



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΝΕΥΡΩΝΙΚΗΣ  
ΕΝΟΛΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΠΡΟΩΡΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ ΜΕ  
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΒΛΑΒΗ»**

**MEASUREMENT OF NEURON SPECIFIC ENOLASE LEVELS IN  
THE SERUM OF PREMATURE NEONATES WITH BRAIN  
INJURY**

**Λούμα Μαρία Ιωάννα**

Φοιτήτρια Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Λάρισα, 2023**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	Υπογραφή
<p><b>Μεταλλινού Δήμητρα (Επιβλέπουσα)</b>  Επίκουρη Καθηγήτρια  Τμήμα Μαιευτικής  Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής</p>	
<p><b>Ψαρρά Άννα-Μαρία (Συνεπιβλέπουσα)</b>  Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  Τμήμα Βιοχημείας &amp; Βιοτεχνολογίας  Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</p>	
<p><b>Σκαμνάκη Βασιλική (Μέλος)</b>  Επίκουρη Καθηγήτρια  Τμήμα Βιοχημείας &amp; Βιοτεχνολογίας  Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</p>	

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να αποδώσω τις ευχαριστίες μου ως προς τα άτομα που συνέβαλλαν στην αποτελεσματική διεξαγωγή της.

Εκ πρώτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή για την καθοδήγηση της προσπάθειάς μου καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Μεταλλινού Δήμητρα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Μαιευτικής και Επιβλέπουσα της εργασίας μου, για την εμπιστοσύνη, τη στήριξη και την αμέριστη προσοχή της σε καθένα από τα βήματα διεξαγωγής της εργασίας. Ακόμη ευχαριστώ την κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και συνεπιβλέπουσα της εργασίας μου όπως επίσης και την κα. Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας & Μεταβολισμού του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και μέλος της επιτροπής, για τις συμβουλές και την καθοδήγησή τους σε όλο το χρονικό διάστημα της διπλωματικής μου εργασίας.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b> .....	5
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	6
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10

### **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>1. Εισαγωγή στην έννοια της προωρότητας</b> .....	13
<b>2. Εγκεφαλική βλάβη στα πρόωρα νεογνά</b> .....	16
2.1 Περικοιλιακή Λευκομαλακία.....	16
2.2 Εγκεφαλική Αιμορραγία.....	18
<b>3. Πρόωρα νεογνά και Βιοχημικοί Δείκτες Εγκεφαλικής Βλάβης</b> .....	19
3.1 Ειδική Νευρωνική Ενολάση.....	19
3.2 Λοιποί Βιοχημικοί Δείκτες.....	23

### **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>4. Σκοπός Μελέτης</b> .....	28
<b>5. Υλικό και Μέθοδος</b> .....	28
5.1 Σχεδιασμός Μελέτης.....	28
5.2 Υλικό – Μέθοδος.....	30
5.3 Πίνακες Υλικού.....	32
5.4. Στατιστική Ανάλυση.....	38

<b>6. Αποτελέσματα</b> .....	39
<b>7. Συζήτηση – Συμπεράσματα – Προοπτικές</b> .....	42
7.1. Συζήτηση.....	42
7.2 Συμπεράσματα.....	45
7.3 Προοπτικές.....	45

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Activin-A	Ακτιβίνη-A
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor Εγκεφαλικός Νευροτροφικός Παράγοντας
MBP	Myelin Basic Protein Βασική Πρωτεΐνη της Μυελίνης
miRNA	microRNA Μικρό RNA
NSE	Neuron Specific Enolase Ειδική Νευρωνική Ενολάση
PVL	Periventricular Leukomalacia grades Βαθμοί Περικολιακής Λευκομαλακίας
UCH-L1	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 Καρβοξυτελική Υδρολάση-L1 της Ουβικουΐτινης
ΒΔ	Βιοχημικοί δείκτες
ΕΑ	Εγκεφαλική Αιμορραγία
ΕΒ	Εγκεφαλική Βλάβη
ΗΖ	Ημερών Ζωής
ΗΚ	Ηλικία Κύησης
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
MENN	Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών
ΠΛ	Περικολιακή Λευκομαλακία ή Περικολιακή Λευκομαλάκυνση ή Περικολιακή Λευκοεγκεφαλοπάθεια

ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΥΙΕ	Υποξική Ισχαιμική Εγκεφαλοπάθεια
ΦΝ	Φυσιολογικά νεογνά

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ως πρόωρο νεογνό ορίζεται εκείνο που γεννιέται πριν την συμπλήρωση της 37ης εβδομάδας της κύησης. Λόγω της ανωριμότητας των οργάνων των συστημάτων τους, τα πρόωρα νεογνά εντάσσονται στις ομάδες υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη εγκεφαλικής βλάβης.

Ως ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των πρόωρων νεογνών εμφανίζεται η αδυναμία αυτορρύθμισης την αιμάτωσης του εγκεφάλου, ειδικά αυτών με ηλικία κύησης <34 εβδομάδων. Ο συνδυασμός αυτού του χαρακτηριστικού με άλλους παράγοντες που αφορούν την ευθραυστότητα και την ελαττωμένη πυκνότητα των αγγείων καθιστά τα νεογνά αυτά ευάλωτα ως προς τη δημιουργία κάποιας μορφής εγκεφαλικής βλάβης.

**Ο όρος εγκεφαλική βλάβη** χρησιμοποιείται για να περιγράψει οποιαδήποτε μορφή καταστροφής τμήματος του εγκεφάλου. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για εγκεφαλικά κύτταρα ή εγκεφαλικό ιστό που έχει υποστεί βλάβη ή φθορά. Η εγκεφαλική βλάβη μπορεί να εντοπίζεται σε κάποιο τμήμα του εγκεφάλου ή να παρατηρείται διάχυτη σε όλο τον εγκέφαλο. Επιπρόσθετα, μπορεί να αφορά άμεσα, είτε τους νευρώνες είτε τα κύτταρα της νευρογλοίας.

Η αιτία της εγκεφαλικής βλάβης κατά την πρόωρη νεογνική ηλικία μπορεί να σχετίζεται είτε με γενετικά αίτια ή με ανατομικές ανωμαλίες, αλλά συνήθως είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης διάφορων περιγεννητικών παραγόντων, όπως είναι οι συγγενείς λοιμώξεις, η χοριοαμνιονίτιδα, η περιγεννητική ασφυξία και η σοβαρή υπόταση. Οι συχνότερες μορφές εγκεφαλικής βλάβης σε νεογνά <34 εβδομάδων είναι η εγκεφαλική αιμορραγία και η περικοιλιακή λευκομαλακία και σε μικρότερη συχνότητα η υποξική-ισχαιμική

εγκεφαλοπάθεια και τα αιμορραγικά έμφρακτα.

Μέσα στα πρώτα τρία 24ωρα της ζωής ενός νεογνού η πιθανότητα ανάπτυξης εγκεφαλικής αιμορραγίας είναι αυξημένη, ενώ σε περίπτωση ασυμπτωματικού νεογνού μπορεί να διαγνωσθεί ύστερα από την 1<sup>η</sup> εβδομάδα ζωής στα πλαίσια του προληπτικού ελέγχου (screening). Η επιπλοκή μιας σοβαρής εγκεφαλικής αιμορραγίας μπορεί να είναι ο μεθαιμορραγικός υδροκέφαλος. Όσον αφορά την περικολιακή λευκομαλακία, πρόκειται για μια μη αιμορραγικής μορφής βλάβη, δηλαδή τη νέκρωση της περικολιακής λευκής ουσίας. Η σοβαρού βαθμού περικολιακή λευκομαλακία χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία πολλαπλών κύστεων στον εγκέφαλο του νεογνού, γεγονός που συνδέεται με δυσμενείς επιπτώσεις στη μετέπειτα ζωή του νεογνού. Προκειμένου να γίνει η πρόγνωση και η διάγνωση της εγκεφαλικής βλάβης απαραίτητο είναι να γίνει συνδυασμός περιγεννητικών παραγόντων με κλινικά, εργαστηριακά και ακτινολογικά ευρήματα. Όσον αφορά τις επιπτώσεις των εγκεφαλικών βλαβών στα πρόωρα νεογνά, συνδέονται ως επί το πλείστον με νευροαναπτυξιακές διαταραχές. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να είναι διανοητικές, επικοινωνιακές, μαθησιακές και κινητικές, ενώ σε περίπτωση σοβαρής εγκεφαλικής βλάβης η εγκεφαλική παράλυση και ο νεογνικός/βρεφικός θάνατος αποτελούν δυσμενείς εκβάσεις. Για όλους λοιπόν αυτούς τους λόγους, κρίνεται επιτακτική ανάγκη της πρώιμης ανίχνευσης πρόωρων νεογνών υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη εγκεφαλικής βλάβης.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον που έχουν συγκεντρώσει οι **βιοχημικοί δείκτες** (ή βιοδείκτες) λόγω του ότι φαίνεται πως παρέχουν αρκετά χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη διάγνωση και την πρόγνωση των εγκεφαλικών βλαβών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Ως εγκεφαλική βλάβη (ΕΒ) ορίζεται η βλάβη που αφορά οποιαδήποτε περιοχή του εγκεφάλου και μπορεί να παρουσιαστεί σε ένα άτομο ανεξαρτήτως ηλικίας. Η εμφάνιση της σε πρόωρα νεογνά φαίνεται να έχει αρκετά δυσμενή αποτελέσματα θέτοντας έτσι τα νεογνά σε τεράστιο κίνδυνο για την ομαλή ανάπτυξη τους. Απαραίτητη κρίνεται η έγκαιρη ανίχνευση πρόωρων νεογνών με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΕΒ, η οποία προς το παρόν δεν είναι εφικτή. Έτσι, κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση βιοχημικών δεικτών (ΒΔ) που εξετάζονται ως προς την προγνωστική αξία τους.

**Σκοπός:** Η διερεύνηση των επιπέδων της ειδικής νευρονικής ενολάσης (NSE), κατά τις τρεις πρώτες ημέρες ζωής, στον ορό πρόωρων νεογνών (<34 εβδομάδες) με ΕΒ και συγκεκριμένα περικοιλιακή λευκομαλακία ή εγκεφαλική αιμορραγία, διαφόρου βαθμού, σε σχέση με φυσιολογικά νεογνά (ΦΝ) της ίδιας ΗΚ.

**Υλικό – Μέθοδος:** Πρόκειται για μελέτη ασθενών-μαρτύρων, με προοπτικό διαχρονικό σχεδιασμό, όπου έλαβαν συμμετοχή 96 πρόωρα νεογνά με συγκεκριμένα κριτήρια ένταξης. Τα νεογνά αυτά στρατολογήθηκαν από μια Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών (MENN) Ιδιωτικής Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής των Αθηνών. Η ομάδα των ασθενών δημιουργήθηκε έπειτα από ανίχνευση υπερηχογραφικών ευρημάτων ως και την έξοδό τους από τη MENN. Βρέθηκε ότι 29/96 νεογνά είχαν αναπτύξει ΕΒ τα οποία μετέπειτα αντιστοιχήθηκαν με υγιή νεογνά που είχαν φυσιολογικά απεικονιστικά ευρήματα εγκεφάλου (ομάδα μαρτύρων). Για τις μετρήσεις των



επιπέδων της NSE έγινε χρήση του περισευούμενου ορού των νεογνών, που προήλθε από αρτηριακό ή φλεβικό αίμα, ύστερα από λήψη προγραμματισμένων εργαστηριακών εξετάσεων. Η λήψη του πρώτου δείγματος πραγματοποιήθηκε κατά την εισαγωγή των νεογνών στη MENN και τα υπόλοιπα δείγματα την 2η και 3η ημέρα ζωής. Όσον αφορά τους περιγεννητικούς παράγοντες, έγινε συλλογή αρκετών στοιχείων από το μαιευτικό και νεογνικό ιστορικό. Για τη μέτρηση των επιπέδων της NSE χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του πρόγραμματος IBM SPSS statistics version 23.

**Αποτελέσματα:** Σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων εισαγωγής και της 3ης ημέρας ζωής στην ομάδα μαρτύρων, με τα νεογνά να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα NSE την 1η ημέρα ζωής. Τα επίπεδα βρέθηκε να παρουσιάζουν πτωτική τάση κατά τις επόμενες ημέρες. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην ομάδα ασθενών κατά τις τρεις πρώτες ημέρες ζωής με την NSE να παρουσιάζει σχετικά σταθερά επίπεδα. Η ανάλυση μεταξύ των δύο ομάδων έδειξε ότι η NSE ορού δεν διέφερε σημαντικά κατά τις τρεις πρώτες ημέρες της ζωής. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε ότι τα νεογνά με εγκεφαλική αιμορραγία είχαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση NSE στον ορό τόσο σε σχέση με τους μάρτυρες όσο και σε σχέση με τα νεογνά με περικοιλιακή λευκομαλακία, την 3η ημέρα ζωής ( $p=0,014$  και  $p=0,033$  αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, η NSE ορού την 1η και την 3η ημέρα ζωής ήταν οι καλύτεροι προγνωστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη εγκεφαλικής αιμορραγίας II-IV βαθμού. Τέλος η καμπύλη ROC για την NSE ορού την 3η ημέρα ζωής έδωσε υψηλή προγνωστική αξία με περιοχή κάτω από την καμπύλη στο 91,3% ( $p=0,001$ , 95%CI: 83,4% - 99,2%). Σύμφωνα με την ανάλυση της καμπύλης ROC για τιμή αποκοπής (cut-off value) 5,43 ng/ml, η ευαισθησία ήταν 100% και η ειδικότητα 87%.

**Συμπεράσματα:** Η NSE στον ορό πρόωρων νεογνών δεν διαφέρει σημαντικά κατά τις τρεις πρώτες ημέρες της ζωής μεταξύ των φυσιολογικών νεογνών και των νεογνών με εγκεφαλική βλάβη. Όμως, η NSE στον ορό κατά την 1η και 3η ημέρα ζωής μπορεί να διακρίνει αποτελεσματικά τα πρόωρα νεογνά τα οποία θα αναπτύξουν μετέπειτα εγκεφαλική αιμορραγία II- IV βαθμού.

## ABSTRACT

**Introduction:** As brain injury is defined a lesion affecting any part of the brain and can occur in a person regardless of age. its occurrence in premature neonates appears to have several adverse effects thus placing them at high risk for a normal development. Early detection of premature neonates at increased risk to develop brain injury is essential but currently not possible. It is therefore crucial to investigate biochemical markers for their prognostic value.

**Aim:** To investigate the levels of neuron specific enolase (NSE), during the first three days of life, in the serum of premature neonates (<34 weeks) with brain injury and specifically periventricular leukomalacia or intraventricular haemorrhage, of varying degrees, compared to normal neonates of the same gestational age.

**Material - Methods:** This was a prospective longitudinal case-control study, involving 96 premature neonates with specific inclusion criteria. These neonates were recruited from a Neonatal Intensive Care Unit (NICU) of a private Obstetrics and Gynaecology Clinic in Athens. The case group was created after detection of ultrasound findings up to discharge from the NICU. It was found that 29/96 neonates had developed brain injury which were subsequently matched with healthy neonates who had normal brain imaging findings (control group). For the measurements of NSE levels, excess serum of the neonates, derived from arterial or venous blood, was used after obtaining scheduled laboratory tests. The first sample was taken at the time of admission of the neonates to the NICU and the remaining samples were taken on day 2 and day 3 of life. Regarding perinatal factors, several data

were collected from obstetric and neonatal history. The ELISA method was used to measure the levels of NSE. Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistics version 23 program.

**Results:** Significant difference was observed between the NSE levels at admission and 3rd day of life in the control group, with neonates showing higher NSE levels on day 1 of life. Levels were found to show a downward trend in the following days. No differences were observed in the case group during the first 3 days of life with NSE showing relatively stable levels. Analysis between the two groups showed that serum NSE did not differ significantly during the first three days of life. Further analysis revealed that neonates with intraventricular haemorrhage had a significantly higher serum NSE concentration both compared to controls and to neonates with periventricular leukomalacia on day 3 of life ( $p=0.014$  and  $p=0.033$  respectively). In addition, serum NSE on day 1 and day 3 of life were the best predictors for the development of grade II-IV intraventricular hemorrhage. Finally, the ROC curve for serum NSE on day 3 of life gave a high predictive value with an area under the curve at 91.3% ( $p=0.001$ , 95%CI: 83.4%-99.2%). According to the ROC curve analysis for a cut-off value of 5.43 ng/ml, the sensitivity was 100% and specificity 87%.

**Conclusions:** Serum NSE in premature neonates does not differ significantly during the first three days of life between normal neonates and neonates with brain injury. However, serum NSE at day 1 and day 3 of life can effectively discriminate premature neonates who will subsequently develop grade II-IV intraventricular hemorrhage.

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Εισαγωγή στην έννοια της προωρότητας

Ως πρόωρος τοκετός ορίζεται εκείνος που επέρχεται πριν από την ολοκλήρωση της 37ης εβδομάδας της κύησης ή σε λιγότερο από 259 ημέρες από την πρώτη ημέρα της τελευταίας εμμήνου ρύσεως της γυναίκας. Τα πρόωρα νεογνά παρουσιάζουν πολλαπλά προβλήματα που οφείλονται κυρίως στην ανατομική και λειτουργική ανωριμότητα των διαφόρων οργάνων-συστημάτων του οργανισμού τους. Τα προβλήματα αυτά αναφέρονται συνοπτικά κατά συστήματα στον παρακάτω πίνακα<sup>1,2</sup>.

Πίνακας 1.1: Συνήθη προβλήματα πρόωρων νεογνών.

<b>Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και Αισθητήρια</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• εγκεφαλική αιμορραγία</li><li>• περικοιλιακή λευκομαλακία</li><li>• υποξική-ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια</li><li>• πυρηνικός ίκτερος</li><li>• αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας</li><li>• υποτονία</li></ul>
<b>Καρδιαγγειακό Σύστημα</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• ανοικτός αρτηριακός πόρος</li><li>• υπόταση</li><li>• υπέρταση</li></ul>
<b>Αναπνευστικό Σύστημα</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας</li><li>• βρογχοπνευμονική δυσπλασία</li><li>• πνευμοθώρακας</li><li>• διάμεσο πνευμονικό εμφύσημα</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• συγγενής πνευμονία</li> <li>• πνευμονική αιμορραγία</li> <li>• άπνοιες</li> </ul>
<b>Γαστρεντερικά</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• μειωμένη κινητικότητα και λειτουργικότητα</li> <li>• νεκρωτική εντεροκολίτιδα</li> </ul>
<b>Μεταβολικά – Ενδοκρινικά</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• υπασβεστιαμία</li> <li>• υπεργλυκαιμία</li> <li>• υπογλυκαιμία</li> <li>• όψιμη μεταβολική οξέωση</li> <li>•</li> </ul>
<b>Διάφορα</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• περιγεννητική ασφυξία</li> <li>• προβλήματα σίτισης</li> <li>• λοιμώξεις (συγγενείς-περιγεννητικές νοσοκομειακές)</li> <li>• διαταραχές θερμορύθμισης</li> </ul>

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται επίσης η ταξινόμηση των πρόωρων νεογνών σύμφωνα με το βάρος γέννησής τους<sup>3</sup>.

**Πίνακας 1.2 :** Ταξινόμηση πρόωρων νεογνών σύμφωνα με το βάρος γέννησης.

<b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ</b>	<b>ΒΑΡΟΣ (gr)</b>
Χαμηλό βάρος γέννησης	<2500
Πολύ χαμηλό βάρος γέννησης	<1500
Εξαιρετικά χαμηλό βάρος γέννησης	<1000

Ακόμη, στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ταξινόμηση των πρόωρων νεογνών σύμφωνα με την ηλικία κύησης (ΗΚ)<sup>4</sup>.

**Πίνακας 1.3:** Ταξινόμηση πρόωρων νεογνών σύμφωνα με την ηλικία κύησης.

<b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ</b>	<b>ΗΛΙΚΙΑ ΚΥΗΣΗΣ (Εβδομάδες)</b>
Μετρίως ως όψιμα πρόωρα	32 ως <37

Πολύ πρόωρα	28 ως <32
Εξαιρετικά πρόωρα	<28

Ένας πρόωρος τοκετός μπορεί να είναι αποτέλεσμα διάφορων προδιαθεσιακών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να αφορούν τόσο τη μητέρα όσο και το έμβρυο. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι γνωστή η αιτία του πρόωρου τοκετού. Έως και σήμερα δεν έχουν βρεθεί μέθοδοι ασφαλούς πρόβλεψης του πρόωρου τοκετού κι έτσι δίνεται έμφαση στην προσπάθεια αναστολής του.

Γίνεται λοιπόν προφανές ότι τα πρόωρα νεογνά αποτελούν μια ομάδα υψηλού κινδύνου για εμφάνιση αναπτυξιακών βλαβών και δυσμενών επιπλοκών. Για το λόγο αυτό κρίνεται ζωτικής σημασίας η ευαισθητοποίηση του κοινωνικού συνόλου στο θέμα της προωρότητας αλλά και των λοιπών νοσηροτήτων που επιβάλλουν τη νοσηλεία ενός νεογνού στη Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας. Ακόμη είναι σημαντική η βελτίωση της ποιότητας και του όγκου των δεδομένων που αφορούν τον πρόωρο τοκετό και πιο συγκεκριμένα δεδομένων που σχετίζονται με την καταγραφή και αναφορά των ποσοστών και των αιτιών των πρόωρων γεννήσεων. Τέλος παρατηρείται επιτακτική ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθόδων για την πρόληψη και διαχείριση του πρόωρου τοκετού και των συνεπειών του, παγκοσμίως προκειμένου να μειωθούν τα ποσοστά νεογνικής θνησιμότητας και νοσηρότητας<sup>5</sup>.

Σε σχετική έρευνα του έτους 2016 παρατηρήθηκε ότι η κύρια αιτία θανάτου σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών ήταν οι επιπλοκές της πρόωρης γέννησης σε παγκόσμιο επίπεδο, σε ποσοστό που αντιπροσωπεύει περίπου το 16% όλων των θανάτων και το 35% των νεογνικών θανάτων. Αργότερα, υπολογίστηκε το ποσοστό των γεννηθέντων ζώντων πρόωρων νεογνών παγκοσμίως, το οποίο βρέθηκε αυξημένο κατά 0.8% σε σχέση με το 2000, με στοιχεία από 107 χώρες συνολικά. Άρα γίνεται αντιληπτό ότι, από το 2000 σημειώθηκε ραγδαία αύξηση των ποσοστών αυτών σε 26 χώρες και ταυτόχρονη μείωση σε 12 χώρες. Όσον αφορά την Ελλάδα, ανήκε στις χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά πρόωρων τοκετών με ζώντα νεογνά. Πιο συγκεκριμένα, εμφάνισε ποσοστό 11.4% με το υψηλότερο ποσοστό να παρατηρείται στο 12% στην Κύπρο<sup>6</sup>.

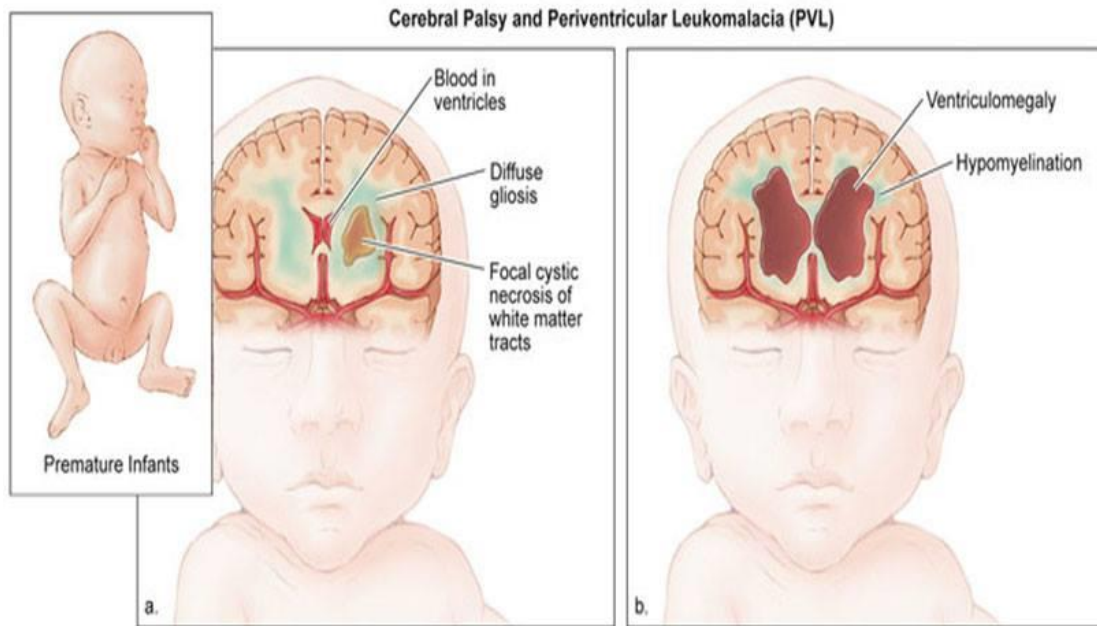
## **2. Εγκεφαλική βλάβη σε πρόωρα νεογνά**

### **2.1 Περικοιλιακή Λευκομαλακία**

Περικοιλιακή λευκομαλακία ή περικοιλιακή λευκομαλάκυνση ή περικοιλιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια (ΠΛ), ονομάζεται η μορφή της βλάβης που αφορά τη λευκή ουσία του εγκεφάλου, η οποία κατανέμεται ραχιαία και πλάγια των εξωτερικών γωνιών των πλάγιων κοιλιών. Η βλάβη αυτή σχετίζεται με καθυστερημένη ή μόνιμη βλάβη της μυελίνωσης, που μπορεί να οφείλεται στην εκτεταμένη νέκρωση της μικρογλοίας αλλά και στη δυσλειτουργία των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων. Μπορεί να είναι νέκρωση με παρουσία ή μη κύστεων (κυστική ΠΛ και μη κυστική ΠΛ).

Γίνεται διάκριση της βλάβης αυτής σύμφωνα με τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της σε δυο μορφές: στην εστιακή και στη διάχυτη ΠΛ. Η εστιακή μορφή ΠΛ αφορά την καταστροφή όλων των κυτταρικών στοιχείων στην προσβεβλημένη περιοχή και προσβάλλει κυρίως τη λευκή ουσία, ενώ η διάχυτη μορφή της ΠΛ αφορά την επιλεκτική προσβολή πρόδρομων ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων της λευκής ουσίας με αποτέλεσμα η μυελίνωση σε αυτή να υπολείπεται. Ακόμη, στην ΠΛ η φαιά ουσία δεν προσβάλλεται άμεσα<sup>7,8</sup>.

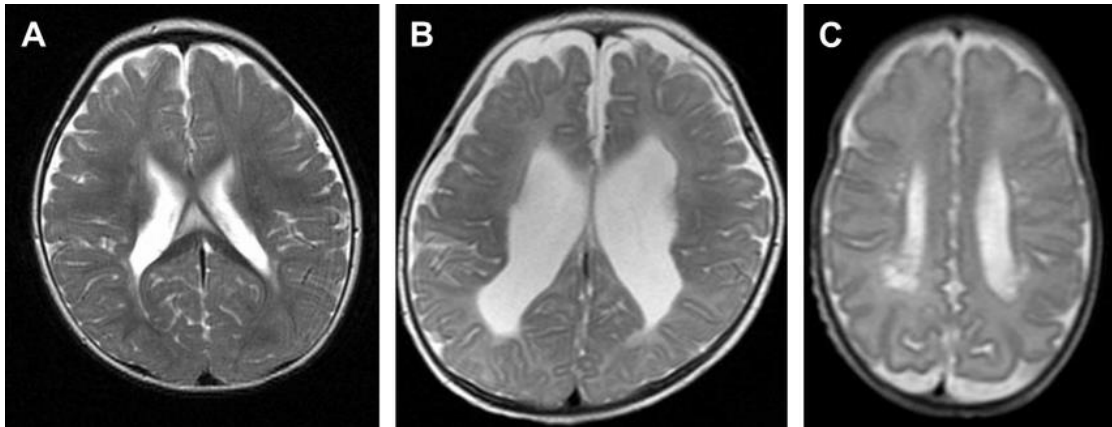




**Εικόνα 2.1:** Εγκεφαλική παράλυση και Λευκομαλακία: a) αίμα στις κοιλίες, διάχυτη γλοίωση, εστιακή κυστική νέκρωση της λευκής ουσίας. b) κοιλιομεγαλία, υπομυελίνωση.

Πιο αναλυτικά, η εστιακή ΠΛ χωρίζεται σε τρεις επιμέρους φάσεις:

- **Οξεία φάση:** Παρατηρείται 12-24 ώρες μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο. Αποτελείται από κυτταρική τήξη, πυρηνική νέκρωση και «σπογγίωση» του ιστού.
- **Υποξία φάση:** Αφορά τις επόμενες 24 ώρες, μετά την οξεία φάση και αποτελείται από πολλαπλασιασμό μικρογλοιακών κυττάρων, συσσώρευση μακροφάγων τις επόμενες μέρες που ακολουθούνται από αστροκύτταρα.
- **Χρόνια φάση:** Πρόκειται για το σχηματισμό νεοαγγείωσης στα όρια της βλάβης και τη δημιουργία κύστεων που μπορεί να παραμένουν εντός της λευκής ουσίας ή να δημιουργούν χαρακτηριστικές βλάβες κυστικής εγκεφαλομαλακίας, οι οποίες φαίνονται απεικονιστικά, καθώς και ανώμαλο περίγραμμα κοιλιακού συστήματος, όταν συνυπάρχει προσβολή του επενδύματος από την ισχαιμία <sup>8</sup>.



**Εικόνα 2.2:** Οι βαθμοί περικοιλιακής λευκομαλακίας (PVL) που προσδιορίζονται με βάση τα ευρήματα της μαγνητικής τομογραφίας (απεικόνιση στο εγκάρσιο επίπεδο): (A) 1ου βαθμού PVL. (B) 2ου βαθμού PVL. (C) 3ου βαθμού PVL.

### **Μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ΠΛ διατρέχουν τα πρόωρα νεογνά λόγω:**

- **Ανωριμότητας του μηχανισμού αυτορρύθμισης της εγκεφαλικής αιματικής ροής:** Οι διακυμάνσεις της αρτηριακής πίεσης έχουν κυρίαρχο ρόλο στην εγκεφαλική αιματική ροή στα πρόωρα νεογνά. Σε περίπτωση υπότασης αυξάνεται ο κίνδυνος ισχαιμίας, ενώ σε περίπτωση υπέρτασης αυξάνεται ο κίνδυνος ρήξης των εγκεφαλικών αγγείων.
- **Των χαρακτηριστικών ανάπτυξης του αγγειακού δικτύου του εγκεφάλου:** Τα αγγεία στον εγκέφαλο των πρόωρων νεογνών εμφανίζουν μειωμένη πυκνότητα και είναι ιδιαίτερα περιορισμένος ο αριθμός παράπλευρων κλάδων και αναστομώνσεων, καθιστώντας έτσι ευάλωτη την αγγείωση της λευκής περικοιλιακής ουσίας σε επεισόδια που σχετίζονται με μειωμένη παροχή αιμάτωσης ή και οξυγόνου, με αποτέλεσμα την δημιουργία αλλοιώσεων.
- **Της ευπάθειας πρόδρομων ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων:** Τα κύτταρα αυτού του τύπου παρατηρούνται κυρίως πριν από τις 32 εβδομάδες κύησης, ενώ τα ώριμα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα που παράγουν μυελίνη εμφανίζονται περίπου προς το τέλος της κύησης κι έτσι δικαιολογείται και το γεγονός της μείωσης της συχνότητας εμφάνισης της ΠΛ σε πρόωρα <sup>9,10</sup>.

Η ΠΛ δύναται να οδηγήσει σε νευρολογικές βλάβες και νευροαναπτυξιακές διαταραχές ενώ ταξινομείται κατά de Vries σε 4 βαθμούς σοβαρότητας.

## 2.2 Εγκεφαλική Αιμορραγία

Ως **εγκεφαλική αιμορραγία (ΕΑ)** ορίζεται η βλάβη στην οποία παρατηρείται ρήξη ενός αιμοφόρου αγγείου και έξοδος αίματος στον περιβάλλοντα εγκεφαλικό ιστό. Υπάρχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισής της σε τελειόμηνα αλλά και σε πρόωρα νεογνά, γεγονός που την καθιστά μία από τις πιο συχνές επιπλοκές του κεντρικού νευρικού συστήματος μιας πρόωρης γέννησης. Είναι δυνατόν να προκαλέσει αρκετές δυσμενείς επιπτώσεις που μπορεί να σχετίζονται με βλάβες στο νευρικό σύστημα αλλά και σε ύστατη περίπτωση προκαλεί ακόμη και το θάνατο. Οι επιπτώσεις εξαρτώνται άμεσα από τη βαρύτητα της αιμορραγίας. Ανάλογα με τη θέση εντοπισμού της αιμορραγίας, διακρίνεται σε πολλούς τύπους οι οποίοι είναι: η επισκληρίδια, η υπαραχνοειδής, η υποσκληρίδια, η παρεγκεφαλιδική, η ενδοπαρεγχυματική, η θαλαμική, η παρεγχυματική, η ενδοκοιλιακή αιμορραγία και η αιμορραγία χοριοειδούς πλέγματος<sup>11</sup>. Στα τελειόμηνα νεογνά σχετίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό με υποξικά ισχαιμικά επεισόδια, μαιευτικές κακώσεις, αλλά και με διαταραχή στο μηχανισμό της πηκτικότητας. Οι κυριότεροι τύποι ΕΑ που παρατηρούνται σε πρόωρα νεογνά είναι η υπαραχνοειδής, η ενδοκοιλιακή, και η παρεγχυματική αιμορραγία.

Η **ενδοκοιλιακή αιμορραγία** λαμβάνει χώρα αρχικά στη βλαστική στοιβάδα, περιοχή που υποστρέφει προς το τέλος της κύησης. Η διάγνωσή της μπορεί να γίνει με υπερηχογράφημα εγκεφάλου, αξονική ή μαγνητική τομογραφία. Σε περίπτωση αιμορραγίας σοβαρού βαθμού μπορεί να προκύψουν διάφορες νευρολογικές βλάβες, υδροκεφαλία ακόμη και νεογνικός θάνατος. Η ταξινόμηση πραγματοποιείται κατά Papile ή κατά Volpe. Όσον αφορά την παθογένεια της ενδοκοιλιακής αιμορραγίας αυτή επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες αφού αποτελεί συνδυασμό ενδοαγγειακών και εξωαγγειακών παραγόντων που συμβάλλουν στη ρήξη των αγγείων. **Οι ενδοαγγειακοί παράγοντες** αφορούν διαταραχές των αιμοπεταλίων και της πηκτικότητας,

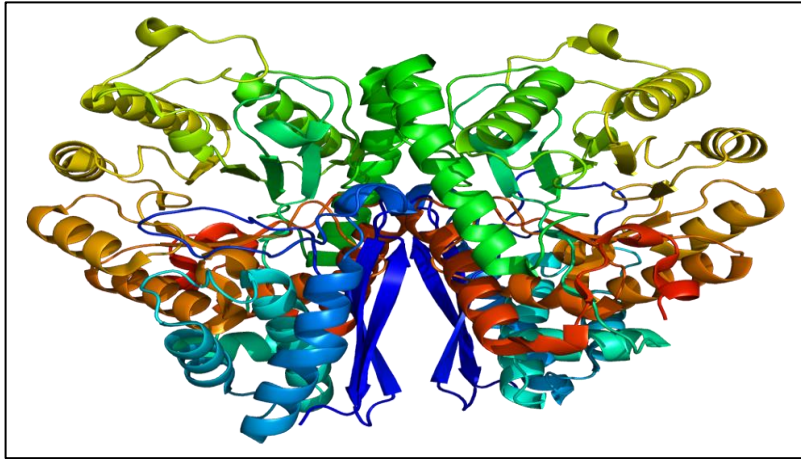
διακυμάνσεις της εγκεφαλικής ροής και αύξηση της εγκεφαλικής φλεβικής πίεσης λόγω ανατομίας του φλεβικού συστήματος στη βλαστική στοιβάδα . **Οι αγγειακοί παράγοντες** αφορούν την ανωριμότητα της δομής των αγγείων της βλαστικής στοιβάδας και την ευαισθησία των τριχοειδών της βλαστικής στοιβάδας στην ισχαιμία-υποξία. Τέλος, **οι εξωαγγειακοί παράγοντες** συσχετίζονται με την ινωδολυτική δραστηριότητα και τη φτωχή στήριξη από τον εξωαγγειακό χώρο<sup>12-14</sup>.

### **3. Πρόωρα νεογνά και Βιοχημικοί Δείκτες Εγκεφαλικής Βλάβης**

#### **3.1 Ειδική Νευρωνική Ενολάση**

##### **Ειδική Νευρωνική Ενολάση (Neuron Specific Enolase, NSE)**

Η ειδική νευρωνική ενολάση (Neuron Specific Enolase, NSE) ή ενολάση 2 ή γ-ενολάση, κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 12 από το γονίδιο ENO2. Αποτελείται από 434 αμινοξέα και το υπολογιζόμενο μοριακό της βάρος ανέρχεται περίπου στα 46 kDa. Η NSE μπορεί να ανευρεθεί στους ώριμους νευρώνες, σε κύτταρα νευρωνικής προέλευσης, σε κύτταρα με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση και στους νευρώνες του εγκεφαλικού ιστού. Επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν τη νευροτροφική της δράση. Η αρκετά υψηλή περιεκτικότητα της NSE στο αίμα δυσχεραίνει την απόδοση αξιόπιστων αποτελεσμάτων σε περίπτωση αιμολυμένων δειγμάτων<sup>15,16</sup>.



**Εικόνα 3.1** : Δομή της NSE  
Πηγή: <https://en.wikipedia.org>

Η πραγματοποίηση μιας μελέτης το 2004<sup>17</sup> που αφορούσε την μέτρηση επιπέδων της NSE σε τελειόμηνα νεογνά με ΥΙΕ οδήγησε στη διαπίστωση ότι η NSE ήταν σημαντικά αυξημένη στον ορό των ασθενών-νεογνών σε σχέση με τα νεογνά μάρτυρες. Τα δυο δείγματα προέρχονταν από ορό αίματος και είχαν ληφθεί μεταξύ των χρονικών διαστημάτων 4-48 ωρών και 5-7 ημερών αντίστοιχα. Τα αυξημένα επίπεδα της NSE που ανιχνεύτηκαν στον ορό νεογνών με ΥΙΕ συσχετίστηκαν με το βαθμό της ΥΙΕ, την πρόγνωση των νεογνών αλλά και με ανεπιθύμητες νευροαναπτυξιακές εκβάσεις στους 15 μήνες ζωής<sup>17,18</sup>. Αντίθετα, άλλοι ερευνητές αναφέρουν δεν βρήκαν καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις της NSE μεταξύ των νεογνών με ήπια ή χωρίς ΥΙΕ και των νεογνών με μέτρια ή σοβαρή ΥΙΕ<sup>19</sup>.

Μελέτες επίσης που πραγματοποιήθηκαν σε πρόωρα νεογνά με ηλικία κύησης μεταξύ 28-35 εβδομάδων και είχαν υποστεί περιγεννητική ασφυξία έδειξαν ότι τα νεογνά που εμφάνιζαν σοβαρού βαθμού περιγεννητική ασφυξία εμφάνιζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα NSE στον ορό τους συγκριτικά με εκείνα που είχαν ήπιου βαθμού ή καθόλου περιγεννητική ασφυξία<sup>20</sup>. Επιπρόσθετα, Έλληνες ερευνητές παραθέτουν δημοσιευμένα στοιχεία που υποστηρίζουν ότι βρήκαν την 18η ημέρα ζωής υψηλές συγκεντρώσεις της NSE σε περιφερικό αίμα νεογνών με εγκεφαλική βλάβη<sup>21</sup>. Τέλος, σε μελέτες που συμπεριέλαβαν πρόωρα νεογνά μεταξύ 28-36 εβδ με ΠΛ βρέθηκε ότι τα πάσχοντα νεογνά είχαν χαμηλότερα επίπεδα NSE στο περιφερικό φλεβικό

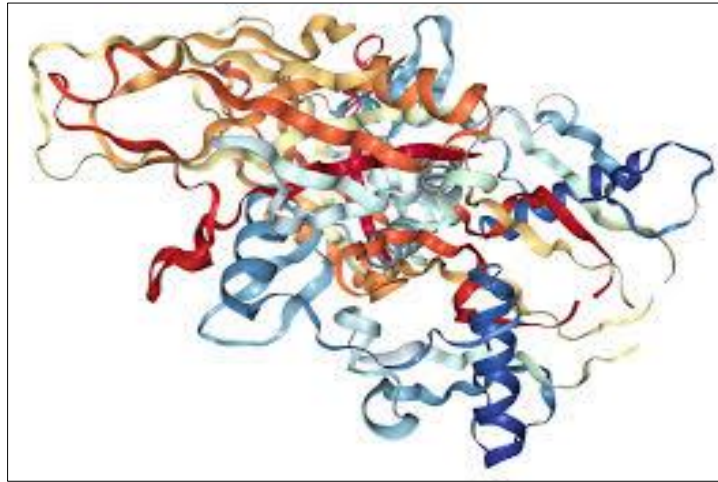
τους αίμα την 7η και 14η ημέρα ζωής συγκριτικά με τα νεογνά-μάρτυρες<sup>16</sup>.

## **3.2 Λοιποί Βιοχημικοί Δείκτες Σχετιζόμενοι με τη Βλάβη των Νευρικών Ιστών**

### **Ακτιβίνη-A (Activin-A)**

Οι ακτιβίνες είναι μέλη μιας ομόλογης οικογένειας ομοδιμερών και ετεροδιμερών και συμπεριλαμβάνονται στην ευρεία οικογένεια του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β. Οι ακτιβίνες συμμετέχουν σε διαδικασίες του αιμοποιητικού, αναπαραγωγικού και ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και σε διαδικασίες που σχετίζονται με τη φλεγμονή και την ίνωση. Επίσης συμβάλλουν σημαντικά και σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως για παράδειγμα η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης.

Η ακτιβίνη-A είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δυο υπομονάδες β-A και έχει μοριακό βάρος 25 kDa. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εδρεύει στο χρωμόσωμα 7 και εκφράζεται στο ΚΝΣ. Βασικός της ρόλος είναι η προαγωγή της επιβίωσης των νευρώνων και της διαφοροποίησής τους καθώς και η ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας του εγκεφάλου. Αυξημένη έκκριση της ακτιβίνης-A έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις οξέων νευρωνικών βλαβών, όπως είναι η περιγεννητική ασφυξία. Επειδή η παραγωγή της επέρχεται πολύ σύντομα μετά το επεισόδιο της εγκεφαλικής βλάβης, έχει προταθεί ως σημαντικός βιοδείκτης για την ανίχνευση της θέσης, της παρουσίας και της έκτασης των εγκεφαλικών βλαβών<sup>23,28</sup>.

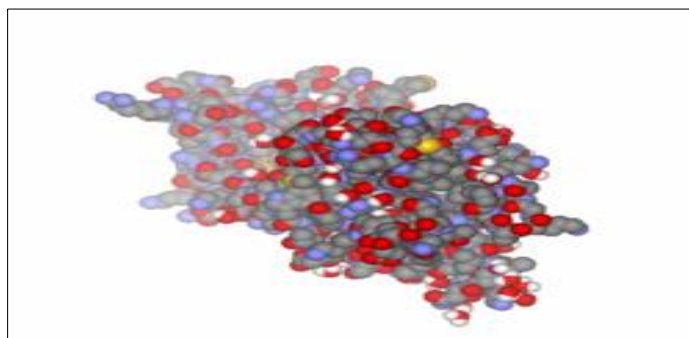


**Εικόνα 3.2 :** Η δομή της ακτιβίνης-A.

Πηγή: <https://www.sinobiological.com>

### **Εγκεφαλικός Νευροτροφικός Παράγοντας (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)**

Ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF) συμπεριλαμβάνεται στην οικογένεια των νευροτροφινών, είναι πρωτεΐνη και κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο BDNF που έχει έδρα στο χρωμόσωμα 11. Η πρόδρομη μορφή του αποτελείται από 229 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 32 kDa, ενώ η ώριμη μορφή του αποτελείται από 119 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 14 kDa. Η τελική διαμόρφωση της πρωτεΐνης είναι ομοδιμερής<sup>24</sup>. Εκκρίνεται από τα αστροκύτταρα του ΚΝΣ και βασικός του ρόλος είναι η προαγωγή της ανάπτυξης, της αναγέννησης, της διαφοροποίησης και της επιδιόρθωσης των νευρώνων. Ακόμη έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αξονική και δενδριτική διακλάδωση των νευρώνων, στη συναπτογένεση των δενδροειδών αξονικών απολήξεων αλλά και στην αποτελεσματικότητα της συναπτικής μεταβίβασης. Στον εγκέφαλο δραστηριοποιείται σε διάφορα σημεία (ιππόκαμπο, φλοιό, πρόσθιο εγκέφαλο). Η έκφρασή του μειώνεται επί της παρουσίας κυτταροτοκινών<sup>25</sup>. Μελέτες έδειξαν ότι ο BDNF μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βιοδείκτη για εγκεφαλικές βλάβες αφού η συγκέντρωσή του βρέθηκε να είναι αυξημένη στο πλάσμα νεογνών με εγκεφαλοπάθεια<sup>26,28</sup>.

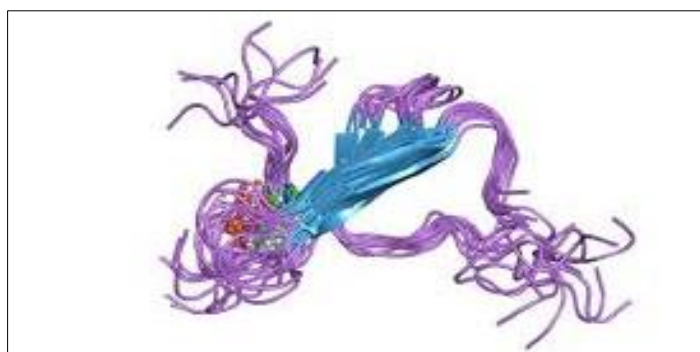


**Εικόνα 3.3 :** Η δομή του BDNF.

Πηγή: <https://en.wikipedia.org>

### **Πρωτεΐνη Ταυ (Tau protein)**

Πρόκειται για μία πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους η οποία σχετίζεται άμεσα με μικροσωληνίσκους. Η παρουσία της είναι έντονη σε κύτταρα του ΚΝΣ. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που ονομάζεται MAPT και ανευρίσκεται στο χρωμόσωμα 17. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στους νευρωνικούς άξονες του περιφερικού νευρικού συστήματος, στα αστροκύτταρα και στα ολιγοδενδροκύτταρα του ΚΝΣ. Όταν υπάρχει κάποιος τραυματισμός που αφορά νευρώνες, τότε αυτή απελευθερώνεται στην κυκλοφορία και στο ΕΝΥ. Μελέτες της πρωτεΐνης Ταυ σε ορό τελειόμηνων νεογνών ανέδειξαν τη σημαντικότητά της ως βιοχημικού δείκτη για τη διάγνωση και πρόγνωση της ΥΙΕ καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις της βρέθηκαν να συσχετίζονται με σοβαρού βαθμού εγκεβαλικές βλάβες<sup>28-30</sup>.



**Εικόνα 3.4 :** Η δομή της Tau protein.

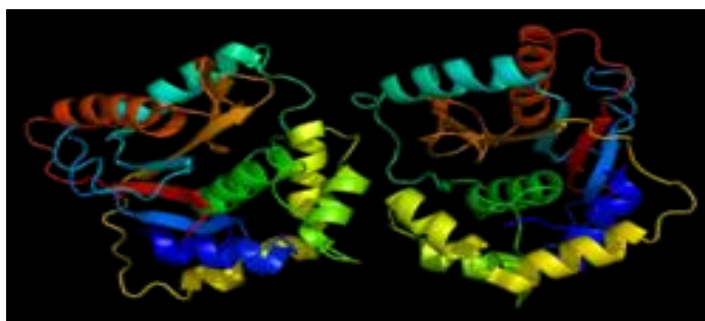
Πηγή: [www.kerafast.com](http://www.kerafast.com)

### **Καρβοξυτελική Υδρολάση-L1 της Ουβικουΐνης (Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1, UCH-L1)**

Η καρβοξυτελική υδρολάση-L1 της ουβικουΐνης ή υδρολάση του C-άκρου της



ουβικουϊτίνης (Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1, UCH-L1), ανήκει στην κατηγορία των κυτταροπλασματικών ενζύμων, είναι ειδική για τους νευρώνες και κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 4. Η UCH-L1 είναι μια αποουβικουιτινάση που έχει ως ρόλο την απομάκρυνση της ουβικουϊτίνης από τα πρωτεασώματα. Νευρολογικές ασθένειες δύναται να προκληθούν σε περίπτωση δυσλειτουργίας του συστήματος ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος. Επίσης η UCH-L1 μπορεί να αντικατοπτρίσει τη νευρωνική απόπτωση λόγω συσσώρευσής της στους δενδρίτες των νευρώνων. Είναι ενδεικτική της έκτασης της νευρωνικής βλάβης αφού απελευθερώνεται στην κυκλοφορία αμέσως μετά τη βλάβη<sup>31,32</sup>. Τέλος ως βιοδείκτης σε ΥΙΕ συσχετίστηκε με τη κακή πρόγνωση και το νεογνικό θάνατο<sup>33,34</sup>.

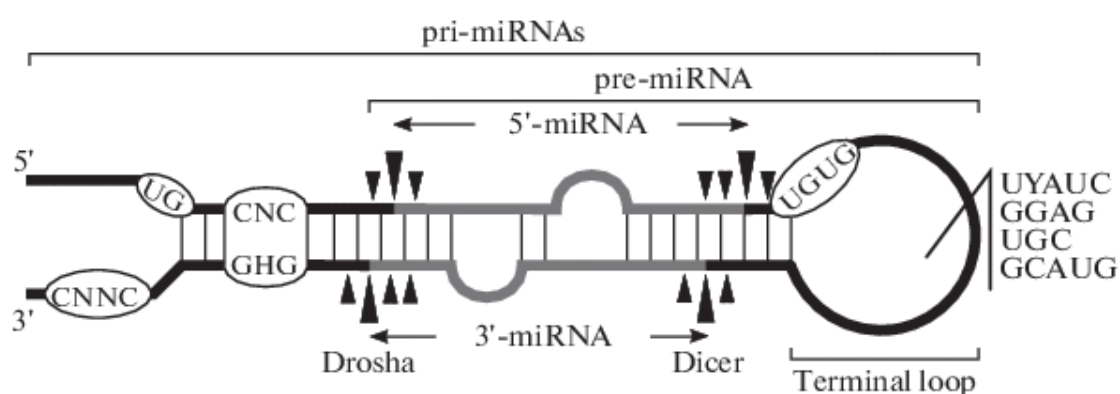


**Εικόνα 3.5 :** Η δομή της UCH-L1.  
Πηγή: <https://en.wikipedia.org>

### **Μικρό RNA ( microRNA, miRNA)**

Πρόκειται για μονόκλινα μόρια RNA που διαθέτουν 19-23 νουκλεοτίδια που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Έχουν ρόλο δράσης ως αρνητικοί ρυθμιστές γονιδίων και συμμετέχουν σε αρκετές διεργασίες στα κύτταρα. Επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση, συνεπώς, η πιθανή απορρύθμισή τους μπορεί να είναι πλειοτροπική και να έχει ως αποτέλεσμα πληθώρα ασθενειών. Ακόμη τα miRNAs είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη διαδικασία της ωρίμανσης των ολιγοδενδροκυττάρων, του σχηματισμού της μυελίνης όπως επίσης και στη ρύθμιση της τοξικότητας των διεγερτικών αμινοξέων, των φλεγμονωδών αντιδράσεων, του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης. Τα miRNA-199a είναι γνωστά ως ειδικοί δείκτες για το νευρικό ιστό, ενώ το miRNA-21 εκφράζεται στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου<sup>16,35</sup>. Η

πραγματοποίηση μελετών σε τελειόμηνα νεογνά με περιγεννητική ασφυξία έδειξε ότι υπήρχε σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-374a στο αίμα του ομφάλιου λώρου νεογνών με περιγεννητική ασφυξία που μετέπειτα ανέπτυξαν ΥΙΕ<sup>36</sup>. Ακόμη αυξημένο βρέθηκε το miR-21, που εκφράζεται σε αστροκύτταρα, στον ορό νεογνών με ΥΙΕ σε σχέση με υγιή νεογνά, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να χαρακτηριστεί ως βιοδείκτης πρώιμης ανίχνευσης της νεογνικής ΥΙΕ<sup>37</sup>.

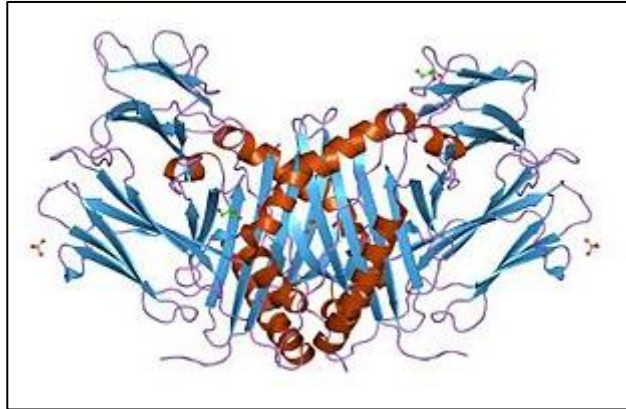


**Εικόνα 3.6:** Η δομή του miRNA.

Πηγή: <https://doi.org/10.1134/S1022795420010135>

### **Βασική Πρωτεΐνη της Μυελίνης (MBP)**

Η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (Myelin basic protein, MBP) είναι το κύριο συστατικό της μυελινικής θήκης. Σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο αίμα αλλά και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, υποδεικνύει ότι συμβαίνει απομυελίνωση. Αρκετά σημαντικός είναι ο ρόλος της MBP στη διατήρηση της δομής και της λειτουργικότητας της μυελίνης η οποία υπό κανονικές συνθήκες διαπερνά από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αλλά μικρή ποσότητα απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Η πρωτεΐνη MBP αποτελείται από 170 αμινοξέα και διαθέτει μοριακό βάρος περίπου 18.5 kDa. Αποτελέσματα κλινικών μελετών κατέδειξαν ότι τα επίπεδα της MBP στον ορό νεογνών που είχαν μέτρια ή σοβαρή ΥΙΕ ήταν υψηλότερα σε σχέση με νεογνά που είχαν ήπια ΥΙΕ ή ήταν υγιή<sup>35,38</sup>.



**Εικόνα 3.7:** Η δομή της MBP.

Πηγή: [https://www.wikiwand.com/en/Myelin\\_basic\\_protein](https://www.wikiwand.com/en/Myelin_basic_protein)

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **4. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν:

1. Να διερευνήσει τη συγκέντρωση του βιοχημικού δείκτη NSE στον ορό πρόωρων νεογνών που γεννήθηκαν νωρίτερα από τις 34 εβδομάδες κύησης και τα οποία εμφάνισαν εγκεφαλική βλάβη διαφόρων βαθμών, και ειδικότερα περικοιλιακή λευκομαλακία ή εγκεφαλική αιμορραγία, κατά τις τρεις πρώτες ημέρες της ζωής τους, σε σύγκριση με φυσιολογικά νεογνά της ίδιας ηλικίας κύησης.
2. Να συσχετίσει τα επίπεδα του παραπάνω βιοδείκτη με εργαστηριακά, ακτινολογικά και κλινικά ευρήματα της εγκεφαλικής βλάβης.
3. Να συσχετίσει τα επίπεδα του παραπάνω βιοδείκτη με την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης.

## 5. ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΣ

### 5.1 Σχεδιασμός Μελέτης

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Ιατρικού Κέντρου Αθηνών, με αριθμό πρωτοκόλλου **KM140657/17-05-2016** καθώς και από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου, με αριθμό πρωτοκόλλου **B-216/13-10-2016**.

Πρόκειται για **μελέτη με προοπτικό διαχρονικό σχεδιασμό ασθενών-μαρτύρων**, όπου εντάχθηκαν πρόωρα νεογνά ηλικίας κύησης <34 εβδ που εισήχθησαν στη MENN. Οι γονείς των νεογνών, κατόπιν λεπτομερούς ενημέρωσης, έδωσαν την ενυπόγραφη συναίνεσή τους για την ένταξη των νεογνών τους στη μελέτη. Τα νεογνά παρακολουθήθηκαν μέχρι που έλαβαν εξιτήριο από τη MENN. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά ενενήντα έξι (96) πρόωρα νεογνά που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη.

Η **συλλογή των δειγμάτων** έλαβε χώρα από το Νοέμβριο του 2016 ως και τον Μάρτιο του 2018, στη MENN της Ιδιωτικής Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής «Γαία» που ανήκε στον Όμιλο Ιατρικού Αθηνών. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο εναπομείναντας ορός που προερχόταν από τις αιμοληψίες για τις εξετάσεις ρουτίνας των νεογνών κατά την 1η, 2η και 3η ημέρα της ζωής τους. Τα δείγματα αίματος της πρώτης ημέρας ζωής λαμβάνονταν όταν το νεογνό έκανε εισαγωγή στη MENN, αμέσως μετά τη γέννηση. Ο ορός συλλέγονταν από αρτηριακό ή φλεβικό αίμα, περιφερικού ή

ομφαλικού αγγείου και τοποθετούνταν σε παιδιατρικό βιοχημικό σωληνάριο της εταιρείας «BD» χωρητικότητας 600 μικρολίτρων (Microtainer) με γέλη και επιταχυντή πήξης. Ο ορός φυγοκεντρούνταν εντός 30-60 λεπτών μετά την αιμοληψία και ακολουθούσε η αποθήκευσή του στους -35°C μέχρι τη βιοχημική ανάλυση. Για τη **μέτρηση** του βιοχημικού δείκτη στον ορό των νεογνών επιλέχθηκε η μέθοδος ELISA.

Η συλλογή των απαραίτητων δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο νοσοκομείο «Γαία». Πληροφορίες συλλέγησαν από το **μαιευτικό και νεογνικό ιστορικό** αλλά και από τα αρχεία των θεραπόντων ιατρών των εγκύων, ώστε να πραγματοποιηθεί διερεύνηση αλλά και συσχέτιση των περιγεννητικών παραγόντων με την έκβαση των νεογνών.

#### **Κριτήρια ένταξης:**

- Ηλικία κύησης του νεογνού μικρότερη των 34 εβδομάδων
- Ενυπόγραφη συναίνεση των γονέων του νεογνού
- Ύπαρξη πλήρους προγεννητικού ελέγχου σε όλα τα τρίμηνα της κύησης
- Μη ανίχνευση συγγενούς εγκεφαλικής ανωμαλίας από τον προγεννητικό υπερηχογραφικό έλεγχο
- Απουσία συγγενούς λοίμωξης TORCH
- Απουσία αρρυθμιστής μητρικής θυρεοειδοπάθειας ή συγγενούς υποθυρεοειδισμού του νεογνού
- Απουσία συγγενών, γενετικών, χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου/νεογνού
- Μη εμφάνιση πυρηνικού ικτέρου στο νεογνό
- Μη χρήση εθιστικών ναρκωτικών ουσιών από την μητέρα κατά την κύηση

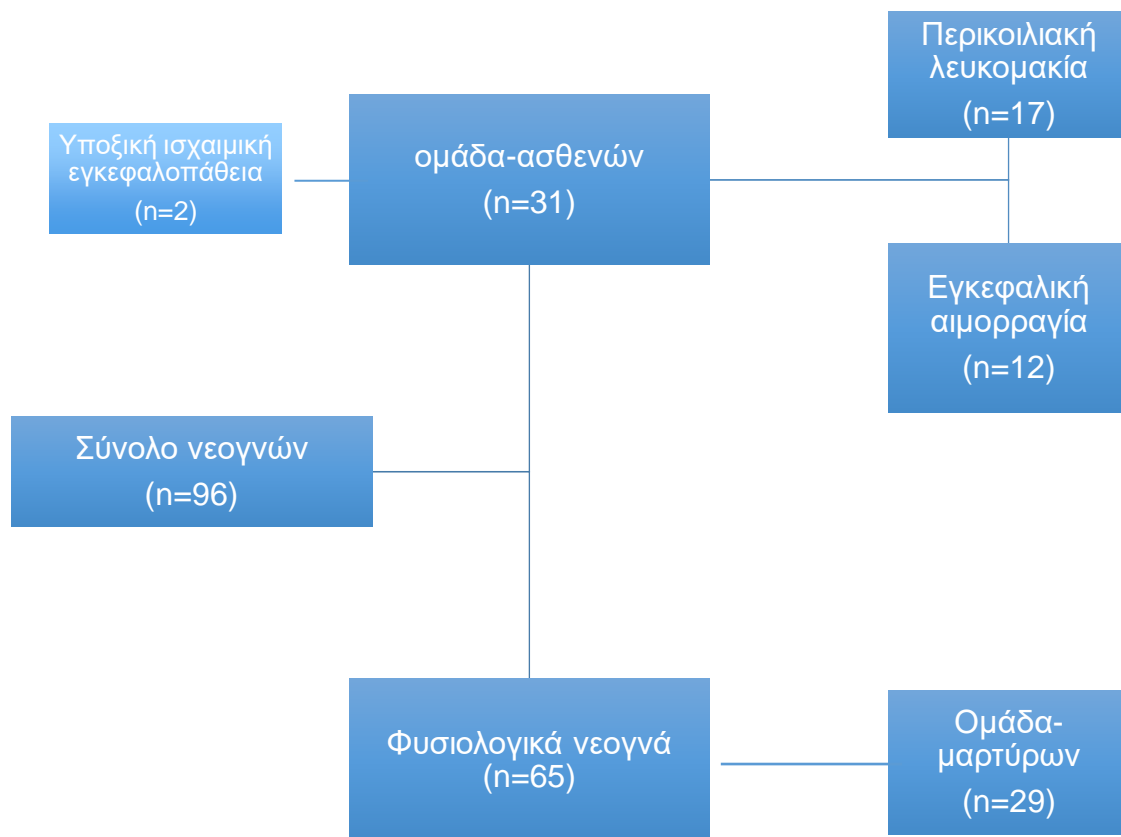
Ως **κύηση υψηλού κινδύνου** ορίστηκαν οι κυήσεις εκείνες που πληρούσαν τα κριτήρια εμφάνισης παθολογίας κατά τη διάρκειά τους (προεκλαμψία, ολιγουδράμνιο, υποθυρεοειδισμός, σακχαρώδης διαβήτης κύησης, χοριοαμνιονίτιδα, ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη, παθολογικό Doppler), βάσει των διεθνών προτύπων και κατευθυντήριων οδηγιών <sup>39-45</sup>.

## 5.2 Υλικό – Μέθοδος

Συνολικά **ενενήντα έξι (96) πρόωρα νεογνά** πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη. Συγκεκριμένα **τριανταένα (31) από αυτά ανέπτυξαν εγκεφαλική βλάβη (32,2%)** σύμφωνα με ευρήματα του υπερηχογραφικού ελέγχου και αποτέλεσαν την ομάδα ασθενών (case group). Επίσης τα **δεκαεπτά (17) ανέπτυξαν περικοιλιακή λευκομαλακία**, τα **δώδεκα (12) εγκεφαλική αιμορραγία** και τα **δύο (2) υποξική ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια**, τα οποία και αποκλείστηκαν από τη μελέτη (Σχήμα 5.1).

Τα είκοσι εννέα (29) τελικά νεογνά-ασθενείς, αντιστοιχήθηκαν ένα προς ένα (1:1 fashion) με φυσιολογικά νεογνά, δηλαδή νεογνά που είχαν φυσιολογικά απεικονιστικά ευρήματα εγκεφάλου (ομάδα μαρτύρων - control group). Η αντιστοίχιση είχε ως βάση την ηλικία κύησης, με μέγιστη απόκλιση τη **μία εβδομάδα ( $\pm 1$  εβδομάδα)** και το παρόμοιο βάρος γέννησης. Πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση νεογνών σε ασθενείς και μάρτυρες κατά την έξοδό τους από τη MENN, σε τελειόμηνη διορθωμένη ηλικία κύησης, λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των υπερηχογραφικών ευρημάτων που απέρρεε από τη συνολική νοσηλεία τους.

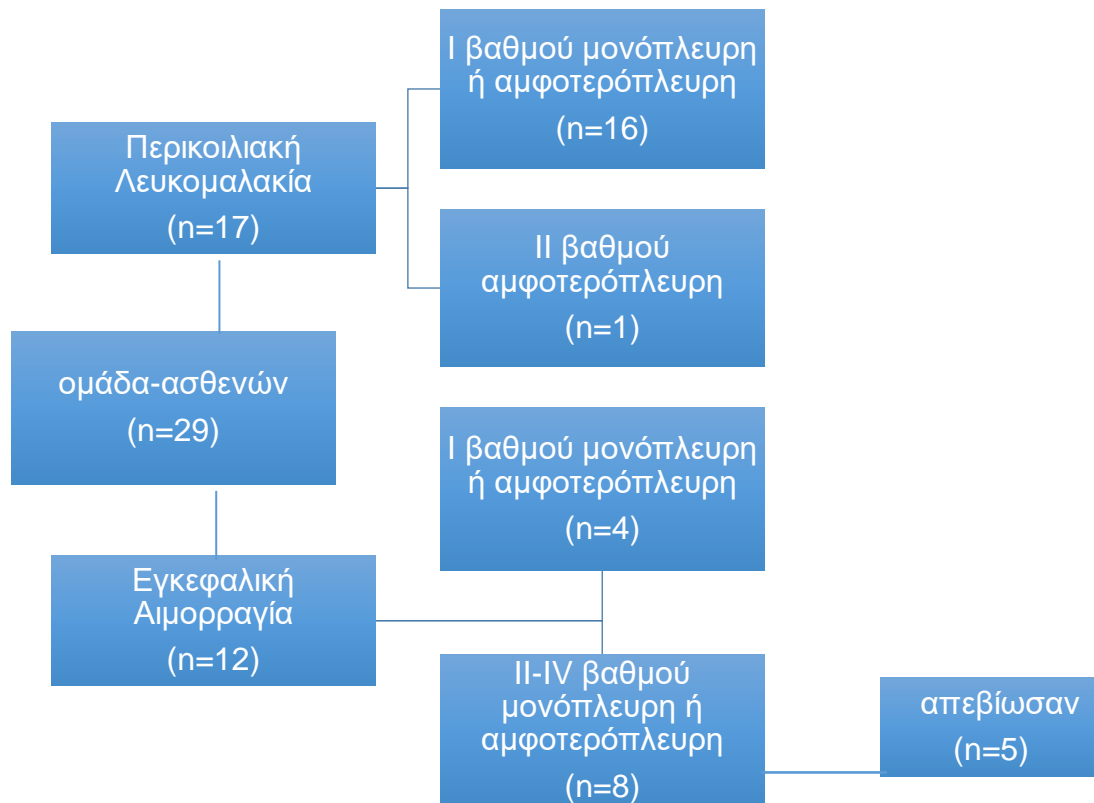
Στην παρούσα μελέτη, το υπερηχογράφημα **(ΥΓ) εγκεφάλου** γινόταν στα πρόωρα νεογνά με βάση το Ευρωπαϊκό Ίδρυμα για τη Φροντίδα των Νεογνών (European Foundation For Care of Newborn Infants, EFCNI)<sup>46</sup>.



**Σχήμα 5.1:** Υλικό μελέτης

Από τα νεογνά που ανέπτυξαν ΠΛ (n=17), 16 διαγνώσθηκαν με I βαθμού μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη ΠΛ, ενώ 1 διαγνώσθηκε με II βαθμού αμφοτερόπλευρη ΠΛ. Στην ομάδα των νεογνών που εμφάνισαν ΕΑ (n=12), τα 4 από αυτά ανέπτυξαν I βαθμού μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη ΕΑ και τα υπόλοιπα 8 ανέπτυξαν II-IV βαθμού μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη ΕΑ. Από αυτά **κατέληξαν τα πέντε (n=5)** (Σχήμα 5.2), ενώ τα υπόλοιπα **τρία (3)** εμφάνισαν υπερτονία και σπασμούς στη διάρκεια της νοσηλείας τους. Όλα τα νεογνά γεννήθηκαν με καισαρική τομή, πλην ενός από την ομάδα των φυσιολογικών νεογνών και τεσσάρων από την ομάδα των νεογνών με εγκεφαλική βλάβη.





**Σχήμα 5.2:** Ομαδοποίηση νεογνών με εγκεφαλική βλάβη

### 5.3 Πίνακες Υλικού

Η σύγκριση μεταξύ των φυσιολογικών νεογνών (ΦΝ) και των νεογνών με εγκεφαλική βλάβη (NEB), ως προς τα χαρακτηριστικά της μητέρας αλλά και προς τις θεραπευτικές παρεμβάσεις στην έγκυο, δεν εντόπισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των νεογνών που σχετίζονται με τα εργαστηριακά ευρήματα, τα νεογνά με NEB παρουσίαζαν σημαντικά χαμηλότερο pH εισαγωγής ( $p=0,033$ ) αλλά και αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων ( $p=0,05$ ), συγκριτικά με τα ΦΝ. Επιπρόσθετα, στο πρώτο δείγμα αίματος που ελήφθη κατά την εισαγωγή του νεογνού στη MENN, οι τιμές του ελλείμματος βάσης και του γαλακτικού οξέος στο αρτηριακό αέριο αίματος, ήταν σε υψηλότερα επίπεδα στα NEB ( $p=0,037$  και  $p=0,05$  αντίστοιχα), όπως επίσης και η επίπτωση σπασμών ( $p=0,01$ ) και θανάτου ( $p=0,019$ ). Αντιθέτως, η

νεκρωτική εντεροκολίτιδα, εμφανιζόταν με μεγαλύτερη συχνότητα σε ΦΝ ( $p=0,044$ ). Συνολικά έξι ( $n=6$ ) NEB παρουσίασαν σπασμούς, τρία ( $n=3$ ) από τα οποία τελικά απεβίωσαν. Τέλος, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις νεογνικές θεραπευτικές παρεμβάσεις αλλά και στη συνολική διάρκεια παραμονής των νεογνών στη MENN.

Η περιγραφή του υλικού παρουσιάζεται στους Πίνακες 1 έως 4.

**Πίνακας 1:** Μητρικά δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά νεογνών ασθενών-μαρτύρων.

Μεταβλητή	Ομάδα μαρτύρων ελέγχου	Ομάδα ασθενών	p-Value
<i>N</i>	29	29	
Μητρική ηλικία (χρόνια)	38.4 ± 5.8	37.9 ± 5.7	0.764
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	29.8 ± 2.5	29.6 ± 3.0	0.817
Τόκος, n (%)			
Πρωτοτόκος	22 (76)	22 (76)	
Πολυτόκος	7 (24)	7 (24)	
Φυλή, n (%)			
Καυκάσια φυλή	29 (100%)	29 (100%)	>0.99
Τρόπος σύλληψης, n (%)			
Αυτόματη	9 (31)	11(38)	
IVF <sup>1</sup>	20 (69)	18 (62)	0.581
Κύηση, n (%)			
Μονήρης	13 (45)	8 (28)	

Πολύδυμη	16 (55)	21 (72)	0.172
Τοκετός με καισαρική τομή, n (%)	28 (97)	25 (86%)	0.160
Πρόωρη πρώιμη ρήξη υμένων, n (%)	9 (31)	9 (31)	>0.99
Προεκλαμψία, n (%)	4 (14)	1 (3.5)	0.160
Ολιγοϋδράμνιο, n (%)	2 (7)	2 (7)	>0.99
Υποθυρεοειδισμός, n (%)	15 (52)	11 (38)	0.291
Ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης κύησης, n (%)	4 (14)	2 (7)	0.389
Παθολογικό Doppler, n (%)	3 (10)	6 (20)	0.277
Προγεννητική χορήγηση στεροειδών, n (%)	25 (86)	23 (79)	0.487
Νεογνά με ΠΛ <sup>2</sup>		16/17	
Νεογνά με ΕΑ <sup>3</sup>		7/12	0.019 *
Προγεννητική χορήγηση θειϊκού μαγνησίου, n (%)	11 (38)	15 (52)	0.291
Αποκόλληση πλακούντα, n (%)	1 (3.5)	1 (3.5)	>0.99
Κλινική χοριοαμνιονίτιδα, n (%)	7 (24)	3 (10)	0.164

<sup>1</sup>IVF: εξωσωματική γονιμοποίηση; <sup>2</sup>ΠΛ: περικοιλιακή λευκομαλακία; <sup>3</sup>ΕΑ: ενδοκοιλιακή αιμορραγία. \*στατιστικά σημαντικές τιμές

**Πίνακας 2.** Δημογραφικά - κλινικά χαρακτηριστικά και εργαστηριακά ευρήματα νεογνών ασθενών-μαρτύρων.

Μεταβλητή N	Ομάδα μαρτύρων 29	Ομάδα ασθενών 29	p-Value
Φύλο, n (%)			
Άρρεν	13 (45)	12 (41)	
Θήλυ	16 (55)	17 (59)	0.791
Apgar σκορ, μέση (IQR) <sup>1</sup>			
1ο λεπτό	8 (2)	8 (3)	0.089
5ο λεπτό	9 (1)	9 (1)	0.665
Apgar σκορ < 7, n (%)			
1ο λεπτό	5 (17)	9 (31)	0.220
5ο λεπτό	0 (0)	1 (3.5)	0.274
Βάρος Γέννησης (gr)	1302 ± 429	1225 ± 475	0.517
Σωματικό βάρος κατά την έξοδο από τη MENN (gr)	2837 ± 576	2613 ± 385	0.134
Περίμετρος κεφαλής κατά τη γέννηση (cm)	27.5 ± 2.5	27.0 ± 3.2	0.533
Περίμετρος κεφαλής κατά την έξοδο από τη MENN (cm)	33.5 ± 1.4	33.5 ± 1.1	0.915
Κατά την εισαγωγή στη MENN, αρτηριακό αίμα			
pH	7.37 ± 0.01	7.29 ± 0.16	0.033 *

Έλλειμμα βάσης, mmol/L	4.29 ± 1.92	7.22 ± 6.59	0.037 *
pCO <sub>2</sub> , mmHg	38 ± 10	40 ± 10	0.371
HCO <sub>3</sub> , mmol/L	20 ± 2	19 ± 5	0.087
Γαλακτικό οξύ, mmol/L	3.1 ± 1.2	4.8 ± 4.3	0.05 *
Hb, g/dL	16.5 ± 3.0	16.9 ± 2.0	0.438
WBC <sup>2</sup> count, K/μL	11456 ± 9550	9153 ± 5562	0.05 *
CRP <sup>3</sup> , mg/L	1.0 ± 0.2	1.3 ± 1.5	0.998
Θετική CRP κατά την εισαγωγή στη MENN, n (%)	14 (48)	12 (41)	0.597
CRP 2 <sup>ης</sup> ημέρας, mg/L	6.1 ± 8.7	4.9 ± 8.7	0.294
CRP 3 <sup>ης</sup> ημέρας, mg/L	7.6 ± 11.1	6.0 ± 7.5	0.809

<sup>1</sup>IQR: ενδοτεταρτημοριακό εύρος. <sup>2</sup>WBC: λευκά αιμοσφαίρια. <sup>3</sup>CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη.  
\*στατιστικά σημαντικές τιμές.

**Πίνακας 3:** Θεραπευτικές παρεμβάσεις στα νεογνά ασθενείς και μάρτυρες.

Μεταβλητή N	Ομάδα μαρτύρων 29	Ομάδα ασθενών 29	p-Value
Χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα n (%)	21 (72)	22 (76)	0,764
Ινóτροπα , n (%)	14 (48)	20 (69)	0,145

Καφεΐνη, n (%)	26 (90)	25 (86)	0,687
Καρδιοπνευμονική αναζωογόνηση, n (%)	3 (10)	6 (20)	0,277
Θεραπεία σύγκλισης αρτηριακού πόρου, n (%)	8 (28)	8 (28)	>0,99
Παρακεταμόλη	2	0	
Ιβουπροφαίνη	5	7	
Χειρουργική επέμβαση	1	1	
Υψίσυχνος αερισμός, n (%)	4 (14)	7 (24)	0,315
Μετάγγιση, n (%)	3 (10)	7 (24)	0,16

**Πίνακας 4:** Έκβαση νεογνών ασθενών-μαρτύρων

Αποτέλεσμα N	Ομάδα Ελέγχου 29	Ομάδα Υπόθεσης 29	p-Value
Σπασμοί, n (%)	0 (0)	6 (20)	0,01 *
Υπέρταση, n (%)	0 (0)	2 (7)	0,15
Θάνατος, n (%)	0 (0)	5 (17)	0,019 *
Νεογνά με ΠΛ <sup>1</sup>		0/17	
Νεογνά με ΕΑ <sup>2</sup>		5/12	0,015 *
Θετική καλλιέργεια αίματος, n (%)	1 (3,5)	2 (7)	0,553
Θετική καλλιέργεια εγκεφαλονωτιαίου υγρού, n (%)	0 (0)	1 (3,5)	0,274
Κλινική νεογνική σήψη, n (%)	1 (3,5)	2 (7)	0,553

Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, n (%)	21 (72)	23 (79)	0,539
Χρόνια πνευμονοπάθεια, n (%)	6/27 (22)	5/21 (24)	0,897
Νεκρωτική εντεροκολίτιδα, n (%)	6 (20)	1 (3,5)	0,044 *
Αρνητικές ωτοακουστικές εκπομπές, n (%)	7/23 (30)	9/21 (43)	0,392
Αρνητικά αυτόματα προκλητά δυναμικά εγκεφαλικού στελέχους, n (%)	4/11 (36)	4/10 (40)	0,864
Διάρκεια παραμονής στη MENN <sup>3</sup> (ημέρες)	ημέρες 63 ± 48	45 ± 30	0,089

<sup>1</sup>ΠΛ: περικοιλιακή λευκομαλακία; <sup>2</sup>ΕΑ: ενδοκοιλιακή αιμορραγία; <sup>3</sup>MENN: Μονάδα εντατικής νοσηλείας νεογνών;\* στατιστικά σημαντικές τιμές

## 5.4 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα: **IBM SPSS statistics version 23** (IBM Corporation, Somers, NY 10589, USA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα. Ο υπολογισμός του μεγέθους του δείγματος για αυτή τη μελέτη που είναι μέρος ενός ευρύτερου ερευνητικού πρωτοκόλλου βασίστηκε στα επίπεδα του βιοδείκτη S100B, ο οποίος θεωρείται το "χρυσό πρότυπο" των βιοδεικτών για τη νεογνική εγκεφαλική βλάβη. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μητρικών και νεογνικών χαρακτηριστικών για να διασφαλιστεί η επιτυχία της αντιστοίχισης και να εντοπιστούν οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Οι συγκρίσεις των ποιοτικών δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία  $\chi^2$  - τεστ του Pearson. Η κατανομή της συγκέντρωσης της NSE και όλων των άλλων ποσοτικών παραμέτρων ελέγχθηκε για κανονικότητα με τη χρήση του Kolmogorov-Smirnov τεστ. Με βάση την ανάλυση αυτή, χρησιμοποιήθηκε το παραμετρικό t-test του Student για τις συγκρίσεις της συγκέντρωσης της NSE και των άλλων ποσοτικών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων. Η σύγκριση των επιπέδων της NSE εντός των δύο ομάδων κατά τις

τρεις πρώτες ημέρες της ζωής έγινε με τη δοκιμασία ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (ANOVA). Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση υποομάδων μεταξύ των νεογνών μαρτύρων και των νεογνών είτε με ΠΛ είτε με ΕΑ, ώστε να διερευνηθεί εάν τα επίπεδα της NSE διέφεραν στις διάφορες μορφές εγκεφαλικής βλάβης. Εκτός αυτού, τα 5 νεογνά που πέθαναν από την ομάδα των ασθενών συγκρίθηκαν με τα νεογνά μάρτυρες και τα υπόλοιπα νεογνά ασθενείς, προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η NSE μεταβάλλεται σε μια τέτοια δυσμενή νεογνική έκβαση κατά τη διάρκεια των τριών πρώτων ημερών της ζωής. Τέλος, διερευνήθηκε η προγνωστική αξία της NSE ορού όσον αφορά τη νεογνική εγκεφαλική βλάβη σε ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης, θέτοντας ως έκβαση την παρουσία ή μη ΕΑ ΙΙου - ΙVου βαθμού κατά την έξοδο από τη ΜΕΝΝ και ως προγνωστικές μεταβλητές τα επίπεδα της NSE ορού κατά τις τρεις πρώτες ημέρες της ζωής. Επίπεδο πιθανότητας  $p \leq 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

## 6. Αποτελέσματα

Τα επίπεδα της NSE στον ορό ήταν διαθέσιμα για σύγκριση σε 84/87 (96,5%) από τις επιθυμητές χρονικές στιγμές τόσο για την ομάδα ασθενών όσο και για την ομάδα μαρτύρων. Τα δεδομένα που απουσίαζαν οφείλονταν σε ανεπάρκεια ορού για περαιτέρω ανάλυση.

Ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD) των επιπέδων NSE στην ομάδα ασθενών και στην ομάδα μαρτύρων παρουσιάζεται στον Πίνακα 5. Σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων εισαγωγής και της 3ης ημέρας ζωής στην ομάδα μαρτύρων, με τα νεογνά να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα NSE την 1η ημέρα ζωής. Τα επίπεδα βρέθηκε να παρουσιάζουν πτωτική τάση κατά τις επόμενες ημέρες. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην ομάδα ασθενών κατά τις τρεις πρώτες ημέρες ζωής με την NSE να παρουσιάζει σχετικά σταθερά επίπεδα. Η ανάλυση μεταξύ των δύο ομάδων έδειξε ότι η NSE ορού δεν διέφερε σημαντικά κατά τις τρεις πρώτες ημέρες της ζωής. Επιπλέον, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson ( $r$ ) αποκάλυψε ότι τα επίπεδα της NSE δεν παρουσίασαν σημαντική



συσχέτιση με την ηλικία κύησης στα νεογνά μάρτυρες την 1η ημέρα ( $r = -0,026$ ,  $p = 0,899$ ), τη 2η ημέρα ( $r = 0,081$ ,  $p = 0,693$ ) ή την 3η ημέρα ( $r = 0,307$ ,  $p = 0,128$ ) της ζωής.

**Πίνακας 5** . Μέση Τιμή  $\pm$  Σταθερά απόκλισης της NSE (ng/ml) στις δύο ομάδες νεογνών κατά τη διάρκεια των τριών πρώτων ημερών της ζωής.

N	Ομάδα μαρτύρων	Ομάδα ασθενών	p-value
	29	29	
<b>1<sup>η</sup> ημέρα</b>			
Mean ( $\pm$ SD)	5.91 ( $\pm$ 3.68)	5.62 ( $\pm$ 3.11)	<b>0.904</b>
<b>2<sup>η</sup> ημέρα</b>			
Mean ( $\pm$ SD)	4.92 ( $\pm$ 2.14)	5.12 ( $\pm$ 2.8)	<b>0.521</b>
<b>3<sup>η</sup> ημέρα</b>			
Mean ( $\pm$ SD)	3.86 ( $\pm$ 1.68) <sup>a</sup>	5.06 ( $\pm$ 3.49)	<b>0.124</b>

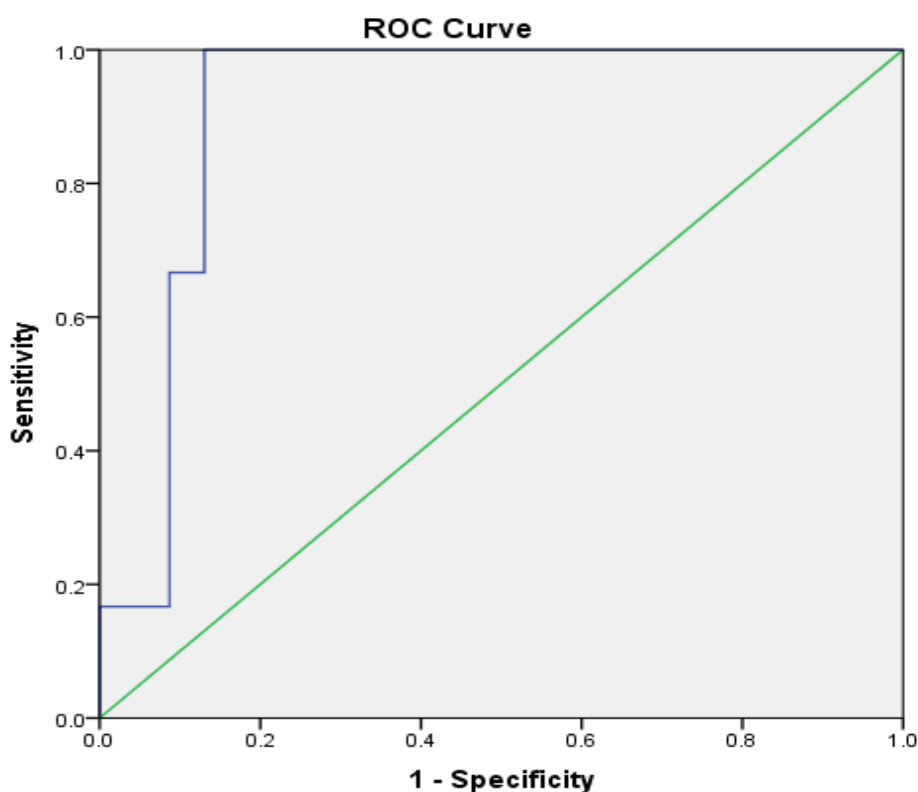
<sup>a</sup> $p=0.02$ , compared to admission in control neonates

Περαιτέρω ανάλυση υποομάδων περιελάμβανε σύγκριση α) μεταξύ των νεογνών μαρτύρων και των νεογνών είτε με ΠΛ είτε με ΕΑ, β) μεταξύ των νεογνών με ΕΑ ( $n=12$ ) και όλων των άλλων νεογνών ( $n=46$ ) και γ) μεταξύ των οκτώ ( $n=8$ ) νεογνών που εμφάνισαν II-IV βαθμό ΕΑ και όλων των άλλων ( $n=50$ ) νεογνών και δ) μεταξύ των πέντε ( $n=5$ ) νεογνών που πέθαναν από την ομάδα των ασθενών και όλων των υπόλοιπων νεογνών ( $n=53$ ).

Η εν λόγω ανάλυση αποκάλυψε ότι τα νεογνά με ΕΑ είχαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση NSE στον ορό τόσο σε σχέση με τους μάρτυρες όσο και σε σχέση με τα νεογνά με ΠΛ, την 3η ημέρα ζωής ( $p=0,014$  και  $p=0,033$  αντίστοιχα). Το ίδιο πρότυπο την 3η ημέρα ζωής παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ των νεογνών με ΕΑ και όλων των άλλων νεογνών ( $p=0,003$ ), μεταξύ των νεογνών με ΕΑ II-IV βαθμού και όλων των άλλων νεογνών ( $p=0,003$ ) και μεταξύ των 5 νεογνών που πέθαναν και όλων των άλλων νεογνών την 3η ημέρα ζωής ( $p<0,001$ ).

Η προγνωστική αξία της NSE ορού κατά τις 3 πρώτες ημέρες της ζωής αξιολογήθηκε σε ένα πολυμεταβλητό υπό συνθήκη μοντέλο λογιστικής

παλινδρόμησης, θέτοντας ως έκβαση την παρουσία ή μη EA II-IV βαθμού κατά την έξοδο από τη MENN και ως προγνωστικές μεταβλητές τα επίπεδα της NSE ορού κατά τις 3 πρώτες ημέρες της ζωής. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εξαρτημένης εμπρόσθιας βηματικής παλινδρόμησης, η NSE ορού την 1η και την 3η ημέρα ζωής ήταν οι καλύτεροι προγνωστικοί παράγοντες για τη δυσμενή νεογνική έκβαση ( $p=0,002$  για το μοντέλο,  $p=0,033$  και  $p=0,017$  για την NSE ορού την 1η και την 3η ημέρα και  $p=0,013$  για τη σταθερά). Πιο συγκεκριμένα, η καμπύλη ROC για την NSE ορού την 3η ημέρα ζωής έδωσε υψηλή προγνωστική αξία με περιοχή κάτω από την καμπύλη στο 91,3% ( $p=0,001$ , 95%CI: 83,4% - 99,2%). Σύμφωνα με την ανάλυση της καμπύλης ROC για τιμή αποκοπής (cut-off value) 5,43 ng/ml, η ευαισθησία ήταν 100% και η ειδικότητα 87% (Σχήμα 5.2).



**Σχήμα 5.2:** Καμπύλη ROC της προγνωστικής αξίας της συγκέντρωσης της NSE στον ορό των πρόωρων νεογνών με EA II- IV βαθμού κατά την 3η ημέρα ζωής σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα νεογνά. Περιοχή κάτω από την καμπύλη 91.3%,  $p=0.001$ , 95% CI: 83.4–99.2%.

## 7. Συζήτηση - Συμπεράσματα - Προοπτικές

### 7.1 Συζήτηση

Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν βιοδείκτες ή προγνωστικά μοντέλα με ικανοποιητική αποτελεσματικότητα ως προς την πρώιμη ανίχνευση πρόωρων νεογνών που πρόκειται να αναπτύξουν εγκεφαλική βλάβη μεταγεννητικά<sup>16</sup>. Επίσης, το υπερηχογράφημα και η μαγνητική τομογραφία δεν επαρκούν για την πρόβλεψη της πρόγνωσης της εγκεφαλικής βλάβης κατά την πρώιμη κρίσιμη περίοδο της ζωής των πρόωρων βρεφών. Το υπερηχογράφημα εγκεφάλου θεωρείται ως ο “χρυσός κανόνας” για τη διάγνωση, αλλά όχι την πρόβλεψη της ΠΛ και της ΕΑ, ειδικά στα πρόωρα νεογνά<sup>47,48</sup>. Η μαγνητική τομογραφία έχει επίσης αποδειχθεί ότι παρέχει ακριβή εικόνα της έκτασης της ΠΛ και ότι συμβάλλει στην πρόγνωση νευροαναπτυξιακών διαταραχών που έχουν αρνητικό αντίκτυπο στη μετέπειτα ζωή. Ωστόσο, παρουσιάζει και αυτή περιορισμένη προγνωστική αξία τις πρώτες ημέρες ζωής στα πρόωρα νεογνά<sup>49</sup>.

Ο έγκαιρος εντοπισμός των πρόωρων νεογνών που πρόκειται να αναπτύξουν εγκεφαλική βλάβη τις πρώτες ημέρες της ζωής είναι ζωτικής σημασίας, καθώς η έγκαιρη παρέμβαση ενδεχομένως να μειώσει τις δυσμενείς εκβάσεις και τις νευροαναπτυξιακές διαταραχές. Τα τελευταία χρόνια βιοδείκτες έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά την προγνωστική τους αξία, αλλά κανένας ωστόσο μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί χρήσιμος στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Η NSE, παρότι έχει μελετηθεί σε νεογνά με υποξική ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια, εμφανίζει περιορισμένα ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την ΠΛ και την ΕΑ. Πιο συγκεκριμένα, οι Celtic et al<sup>17</sup>, μελέτησαν την NSE σε τελειόμηνα νεογνά με ΥΙΕ και διαπίστωσαν ότι τα επίπεδά της στον ορό των ασθενών-νεογνών ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτά των υγιών-νεογνών. Τα δυο δείγματα είχαν ληφθεί μεταξύ 4-48 ωρών και 5-7 ημερών αντίστοιχα. Τα υψηλά επίπεδα της NSE στο πρώτο δείγμα ορού μπορούσαν να συσχετιστούν με το βαθμό της ΥΙΕ και επιπροσθέτως μπορούσαν να διαχωρίσουν τα νεογνά με φτωχή πρόγνωση. Ακόμα, αυξημένα επίπεδα της NSE στον ορό νεογνών με ΥΙΕ, κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους με

θεραπευτική υποθερμία, συσχετίστηκαν με ανεπιθύμητες νευροαναπτυξιακές εκβάσεις στους 15 μήνες ζωής<sup>18</sup>. Οι Nagdyma et al.<sup>19</sup> αντιθέτως, δεν διαπίστωσαν καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις της NSE στον ορό νεογνών με ήπια ή καθόλου ΥΙΕ σε σχέση με νεογνά που διεγνώστηκαν με μέτρια ή σοβαρή ΥΙΕ. Τέλος, η NSE έχει επίσης μελετηθεί στο ΕΝΥ νεογνών με ΥΙΕ, με υψηλότερες συγκεντρώσεις να υποδηλώνουν πιο σοβαρού βαθμού ΥΙΕ<sup>35</sup>.

Στην παρούσα μελέτη, η NSE ορού φαίνεται, για πρώτη φορά, να αποτελεί έναν πολύ ελπιδοφόρο βιοδείκτη για την έγκαιρη ανίχνευση πρόωρων νεογνών υψηλού κινδύνου να αναπτύξουν εγκεφαλική βλάβη. Στα αποτελέσματα της μελέτης φάνηκε ότι η NSE ορού την 1η και την 3η ημέρα ζωής αποτέλεσαν τους καλύτερους προγνωστικούς παράγοντες για τη δυσμενή έκβαση των νεογνών, ενώ η καμπύλη ROC για την 3η ημέρα ζωής έδωσε υψηλή προγνωστική αξία με περιοχή κάτω από την καμπύλη στο 91,3%. Παρατηρείται λοιπόν ότι η νέκρωση ή η απόπτωση των νευρικών κυττάρων οδηγεί στην απελευθέρωση της NSE στην κυκλοφορία.

Σε μια προοπτική μελέτη κοόρτης σε πρόωρα νεογνά με ηλικία κύησης <34 εβδομάδων, η οποία πραγματοποιήθηκε από ελληνική ερευνητική ομάδα το 2015<sup>35</sup>, συλλέγησαν δείγματα περιφερικού αίματος τις ημέρες 1, 3, 9, 18 και 45 της ζωής για τη μέτρηση των επιπέδων της NSE. Τα νεογνά είχαν επιπλακεί με ενδοκοιλιακή αιμορραγία βαθμού III/IV, κυστική περικοιλιακή λευκομαλακία ή έμφρακτο. Στην μελέτη αυτή, τα επίπεδα της NSE ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα ασθενών σε σύγκριση με τους μάρτυρες την 18η ημέρα της ζωής, ενώ τα επίπεδα στην ομάδα μαρτύρων μειωνόντουσαν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου, εύρημα που συνάδει και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Τέλος, οι Wang et al<sup>50</sup>, μελέτησαν την NSE σε περιφερικό φλεβικό αίμα, σε νεογνά με ηλικία κύησης μεταξύ 28 και 36 εβδομάδων που διεγνώσθησαν με ΠΛ και ανέδειξαν ότι τα νεογνά-ασθενείς είχαν χαμηλότερα επίπεδα NSE την 7η και 14η ημέρα ζωής σε σχέση με τα νεογνά-μάρτυρες. Καμία ερευνητική εργασία δεν έχει επί του παρόντος παρουσιάσει αποτελέσματα που να αφορούν διαδοχικές μετρήσεις της NSE στον ορό πρόωρων νεογνών κατά τις 3 πρώτες μέρες ζωής και αυτό ενισχύει την πρωτοτυπία της μελέτης αυτής αλλά δυσχαιρένει και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της με άλλες μελέτες.

Πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης επιπροσθέτως αποτελεί το γεγονός ότι οι δύο ομάδες δεν διέφεραν σημαντικά τόσο ως προς τη συχνότητα επιπλοκών προ και μετά του τοκετού όσο και ως προς τις θεραπευτικές παρεμβάσεις στην έγκυο και το νεογνό. Είναι γνωστό για παράδειγμα, ότι η χορήγηση θειϊκού μαγνησίου και κορτικοστεροειδών προγεννητικά είναι ισχυροί προστατευτικοί παράγοντες για την εγκεφαλική βλάβη και επομένως σημαντική διαφορά ως προς αυτούς τους παράγοντες μεταξύ των δύο ομάδων υπό μελέτη, θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα της NSE. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το νευροπροστατευτικό αποτέλεσμα από την προγεννητική χορήγηση κορτικοστεροειδών υπό την μορφή της βηταμεθαζόνης, έχει επισημανθεί και από προγενέστερες μελέτες<sup>51</sup>, το οποίο επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι νεογνά που οι μητέρες τους έλαβαν προγεννητικά βηταμεθαζόνη εμφάνισαν συχνότερα χαμηλού βαθμού ΠΛ, σε αντίθεση με τα νεογνά εκείνα των οποίων οι μητέρες δεν έλαβαν προγεννητικά βηταμεθαζόνη και εμφάνισαν συχνότερα ΕΑ και νεογνικό θάνατο.

Αξίζει να αναφερθεί ότι γενικά υπάρχει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ μελετών που διερευνούν τον βιοδείκτη NSE όσον αφορά το δείγμα της μελέτης και τις μορφές της εγκεφαλικής βλάβης που συμπεριλαμβάνονται. Το γεγονός αυτό καθιστά πολλές φορές δύσκολη την απευθείας σύγκριση των διαφορετικών μελετών και ακόμα δυσκολότερη την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την προγνωστική αξία της NSE.

Συμπερασματικά, αν και η παρούσα μελέτη είχε κάποια πλεονεκτήματα, όπως η προοπτική διαχρονική μεθοδολογία της με επαναλαμβανόμενα δείγματα αλλά και η σαφώς καθορισμένη παθολογία εγκεφαλικής βλάβης στην ομάδα ασθενών, με νεογνά που παρουσίασαν είτε ΠΛ είτε ΕΑ, αλλά όχι συνύπαρξη αυτών, είχε εντούτοις και κάποιους περιορισμούς. Ένας κύριος περιορισμός, ήταν ο μικρός αριθμός συμμετεχόντων και στις δυο ομάδες της μελέτης, κάτι που θα μπορούσε να εξηγήσει την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων ασθενών και μαρτύρων. Άλλος περιορισμός ήταν ο ιδιαίτερα μικρός αριθμός νεογνών με ανεπιθύμητο περιγεννητικό αποτέλεσμα, όπως θάνατος ή ΕΑ II-IV βαθμού. Ωστόσο, μετά την ανάλυση αποκαλύφθηκε ότι τα νεογνά με ΕΑ είχαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση NSE στον ορό

τόσο σε σχέση με νεογνά που απεβίωσαν όσο και σε σχέση με νεογνά που ανέπτυξαν ΕΑ ΙΙ-ΙV βαθμού.

Συνοψίζοντας, η δυνατότητα πρόβλεψης της εγκεφαλικής βλάβης στα πρόωρα νεογνά κατά τις πρώτες ημέρες της ζωής, θα επιτρέψει στη διεπιστημονική ομάδα να παρέμβει νωρίτερα προκειμένου να βελτιώσει τη νεογνική έκβαση.

## **7.2 Συμπεράσματα**

Συμπεραίνεται ότι:

1. Η NSE στον ορό πρόωρων νεογνών δεν διαφέρει σημαντικά κατά τις τρεις πρώτες ημέρες της ζωής μεταξύ των φυσιολογικών νεογνών και των νεογνών με εγκεφαλική βλάβη (ΠΛ ή ΕΑ).
2. Η NSE στον ορό πρόωρων νεογνών με εγκεφαλική αιμορραγία έχει υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα νεογνά μάρτυρες και με τα νεογνά με ΠΛ, την 3η ημέρα ζωής.
3. Η NSE στον ορό κατά την 1η και 3η ημέρα ζωής μπορεί να διακρίνει αποτελεσματικά τα πρόωρα νεογνά τα οποία θα αναπτύξουν μετέπειτα εγκεφαλική αιμορραγία ΙΙ- ΙV βαθμού.
4. Η προγεννητική χορήγηση βηταμεθαζόνης προστατεύει τα πρόωρα νεογνά από εγκεφαλική αιμορραγία.

## **7.3 Προοπτικές**

Πιθανές μελλοντικές κατευθύνσεις πάνω στην παρούσα έρευνα είναι οι εξής:

1. Η διενέργεια μεγαλύτερων προοπτικών μελετών με συλλογή πολλαπλών δειγμάτων ορού από πρόωρα νεογνά που ανέπτυξαν εγκεφαλική βλάβη, ιδιαίτερα σοβαρού βαθμού έτσι ώστε να αξιολογηθεί η NSE ως ένας από τους πιθανούς νέους βιοδείκτες δημιουργίας ενός αποτελεσματικού προγνωστικού μοντέλου της εγκεφαλικής βλάβης.

2. Η μέτρηση των επιπέδων και της μεταβολής της NSE προοπτικά σε άλλα βιολογικά υγρά πρόωρων νεογνών, όπως ούρα ή σίελος.
3. Η πιθανή συσχέτιση της συγκέντρωσης της NSE με τις συγκεντρώσεις άλλων βιοχημικών δεικτών ενδεικτικών εγκεφαλικής βλάβης.
4. Η αξιολόγηση της μεταβολής των επιπέδων της NSE σε πρόωρα νεογνά υψηλού κινδύνου να αναπτύξουν εγκεφαλική βλάβη ύστερα από παροχή ή μη νευροπροστατευτικής φροντίδας.

## Βιβλιογραφία

1. Gomella TL, Neonatology, 7<sup>th</sup> ed, McGraw Hill Education, 2013.
2. Jaesch William H, Avery Ellen M, Avery's εγχειρίδιο νεογνολογίας, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 2005.
3. Cutland CL, Lackritz EM, Mallett-Moore T, et al. Low birth weight: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of maternal immunization safety data. *Vaccine*. 2017;35(48 Pt A):6492-6500. doi:10.1016/j.vaccine.2017.01.049
4. Quinn JA, Munoz FM, Gonik B, et al. Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safetydata. *Vaccine*.2016;34(49):6047-6056. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.045
5. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health*. 2019;7(1):e37-e46. doi:10.1016/S2214-109X(18)30451-0
6. Euro-Peristat Project. European Perinatal Health Report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015. November 2018. Available at [www.europeristat.com](http://www.europeristat.com)
7. Soltani M, Tabatabaee HR, Saeidinejat S, et al. Assessing the risk factors before pregnancy of preterm births in Iran: a population-based case-control study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019;19(1):57. Published 2019 Feb 6. doi:10.1186/s12884-019-2183-0
8. Αντσακλής Α, Μαιευτική και Γυναικολογία, Β' Έκδοση, Εκδόσεις Παρισιάνου, 2011.
9. Ξύδης Β, Μελέτη με μαγνητική τομογραφία των δομών του υπερσκληνιδίου χώρου και του οπίσθιου κρανιακού βόθρου σε βρέφη με και χωρίς περικοιλιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια, διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα, 2007.
10. Gano D, White Matter Injury in Premature Newborns, *Neonatal Netw*. 2016;35(2): 73-7.
11. Schleussner E, The prevention, diagnosis and treatment of premature labor, *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(13): 227–36.



12. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health*. 2019;7(1):e37-e46. doi:10.1016/S2214-109X(18)30451-0
13. Volpe JJ, Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant, *Pediatr Res*. 2001 Nov;50(5): 553-62.
14. Van Tilborg E, de Theije CGM, van Hal M, et al. Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*. 2018;66(2):221-238. doi:10.1002/glia.23256
15. Florio P, Abella R, Marinoni E, et al. Biochemical markers of perinatal brain damage. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010;2(1):47-72. Published 2010 Jan 1. doi:10.2741/s45
16. Wang KK, Yang Z, Zhu T, et al. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(2):165-180. doi:10.1080/14737159.2018.1428089
17. Celtic C, Acunaş B, Oner N, Pala O. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev*. 2004;26(6):398-402. doi:10.1016/j.braindev.2003.12.007
18. Massaro AN, Chang T, Baumgart S, McCarter R, Nelson KB, Glass P. Biomarkers S100B and neuron-specific enolase predict outcome in hypothermia-treated encephalopathic newborns\*. *Pediatr Crit Care Med*. 2014;15(7):615-622. doi:10.1097/PCC.000000000000155
19. Nagdyman N, Kömen W, Ko HK, Müller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res*. 2001;49(4):502-506. doi:10.1203/00006450-200104000-00011
20. Giuseppe D, Sergio C, Pasqua B, et al. Perinatal asphyxia in preterm neonates leads to serum changes in protein S-100 and neuron specific enolase. *Curr Neurovasc Res*. 2009;6(2):110-116. doi:10.2174/156720209788185614
21. Efstathiou N, Soubasi V, Koliakos G, et al. Mobilization of circulating progenitor cells following brain injury in premature neonates could be indicative of an endogenous repair process. A pilot study. *Hippokratia*. 2015;19(2):141-147.

22. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192(2):553-560. doi:10.1006/bbrc.1993.1451
23. Florio P, Luisi S, Bruschetti M, et al. Cerebrospinal fluid activin a measurement in asphyxiated full-term newborns predicts hypoxic ischemic encephalopathy. *Clin Chem.* 2004;50(12):2386-2389. doi:10.1373/clinchem.2004.035774
24. Mandel AL, Ozdener H, Utermohlen V. Identification of pro- and mature brain-derived neurotrophic factor in human saliva. *Arch Oral Biol.* 2009;54(7):689-695. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.04.005
25. Καϊκη-Αστάρια Α, Άσκηση και νευροβιολογικοί μηχανισμοί της μνήμης. *Ελληνική Ιατρική.* 2009; 75(2):112-123.
26. Chouthai NS, Sampers J, Desai N, Smith GM. Changes in neurotrophin levels in umbilical cord blood from infants with different gestational ages and clinical conditions. *Pediatr Res.* 2003;53(6):965-969. doi:10.1203/01.PDR.0000061588.39652.26
27. Imam SS, Gad GI, Atef SH, Shawky MA. Cord blood brain derived neurotrophic factor: diagnostic and prognostic marker in fullterm newborns with perinatal asphyxia. *Pak J Biol Sci.* 2009;12(23):1498-1504. doi:10.3923/pjbs.2009.1498.1504
28. Lv HY, Wang QL, Chen HY, You YJ, Ren PS, Li LX. Study on serum Tau protein level and neurodevelopmental outcome of placental abruption with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;33(23):3887-3893. doi:10.1080/14767058.2019.1588878
29. Lv HY, Wu SJ, Gu XL, et al. Predictive Value of Neurodevelopmental Outcome and Serum Tau Protein Level in Neonates with Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Clin Lab.* 2017;63(7):1153-1162. doi:10.7754/Clin.Lab.2017.170103
30. Okumus N, Turkyilmaz C, Onal EE, et al. Tau and S100B proteins as biochemical markers of bilirubin-induced neurotoxicity in term neonates. *Pediatr Neurol.* 2008;39(4):245-252. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2008.07.004

31. Bishop P, Rocca D, Henley JM. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J.* 2016;473(16):2453-2462. doi:10.1042/BCJ20160082
32. Mir IN, Chalak LF. Serum biomarkers to evaluate the integrity of the neurovascular unit. *Early Hum Dev.* 2014;90(10):707-711. doi:10.1016/j.earlhumdev.2014.06.010
33. Douglas-Escobar MV, Heaton SC, Bennett J, et al. UCH-L1 and GFAP Serum Levels in Neonates with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Single Center Pilot Study. *Front Neurol.* 2014;5:273. Published 2014 Dec 19. doi:10.3389/fneur.2014.00273
34. Douglas-Escobar M, Yang C, Bennett J, et al. A pilot study of novel biomarkers in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res.* 2010;68(6):531-536. doi:10.1203/PDR.0b013e3181f85a03
35. Lv H, Wang Q, Wu S, et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta.* 2015;450:282-297. doi:10.1016/j.cca.2015.08.021
36. Looney AM, Walsh BH, Moloney G, et al. Downregulation of Umbilical Cord Blood Levels of miR-374a in Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr.* 2015;167(2):269-73.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2015.04.060
37. Cho KHT, Xu B, Blenkiron C, Fraser M. Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Front Physiol.* 2019;10:227. Published 2019 Mar 28. doi:10.3389/fphys.2019.00227
38. Graham EM, Burd I, Everett AD, Northington FJ. Blood Biomarkers for Evaluation of Perinatal Encephalopathy. *Front Pharmacol.* 2016;7:196. Published 2016 Jul 13. doi:10.3389/fphar.2016.00196
39. Portelli M, Baron B. Clinical Presentation of Preeclampsia and the Diagnostic Value of Proteins and Their Methylation Products as Biomarkers in Pregnant Women with Preeclampsia and Their Newborns. *J Pregnancy.* 2018;2018:2632637. Published 2018 Jun 28. doi:10.1155/2018/263263
40. Mushtaq E, Parveen S, Shaheen F, et al. Perinatal Outcome in Patients with Isolated Oligohydramnios at Term: A Prospective Study. *J Preg Child Health* 2017; 4:332.

41. McNeil AR, Stanford PE. Reporting Thyroid Function Tests in Pregnancy. *Clin Biochem Rev.* 2015;36(4):109-126.
42. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, Metzger BE, Gabbe SG, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care.* 2010;33(3):676-682. doi:10.2337/dc09-1848
43. Romero R, Chaemsaihong P, Korzeniewski SJ, et al. Clinical chorioamnionitis at term III: how well do clinical criteria perform in the identification of proven intra-amniotic infection?. *J Perinat Med.* 2016;44(1):23-32. doi:10.1515/jpm-2015-0044
44. Buck Louis GM, Grewal J, Albert PS, et al. Racial/ethnic standards for fetal growth: the NICHD Fetal Growth Studies. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(4):449.e1-449.e41. doi:10.1016/j.ajog.2015.08.032
45. Ciobanu A, Wright A, Syngelaki A, Wright D, Akolekar R, Nicolaides KH. Fetal Medicine Foundation reference ranges for umbilical artery and middle cerebral artery pulsatility index and cerebroplacental ratio. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;53(4):465-472. doi:10.1002/uog.20157
46. EFCNI, Dudink J, Hellström-Westas L et al., European Standards of Care for Newborn Health: Neurological monitoring in the high-risk infant: ultrasound and MRI scanning (2018).
47. Hinojosa-Rodríguez M, Harmony T, Carrillo-Prado C, Van Hornb JD, Irimiab A, Torgerson C et al, Clinical neuroimaging in the preterm infant: Diagnosis and prognosis, *NeuroImage: Clinical* 16 (2017) 355-368.
48. Smyser CD, Wheelock MD, Limbrick DD Jr, Neil JJ, Neonatal brain injury and aberrant connectivity, *Neuroimage.* 2019 Jan 15;185: 609-623.
49. Sewell EK, Andescavage NN. Neuroimaging for Neurodevelopmental Prognostication in High-Risk Neonates. *Clin Perinatol.* 2018; 45(3):421-437.
50. Wang X, Tian X, Ma J, Zheng J, Clinical efficacy of gangliosides on premature infants suffering from white matter damage and its effect on the levels of IL-6, NSE and S100 $\beta$ . *Exp Ther Med.* 2019 Jul;18(1):63-68.
51. Stewart A, Tekes A, Huisman TA, Jennings JM, Allen MC, Northington FJ et al, Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for periventricular white

matter injury, Am J Obstet Gynecol. 2013 Jul;209(1):27.e1-7.