

На правах рукописи



Панова Марина Сергеевна

**РОЛЬ ЦИТОКИНОВ И АНТИТЕЛ К БЕЛКУ NR2 В ДИАГНОСТИКЕ
ПОСТГИПОКИСТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ НА ПЕРВОМ ГОДУ ЖИЗНИ У
ДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ**

3.1.21. – педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, доцент Панченко Александра Сергеевна

Официальные оппоненты:

Овсянников Дмитрий Юрьевич - доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра педиатрии Медицинского института, заведующий

Брыксина Евгения Юрьевна - доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра педиатрии и неонатологии, профессор

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иваново

Защита диссертации состоится «14» марта 2024 г. в 10-00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.062.02 в ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, д.39 кор. 2) и на сайте ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России <http://gpmu.org>.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.2.062.02
доктор медицинских наук, доцент

Тыртова Людмила Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Статистика последних лет регистрирует подъем ряда патологий среди беременных женщин, приводящих к внутриутробным страданиям плода (Голубев Н.А. и др., 2021). Воздействие ряда неблагоприятных факторов во время беременности может закончиться плацентарной недостаточностью с развитием внутриутробной гипоксии и рождением ребенка в состоянии асфиксии, последствиями которых в постнатальном периоде будут различные неврологические заболевания (Фредерикс Е.В. и др., 2023; Овсянников Д. Ю. и др., 2021; Барышева А.Ю. и др., 2020). Учитывая достаточно высокую распространенность перинатальных гипоксических состояний, а также постгипоксических последствий, поиск новых методов их профилактики и диагностики по сей день является актуальным.

Одним из звеньев патогенеза гипоксического поражения головного мозга является воспалительный процесс, основные участники которого – цитокины. Они были изучены в разных возрастных периодах при ряде заболеваний: гипоксические поражения головного мозга (Кузьмина Е.С. и др., 2022; Go H. et. al., 2021; Pang R. et. al., 2022; Magalhães R.C. et. al., 2019), детский церебральный паралич (ДЦП) (Pang R. et. al., 2022; Sumanovic-Glamuzina D. et. al., 2020), аутизм (Filippova Y.Y. et. al., 2022), эпилепсия (Ma H. et. al., 2021; Артыкова М.А. и др., 2019; Soltani Khaboushan A. et. al., 2022) и другой патологии (Yue S.L. et. al., 2021; Pang R. et. al., 2022; Magalhaes R.C. et. al., 2019; Chen M.A. et. al., 2021). Ряд работ были посвящены исследованию цитокинов при гипоксических поражениях головного мозга, но единичны исследования, изучающие цитокины с позиции продолжительности и тяжести гипоксии в анте и интранатальных периодах (Perrone S. et. al., 2018; Стародубцева Н.Л. и др., 2022; Boskabadi H., et. al., 2018).

Генетическая детерминированность активности цитокинов обуславливает различные варианты иммунных реакций и возникновение воспаления. В педиатрии изучена лишь часть подобных механизмов гипоксического поражения головного мозга (Jiang L. et. al., 2020; Saad K. et. al., 2020; Панина Ю.С. и др., 2019; Xia L. et. al., 2018), малое количество работ посвящено периоду новорожденности (Genetic Polymorphisms, Esih K. et. al., 2020; Holborn M.A. et. al., 2022; Aslam S. et. al., 2019). Этот факт дает повод рассмотреть полиморфизм цитокинов при гипоксии для выявления предрасположенности к возникновению заболевания и изучения механизмов его развития.

Нейроповреждение не заканчивается периодом новорожденности и может продолжаться годами. У детей с неврологической патологией были проанализированы нейротрофины с положительным влиянием на регенерирующие процессы в центральной нервной системе (ЦНС) (Зыкова Ю.В. и др., 2021; Lesniak A. et. al., 2021; Sahay A. et. al., 2020; Gümüş C. et. al., 2022), антитела к глутаматным рецепторам (Zhang X. et. al., 2020; Rasineni G.K. et. al., 2020; Пономарев Г.В. и др., 2020; Gardoni F. и др., 2021), а также другие белковые молекулы, рецепторы (Zhao Y.C. и др., 2019; Yu F.P.S. et. al., 2018; Wu Q. et. al., 2019; Dulewicz M. et. al., 2020;), которые широко используются в диагностике патологии ЦНС у взрослых, но не исследовались у детей. Учитывая вышесказанное, представляется интересным изучение новых маркеров нейровоспаления у детей раннего возраста с гипоксическим анамнезом в анте и интранатальном периодах.

Совершенствование диагностических методов и раскрытие новых современных представлений о механизмах развития поражений головного мозга гипоксического генеза в педиатрии стало основанием для реализации данной работы.

Цель исследования

Определить роль цитокинов и нейроспецифических маркеров в диагностике постгипоксических состояний на первом году жизни у доношенных детей.

Задачи исследования

1. Оценить содержание цитокинов (интерлейкин (ИЛ)-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, фактор некроза опухолей- α (ФНО- α)) и нейронспецифической енолазы (НСЕ) в сыворотке пуповинной крови у доношенных новорожденных детей с гипоксическим анамнезом в раннем неонатальном периоде с учетом оценки по шкале Апгар.
2. Исследовать частоту генотипов генетического полиморфизма цитокинов ИЛ-1 β -C511T, ИЛ-1 β -C+3954T, ИЛ-4-589C>T, ИЛ-6-174C>G, ИЛ-10-1082G>A, ИЛ-10-819C>T, ФНО- α -308G>A) в сыворотке пуповинной крови у доношенных новорожденных детей с гипоксическим анамнезом.
3. Оценить динамику неврологического статуса и психомоторного развития в раннем неонатальном периоде и в один год жизни у доношенных детей с гипоксическим анамнезом в анте и интранатальных периодах.
4. Определить содержание в сыворотке крови нейроспецифических маркеров (нейротрофического фактора роста (BDNF), моноцитарного хемотаксического протеина (CCL2), триггерного рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках-1, 2 (TREM-1, TREM-2), трансформирующего ростового фактора бета - β 1 (TGF - β 1), фактора роста нерва (NGF), визиноподобного белка-1 (VILIP-1), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), фракталкина (CX3CL1), ИЛ-6, ИЛ-18, ФНО- α и антител к белку NR2 (AntiGRIN2A)) и установить связь с особенностями неврологического статуса у детей с гипоксическим анамнезом в один год жизни.
5. С помощью технологии обучения нейронной сети, многофакторной регрессионной модели разработать современные методы диагностики гипоксического поражения головного мозга у доношенных детей с учетом клинико-анамнестических данных и результатов лабораторных исследований.

Научная новизна

Впервые доказано, что комплексное влияние таких факторов риска как угрозы прерывания беременности, хронической плацентарной недостаточности (ХрПН), хронической гипоксии плода (ХГП), преэклампсии и дистресса плода, наряду с повышенными уровнями ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и НСЕ в пуповинной крови увеличивает риск развития гипоксического поражения головного мозга. Впервые показано, что использование вышеперечисленных показателей в базе данных нейросети с высокой долей вероятности позволяет диагностировать развитие гипоксического поражения головного мозга у доношенных детей.

Установлено, что чем ниже оценка по шкале Апгар, тем выше концентрация цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ФНО- α и НСЕ в пуповинной крови у доношенных детей.

Впервые установлено распределение генотипов цитокина ИЛ-1 β в локусе C511T и ИЛ-4 в точке C589T у доношенных новорожденных детей в пуповинной крови, которые перенесли внутриутробную гипоксию и умеренную асфиксию при рождении. Носительство гомозиготного генотипа ТТ ИЛ-1 β в точке С-511T и гетерозиготного генотипа СТ ИЛ-4 в точке С589T увеличивает вероятность развития поражения ЦНС у доношенных новорожденных детей, которые перенесли внутриутробную гипоксию и имели умеренную асфиксию при рождении.

На основании данных суммы баллов по шкале Журба, уровня TGFB-1 в крови (пг/мл) и уровня AntiGRIN2A в крови (нг/мл) впервые предложен математический подход для диагностики развития поражения головного мозга у доношенных детей раннего возраста.

Впервые было доказано, что использование базы данных нейросети, включающих уровни TGFB-1 и AntiGRIN2A, а также сумму баллов по шкале Журба позволит с высокой долей вероятности диагностировать развитие поражений головного мозга у доношенных детей в раннем возрасте.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты исследования расширяют сведения о патогенезе гипоксического поражения головного мозга у доношенных новорожденных детей. Установлены новые данные о распространенности полиморфизма генов цитокинов (ИЛ-1 β C511T и ИЛ-4 C589T) у детей,

рожденных на доношенном сроке при различных вариантах гипоксии. Выявленное наличие носительства гомозиготного генотипа ТТ ИЛ-1 β в точке С-511Т и гетерозиготного генотипа СТ ИЛ-4 в точке С589Т позволяют определять группы риска по возникновению заболеваний ЦНС у детей, рожденных доношенными.

Разработанные статистические модели прогнозирования развития гипоксического поражения головного мозга у доношенных детей могут послужить основой для разработки новых методов предиктивной медицины.

Выявлено, что дети с гипоксическим анамнезом в антенатальном и интранатальном периодах формируют группу риска по развитию неврологической патологии в раннем возрасте, в связи с чем, наряду с общепринятыми диагностическими мероприятиями целесообразно определение концентраций в сыворотке крови TGF β -1 и AntiGRIN2A.

Предложена программа для электронно-вычислительной машины (ЭВМ) определения риска развития гипоксического поражения головного мозга у доношенных новорожденных (опубл. 21.12.2020).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Комплексная оценка клинико-анамнестических факторов риска и иммунологических показателей в пуповинной крови с использованием технологии нейросети позволяет с высокой долей вероятности увеличить диагностику гипоксических поражений головного мозга у доношенных детей.
2. Оценка генетических показателей в пуповинной крови у детей, рожденных доношенными, позволяет выделить группу риска развития поражения головного мозга гипоксического генеза.
3. Разработанная модель диагностики риска развития поражения головного мозга у доношенных детей раннего возраста, включающая сумму баллов по шкале Журба, уровень в крови TGFB-1 и AntiGRIN2A позволяет с высокой долей вероятности прогнозировать поражение головного мозга у детей раннего возраста.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов определяется репрезентативным числом наблюдений и выполненных исследований. Результаты работы доложены на многочисленных всероссийских и межрегиональных научно-практических конференциях. Результаты исследований внедрены в образовательный процесс кафедр пропедевтики детских болезней, педиатрии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», в лечебно-диагностическую работу ГУЗ «Детский клинический медицинский центр г. Читы» и ГБУЗ «Забайкальский краевой перинатальный центр» г. Читы. По теме диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 4 в журналах, индексируемых в международной базе Scopus. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики методов исследования, главы собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы (97 отечественных и 104 зарубежных источников). Работа иллюстрирована 32 таблицами и 9 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проведено обследование 105 детей в раннем неонатальном периоде и 45 детей в 1 год жизни (рис.1). Критерии включения: рождение на сроке гестации 37-41 недель; патогномоничные признаки ХГП; оценка по шкале Апгар от 6 до 4 баллов, клинико-лабораторные признаки нарушения состояния ребенка; информированное добровольное согласие законных представителей на участие в исследовании. Критерии исключения: рождение на сроке гестации менее 37 недель и более 41 недель; наличие инфекционных и генетических заболеваний, гемолитической болезни новорожденного, родового травматизма; отказ законных

представителей от участия в исследовании. Проведен ретроспективный анализ историй развития новорожденных в раннем неонатальном периоде и амбулаторных карт детей 1 года жизни с оценкой течения беременности и родов, клинической характеристики детей, неврологического статуса и нервно-психического развития (НПР). Качественно-количественная оценка НПР в 1 год жизни проводилась по К.Л. Печора. Психомоторное развитие новорожденного и в 1 год жизни оценивалось по методике Л.Т. Журба и Е.М. Мастюкова.

I этап: ранний неонатальный период

1 исследуемая группа (n=26) – доношенные новорожденные дети с хронической внутриутробной гипоксией и умеренной асфиксии при рождении;

2 исследуемая группа (n=38) – доношенные новорожденные дети с хронической внутриутробной гипоксией без асфиксии при рождении;

3 контрольная группа (n=41) – доношенные новорожденные дети без хронической внутриутробной гипоксии и асфиксии при рождении.

Изучение факторов риска возникновения хронической внутриутробной гипоксии и асфиксии при рождении у доношенных новорожденных детей;

Клинико-лабораторное исследование детей, данные инструментальных методов исследования;

Иммунологические исследования - определение уровня цитокинов в пуповинной крови (ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α);

Генетические исследования - полиморфизм генов цитокинов в пуповинной крови (ИЛ-1 β -C511T, C+3954T, ИЛ-4-589C>T, ИЛ-6-174C>G, ИЛ-10-1082G>A, ИЛ-10-819C>T, ФНО- α -308G>A);

Исследование уровня НСЕ в пуповинной крови.

II этап: один год жизни

1 исследуемая группа (n=10) – катамнез детей в один год жизни, рожденных доношенными, имевших в анамнезе хроническую внутриутробную гипоксию и умеренную асфиксию при рождении;

2 исследуемая группа (n=17) – катамнез детей в один год жизни, рожденных доношенными, имевших в анамнезе хроническую внутриутробную гипоксию без асфиксии при рождении;

3 контрольная группа (n=18) – катамнез детей в один год жизни, рожденных доношенными, без хронической внутриутробной гипоксии и асфиксии при рождении в анамнезе;

Клиническая характеристика детей в 1 год жизни, данные нейросонографии на первом году жизни, других инструментальных методов исследования в 1 год жизни;

Исследование в сыворотке крови уровня нейроспецифических маркеров в 1 год жизни (BDNF, CX3CL-1, CCL2, TREM-1, TREM-2, TGF- β 1, β -NGF, VILIP-1, VEGF, sRAGE, ИЛ-6, ИЛ-18, TNF- α).

Определения антител к белку NR2 (NMDA)

Рисунок 1 – Дизайн исследования

Проводилась оценка данных нейросонографии (НСГ), ультразвукового исследования внутренних органов, рентгенологического исследования органов грудной клетки, электроокардиографии (ЭКГ), электроэнцефалографии (ЭЭГ) и компьютерной томографии (КТ) головного мозга.

Лабораторные методы исследования:

- оценка кислотно-основного состояния в сыворотке пуповинной крови;
- иммуноферментный анализ для определения ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 ФНО- α и НСЕ в пуповинной крови, AntiGRIN2A в сыворотке крови в 1 год жизни («сэндвич»-метод) с

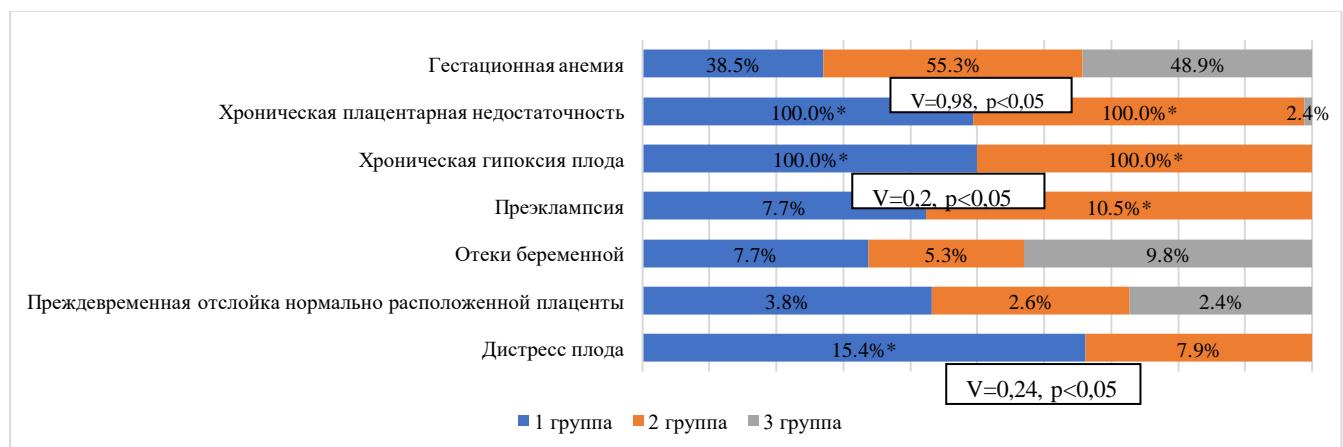
использованием наборов реактивов («Вектор-Бест») на аппарате Expert 96 IFA-Rider (Англия), молекулярно генетический анализ образцов ДНК, выделенные из лейкоцитов пуповинной крови реагентами «ДНК-Экспресс-кровь», амплификацию фрагментов генов в термоциклире «БисМ111» (ООО «Бис-Н», Новосибирск) с использованием стандартных наборов реактивов ИЛ1 β -C511T, C+3954T, ИЛ4-589C> T, ИЛ6-174C> G, ИЛ10-1082G> A, ИЛ10-819C> T, ФНО- α -308G> A НПФ «Литех» (Москва);

- проточная флюориметрия для определения нейроспецифических маркеров VLIP-1, CCL2, TREM-2, BDNF, TGF - β 1, VEGF, ИЛ-6, TREM-1, NGF - β , ИЛ-18, TNF- α , sRAGE, CX3CL-1 на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США), тест-системы LEGENDplex TM Human Neuroinflammation Panel 1 (13-plex) (BioLegend, США), в сыворотке крови в 1 год жизни.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, США). Анализ нормальности распределения признаков проводился путем оценки критерия Шапиро-Уилка, учитывая ненормальность распределения данные представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартилей: Me (Q1; Q3). Для сравнения 3-х независимых групп по одному количественному признаку использовался ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису (H). Попарное сравнение проводилось с помощью критерия Манна-Уитни (поправка Бонферрони ($p<0,017$)). Для сравнения количественных показателей зависимых исследуемых групп использовали ранговый критерий Уилкоксона, который в заключении SPSS автоматически преобразуется в величину Z (z-score). Корреляционную связь оценивали коэффициентом корреляции Спирмена. Силу связи определяли по шкале Чеддока. Номинальные данные описывались абсолютными значениями и процентными долями (сравнение – критерия χ^2 Пирсона, с поправкой на правдоподобие – при малой выборке). Во всех случаях $p<0,05$ считали статистически значимым. Для определения силы связи между фактором риска и исходом использовался критерий Крамера (V). Для попарного сравнения номинальных данных использовали критерий Фишера, номинальных показателей зависимых исследуемых групп – критерий Мак-Нимара. Статистически значимые параметры включены в базу данных, которая легла в основу обучения многослойного персептрона. Диагностическая ценность модели на основе нейросети определялась путем применения ROC-анализа: определялась чувствительность, специфичность и точность.

Результаты исследования и их обсуждение

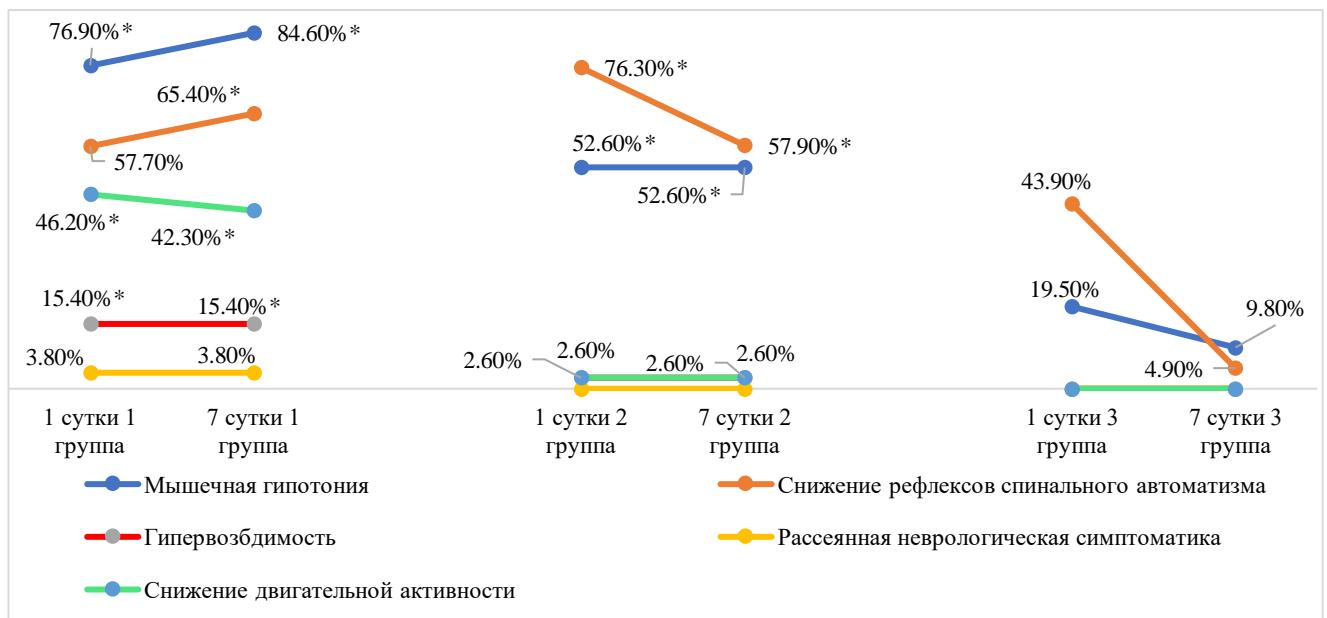
По данным нашего исследования беременность у женщин осложнилась угрозой прерывания в 1-ой группе в 26,9% и 2-ой группа в 15,8% случаях ($p<0,001$, $V=0,29$). Во 2-й половине беременности значимыми осложнениями были ХрПН, ХГП, преэклампсия и дистресс плода у детей 1-ой группы исследования (рис.2). Эти факторы осложнения беременности хорошо изучены и без сомнения влияют на возникновение поражений ЦНС у новорожденных (Иутинский Э. М. и др., 2014; Кузнецов П.А. и др., 2017; Burton G. J. et. al., 2019).



*статистически значимые различия между группами

Рисунок 2 – Структура осложнений течения второй половины беременности

В неврологическом статусе (рис.3) преобладающим и значимым была мышечная гипотония в 1-й и 2-й группах, сохраняющаяся к концу 7-х суток жизни, снижение рефлексов спинального автоматизма, частота которого снизилась в динамике во 2-й и 3-й группах. Синдром гипервозбудимости и сниженная двигательная активность имели значимость для 1-й группы и не изменяли свою частоту в динамике.



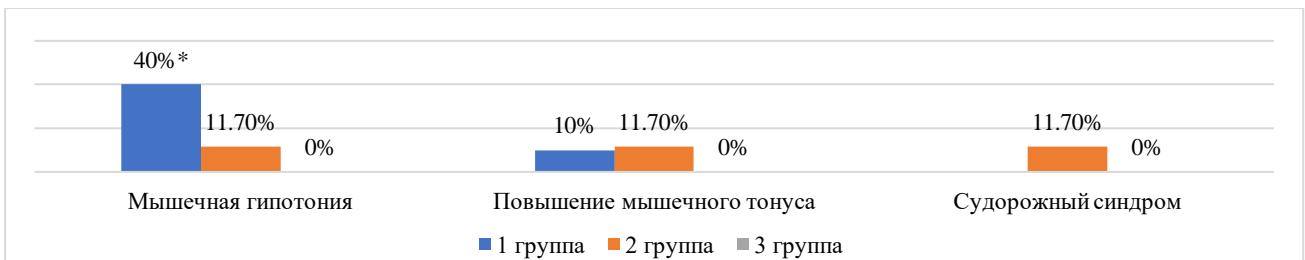
*статистически значимые различия между группами

Рисунок 3 – Особенности неврологического статуса в раннем неонатальном периоде

Оценка психомоторного развития показала отличия в 1-е сутки жизни по критериям коммуникабельности и голосовым реакциям между 1-й/2-й и 1-й/3-й группами, на 7-е сутки – между 1-й и 3-й группами, изменения в динамике показали небольшое улучшение в 1-й группе и малозначимое улучшение во 2-й группе. По критерию мышечного тонуса на 1-е и на 7-е сутки изменения были между всеми группами, существенное улучшение в динамике отмечено в 3-й группе. Анализ параметра безусловных рефлексов выявил изменения между 1-й и 2-й группами и 3-й на 1-е сутки и между всеми группами на 7-е сутки, причем существенные изменения в динамике было во 2-й и 3-й группах. Наличие патологических движений было значимо между 1-й и 3-й группами, ухудшение в динамике отмечено во 2-й группе.

Сумма баллов по всем признакам показала различия между всеми группами на 1-е и 7-е сутки жизни, значительное улучшение в неврологическом статусе отмечено в 3-й группе.

Оценка неврологического статуса в 1 год жизни выявила значимые различия по параметру мышечной гипотонии ($V=0,45$, $p=0,01$) между 1-й и 3-й группами (рис.4).

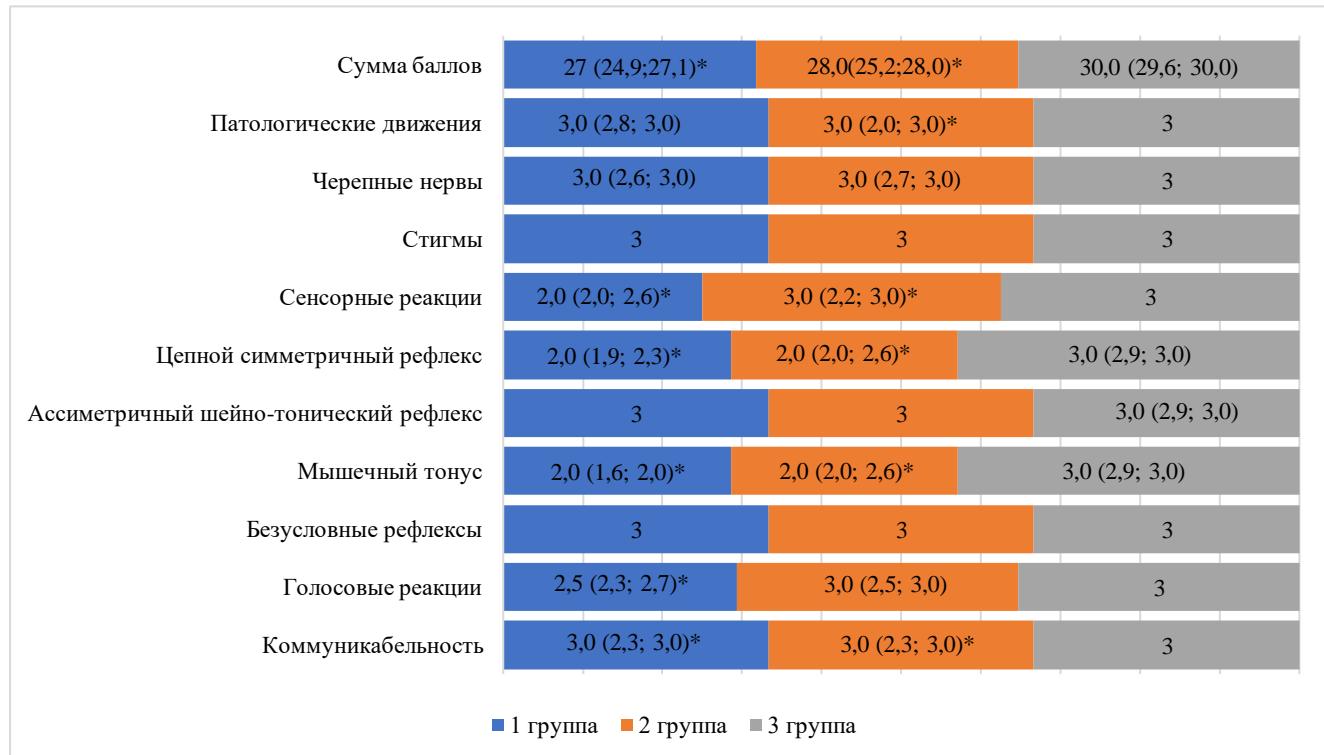


*статистически значимые различия между группами

Рисунок 4 – Особенности неврологического статуса у детей в 1 год жизни

В дальнейшем провели оценку психомоторного развития детей в 1 год жизни (рис. 5) и было показано, что значимые отличия по критериям коммуникабельности, мышечного тонуса, цепного симметричного рефлекса и сенсорным реакциям есть между двумя основными группами

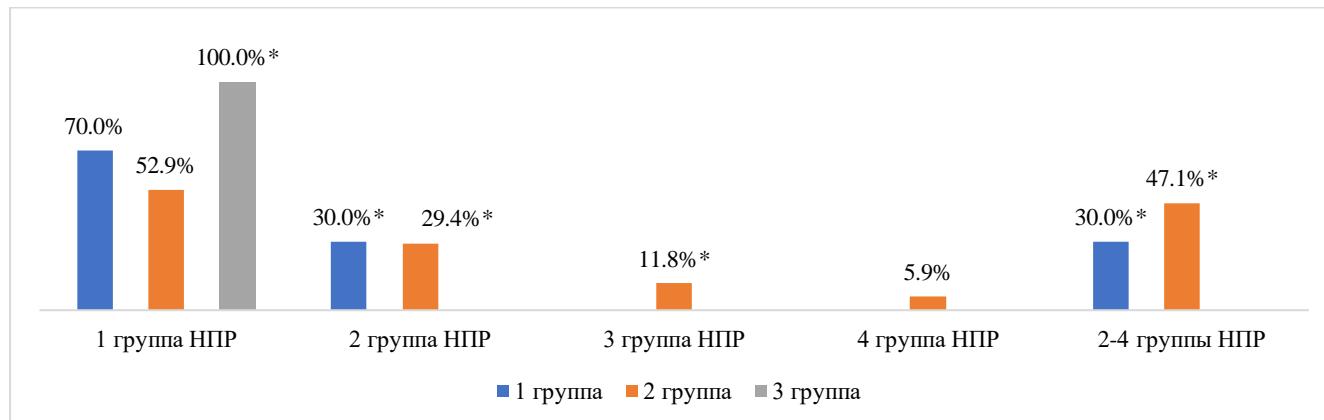
и 3-й группой. Между 1-й и 3-й группами выявлены различия по голосовым реакциям, а между 2-й и 3-й – по патологическим движениям. Окончательная сумма баллов показала значимые различия между двумя основными группами и 3-й группой.



*статистически значимые различия между группами

Рисунок 5 – Оценка психомоторного развития детей в 1 год жизни

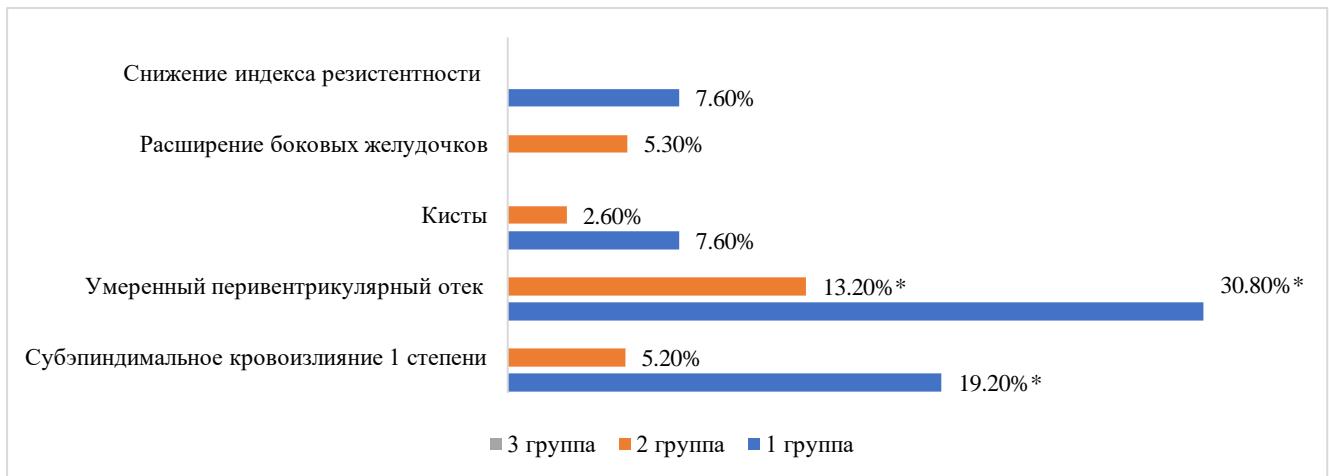
В 1 год жизни было отмечено, что все дети группы контроля не имели отставания в НПР, а существенная часть младенцев основных исследуемых групп имели задержку ($p=0,001$) (рис.6).



*статистически значимые различия между группами

Рисунок 6 – Качественно-количественная оценка нервно-психического развития в 1 год жизни (по К.Л. Печора)

В раннем неонатальном периоде по данным НСГ (рис.7) значимое наличие структурно-функциональных изменений головного мозга было в 1-й группе 57,7% и во 2-й – 21,1% ($F_{1,2}=0,004$, $p_{1,2}<0,05$, $F_{1,3}=0,001$, $p_{1,3}<0,05$, $F_{2,3}=0,002$, $p_{2,3}<0,05$). В 3-й группе изменений головного мозга выявлено не было. Преобладающими и значимыми были умеренный перивентрикулярный отек для 1-й и 2-й групп ($V=0,36$), субэпиндимальное кровоизлияние 1 степени для в 1-й и во 2-й группах, ($V=0,3$)



*статистически значимые различия между группами

Рисунок 7 – Особенности НСГ в раннем неонатальном периоде

В катамнестическом наблюдении дети 1-й группы имели структурные изменения головного мозга по данным НСГ в 60% случаев (6/10), в отличие от детей 3-й группы (1 случай – 5,6%), $F_{1-3} = 0,003$, $p_{1-3} < 0,05$. Во 2-й группе патологическая картина отмечена у 47,1% детей (8/17), $F_{2-3} = 0,007$, $p_{2-3} < 0,05$. (рис.8).

В 1 год жизни при наличии показаний двум младенцам 1-й группы и 3-м во 2-й группе была проведена ЭЭГ, по результатам которой патологические изменения выявлены во 2-й группе в виде задержки формирования коркового электрогенеза, островолиновой активности в межприступный период – 2/3 (66,6%). В 1-й группе патологических изменений обнаружено не было. В неонатальном периоде показаний для проведения ЭЭГ не было.



Рисунок 8 – Структура изменений головного мозга по данным нейровизуализации на первом году жизни

У детей со структурными изменениями головного мозга выявлен ряд неврологических симптомов без значимых различий (рис.9).

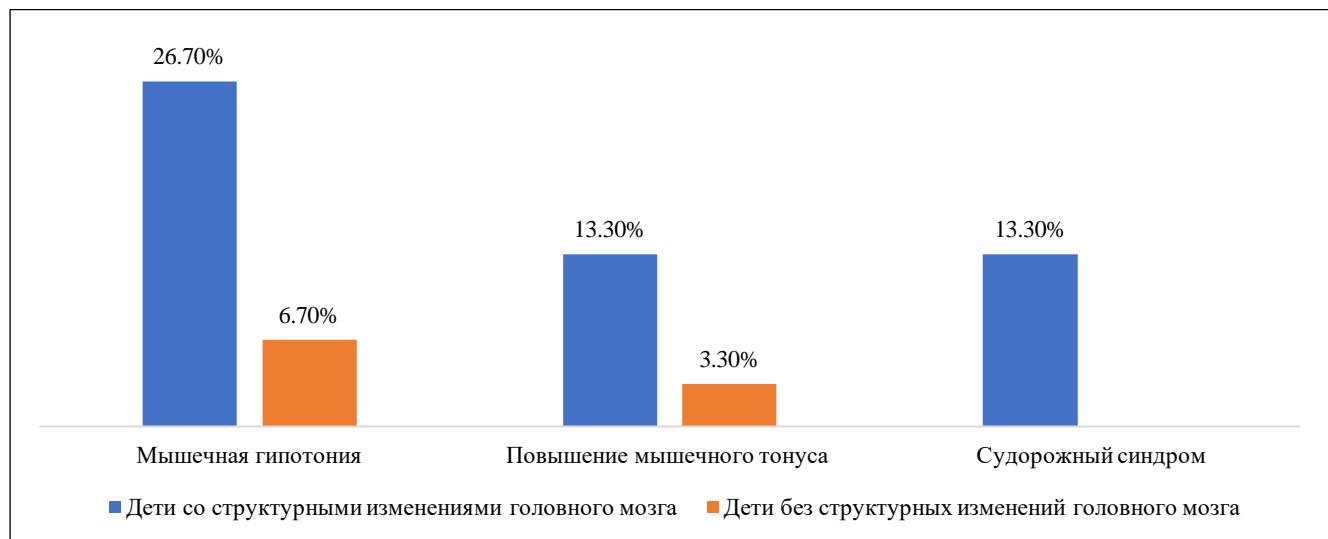
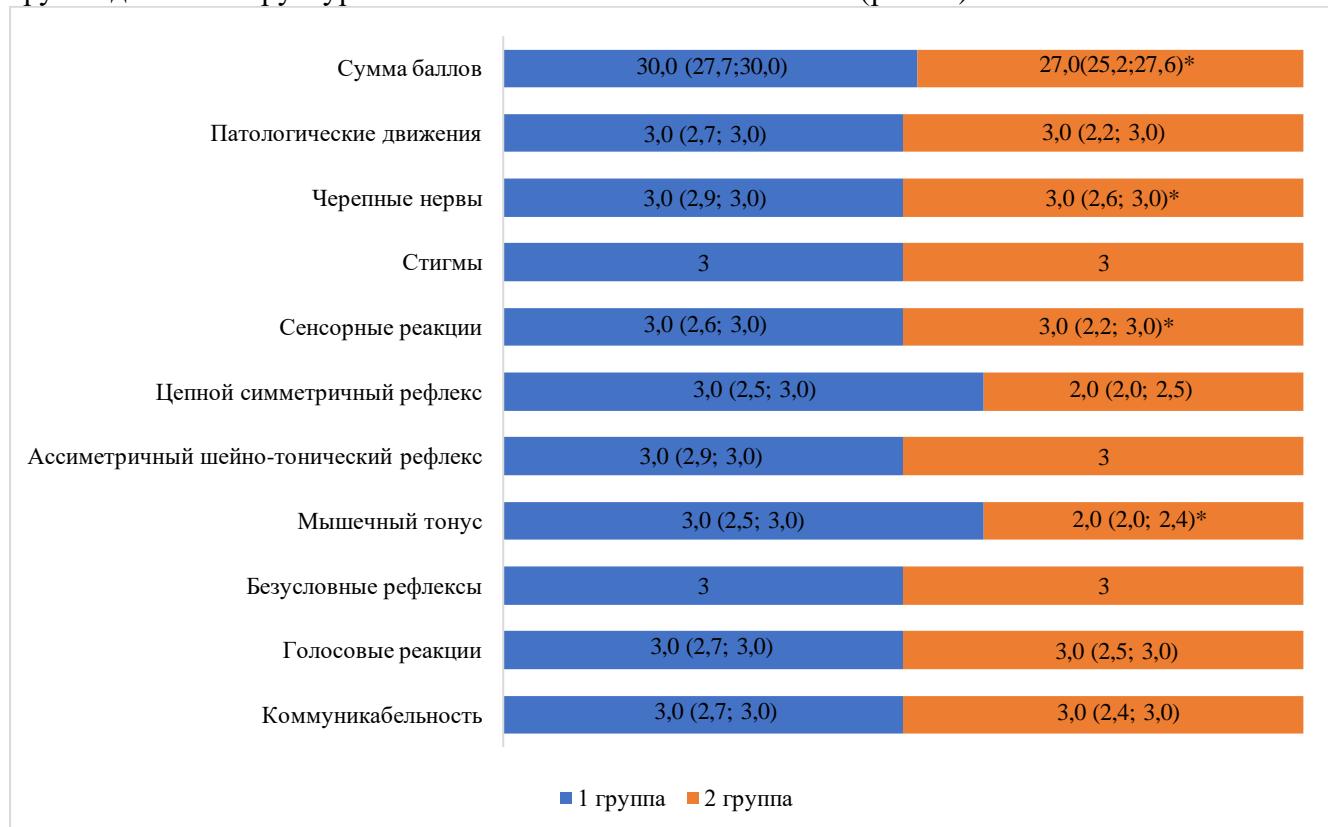


Рисунок 9 – Неврологический статус у детей 1 года жизни

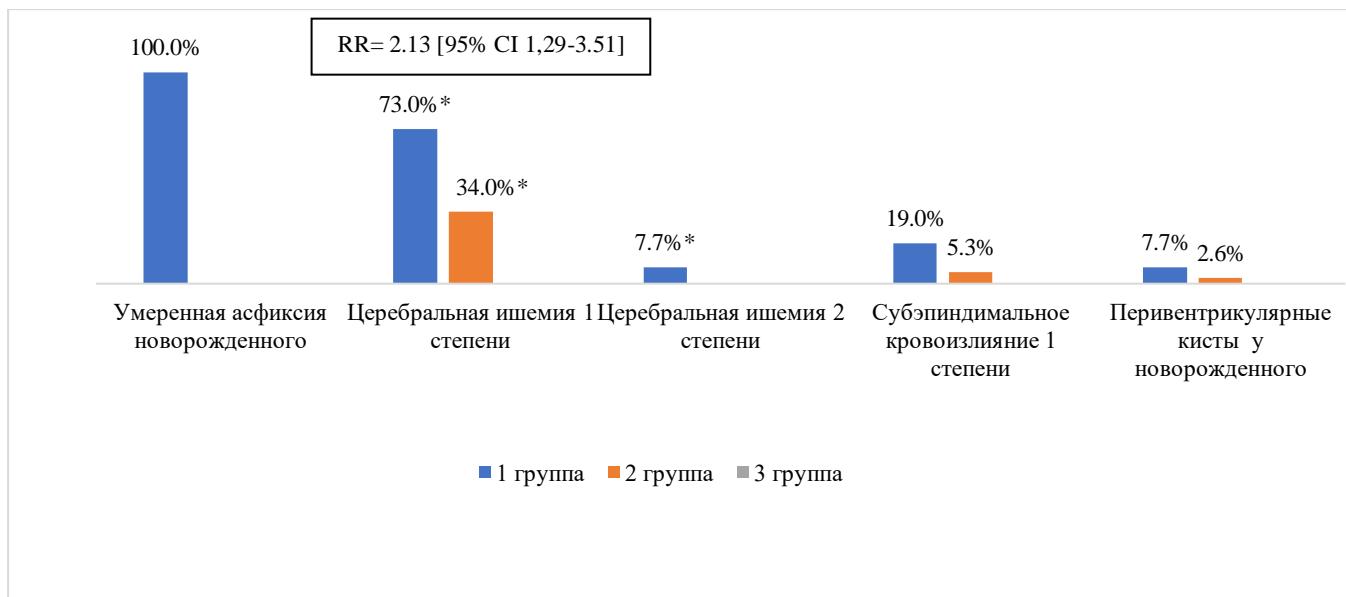
Оценка психомоторного развития детей в 1 год жизни показала значимые отличия по критериям мышечного тонуса, сенсорных реакций, черепных нервов и итоговой сумме баллов в группе детей со структурными изменениями головного мозга (рис.10).



*статистически значимые различия между группами

Рисунок 10 – Оценка психомоторного развития детей в 1 год жизни

По завершении раннего неонатального периода с учетом анамнеза, клинической картины и НСГ с доплерографией, осмотра невролога детям были выставлены неврологические диагнозы (рис. 11)



*статистически значимые различия между группами

Рисунок 11 – Неврологические диагнозы в раннем неонатальном периоде

В 1 год жизни дети были консультированы неврологом, неврологический диагноз был установлен в 70% случаев детям 1 группы (7/10) и в 41,7% случаев детям 2 группы (6/17), в 3 группе дети были здоровы (рис.12).



Рисунок 12 – Неврологические диагнозы в 1 год жизни

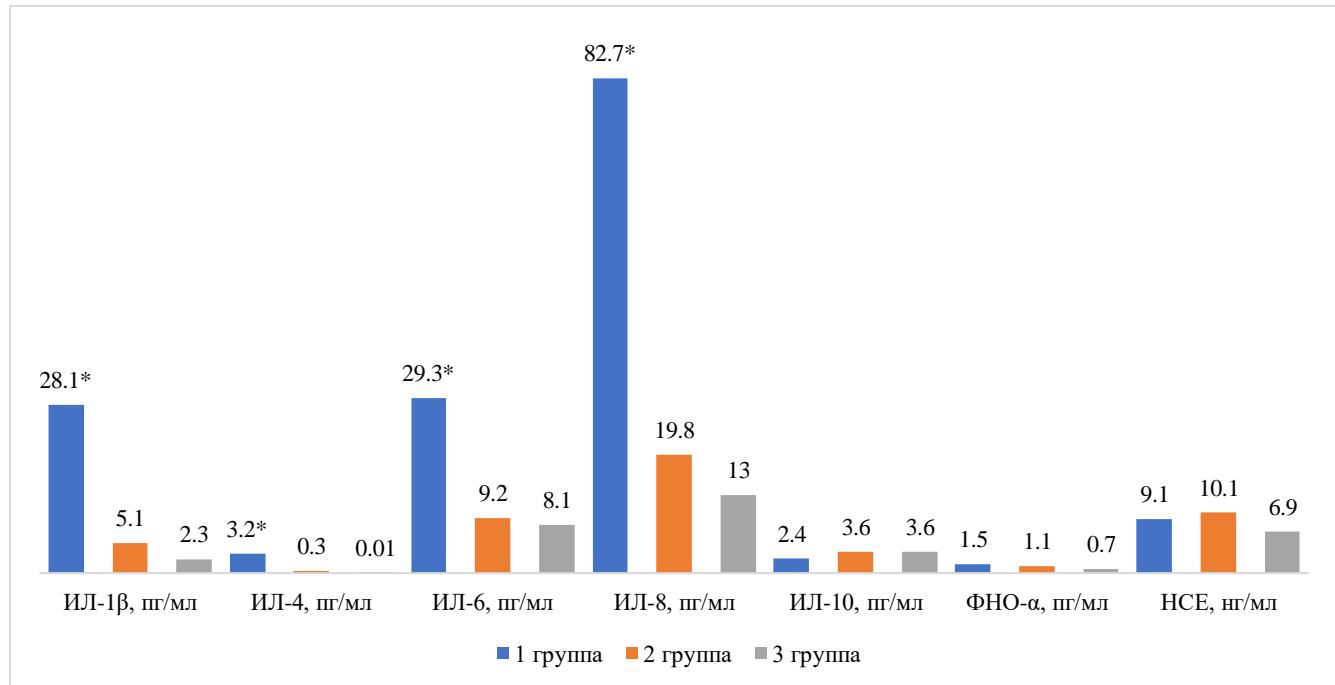
Детям со структурными изменениями головного мозга в 1 год жизни клинический неврологический диагноз устанавливался чаще (60% - 9/15), чем в группе детей без изменений по результатам проведенной нейровизуализации (13,3% - 4/30), ($F=0.003$, $p<0.05$).

Данные исходы в 1 год можно объяснить функциональной незрелостью мозга, несформированностью ассоциативных связей, отвечающие за клинические проявления

неврологического заболевания, поэтому даже грубые органические поражения в первые месяцы жизни порой себя не проявляют (Прусаков В.Ф. и др., 2016).

В связи с вышесказанным остается актуальным вопрос поиска ранних маркеров, которые помогут заподозрить нейроповреждение.

При оценке показателей цитокинов в пуповинной крови, у детей 1-й группы уровни ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 оказались значимо выше, чем во 2-й и 3-й группах детей (рис.13).



*статистически значимые различия между группами

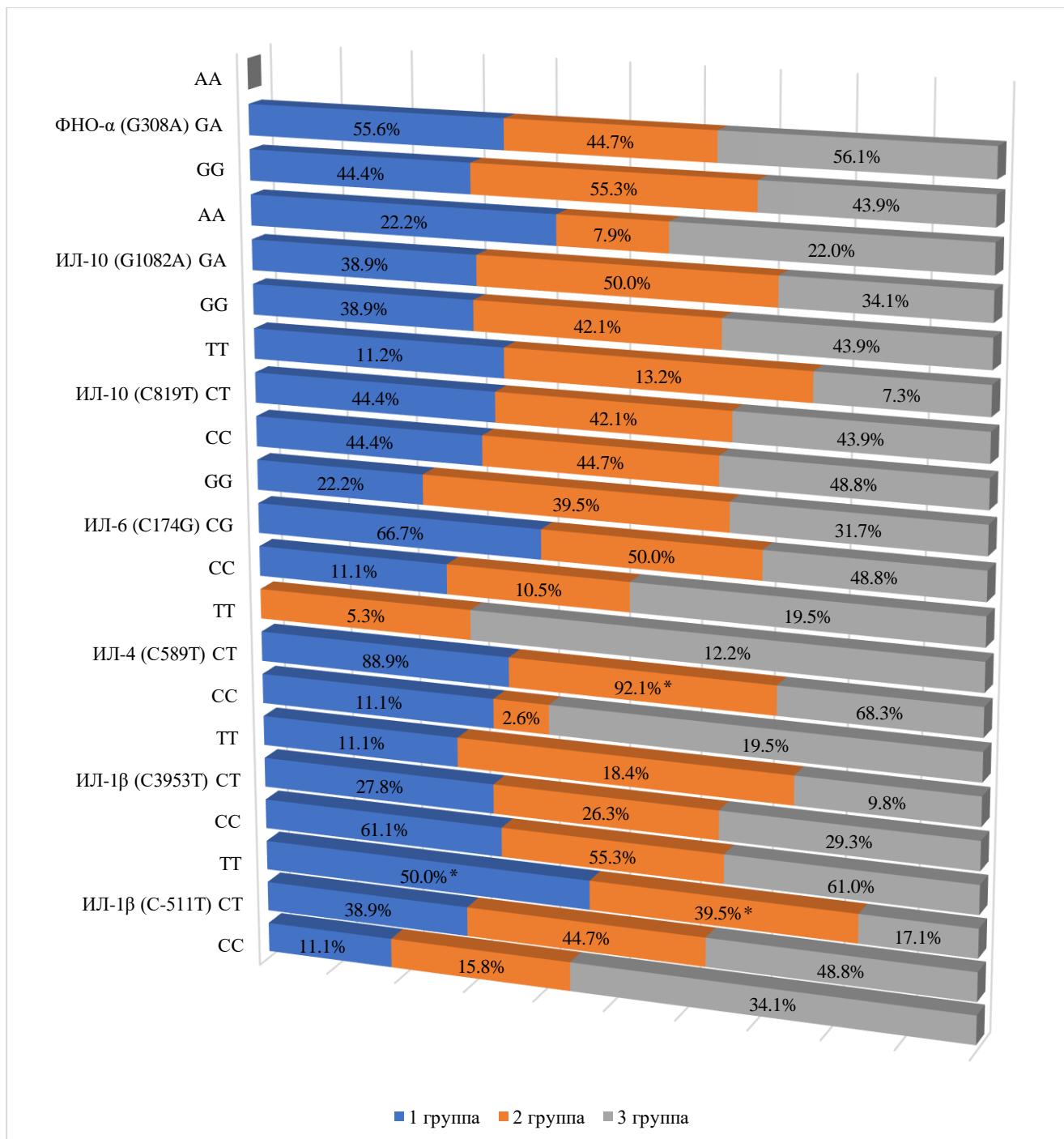
Рисунок 13 – Иммунологические параметры пуповинной крови в исследуемых группах

Корреляционный анализ выявил обратную слабую связь в отношении ИЛ-1 β и ИЛ-6 со шкалой Апгар в конце 1-й минуты, умеренную с ИЛ-4, ИЛ-8 и НСЕ, а в конце 5-й минуты – обратная слабая связь в отношении ФНО- α , ИЛ-8 и НСЕ, умеренная – ИЛ-4 и ИЛ-6.

Данные результаты частично повторяют исследования, подтвердившие теорию участия цитокинов в гипоксическом повреждении ЦНС (Кузьмина Е.С. и др., 2022; Стародубцева Н. Л. и др., 2022; Ходжиметова Ш. Х. и др., 2022).

Впервые было проанализировано носительство SNP цитокинов у детей с различными вариантами гипоксического анамнеза и в качестве факторов риска развития поражения головного мозга. Анализ SNP (рис.14) ИЛ-1 β (С-511Т) показал, что у детей 1-й и 2-й группы чаще регистрировался гомозиготный генотип ТТ в отличие от 3-й группы (OR 4.86 [1,62– 16,63] и 3.17 [1.12 – 8.98]). Исследование гена ИЛ-4 в точке С589Т выявило, что во 2-й группе преобладает носительство генотипа СТ (OR 5,41 [1,40– 20,89]).

На следующем этапе обследования у детей в 1 год жизни был определен уровень нейроспецифических маркеров (BDNF, CX3CL-1, CCL2, TREM-1, TREM-2, TGF- β 1, NGF β , VILIP-1, VEGF, ИЛ-6, ИЛ-18, sRAGE, ИЛ-18, ФНО- α , AntiGRIN2A). Часть из них были исследованы у детей как маркеры нейрогенеза, дифференцировки, играющие роль в развитии ЦНС в норме и при патологии (Al-Ayadhi L. et al., 2018; Qiu A. et al., 2021; Sahay, A. et al., 2020), у взрослого населения при неврологических заболеваниях (Шевцова А. И. и др., 2019; Dulewicz, M. et al., 2020; Xu P. et al., 2019; Liu D. et al., 2020). Значимый результат был выявлен в отношении TGF- β 1 и AntiGRIN2A в группе детей, со структурными изменениями головного мозга по данным НСГ и КТ головного мозга.



*статистически значимые различия между группами

Рисунок 14 – Частота встречаемости генотипов изучаемых полиморфизмов

Для создания модели ранней диагностики гипоксических состояний у новорожденных была выбрана процедура многослойного перцептрона (рис.15). Входные нейроны: наличие/отсутствие угрозы прерывания, преэклампсии и/или плацентарной недостаточности во время беременности, уровни ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , НСЕ, имеющие наиболее значимую и патогенетически обоснованную роль). Выходной слой – 3 целевые (зависимые) переменные (1 группа – доношенные новорожденные, рожденные в умеренной асфиксии, 2 группа – доношенные новорожденные, имевшие в анамнезе перенесенную ХГП и рожденные без асфиксии, 3 группа – доношенные новорожденные, не имевшие в анамнезе перенесенную ХГП и асфиксию).

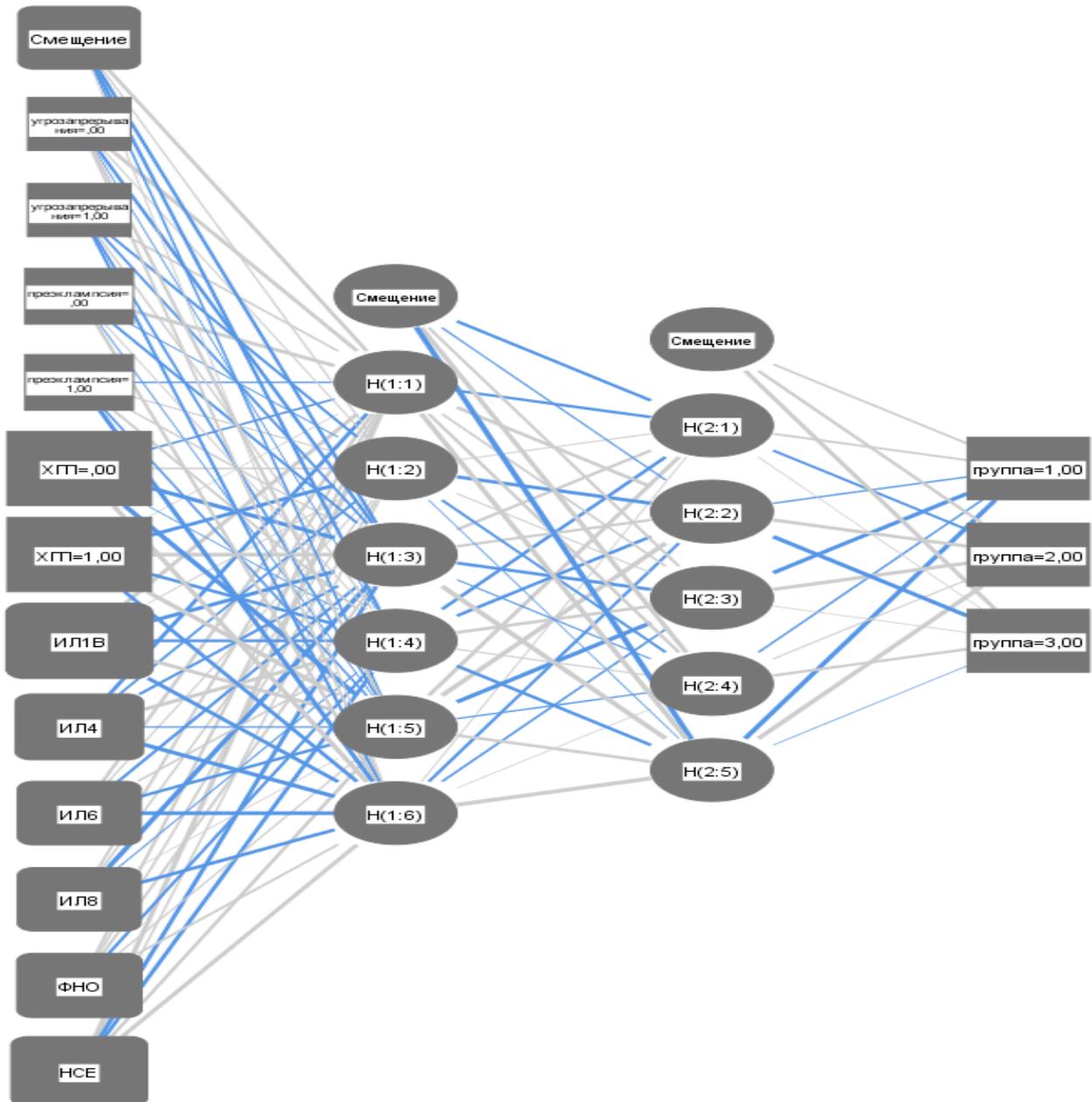


Рисунок 15 – Структура многослойного персептрона, позволяющего прогнозировать развитие гипоксических состояний у доношенных новорожденных
Точность диагностики – 96,2% (табл. 1, рис.16)

Таблица 1 – Информативность разработанной технологии ранней диагностики гипоксических состояний у доношенных новорожденных

Ранняя диагностика	AUC	Статистическая значимость	Чувствительность	Специфичность
1 группа	0,98	p < 0,001	0,89	1,00
2 группа	0,98	p < 0,001	1,00	0,96
3 группа	1,00	p < 0,001	1,00	1,00

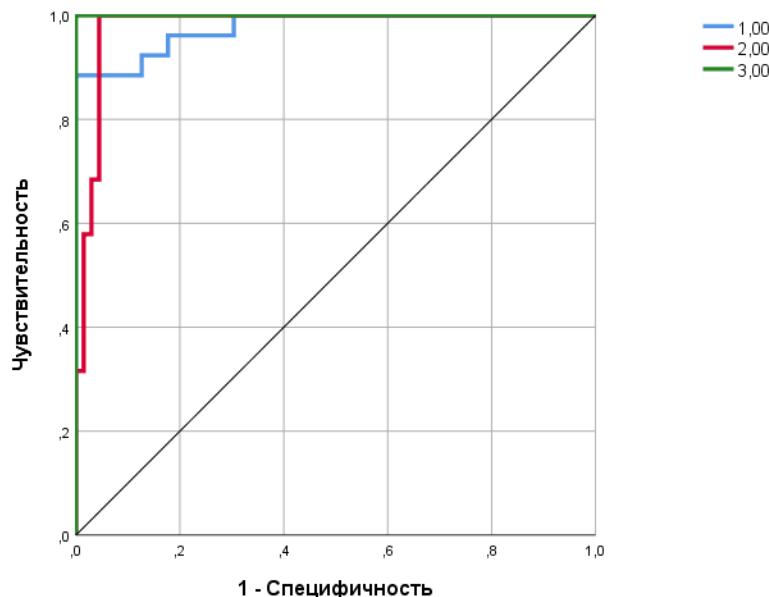


Рисунок 16 – Площадь под ROC-кривыми

Для повседневной клинической практики создана программа для ЭВМ, позволяющая рассчитать вероятность гипоксического повреждения головного мозга путем ввода параметров уровней цитокинов и НСЕ.

Наше исследование с использованием нейросети отлично от других (Абдурагимова Н.Х. и др., 2023; Raurale S.A. et. al., 2020; Liu L. et. al., 2011) комплексным подходом: использованием ранних факторов риска гипоксического поражения ЦНС (осложнения беременности) и патогенетически обусловленных маркеров.

Для создания технологии ранней диагностики поражений ЦНС в 1 год проанализировали значимые факторы риска (табл. 2)

Таблица 2 – Роль факторов риска как маркеров развития структурных изменений головного мозга у детей в возрасте 1 года

Факторы риска	EER	CER	OR	95% CI OR	S	Se	Sp	ROC-AUC	95% CI AUC
TGF - $\beta 1 \geq 22,74$ пг/мл	4,0	0,5	8,0	1,83-34,98	0,75	0,8	0,67	0,73	0,57-0,89
AntiGRIN2A $> 3,47$ нг/мл	2,0	0,3	6,57	1,67-25,78	0,7	0,67	0,77	0,75	0,6-0,9
Наличие неврологического диагноза	1,0	0,25	4,0	1,11-14,74	0,65	0,6	0,8	0,7	0,53-0,87
Мышечный тонус ≤ 2 баллов	2,0	0,43	4,67	1,24-17,6	0,68	0,67	0,7	0,67	0,5-0,84
Сенсорные реакции ≤ 2 баллов	0,87	0,2	4,37	1,08-17,68	0,71	0,47	0,83	0,65	0,47-0,82
Черепные нервы ≤ 2 баллов	0,36	0,03	10,5	1,06-105,0	1,17	0,27	0,97	0,62	0,43-0,8
Сумма баллов по шкале Журба	2,0	0,5	4,0	1,07-14,9	0,67	0,67	0,67	0,68	0,51-0,85

* Примечание: EER – шанс найти фактор риска у детей со структурными изменениями головного мозга у детей в 1 год; CER – шанс найти фактор риска в группе контроля; OR – отношение шансов; 95% CI – 95% доверительный интервал; S – стандартная ошибка отношения шансов; Se – чувствительность; Sp – специфичность; ROC-AUC – площадь под ROC-кривой.

Для создания модели ранней диагностики использовалась бинарная логистическая регрессия (табл. 3).

Таблица 3 – Значимость показателей в структуре модели ранней диагностики структурных изменений головного мозга у детей в возрасте 1 года жизни, $df = 1$

Модель	B	Среднеквадратичная ошибка	Вальд	Значимость	Exp(B)	95% ДИ для Exp(B)
Константа	2,225	3,033	0,538	0,463	9,252	
TGF - $\beta 1$	0,118	0,045	6,877	0,009	1,125	1,03-1,228
AntiGRIN2A	0,453	0,181	6,251	0,012	1,574	1,103-2,245
Сумма – Журба	-0,277	0,122	5,19	0,023	0,758	0,597-0,962

В результате округления коэффициентов получено уравнение вида:

$DS = \frac{1}{1+e^{0,28 \times СЖ - 0,12 \times TGFB - 0,45 \times AntiGRIN - 2,22}}$, где 2,22 – константа (регрессионный коэффициент b_0); 0,28, 0,12 и 0,45 – нестандартизированные коэффициенты b ; СЖ – сумма баллов по шкале Журба; TGFB – уровень TGF - $\beta 1$ в крови (пг/мл); AntiGRIN – уровень AntiGRIN2A в крови (нг/мл); e - основание натурального логарифма ($e \sim 2,72$). При значении коэффициента DS 0,42 и более – высокая вероятность наличия структурных изменений головного мозга у детей.

Чувствительность и специфичность модели – 0,8. Площадь под ROC-кривой – 0,86 (95% ДИ 0,75-0,98), $p < 0,001$. Стандартная ошибка 0,06 (рис. 17).

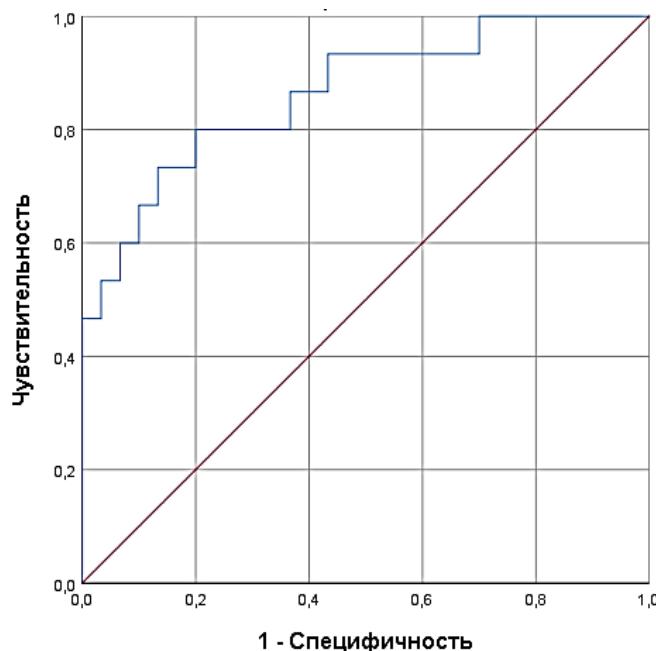


Рисунок 17 – Площадь под ROC-кривой

Точность модели 80,0%. Вероятность ранней диагностики при коэффициенте DS 0,42 и более превышает таковую в группе контроля в 16 раз ($OR=16,0$ [95% CI 3,4-75,35], $p < 0,001$), ($V=0,58$, $p < 0,001$).

Процедура многослойного перцептрона имела 2 скрытых слоя и входные нейроны: TGFB1 и AntiGRIN2A, сумма баллов по шкале Журба (рис. 18). Выходной слой – 2 зависимые переменные (наличие или отсутствие структурных изменений головного мозга).

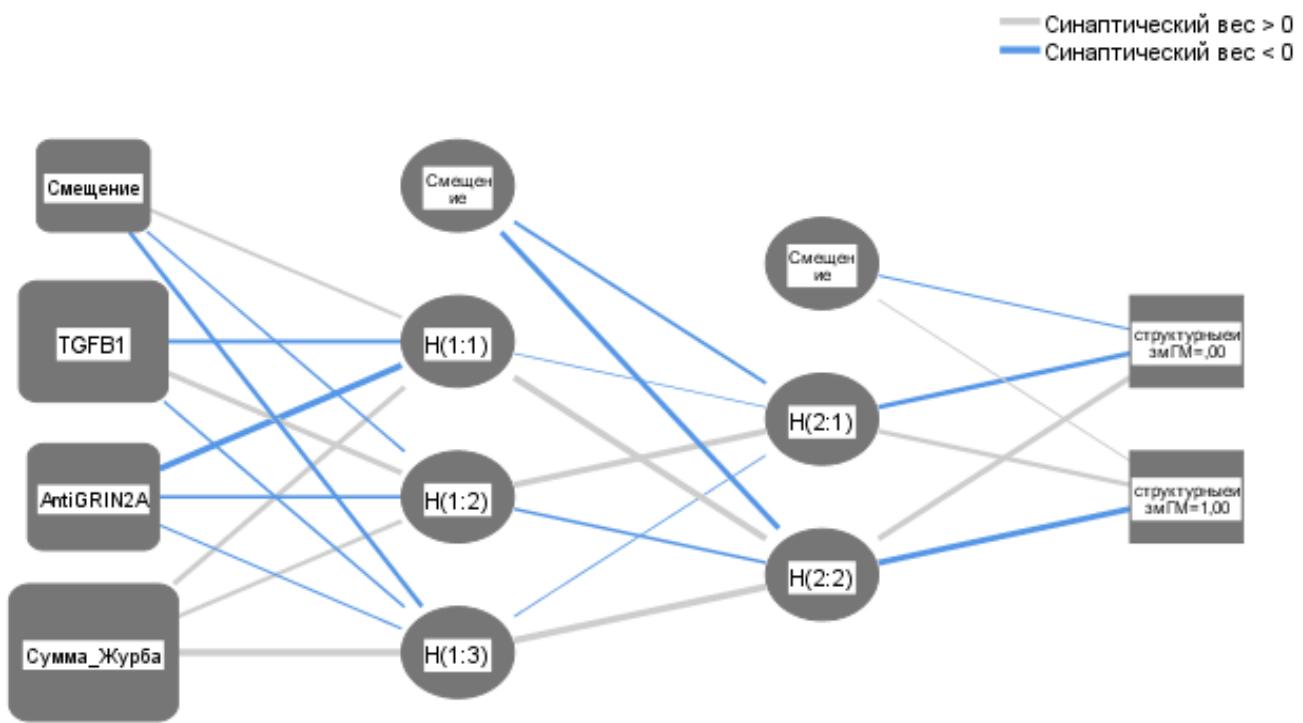


Рисунок 18 – Структура многослойного персептрона для ранней диагностики структурных изменений головного мозга у детей в возрасте 1 года жизни

Диагностическая точность - 86,7% (чувствительность – 86,5%, специфичность – 86,5%; площадь под кривой (ROC-AUC) = 0,94 (95% CI = 0,91–0,98; $p < 0,001$) (рис.19).

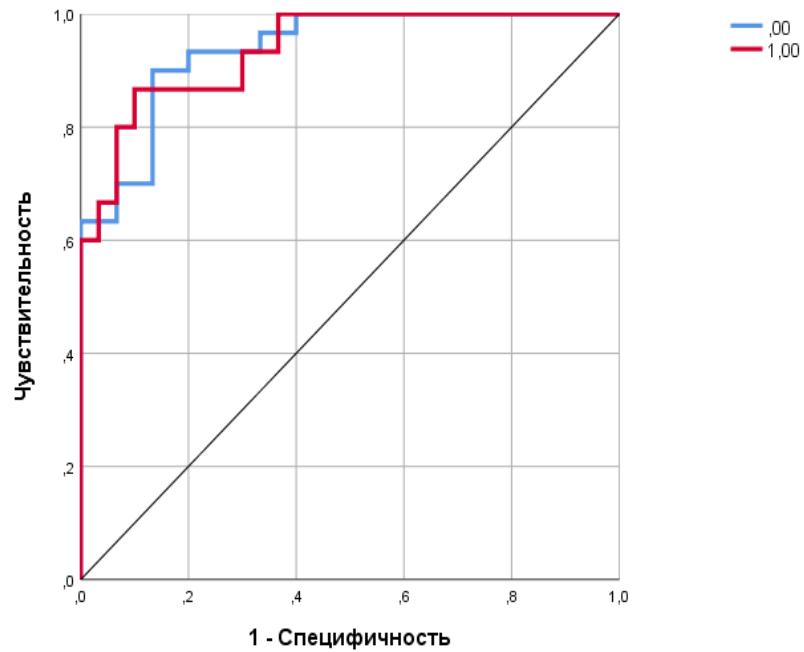


Рисунок 19 – ROC-анализ вероятности диагностики структурных изменений головного мозга у детей в возрасте 1 года жизни

Таким образом, представленные технологии обладают достаточно высокой эффективностью для ранней диагностики поражений ЦНС у детей на первом году жизни. Разработана схема механизмов формирования неврологической патологии у детей на первом году жизни (рис. 20)

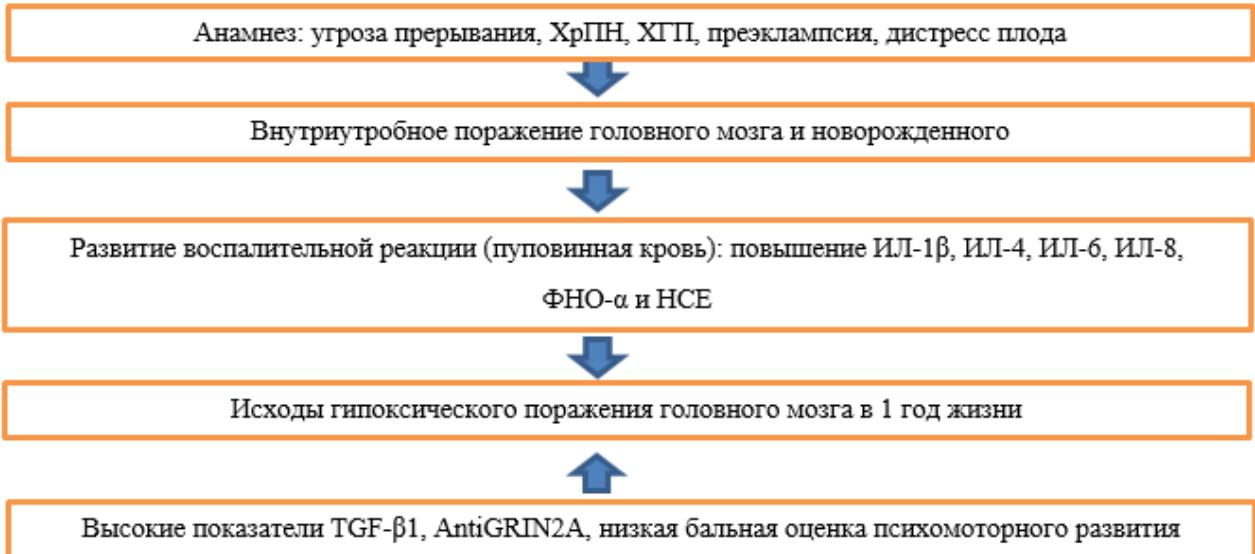


Рисунок 20 – Механизмы формирования неврологической патологии у доношенных детей на первом году жизни из групп высокого риска

ВЫВОДЫ

1. У детей с хронической внутриутробной гипоксией и умеренной асфиксии при рождении повышено содержание ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 в пуповинной крови. Чем ниже оценка по шкале Апгар в конце первой минуты, тем выше уровень ИЛ-1 β и ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-8 и НСЕ. Чем ниже оценка по шкале Апгар в конце 5 минуты, тем выше уровень ФНО- α , ИЛ-8, ИЛ-4 и ИЛ-6 и НСЕ.
2. Вероятность выявления гомозиготного генотипа ТТ ИЛ-1 β в точке С-511Т у детей, рожденных в умеренной асфексии на фоне хронической внутриутробной гипоксии, в 4 раза выше, у младенцев, рожденных вне асфексии, но с ХГП в анамнезе в 3 раза выше, чем у детей без гипоксических событий. Вероятность выявления гетерозиготного генотипа СТ гена ИЛ-4 в точке С589Т в 5 раз выше у детей, испытавших только хроническую внутриутробную гипоксию, чем у новорожденных без гипоксического анамнеза.
3. Синдром угнетения (мышечная гипотония, снижение рефлексов спинального автоматизма, сниженная двигательная активность) и синдром гипервозбудимости, сохраняющийся в динамике к концу 7-х суток жизни, являются особенностями неврологического статуса в группе детей, которые родились в асфексии на фоне ХГП. Синдром угнетения в форме снижения рефлексов спинального автоматизма является особенностью для детей с хронической внутриутробной гипоксией в анамнезе, которые родились вне состояния асфексии, до конца 1-х суток жизни. Снижение мышечного тонуса сохраняется к одному году жизни. Отставание в психомоторном развитии (по шкале Л.Т. Журба и Е.М. Мастюкова) как на 1-е, так и на 7-е сутки жизни характерно для детей с гипоксическим анамнезом в анте- и интранатальном периодах, которое сохраняется у существенной части к одному году жизни.
4. У детей с патологическими изменениями головного мозга по данным НСГ и КТ в сыворотке крови повышенены уровни TGF - β 1 и AntiGRIN2A.
5. Использование базы данных нейросети, с входящими параметрами угрозы прерывания беременности, ХрPIN, ХГП, преэклампсии, дистресса плода и концентраций ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и НСЕ в сыворотке пуповинной крови позволяет с вероятностью 96,2% диагностировать гипоксическое поражение головного мозга у доношенных новорожденных. В раннем возрасте вероятность диагностики гипоксического поражения головного мозга с использованием параметров суммы баллов по шкале Журба, уровня TGFB-1 и AntiGRIN2A при

значении коэффициента DS равном 0,42 в 16 раз выше (OR=16,0 [95% CI 3,4-75,35], p<0,001). Использование базы данных нейросети, включающих вышеперечисленные параметры, позволит с вероятностью 90% диагностировать развитие поражений головного мозга у доношенных детей в раннем возрасте.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанную программу для ЭВМ, основанную на определении содержания цитокинов в пуповинной крови у доношенных новорожденных детей с гипоксическим анамнезом, можно использовать для оперативного выявления групп риска развития гипоксического поражения головного мозга.
2. Для диагностики поражений ЦНС у доношенных новорожденных можно рекомендовать использовать базу данных нейросети, включающих параметры материнских факторов риска (ХрПН, ХГП, преэклампсия, угроза прерывания) и уровней в пуповинной крови ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и НСЕ.
3. Для диагностики поражения головного мозга у детей раннего возраста целесообразно определять в сыворотке крови уровни маркеров TGF - β 1 и AntiGRIN2A с учетом данных суммарной оценки психомоторного развития по шкале Журба Т.Л. и соавт. Для более точной и быстрой диагностики можно рекомендовать использовать базу данных нейросети, включающих вышеперечисленные параметры.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации научных результатов диссертации

1. **Панова, М. С.** Роль цитокинов и их генетического полиморфизма в развитии гипоксически ишемической энцефалопатии у доношенных новорожденных детей / М. С. Панова, А. С. Панченко. – DOI 10.17816/PED8699-104 // **Педиатр.** – 2017. – Т. 5, вып. 6. – С. 99–104.
2. Панченко, А. С. Факторы риска гипоксически-ишемической энцефалопатии у доношенных новорожденных детей / А. С. Панченко, **М. С. Панова** // **Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание.** – 2018. – № 1. – С. 84–89. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2017-god/faktory-riska-gipoksicheskoi-ishemiceskoi-jencefalopatii-u-donoshennyh-novorozhdennyh-detej> (дата обращения: 21.01.2022).
3. Панченко, А. С. Содержание провоспалительных цитокинов в пуповинной крови у доношенных новорожденных детей с гипоксическими событиями / А. С. Панченко, **М. С. Панова** // **Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание.** – 2019. – № 4. – С. 84–89. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2019-god/soderzhanie-provospalitelnyh-citokinov-v-pupovinnoj-krovi-u-donoshennyh-novorozhdennyh-detej-s-gipoksicheskimi-sobytiyami> (дата обращения: 21.01.2022).
4. Панченко, А. С. Биохимические маркеры гипоксического поражения головного мозга у доношенных новорожденных / А. С. Панченко, **М. С. Панова**. – DOI 10.31550/1727-2378-2020-19-3-12-16 // **Доктор.Ру.** – 2020. – № 3. – С. 12–16.
5. **Панова, М. С.** Частота полиморфизма генов цитокинов у доношенных новорожденных детей с гипоксическими событиями / М. С. Панова, А. С. Панченко, Б. С. Пушкирев. – DOI 10.29413/ABS.2020-5.4.3 // **Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal).** – 2020. – № 5 (4). – С. 21–27.
6. **Панова, М. С.** Маркеры повреждения центральной нервной системы у детей. Современное состояние проблемы / М. С. Панова, А. С. Панченко. – DOI 10.17816/PED11393-99 // **Педиатр.** – 2020. – Т. 11, № 3. – С. 93–99.
7. **Панова, М. С.** Концентрация цитокинов как ранний маркер гипоксического повреждения головного мозга у доношенных новорожденных / М. С. Панова, А. С. Панченко, А. М. Зиганшин, В. А. Мудров // **Лечение и профилактика.** – 2021. – Т. 11, № 1. – С. 20–25.

8. **Панова, М. С.** Возможности ранней диагностики гипоксического повреждения головного мозга у доношенных новорожденных / М. С. Панова, А. С. Панченко, В. А. Мудров, А. М. Зиганшин. – DOI 10.20333/25000136-2022-1-51-58 // **Сибирское медицинское обозрение**. – 2022. – №1. – С. 51–58.
9. **Панова, М. С.** Лабораторная диагностика нейроповреждения у детей первого года жизни / М. С. Панова, А. С. Панченко, А. М. Зиганшин, В. А. Мудров // **Лечение и профилактика**. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 13–20.
10. **Панова, М. С.** Нейроспецифические маркеры поражения головного мозга у детей раннего возраста / М.С. Панова, А.С. Панченко, А.М. Зиганшин, В.А. Мудров. – DOI 10.21508/1027-4065-2022-67-5-55-61 // **Российский вестник перинатологии и педиатрии**. – 2022. Т. 67, №5. – С. 55-61.
11. **Панова, М. С.** Предикторы поражения центральной нервной системы у новорожденных детей с асфиксиею / М.С. Панова, А.С. Панченко, В.А. Мудров. – DOI – 10.14300/mnnc.2022.1709 // **Медицинский вестник Северного Кавказа**. – 2022. Т. 17, №4. – С. 389-3933.
12. Программа для определения риска развития гипоксического поражения головного мозга у доношенных новорожденных: **М. С. Панова**, А. С. Панченко, В. А. Мудров. **Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020667207.**

Публикации в журналах, сборниках, материалах конференций

1. **Панова, М. С.** Клинические особенности течения гипоксически-ишемической энцефалопатии у доношенных новорожденных детей / М. С. Панова, А. С. Панченко // Рецензируемый сборник научных трудов. – 2018. – Часть 1. – С. 85–89.
2. **Панова, М. С.** Parameters pro-and anti-inflammatory cytokines in mature newborns with hypoxic events / М. С. Панова // Медицина завтрашнего дня: материалы XVIII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 23-26 апреля 2019 г., г. Чита / ответственный за выпуск Д. М. Серкин. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2019. – С. 389. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.
3. **Панова, М. С.** Особенности неврологического статуса у доношенных новорожденных детей с гипоксическими событиями / М. С. Панова, А. С. Панченко // Медицина: теория и практика. – 2019. – Т. 4, спецвыпуск. – С. 416. – (Сборник трудов третьего национального конгресса с международным участием здоровые дети - будущее страны).
4. **Панова, М. С.** Особенности содержания провоспалительных цитокинов в пуповинной крови у доношенных новорожденных детей с гипоксическим событиями / М. С. Панова, А. С. Панченко // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск. – 2019. – № 2. – С. 35–37.
5. **Панова, М. С.** Содержание нейронспецифической енолазы у детей, рожденных в асфиксии / М.С. Панова, А.С. Панченко // Интеграция и дифференциация науки и практики в контексте приоритетных парадигм развития цивилизации: сборник научных статей по итогам национальной научно-практической конференции, 23-24 октября 2020 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург : Изд-во СПбГЭУ, 2020. – С. 91–93. – ISBN 978-5-7310-5103-3.
6. **Панова, М. С.** Особенности неврологического статуса у доношенных детей, рожденных в тяжелой асфиксии / М. С. Панова, А. С. Панченко // Children's Medicine of the North-West. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 275.
7. **Панова, М. С.** Неврологический статус у новорожденных после терапевтической гипотермии / М. С. Панова, А. С. Панченко // Children's Medicine of the North-West. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 276.
8. **Панова, М. С.** Последствия перинатальных гипоксических поражений головного мозга у доношенных новорожденных на первом году жизни / М. С. Панова, А. С. Панченко // Забайкальский медицинский журнал. – 2021. – № 2. – С. 40–43.

Список сокращений и условных обозначений

ИЛ – интерлейкин
КТ – компьютерная томография
НПР – нервно-психическое развитие
НСГ – нейросонография
НСЕ – нейронспецифическая енолаза
ФНО – фактор некроза опухолей
ХГП – хроническая гипоксия плода
ХрПН – хроническая плацентарная недостаточность
ЦИ – церебральная ишемия
ЦНС – центральная нервная система
ЭВМ – электронно-вычислительная машина
ЭЭГ – электроэнцефалография
AntiGRIN2A – антитела к белку NR2
BDNF – нейротрофический фактор роста
CCL2 – макроцитарный хемотаксический протеин
CX3CL1 – фракталкин
NGF – фактор роста нервов
RAGE – рецептор конечных продуктов гликовилирования
TGF – трансформирующий ростовой фактор
TREM-1,-2 – триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-1,-2
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
VILIP-1 – визиноподобный белок – 1