuroprotection after neonatal hypoxia-ischemia [Text] / M. Thoresen, C. E. Hobbs, T. Wood [et al.] // Journal of cerebral blood flow and metabolism. – 2009. – Vol. 29, N 4. – P. 707-714.

54. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy [Text] / S. E. Jacobs, M. Berg, R. Hunt [et al.]. – DOI 10.1002/14651858.CD003311.pub3 // The Cochrane database of systematic reviews. – Vol. 1. – P. 1-52 (pag. var.).

55. Cooper, C. Competitive, reversible, physiological? Inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by nitric oxide [Text] / C. Cooper // IUBMB Life. – 2004. – Vol. 55, N 10. – P. 591-597.

56. Correlation of glutamate-induced apoptosis with caspase activities in cultured rat cerebral cortical neurons [Text] / Y. Hirashima, M. Kurimoto, K. Nogami [et al.] // Brain research. – 1999. – Vol. 849, N 1-2. – P. 109-118.

57. Cowan, F. M. The internal capsule in neonatal imaging [Text] / F. M. Cowan, L. S. de Vries // Seminars in fetal and neonatal medicine. – 2005. – Vol. 10, N 5. – P. 461-474.

58. Crosstalk between astrocytes and microglia results in increased degradation of α -synuclein and amyloid- β aggregates [Text] / J. Rostami, T. Mothes, M. Kolahdouzan [et al.]. – DOI 10.1186/s12974-021-02158-3 // Journal of Neuroinflammation. – 2021. – Vol. 18, N 1. – P. 1-20 (pag. var.).

59. De Vries, L. S. Patterns of neonatal hypoxic-ischemic brain injury [Text] / L. S. De Vries, F. Groenendaal // Neuroradiology. – 2010. – Vol. 52, N 6. – P. 555-566.

60. Delayed ("Secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy [Text] / A. Lorek, Y. Takei, E. B. Cady [et al.] // Pediatric Research. – 1994. – Vol. 36, N 6. – P. 699-706.

61. Developmental regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. II. Human cerebral white matter and cortex [Text] / D. M. Talos, P. L. Follett, R. D. Folkerth [et al.] // The Journal of comparative neurology. – 2006. – Vol. 497, N 1. – P. 61-77.

62. Diagnosis of severe birth asphyxia and early prediction of neonatal neurological outcome in term asphyxiated newborns [Text] / J. L. Wayenberg, D. Vermeylen, J. Bormans [et al.] // Journal of perinatal medicine. – 1994. – Vol. 22, N 2. – P. 129-136.

63. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation [Text] / J. A. White, A. M. Manelli,

K. H. Holmberg [et al.] // Neurobiology of disease. – 2005. – Vol. 18, N 3. – P. 459-465.

64. Differential expression of glutamate receptor subtypes in human brainstem sites involved in perinatal hypoxia-ischemia [Text] / A. Panigrahy, P. A. Rosenberg, S. Assmann [et al.] // The Journal of comparative neurology. – 2000. – Vol. 427, N 2. – P. 196-208.

65. Dubowitz, L. M. Developmental sequence of periventricular leukomalacia. Correlation of ultrasound, clinical, and nuclear magnetic resonance functions [Text] / L. M. Dubowitz, G. M. Bydder, J. Mushin // Archives of disease in childhood. – 1985. – Vol. 60, N 4. – P. 349-355.

66. Early EEG findings in hypoxic-ischemic encephalopathy predict outcomes at 2 years [Text] / D. M. Murray, G. B. Boylan, C. A. Ryan, S. Connolly // Pediatrics. – 2009. – Vol. 124, N 3. – P. 459-467.

67. Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors [Text] / R. Roenicke, M. Mikhaylova, S. Roenicke [et al.] // Neurobiology of aging. – 2011. – Vol. 32. – P. 2219-2228.

68. Early serial EEG in hypoxic ischaemic encephalopathy [Text] / R. M. Pressler, G. B. Boylan, M. Morton [et al.] // Clinical neurophysiology. – 2001. – Vol. 112, N 1. – P. 31-37.

69. Effect of hypothermia on amplitude-integrated electroencephalogram in infants with asphyxia [Text] / M. Thoresen [et al.] // Pediatrics. – 2010. – Vol. 126, N 1. – P. 131-139.

70. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes [Text] / D. Azzopardi, B. Strohm, N. Marlow [et al.] // New England Journal Of Medicine. – 2014. – Vol. 371, N 2. – P. 140-149.

71. Effects of hypothermia on NSE and S-100 protein levels in CSF in neonates following hypoxic/ischaemic brain damage [Text] / J. Sun [et al.] // Acta paediatrica. – 2012. – Vol. 101, N 8. – P. 316-320.

72. Encephalopathy and death in infants with abusive head trauma is due

to hypoxic-ischemic injury following local brain trauma to vital brainstem centers [Text] / J. Matschke [et al.] // International journal of legal medicine. – 2015. – Vol. 129, N 1. – P. 105-114.

73. Erratum to: encephalopathy and death in infants with abusive head trauma is due to hypoxic-ischemic injury following local brain trauma to vital brainstem centers [Text] / J. Matschke [et al.] // International journal of legal medicine. – 2015. – Vol. 129, N 1. – P. 115-116.

74. Evans, D. J. Anticonvulsants for preventing mortality and morbidity in full term newborns with perinatal asphyxia [Text] / D. J. Evans, M. I. Levene, M. Tsakmakis. – DOI 10.1002/14651858.CD001240.pub2 // The Cochrane database of systematic reviews. – 2007. – Issue 3, N CD001240.

75. Excitotoxic damage to white matter [Text] / C. Matute, E. Alberdi, M. Domercq [et al.] // Journal of anatomy. – 2007. – Vol. 210, N 6. – P. 693-702.

76. Fenichel, G. M. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn [Text] / G. M. Fenichel // Archives of neurology. – 1983. – Vol. 40, N 5. – P. 261-266.

77. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling [Text] / C. S. Ennen, T. A. Huisman, W. J. Savage [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2011. – Vol. 205, N 3. – P. 251-257.

78. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for periventricular white matter injury [Text] / A. Stewart, A. Tekes, T. A. Huisman [et al.]. – DOI 10.1016/j.ajog.2013.02.049 // American journal of obstetrics and gynecology. – 2013. – Vol. 209, N 1. – P. 1-15 (pag. var.).

79. Govaert, P. An Atlas of Neonatal Brain Sonography [Text] / P. Govaert, L. De Vries. – 2nd ed. – London: Mac Keith Press, 2010. – 419 p.: ill. (some col.). – (Clinics in developmental medicine).

80. Guix, F. X. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain [Text] / F. X. Guix, I. Uribealga, M. Coma, F. J. Munoz // Progress in neurobiology. – 2005. – Vol. 76, N 2. – P. 126-152.

81. Hardy, J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease [Text] / J. Hardy // Trends in neurosciences. – 1997. – Vol. 20, N 4. – P. 154–159.

82. Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [Text] / J. Hardy, D. J. Selkoe // Science. – 2002. – Vol. 297, N 5580. – P. 353-356.

83. Hayden, E. Y. Amyloid beta-protein oligomers and Alzheimer's disease [Text] / E. Y. Hayden, D. B. Teplow. – DOI 10.1186/alzrt226 // Alzheimer's research & therapy. – 2013. – Vol. 5, N 6. – P. 1-12 (pag. var.).

84. Heneka, M. T. Innate immunity in Alzheimer's disease [Text] / M. T. Heneka, D. T. Golenbock, E. Latz // Nature immunology. – 2015. – Vol. 16, N 3. – P. 229-236.

85. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation [Text] / L. Mucke, E. Masliah, G. Q. Yu [et al.] // The Journal of neuroscience. – 2000. – Vol. 20, N 11. – P. 4050-4058.

86. Hill, A. Ischemic and haemorrhagic lesions of newborn [Text] / A. Hill, J. J. Volpe // Cerebrovascular diseases in children: Principles of pediatric neurosurgery. – New York: Springer, 1992 – P. 206-215.

87. Huang, B. Y. Hypoxic-ischemic brain injury: imaging findings from birth to adulthood [Text] / B. Y. Huang, M. Castillo // Radiographics. – 2008. – Vol. 28, N 2. – P. 417-439.

88. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease [Text] / R. Dodel, H. Hampel, C. Depboylu [et al.]. // Annals of neurology. – 2002. – Vol. 52. – P. 253-256.

89. Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1-40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer [Text] / J. B. Mackic, M. Stins,

J. G. McComb [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 1998. – Vol. 102, N 4. – P. 734-743.

90. Human LirB2 is a beta-amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model [Text] / T. Kim, G. S. Vidal, M. Djurisic [et al.] // Science. – 2013. – Vol. 341, N 6152. – P. 1399-1404.

91. Hypoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: perinatal factors and outcome [Text] / N. N. Finer, C. M. Robertson, R. T. Richards [et al.] // The Journal of pediatrics. – 1981. – Vol. 98, N 1. – P. 112-117.

92. Identification of antihypertensive drugs which inhibit Amyloid-beta protein oligomerization [Text] / W. Zhao, J. Wang, L. Ho [et al.] // Journal of Alzheimer's disease. – 2009. – Vol. 16, N 1. – P. 49-57.

93. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition [Text] / N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki [et al.] // Nature medicine. – 2000. – Vol. 6, N 2. – P. 143-150.

94. Implication of the small GTPase Rac1 in the generation of reactive oxygen species in response to beta-amyloid in C6 astrogloma cells [Text] / M. Lee, H. J. You, S. H. Cho [et al.] // The Biochemical journal. – 2002. – Vol. 366, N 3 – P. 937-943.

95. Incidence and prediction of outcome in hypoxic-ischemic encephalopathy in Japan [Text] / M. Hayakawa, Y. Ito, S. Saito [et al.] // Pediatrics international: official journal of the Japan Pediatric Society. – 2014. – Vol. 56, N 2. – P. 215-221.

96. Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin [Text] / M. Pappolla, P. Bozner, C. Sotov [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 1998. – Vol. 273, N 13. – P. 7185-7188.

97. Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism [Text] / D. Paris, T. Town, T. A. Parker [et al.] // Experimental Neurology. –

1999. – Vol. 157. – P. 211-221.

98. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990 [Text] / A. C. Lee, N. Kozuki, H. Blencowe // *Pediatric research*. – 2013. – Vol. 74, Suppl 1. – P. 50-72.

99. Ioroi, T. Effects of hypoxia and reoxygenation on nitric oxide production and cerebral blood flow in developing rat striatum [Text] / T. Ioroi, M. Yonetani, H. Nakamura // *Pediatric research*. – 1998. – Vol. 43, N 6. – P. 733-737.

100. Ivacko, J. A. Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats [Text] / J. A. Ivacko, R. Sun, F. S. Silverstein // *Pediatric research*. – 1996. – Vol. 39, N 1. – P. 39-47.

101. Jia, Q. T. Potential therapeutic strategies for Alzheimer's disease targeting or beyond. Beta-Amyloid: insights from clinical trials [Text] / Q. T. Jia, Y. L. Deng, H. Qing. – DOI 10.1155/2014/837157 // *BioMed research international*. – 2014. – Vol 2014, Art 837157. – P. 1-22 (pag. var.).

102. Johnston, M. V. Plasticity in the developing brain: implications for rehabilitation [Text] / M. V. Johnston // *Developmental disabilities research reviews*. – 2009. – Vol. 15, N 2. – P. 94-101.

103. Jr. Cuestas, R. A. Creatine kinase isoenzymes in high-risk infants [Text] / R. A. Cuestas Jr // *Pediatric research*. – 1980. – Vol. 14, N 8. – P. 935-938.

104. Klein, W. L. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? [Text] / W. L. Klein, G. A. Krafft, C. E. Finch // *Trends in neurosciences*. – 2001. – Vol. 24, N 4. – P. 219-224.

105. Kurinczuk, J. J. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy [Text] / J. J. Kurinczuk, M. White-Koning, N. Badawi // *Early human development*. – 2010. – Vol. 86, N 6. – P. 329-338.

106. Laboda, H. M. Creatine kinase isoenzyme activity in human placenta and in serum of women in labor [Text] / H. M. Laboda, V. Britton //

Clinical chemistry. – 1977. – Vol. 23, N 7. – P. 1329-1332.

107. Lannfelt, L. Amyloid-beta-directed immunotherapy for Alzheimer's disease [Text] / L. Lannfelt, N. R. Relkin, E. R. Siemers // Journal of internal medicine. – 2014. – Vol. 275. – P. 284-295.

108. Liu, F. Dynamic changes of cerebral-specific proteins in full-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy [Text] / F. Liu, S. Yang, Z. Du, Z. Guo. // Cell biochemistry and biophysics. – 2013. – Vol. 66, N 2. – P. 389-396.

109. Loss of alpha7 nicotinic receptors enhances beta-amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [Text] / C. M. Hernandez, R. Kayed, H. Zheng [et al.] // The Journal of neuroscience. – 2010. – Vol. 3, N 7. – P. 2442-2453.

110. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms [Text] / R. Deane, Z. Wu, A. Sagare [et al.] // Neuron. – 2004. – Vol. 43, N 3 – P. 333-344.

111. Martin, L. J. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation [Text] / L. J. Martin, K. Chen, Z. Liu // Journal of Neuroscience. – 2005. – Vol. 25, N 27. – P. 6449-6459.

112. McPherson, R. J. Erythropoietin for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy [Text] / R. J. McPherson, S. E. Juul // Current opinion in pediatrics. – 2010. – Vol. 22, N 2. – P. 139-145.

113. McQuillen, P. S. Selective vulnerability in the developing central nervous system [Text] / P. S. McQuillen, D. M. Ferriero // Pediatric neurology. – 2004. – Vol. 30, N 4. – P. 227-235.

114. Mechanism of acute ischemic injury of oligodendroglia in early myelinating white matter: the importance of astrocyte injury and glutamate release [Text] / S. Wilke, R. Thomas, N. Allcock, R. Fern // Journal of

neuropathology and experimental neurology. – 2004. – Vol. 63, N 8. – P. 872-881.

115. Method for measurement of the blood-brain barrier permeability in the perfused mouse brain: application to amyloid-beta peptide in wild type and Alzheimer's Tg2576 mice [Text] / B. LaRue, E. Hogg, A. Sagare [et al.] // Journal of neuroscience methods. – 2004. – Vol. 138, N 1-2. – P. 233-242.

116. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia [Text] / A. McRae, E. Gilland, E. Bona, H. Hagberg // Brain research. Developmental brain research. – 1995. – Vol. 84, N 2. – P. 245-252.

117. Microglia and complement in the cortex of Creutzfeldt-Jakob disease and comparison with Alzheimer's disease [Text] / A. Rozemuller, T. Awan, B. Ghetti, G. Puoti [et al.] // Brain Pathol. – 2000. – Vol.10, Issue 4. – P. 658. – ISSN 1750-3639.

118. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet [Text] / M. Thoresen, J. Penrice, A. Lorek [et al.] // Pediatric research. – 1995. – Vol. 37, N 5. – P. 667-670.

119. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells [Text] / H. K. Anandatheerthavarada, G. Biswas, M. A. Robin, N. G. Avadhani // J Cell Biol. – 2003. – Vol. 161, N 1. – P. 41–54.

120. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial [Text] / D. Azzopardi, N. J. Robertson, A. Bainbridge [et al.] // Lancet Neurol. – 2016. – Vol. 15, N 2. – P. 145-153.

121. Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD [Text] / Y. Hashimoto, Y. Kaneko, E. Tsukamoto [et al.] // Journal of neurochemistry. – 2004. – Vol. 90, N 3. – P. 549-558.

122. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway [Text] / G. M. Shankar, B. L. Bloodgood, M. Townsend [et al.] // *The Journal of neuroscience*. – 2007. – Vol. 27, N 11. – P. 2866-2875.

123. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo [Text] / D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 416, N 6880. – P. 535-539.

124. Neniskyte, U. Neuronal death induced by nanomolar Amyloid beta is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia [Text] / U. Neniskyte, J. J. Neher, G. C. Brown // *The Journal of biological chemistry*. – 2011. – Vol. 286, N 46. – P. 39904-39913.

125. Neonatal encephalopathy and neurologic outcome, second edition [Text] / American College of Obstetricians and Gynecologists // *Obstetrics & Gynecology*. – 2014. – Vol. 123, N 4. – P. 896-901.

126. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients [Text] / R. Brouns, B. De Vil, P. Cras [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol. 56, N 3. – P. 451-458.

127. Neuron specific enolase in asphyxiated newborns: association with encephalopathy and cerebral function monitor trace [Text] / E. Thornberg, K. Thiringer, H. Hagberg, I. Kjellmer // *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*. – 1995. – Vol. 72, N 1. – P. 39-42.

128. Neuron-specific enolase and myelin basic protein: relationship of cerebrospinal fluid concentrations to the neurologic condition of asphyxiated full-term infants [Text] / A. Garcia-Alix, F. Cabanas, A. Pellicer [et al.] // *Pediatrics*. – 1994. – Vol. 93, N 2. – P. 234-240.

129. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor

translocation [Text] / O. Baud, J. Li, Y. Zhang [et al.] // European journal of neuroscience. – 2004. – Vol. 20, N 7. – P. 1713-1726.

130. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons [Text] / M. Barsoum, H. Yuan, A. Gerencser [et al.] // The EMBO journal. – 2006. – Vol. 25, N 16. – P. 3900-3911.

131. Palmer, C. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol [Text] / C. Palmer, R. C. Vannucci, J. Towfighi // Pediatric research. – 1990. – Vol. 27, N 4. – P. 332-336.

132. Perinatal asphyxia may influence the level of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid: an experimental study on newborn pigs [Text] / T. Benterud, L. Pankratov, R. Solberg [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 10. – P. 1091-1103.

133. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease [Text] / R. B. DeMattos, K. R. Bales, D. J. Cummins [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98, N 15. – P. 8850-8855.

134. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment [Text] / R. D. Terry, E. Masliah, D. P. Salmon [et al.] // Annals of neurology. – 1991. – Vol. 30, N 4. – P. 572-580.

135. Population pharmacokinetics of phenobarbital in infants with neonatal encephalopathy treated with therapeutic hypothermia [Text] / R. A. Shellhaas, C. M. Ng, C. H. Dillon [et al.] // Pediatric critical care medicine. – 2013. – Vol. 14, N 2. – P. 194-202.

136. Predictive value of an early amplitude integrated electroencephalogram and neurologic examination [Text] / S. Shankaran, A. Pappas, S. A. McDonald [et al.] // Pediatrics. – 2011. – Vol. 128, N 1. – P. 112-120.

137. Predictive value of brain-specific proteins in serum for

neurodevelopmental outcome after birth asphyxia [Text] / N. Nagdyman, I. Grimmer, T. Scholz [et al.] // *Pediatric research*. – 2003. – Vol. 54, N 2. – P. 270-275.

138. Primhak, R. A. First day serum creatine kinase BB isoenzyme in high-risk infants [Text] / R. A. Primhak, E. Simmonds // *European journal of pediatrics*. – 1991. – Vol. 150, N 4. – P. 271-273.

139. Prognostic utility of magnetic resonance imaging in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: substudy of a randomized trial [Text] / L. Y. Jeanie, J. L. Cheong, L. Coleman [et al.] // *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. – 2012. – Vol. 166, N 7. – P. 634-640.

140. Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy [Text] / H. Tsukahara, Y. Fujii, K. Matsubara [et al.] // *Pediatrics international*. – 2013. – Vol. 55, N 4. – P. 461-464.

141. Rabi, Y. Room air resuscitation of the depressed newborn: a systematic review and meta-analysis [Text] / Y. Rabi, D. Rabi, W. Yee // *Resuscitation*. – 2017. – Vol. 72, N 3. – P. 353-363.

142. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes [Text] / D. M. Stern, S. Du Yan, S. F. Yan, A. M Schmidt. – DOI 10.3389/fcvm.2020.00037 // *Ageing research reviews*. – 2002. – Vol. 1, N 1. – P. 1-15.

143. Represa, A. Transient increase of NMDA binding sites in human hippocampus during development [Text] / A. Represa, E. Tremblay, Y. Ben-Ari // *Neuroscience letters*. – 1989. – Vol. 99, N 1-2. – P. 61-66.

144. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates [Text] / M. Vento [et al.] // *Pediatrics*. – 2001. – Vol 107, N 4. – P. 642-647.

145. Resveratrol: a neuroprotective polyphenol in the mediterranean diet [Text] / V. Lopez-Miranda, M. L. Soto-Montenegro, G. Vera [et al.] // *Revista de neurologia*. – 2012. – Vol. 54. – P. 349-356.

146. Ruiz, C. C. U., Rosado- de-Castro, P. H., Mendez-Otero, R., Pimentel-Coelho, P. M. Mesenchymal stromal cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy // *Neurological Regeneration* / ed. Pham, Phuc Van. – Cham : Springer, 2017. – P. 105-120.

147. Sarnat H. B. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study [Text] / H. B. Sarnat, M. S. Sarnat // *Archives of neurology*. – 1976. – Vol. 33, N 10. – P. 696-705.

148. Serum biomarkers of MRI brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy treated with whole-body hypothermia: a pilot study [Text] / A. N. Massaro, A. Jeromin, N. Kadom [et al.] // *Pediatric critical care medicine*. – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 310-317.

149. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia [Text] / K. Takahashi, S. Hasegawa, S. Maeba [et al.] // *Brain & development*. – 2014. – Vol. 36, N 8. – P. 670-675.

150. Shah, P. Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischaemic encephalopathy [Text] / P. Shah, S. Riphagen, J. Beyene, M. Perlman // *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*. – 2004. – Vol. 89, N 2. – P. 152-155.

151. Sharma, R. Prevention of Frey syndrome with superficial temporal fascia interpositioning: a retrospective study [Text] / R. Sharma // *International journal of oral and maxillofacial surgery*. – 2014. – Vol. 43, N 3. – P. 413-417.

152. Siesjo, B. K. Calcium in the brain under physiological and pathological conditions [Text] / B. K. Siesjo // *European neurology*. – 1990. – Vol. 30. – P. 39-41.

153. Sondag, C. M. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia [Text] / C. M. Sondag, G. Dhawan, C. K. Combs. – DOI 10.1186/1742-2094-6-1 // *Journal of neuroinflammation*. – 2009. – Vol. 6, N 1. – P. 1-13 (pag. var.).

154. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid

deposits but do not form plaques [Text] / M. Koistinaho, M. Ort, J. M. Cimadevilla [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98, N 25. – P. 14675-14680.

155. Tanzi, R. E. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition [Text] / R. E. Tanzi, R. D. Moir, S. L. Wagner // Neuron. – 2004. – Vol. 43, N 5. – P. 605-608.

156. Tau proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury [Text] / P. C. Liliang, C. L. Liang, H. C. Weng [et al.] // The Journal of surgical research. – 2010. – Vol. 160, N 2. – P. 302-307.

157. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide [Text] / S. J. Soscia, J. E. Kirby, K. J. Washicosky [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0009505 // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, N 3. – P. 1-10 (pag. var.).

158. The effect of the APOE genotype on individual brain AGE in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease [Text] / L. C. Lowe, C. Gaser, K. Franke [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0157514 // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 7. – P. 1-25 (pag. var.).

159. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia [Text] / C. Zhu, X. Wang, F. Xu [et al.] // Cell death and differentiation. – 2005. – Vol. 12, N 2. P. 162-176.

160. Toledo, J. B. Plasma amyloid beta measurements – a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker [Text] / J. B. Toledo, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski. – DOI [10.1186/alzrt162](https://doi.org/10.1186/alzrt162) // Alzheimer's research and therapy. – 2013. – Vol. 5, N 2. – P. 1-10 (pag. var.).

161. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table [Text] / O. Parolini, F. Alviano, I. Bergwerf [et al.] // Stem cells and development. – 2010. – Vol. 19, N 2. – P. 143-154.

162. Treatment of one case of cerebral palsy combined with posterior visual pathway injury using autologous bone marrow mesenchymal stem cells

[Text] / M. Li, A. Yu, F. Zhang [et al.]. – DOI 10.1186/1479-5876-10-100 // Journal of translational medicine. – 2012. – Vol. 10:100. – P. 1-7 (pag. var.).

163. Valencia, A. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons [Text] / A. Valencia, J. Moran // Free radical biology & medicine. – 2004. – Vol. 36, N 9. – P. 1112-1125.

164. van Wezel-Meijler, G. Neonatal cranial ultrasonography [Text] : guidelines for the procedure and atlas of normal ultrasound anatomy / G. van Wezel-Meijler. – Berlin ; New York : Springer, 2007. – 167 p.: ill.

165. Volpe, J. J. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy [Text] / J. J. Volpe // Annals of neurology. – 2012. – Vol. 72, N 2. – P. 156-166.

166. Volpe, J. J. Neurology of Newborn [Text] / J. J. Volpe. – 6th ed. – Philadelphia: Elsevier, 2017. – 1140 p.

167. Volpe, J. J. Neurology of the newborn [Text] / J. J. Volpe. – 5th ed. – Philadelphia : Saunders Elsevier, 2008. – XIV, 1094 p. : ill.

168. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function [Text] / E. J. Coulson, K. Paliga, K. Beyreuther, C. L. Masters // Neurochemistry international. – 2000. – Vol. 36, N 3. – P. 175-184.

169. Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia [Text] / C. Hobbs, M. Thoresen, A. Tucker [et al.] // Stroke. – 2008. – Vol. 39, N 4. – P. 1307-1313.

170. Xenon ventilation during therapeutic hypothermia in neonatal encephalopathy: a feasibility study [Text] / J. Dingley, J. Tooley, X. Liu [et al.] // Pediatrics. – 2014. – Vol. 133, N 5. – P. 809-818.

171. Yankner, B. A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides [Text] / B. A. Yankner, L. K. Duffy, D. A. Kirschner // Science. – 1990. – Vol. 250, N 4978. – P. 279-282.

172. Yu, T. Effect of asphyxia on non-protein-bound iron and lipid peroxidation in newborn infants [Text] / T. Yu, L. Q. Kui, Q. Z. Ming // Developmental medicine and child neurology. – 2003. – Vol. 45, N 1. – P. 24-27.

173. Zanelli S. A. Hypoxicischemic encephalopathy [Electronic resource] / S. A. Zanelli, D. P. Stanley, D. A. Kaufman // Medscape : [site]. – Jul 18, 2018. – Mode of access: <http://emedicine.medscape.com/article/973501> .

ПРИЛОЖЕНИЯ

**Приложение 1.Классификация гипоксически-ишемической энцефалопатии
(стадии/степени ГИЭ у доношенных детей по
Sarnat H., Sarnat M., 1976 в модификации Stoll B., Kliegman R., 2004)**

Показатель	Стадия I	Стадия II	Стадия III
Уровень сознания	Беспокойство	Летаргия	Ступор, кома
Мышечный тонус	Нормальный	Гипотония	Вялость
Поза	Лёгкая дистальная флексия	Значительная дистальная флексия	Децеребрация
Периостальные рефлексы	Повышены	Повышены	Снижены или угнетены
Миоклонус ы	Есть	Есть	Отсутствуют
Рефлекс Моро	Сильный	Слабый	Отсутствует
Зрачки	Мидриаз	Миоз	Неадекватная реакция, сниженная фотореакция
Судороги	Нет	Фокальные, мультифокальные	При децеребрации

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A β 1-42 - бета амилоид 1-42

aЭЭГ - амплитудно-интегрированная ЭЭГ

БА -болезнь Альцгеймера

ВАК МОН ДНР – Высшая аттестационная комиссия Министерства образования и науки Донецкой Народной Республики

ГИЭ - гипоксически-ишемическая энцефалопатия

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ДОКТМО - Донецкое областное клиническое территориальное медицинское объединение

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

КТ- компьютерная томография

МРТ – магнито-резонансная томография

НСГ -нейросонография

НЭ - неонатальная энцефалопатия

ОИТ – отделение интенсивной терапии

ОША - оценка по шкале Апгар

ПП ЦНС - перинатальное поражение центральной нервной системы

ТГ - терапевтическая гипотермия

ЦНС - центральная нервная система

ЭЭГ – электроэнцефалография

APP - белок предшественник амилоида