

ARTICOL ORIGINAL

Rolul factorului ciliar neurotrofic în dezvoltarea tulburărilor reziduale la copii cu leziuni cerebrale perinatale: studiu prospectiv, de cohortă

Svetlana Hadjiu^{1*}

¹Departamentul de pediatrie, Clinica de neuropediatrie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Autor corespondent:

Svetlana Hadjiu, dr. șt. med., conf. univ.

Departamentul de pediatrie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004
e-mail: svetlana.hadjiu@usmf.md

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Se presupune că factorul ciliar neurotrofic (CNTF), parte a unei subfamilii a citokinelor, ar fi esențial pentru dezvoltarea normală a SNC și supraviețuirea celulelor nervoase (în special, a motoneuronilor) și celor musculare după leziuni. Actualmente, se studiază intensiv perspectivele farmacologice ale CNTF în tratarea unor afecțiuni neurologice.

Ipoteza de cercetare

Nivelul seric al CNTF la copiii cu leziuni cerebrale perinatale posedă un rol important în dezvoltarea afecțiunilor reziduale ale sistemului nervos central.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

S-a demonstrat că nivelele de CNTF sunt reduse semnificativ la copii cu leziuni cerebrale perinatale (LCP) și coreleză cu modificările neurofiziologice și neuroimaginești. S-a constatat, că CNTF manifestă efect neuroprotectiv și ar putea avea atât o perspectivă terapeutică în LCP, cât și de biomarker.

Rezumat

Introducere. Modificările biochimice și fiziopatologice care au loc în creierul neonatal în leziunile cerebrale perinatale sunt complexe. În ultimii ani, se fac cercetări importante asupra factorilor neurotrofici, deoarece procesele cerebrale fundamentale sunt legate de neuroregenerare (neurotroficitate, neuroprotecție, neuroplasticitate și neurogeneză).

Material și metode. Studiu prospectiv, de cohortă. Au fost cercetați 75 de copii cu encefalopatie neonatală de geneză hipoxicico-ischemică, repartizați în 3 loturi a către 25 de copii, în

ARTICOL ORIGINAL

The role of the ciliary neurotrophic factor in the development of residual disorders in children with perinatal cerebral lesions: a cohort, prospective study

Svetlana Hadjiu^{1*}

¹Department of pediatrics, Neuropediatrics Clinic, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Corresponding author:

Svetlana Hadjiu, PhD, associate professor

Department of pediatrics

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy
165, Stefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004
e-mail: svetlana.hadjiu@usmf.md

What is not known yet, about the topic

It is supposed that the ciliary neurotrophic factor (CNTF), which is a part of a subfamily of cytokines, is essential for normal development of the CNS, neuronal cell survival (especially of motor neurons) and muscular cell survival after lesions. Today, pharmacologic perspectives of CNTF in treating neurologic diseases is being studied intensely.

Research hypothesis

Seric level of CNTF in children with perinatal cerebral lesions plays an important role in the development of residual disorders of the CNS.

Article's added novelty on this scientific topic

It has been demonstrated that CNTF levels are significantly reduced in children with perinatal cerebral lesions (PCL) and correlates with neurophysiological and neuro-imaging modifications. It has been established that CNTF manifests a neuroprotective effect and could have both therapeutic perspective in PCL and biomarker perspective as well.

Abstract

Introduction. Biochemical and physiopathological modifications that occur in the neonatal brain in perinatal cerebral lesions are complex. In the past few years, important research are being held regarding neurotrophic factors because fundamental cerebral processes are related to neuroregeneration (neurotrophicity, neuroprotection, neuroplasticity and neurogenesis).

Material and methods. Cohort, prospective study. Seventy-five children with neonatal encephalopathy of ischemic-

funcție de gradul de severitate a bolii; referință – 25 de copii practic sănătoși. Examinările au cuprins: aprecierea CNTF seric la vîrstă de 1-3 luni și de 12 luni, EEG și imagistica cerebrală. Studiată corelația dintre CNTF seric și gradele de leziuni cerebrale perinatale, precum și cu tulburările reziduale după aceste leziuni vs. copiii sănătoși.

Rezultate. Au fost constatate concentrații serice scăzute de CNTF la copiii cu vîrstă de 3 luni care, ulterior, au dezvoltat tulburări reziduale (TR) ale SNC: TR majore (3,04 [95CI: 2,2-3,88] pg/mL) și minore (5,15 [95CI: 4,6-5,7] pg/mL), comparativ cu cei practic sănătoși (8,1 [95CI: 7,5-8,7] pg/mL), $p<0,001$. Valorile absolute de CNTF coreleză negativ cu gradul de severitate al LCP ($r_{xy}=-0,921$), cu traseele epileptice pe EEG ($r_{xy}=-0,74$; $p<0,01$), cu modificările structurale ale țesutului cerebral ($r_{xy}=-0,71$, $p<0,01$). La vîrstă de 12 luni, s-a observat o creștere semnificativă a nivelelor de CNTF (cu 25,9%) la copiii cu LCP severe, superioară în valori relative, în comparație cu copiii sănătoși (15,6%). Cu toate acestea, nivelurile serice de CNTF în valori absolute rămâneau scăzute ($r_{xy}=0,875$, $p<0,001$).

Concluzii. Concentrațiile serice de CNTF sunt scăzute semnificativ la copiii cu LCP, cu vîrstă între 1-3 și 12 luni, comparativ cu copiii practic sănătoși și coreleză cu modificările neurofiziologice și neuroimagistice. Odată cu creșterea copilului, cresc concentrațiile serice de CNTF, notificând implicarea sa în procesele de neurodezvoltare atât la copilul practic sănătos, cât și la cel cu LCP. Creșterea semnificativă a nivelurilor de CNTF la copiii cu paralizie cerebrală notifică importanța sa în procesele de neuroregenerare, iar la cei cu epilepsie – implicarea în procesele de epileptogeneză. Aceste rezultate sugerează necesitatea terapiilor neuroprotectoare (administrarea de CNTF) la etapele precoce ale leziunii.

Cuvinte cheie: encefalopatie neonatală, leziuni cerebrale perinatale, hipoxie-ischemie cerebrală, tulburări reziduale, factori neurotrofici, factor ciliar neurotrofic, CNTF.

Introducere

În lucrarea lui D. Mureșanu, se constată următoarele: „*Descoperirea factorilor neurotrofici (FN) a oferit o dimensiune în plus capacitatea de înțelegere a proceselor de proliferare, creștere, diferențiere și transformare a celulelor din SNC în cursul ontogenezei și în cursul diverselor procese patologice*” [1].

Concluziile unui sir de studii biomedicale experimentale proiectează efectele factorului ciliar neurotrofic (CNTF) asupra neurogenezei și implicarea lui în diferențierea celulelor stem-neuronale (NSCs), neuronilor și neurogliei, argumentând importanța CNTF în tratarea diferitor boli ale sistemului nervos central și periferic [2-4].

Rezultatele unor studii experimentale sugerează că CNTF și receptorul său (CNTFR), ar putea avea mai multe efecte asupra SNC. Studiul, realizat de Wagener E. et al. (2014) pe CNTF uman, a constatat că CNTF poate forma legături cu mai mulți receptori, având un potențial terapeutic mare în bolile neurodegenerative și în obezitate [2]. Astfel, CNTF acționează ca și o citokină de protecție împotriva mai multor leziuni neuronale.

hypoxic genesis were studied, they were divided in 3 groups of 25 children, depending on the severity of the disease; the control group was made of 25 almost healthy children. Examinations included: seric CNTF appreciation at the age of 1-3 months and 12 months, EEG and cerebral imagistics. Correlation between seric CNTF and the severity of perinatal cerebral lesions was studied, as well as residual disorders remained after these lesions compared to healthy children.

Results. Low seric concentrations of CNTF were found in children of 1-3 months old, that, eventually, developed residual disorders (RD) of CNS: major RD (3.04 [95CI: 2.2-3.88] pg/mL) and minor RD (5.15 [95CI: 4.6-5.7] pg/mL), compared to healthy children (8.1 [95CI: 7.5-8.7] pg/mL), $p<0.001$. Absolute values of CNTF correlate negatively with the severity level of PCL ($r_{xy}=-0.921$), with EEG epileptic track ($r_{xy}=-0.74$; $p<0.01$), with structural modifications of the cerebral tissue ($r_{xy}=-0.71$, $p<0.01$). At the age of 12 months, a rise in seric levels of CNTF has been observed (with 25.9%) in children with severe PCL, superior in relative values when compared with healthy children (15.6%). However, seric levels of CNTF in absolute values remained low ($r_{xy}=0.975$, $p<0.001$).

Conclusions. Seric concentrations of CNTF are significantly low in children with PCL, with the age ranging between 1-3 months and 12 months, compared to healthy children and correlates with neurophysiological and neuro-imaginistic modifications. With children's growth, seric levels of CNTF rise as well, underlining its implication in processes of neural development in both healthy and children with PCL. Significant rise of CNTF levels in children with cerebral palsy shows its importance in neuroregeneration processes, and in children with epilepsy – its importance in neuroregeneration processes. These results suggest the need of neuroprotective therapies (administration of CNTF) in early stages of the lesions.

Keywords: neonatal encephalopathy, perinatal cerebral lesions, cerebral hypoxic ischemia, residual disorders, neurotrophic factors, ciliary neurotrophic factor, CNTF.

Introduction

In the work of D. Muresanu, the following is stated: “*The discovering of the neurotrophic factors (NF) offered a plus dimension in our capacity of understanding of proliferative, growing, differentiation and transformation processes of cells in the CNS during ontogenesis and during various pathological processes*” [1].

Conclusions of many biomedical experimental studies show the effects of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) on neurogenesis and its implication in differentiation of neuronal stem-cells (NSCs), neurons and neuroglia, underlining the importance of CNTF in treating different diseases of central and peripheral nervous systems [2-4].

Results of certain experimental studies suggest that CNTF and its receptor (CNTFR) could have more effects on CNS. The study made by Wagener E. et al. (2014) on human CNTF showed that CNTF can bind to several receptors, thus having a great therapeutic potential in treating neurodegenerative diseases and obesity [2]. Thereby, CNTF acts like a protec-

le și își exercită efectele sale asupra mușchilor și neuronilor, protejând mușchii scheletici împotriva leziunilor, ameliorând supraviețuirea neuronilor după leziuni (fosforilează tirosina); la fel, reduce atrofia indușă de denervare a mușchilor scheletici [5]. De asemenea, promovează diferențierea celulelor bipolare și celulelor gliale [6], îmbunătățește oligodendrogenza (prin favorizarea celulelor precursorale ale oligodendrocitelor), supraviețuirea și diferențierea *in vivo* [7], promovează proliferarea și diferențierea celulelor stem-neuronale (NSCs) [8].

Scharfman H. et al. (2002) [9]; Brigadski T., Lebmann V. (2014) [10], au remarcat faptul că leziunile celulelor nervoase ale mamiferelor induc urmări ireversibile, deoarece aceste celule nu sunt capabile să regenerze. Perturbarea funcțiilor axonilor sau neuronilor, corelate cu severitatea leziunii, realizează întreuperea conexiunilor pentru transmiterea informației de la celulă la celulă. Cu toate acestea, conform unor studii, sporește numărul dovezilor în favoarea mecanismului de regenerare și de restabilire a conexiunilor interneuronale la adult în urma leziunilor provocate în anumite condiții experimentale [9, 10]. Astfel de rezultate admit posibilitatea de regenerare a conexiunilor sinaptice în anumite zone ale SNC în urma unor leziuni cerebrale.

Mai multe studii relatează beneficiile tratamentului cu CNTF în salvarea numărului și funcției motoneuronilor [11, 12]. Un studiu, realizat pe șoareci cu ischemie cerebrală focală, sugerează că CNTF mediază accidentul vascular cerebral. Stimularea farmacologică continuă cu CNTF ar putea fi o strategie terapeutică bună pentru înlocuirea celulelor după AVC [12].

Deși, în ultimii ani, mai multe descoperiri importante au fost obținute cu privire la epidemiologia, diagnosticul și mecanismul LCP cauzate de EN [13, 14], fiziopatologia și managementul acestora rămân, în cea mai mare parte, controversate [15]. În pofida numarului mic de cercetări experimentale și date clinice pe modele de animale și umane, care sprijină terapiile neuroprotectoare în variate boli ale SNC, calea finală comună de prevenție a distrucțiilor neuronale în LCP rămâne, deocamdată, neclară.

Scopul principal al studiului a fost aprecierea nivelului seric al CNTF la copiii cu leziuni cerebrale perinatale pentru estimarea rolului său în dezvoltarea tulburărilor reziduale ale SNC.

Material și metode

Protocolul și design-ul cercetării

Studiu de tip prospectiv, nerandomizat, de cohortă, a fost realizat la Clinica de neuropediatrie a Departamentului de pediatrie al USMF „Nicolae Testemitanu”, în perioada 2005-2010.

Având în vedere că studiul a fost efectuat asupra minorilor, acordul informat scris a fost obținut de la unul dintre părinții.

Au fost înrolați în studiu 100 de copii cu vîrstă cuprinsă între 1-3 luni și 48 ± 12 luni; 25 dintre ei au fost „practic sănătoși” (LPS), 75 – au suportat LCP hipoxic-ischemice de diferit grad de severitate în perioada perinatală (25 – gradul I / LCPH I, 25 – gradul II / LCPH II, 25 – gradul III / LCPH III).

Antecedentele perinatale au fost apreciate în cadrul unui studiu retrospectiv al fișelor medicale și datele de la apărtinători, care a vizat starea copiilor la naștere (scorul Apgar: gradul I – 5-7 puncte, gradul II – 4-6 puncte, gradul III

tive cytokine against many neuronal lesions and has effects on neurons and muscles, protecting skeletal muscles against lesions, improving survival of neurons after lesions (through tyrosine phosphorylation); also, it reduces atrophy induced by denervation of skeletal muscles [5]. It also promotes bipolar cells and glial cells differentiation [6], improves oligodendrogenesis (by favorising precursor cells of oligodendrocytes), survival and differentiation *in vivo* [7], and promotes proliferation and differentiation of neuronal stem-cells (NSCs) [8].

Sharfman H. et al. (2002) [9]; Brigadski T., Lebmann V. (2014) [10], remarked that lesions of nervous cell of mammals induce irreversible consequences, due to the fact that these cells are not capable to regenerate. Disturbances of axons' or neurons' functions, correlated to the severity of the disease, discontinue connections for informational passage from cell to cell. Nevertheless, according to some studies, there are a rising number of proofs that support the mechanism of regeneration and restoration of interneuronal connections in adults after lesions made under experimental conditions [9, 10]. Such results admit the possibility of regeneration of synaptic connections in certain zones of CNS after some cerebral lesions.

Many studies relate the benefits of the treatment with CNTF in saving the number and function of motor neurons [11, 12]. A study made on rats with focal cerebral ischemia, suggests that CNTF mediates the cerebral vascular accident. Continuous pharmacologic stimulation with CNTF could become a therapeutic strategy for cell replacement after strokes [12].

Although, in the last few years, many discoveries have been made regarding the epidemiology, diagnosis and the mechanism of PCL caused by EN [13, 14], their physiopathology and management remain mostly controversial [15]. Despite the small number of experimental researches and clinical data from human and animal models that support neuroprotective therapies in various diseases of CNS, the final common path of prevention of neuronal destruction in PCL remains unclear.

The main aim of the study was appreciation of the seric level of CNTF in children with perinatal cerebral lesions in order to estimate its role in the development of residual disorders of the CNS.

Material and methods

The protocol and design of the study

The prospective, nonrandomized, cohort study was held at the Neuropediatric Clinic of the Pediatric Department of Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy during 2005-2010.

Considering that the study was performed on minor patients, the written informed consent was obtained from their parents.

One hundred children were enrolled in the study, with ages ranging from 1-3 months and 48 ± 12 months; 25 of them were almost healthy children (AHC), and 75 suffered from hypoxic-ischemic PCL of different level of severity (25 children – of 1st degree / PCLH I, 25 children – of 2nd degree / PCLH II, and 25 children – of 3rd degree / PCLH III).

Perinatal antecedents were appreciated in a previous retrospective study of medical records and data obtained from

- 0-3 puncte) [16] și volumul tratamentului suportiv în secția de terapie intensivă: ventilație adecvată, menținerea unei perfuzii optime, menținerea glicemiei în limite normale, controlul convulsiilor, evitarea supraîncărcării cu fluide, reducerea hipertensiunii intracraaniene, antibioticoterapie în caz de coexistență a unei infecții, în caz de stop cardiac – resuscitare cardio-respiratorie.

Design-ul studiului este redat în Figura 1.

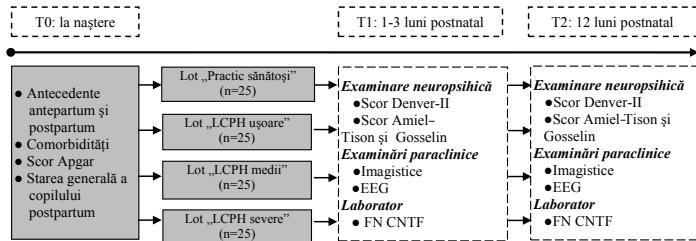


Fig. 1 Design-ul studiului.

Criterii de includere

- Copii care au suportat encefalopatie neonatală (EN) de geneză hipoxic-ischemică (cu 3 grade de severitate), confirmate prin examene clinice.

Criterii de excludere din studiu

- infecții intrauterine;
- erori înăscute de metabolism;
- sindroame genetice și cromosomiale;
- boli inflamatorii curente;
- viciu cardiac congenital;
- istoric de malignitate.

Parametrul principal de rezultat, înregistrat în cadrul studiului – concentrația serică a CNTF (pg/mL).

Parametrii secundari de rezultat, înregistrați în cadrul studiului:

- scorul DENVER II;
- examenul-screening Amiel-Tison și Gosselin;
- rezultatele examinărilor imagistice;
- rezultatele EEG.

Eșantionul de studiu a fost format din 100 de copii: 3 grupuri a câte 25 de copii (cu gradul I, gradul II și gradul III al LCP) și 25 de copii sănătoși, cu vârstă cuprinsă între 1-3 și 48 ± 12 luni.

Definiția entităților clinice studiate

Encefalopatia neonatală reprezintă o varietate de entități clinice care au în comun o scădere a livrării oxigenului destinat creierului, secundară hipoperfuziei cerebrale și se definește prin leziuni cerebrale apărute la nou-născut ca urmare a hipoxiei și ischemiei cerebrale, secundare suferinței fetale cronice sau acute, urmată de consecințe în neurodezvoltare. Este un sindrom clinic definit de afectarea neurologică majoră în primele zile ale vieții la un nou-născut la termen, manifestat prin dificultatea de a iniția și a-și menține respirația, depresia tonusului muscular și reflexelor, nivel redus de conștiință și, frecvent, convulsi. LCP hipoxic-ischemice ușoare (gradul I) se caracterizează prin următoarele manifestări clinice: agitație,

relatives, that regarded their children' state at birth (Apgar score: first degree - 5-7 points, second degree - 4-6 points, third degree - 0-3 points) [16] and the volume of the supportive treatment in the ICU: adequate ventilation, maintenance of an optimal perfusion, maintenance of normal levels of glycaemia, seizures control, avoidance of fluid overfill, reduction of cerebral hypertension, treatment with antibiotics in case of an existing infection, cardio-pulmonary resuscitation in cases of cardiac arrest. The study design is shown in Figure 1.

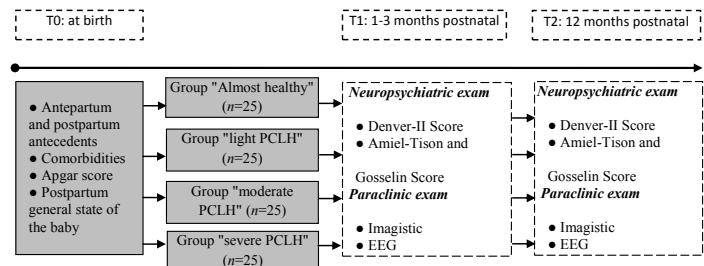


Fig. 1 Study design.

Inclusion criteria

- Children that suffered from neonatal encephalopathy (NE) of hypoxic-ischemic genesis (with 3 severity degrees), confirmed by clinical examination.

Exclusion criteria

- intrauterine infections;
- congenital metabolism errors;
- genetic and chromosome syndromes;
- current inflammatory diseases;
- congenital heart malformations;
- malignancy history.

The main result parameter that has been recorded in the study was the seric concentration of CNTF (pg/mL).

Secondary result parameters, recorded in the study:

- DENVER II Score;
- Amiel-Tison and Gosselin screening exam;
- results of imagistic examinations;
- EEG results.

One hundred children were enrolled in the study, divided into 3 groups, 25 children each (with first, second and third degree of PCL) and 25 healthy children with ages ranging from 1-3 months and 48 ± 12 months.

Definition of studied clinical entities

Neonatal encephalopathy represents a variety of clinical entities that have in common lesser delivery of oxygen designated for the brain, secondary to cerebral hypoperfusion and is defined by cerebral lesions appeared in the new-born baby after hypoxia and ischemia of the brain, secondary to acute or chronic fetal suffering, followed by consequences in neurological development. It is a clinical syndrome defined by the major neurological impact in the first days of life of an interm new-born baby, characterized by difficulty in initiating and maintaining of breathing, depression of muscular tonus and reflexes, reduced level of consciousness, and frequently seizures. Light hypoxic-ischemic PCL (1st degree) are charac-

hiperexcitabilitate, tonus normal, supt slab, reflex Moro diminuat, midriază, tachicardie, absența convulsiilor, EEG normală, durata manifestărilor clinice 1-3 zile; *moderate* (gradul II) prin: letargie / obnubilare, hipotonie moderată, supt slab sau absent, reflex Moro slab, mioză, bradicardie, convulsiile focale sau multifocale, acidoză tranzitorie, EEG cu microvoltaj delta și theta, durata manifestărilor clinice 2-14 zile; *severe* (grad III): stupor ce răspunde doar la stimuli puternici, placiditate, decerebrare intermitentă, supt absent, ritmul cardiac variabil, Moro absent, reflex pupilar la lumină diminuat, convulsiile, acidoză persistentă, EEG cu supresie electrică cerebrală, durata manifestărilor clinice – ore până la săptămâni, cu sechele neurologice severe.

Patologiile reziduale ale SNC, în special PC, constituie sechele ale unei boli a SNC, sau reprezentă o afecțiune curentă, cauzată de o afecțiune apărută anterior. „Tulburările reziduale minore” includ deregările funcționale ale creierului, exprimate prin tulburări comportamentale, de vorbire și limbaj, de atenție, de adaptare socială etc.; „tulburările reziduale majore” includ tulburările organice cerebrale, exprimate prin epilepsie, paralizie cerebrală și retard mental.

Dinamica evolutivă a LCP a fost apreciată timp de 48 ± 12 luni.

Studiul clinic-imunoenzimatic prospectiv, realizat pe cei 100 de copii, a vizat statusul neurodevelopmental, apreciat prin testările neuropsihologice DENVER II [17] și examenul neurologic Amiel-Tison și Gosseline [18], examenele imagistice (TFU și RMN cerebrală) și electroencefalografice. Testul DENVER II s-a efectuat la vîrstă de 1-3 luni și a permis formarea grupurilor de risc pentru probleme neurologice, prin aprecierea performanțelor profesional-sociale (25 itemi), motor fin-adaptive (29 itemi), limbaj (39 itemi), motor-grosiere (motricitate generală) (32 itemi), comportament – 5 itemi. Pentru a facilita calculele matematice, testul s-a punctat în felul următor: „0” – rezultat normal, „1” – suspect, „2” – ușor anormal; „3” – moderat; „4” – sever anormal; „5” – instabil.

Efectuarea examenului screening Amiel-Tison și Gosselin în evoluția creșterii, a permis aprecierea performanțelor neurodevelopmentale și confirmarea diagnozelor evolutive. Datele obținute s-au codificat pentru a ușura calculele matematice: „0” indică un rezultat tipic, în limitele normalului, „1” – un rezultat ușor anormal, „1+” – un rezultat patologic moderat, „2” – indică un rezultat clar patologic (sever), „X” – permite culegerea de date atunci, când rezultatul normal sau anormal al unei observații nu poate fi definit cu certitudine.

Examenul imunoenzimatic a constat în aprecierea concentrațiilor serice ale CNTF în perioada postacută a LCP (1-3 luni) și în cea de recuperare (12 luni), la analizatorul imunologic STAT FAX-303 (SUA, 2005), prin metoda de analiză imuno-enzimatică (ELIZAKit Cat. No. CYT306, care a măsurat forma matură de CNTF).

Calculele și testele statistice, utilizate în studiu: media aritmetică; dispersia; eroarea standard; frecvența relativă; intervalul de incredere; coeficientul de corelare Pearson; testul χ^2 (chi pătrat) al lui Pearson; testul ANOVA; testul Mann-Whitney; regresia liniară, sensibilitatea, specificitatea, curba ROC (l. engl. *Receiver Operator Characteristic curve*).

terized by the following clinical manifestations: agitation, hyperexcitability, normal tonus, weak suck, diminished Moro reflex, mydriasis, tachycardia, absence of seizures, normal EEG, manifestations last for 1-3 days. Moderate hypoxic-ischemic PCL (2nd degree) are characterized by: lethargy / obnubilation, moderate hypotonus, weak or absent suck, weak Moro reflex, miosis, bradycardia, focal or multifocal seizures, transitory acidosis, EEG with delta and theta slow wave activity, manifestations last for 2-14 days. Severe hypoxic-ischemic PCL (3rd degree) are characterized by: stupor that responds only to strong stimulus, paleness, intermittent decerebration, absent suck, variable cardiac rhythm, absent Moro reflex, diminished pupillary reflex on light, seizures, persistent acidosis, EEG with cerebral electrical suppression, manifestations last from hours to weeks, with severe neurological sequelae.

Residual pathologies of the CNS, especially cerebral palsy (CP), are sequelae of CNS diseases, or represent a current pathology, caused by a previous disease. “Minor residual disorders” include functional disturbances of the brain, expressed by behavior / language / speaking / attention / social adaptation disorders. “Major residual disorders” include organic cerebral disturbances, expressed by epilepsy, cerebral palsy and mental retardation.

Evolution dynamics of PCL was evaluated for 48 ± 12 months.

The prospective clinical immune-enzymatic study, made on 100 children, aimed to evaluate the neuro-developmental status, and was appreciated by neuro-psychological tests (DENVER II) [17], neurologic exam Amiel-Tison and Grosselin [18], imagistic exams (TFU – transfontanellar ultrasound, MRI and EEG). DENVER II test was made at the age of 1-3 months and made it possible to form risk groups for neurological problems, by evaluating the following performances: professional-social (25 items), fine motor-adaptive (29 items), language (39 items), gross motor (32 items), behavior (5 items). In order to simplify the mathematical calculation, the test was scored the following way: “0” – normal result, “1” – suspect, “2” – slightly abnormal, “3” – moderate, “4” – severely abnormal, “5” – instable.

Screening Amiel-Tison and Gosselin tests made during child growth, made it possible to evaluate neurodevelopmental performances and confirmation of diagnoses in evolution. For simplification of mathematical calculations, obtained data was codified: “0” indicates a typical result in normal ranges, “1” – slightly abnormal result, “1+” – moderate pathological result, “2” – severe pathological result, “X” – permits data collection when normal or abnormal results of observations can not be defined for sure.

The immune-enzymatic test consisted of seric appreciation of CNTF in the postacute period of PCL (1-3 months) and in the recovery period (12 months), held on the immunologic analyzer STAT FAX-303 (USA, 2005), using the immune-enzymatic method (ELIZAKit Cat. No CYT306, that measured mature forms of CNTF).

Calculations and statistical tests used in this study: arithmetical mean values; dispersion; standard error; relative frequency; confidence interval; Pearson coefficient; Pearson's χ^2

Rezultate

Diagrama de flux CONSORT a pacenților studiați este redate în Figura 2.

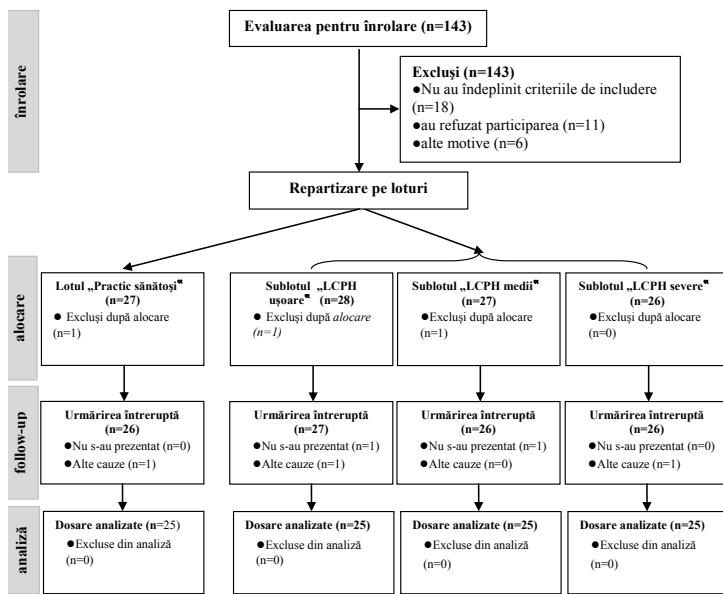


Fig. 2 Diagrama CONSORT al fluxului de pacienți.

Notă: LCPH – leziuni cerebrale peripartum hipoxicu-ischemice.

Caracterizarea generală a loturilor de studiu este prezentată în Tabelul 1. Rezultatele investigațiilor sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 1. Prezentarea generală a loturilor de studiu.

Parametri	Lot Practic sănătos	Lot LCH ușoare	Lot LCH medii	Lot LCH severe	p / r _{xy}
Vârstă de gestație, săptămâni	40 (95CI: 39–41)	39 (95CI: 38–40)	39 (95CI: 37–41)	38 (95CI: 36–40)	p<0,001
Masa corporală, kg	3,6 (95CI: 3,0–4,3)	3,8 (95CI: 2,9–4,6)	3,3 (95CI: 2,8–3,8)	3,1 (95CI: 2,4–3,8)	p<0,05
Apgar la naștere, puncte	9 (95CI: 8–10)	6 (95CI: 5–7)	5 (95CI: 4–6)	2 (95CI: 1–4)	p<0,001 r _{xy} -0,74
Hipoxie intrauterină cronică, %	-	12 (95CI: 5,5–17,5)	68 (95CI: 58,7–77,3)	92 (95CI: 86,6–97,4)	p<0,001 r _{xy} -0,85
Asfixiere la naștere, %	-	32 (95CI: 22,7–41,3)	48 (95CI: 38,0–58,0)	68 (95CI: 58,7–77,3)	p<0,001 r _{xy} -0,74
Prematuritate, %	-	-	-	9,3 (95CI: 5,9–12,7)	p>0,05 r _{xy} -0,22
Patologii ale placentei, %	-	12 (95CI: 5,5–18,5)	24 (95CI: 15,5–32,5)	44 (95CI: 34,1–53,9)	p<0,05 r _{xy} -0,39
Ruperea prematură a membranelor, %	-	8 (95CI: 2,6–13,4)	20 (95CI: 12,0–28,0)	36 (95CI: 26,4–45,6)	p>0,05 r _{xy} -0,24
Patologia cordonului ombilical, %	4 (95CI: 0,1–7,9)	8 (95CI: 2,6–13,4)	12 (95CI: 5,5–17,5)	20 (95CI: 12,0–28,0)	p<0,05 r _{xy} -0,51

test; ANOVA test; Mann-Whitney test; liniar regression; sensitivity; specificity; ROC curve.

Results

CONSORT diagram of the patient' flow enrolled in the study is shown in Figure 2.

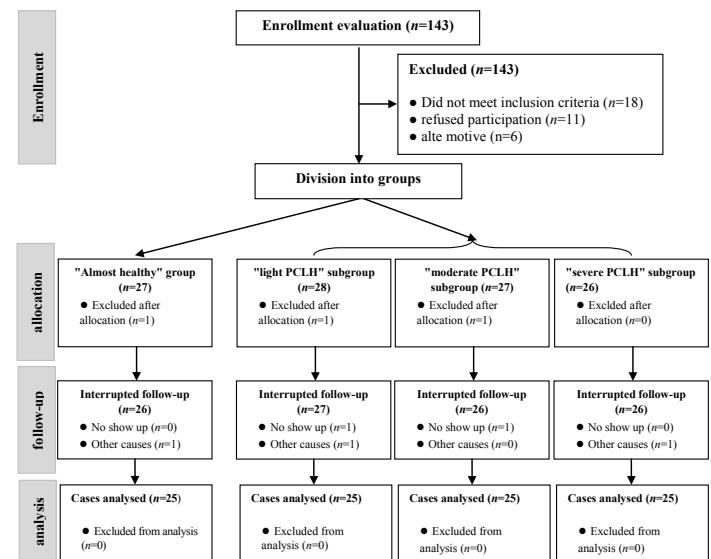


Fig. 2 CONSORT diagram of patients' flow.

Note: PCLH – peripartum cerebral lesions of ischemic-hypoxic genesis.

General characteristics of study groups are presented in Table 1. Main results are presented in Table 2.

Tabelul 2. Rezultatele investigațiilor loturilor de studiu.

Parametri	Lot Practic sănătos	Lot LCPH ușoare	Lot LCPH medii	Lot LCPH severe	p
<i>Scoruri</i>					
Denver II, puncte	0,3 (95CI: 0,0–0,6)	1,8 (95CI: 0,9–2,7)	2,9 (95CI: 2,3–3,5)	4,3 (95CI: 3,8–4,8)	p<0,05
Amiel-Tison și Gosselin, puncte	0,2 (95CI: 0,0–0,4)	0,5 (95CI: 0,2–0,8)	1,2 (95CI: 0,8–1,6)	1,7 (95CI: 1,4–2,0)	p<0,05
tulburări reziduale minore, %	0 (95CI: 67,5–84,5)	76,0 (95CI: 67,5–84,5)	60,0 (95CI: 50,2–69,8)	12,0 (95CI: 5,5–18,5)	p<0,01 (mY=0,002)
tulburări reziduale majore, %	0 (95CI: 30,2–49,8)	0 (95CI: 81,5–94,5)	40,0 (95CI: 30,2–49,8)	88,0 (95CI: 81,5–94,5)	p<0,01 (mY=0,002)
<i>Concluzie EEG</i>					
aspect EEG normal, %	76,0 (95CI: 67,5–84,5)	24,0 (95CI: 15,5–32,5)	0	0	p>0,05
unde ascuțite sau spike, %	24,0 (95CI: 15,5–32,5)	28,0 (95CI: 19,0–37,0)	0	0	p<0,05
unde lente, preponderent theta deformate și intricate cu delta, %	0 (95CI: 38,0–58,0)	48,0 (95CI: 38,0–58,0)	60,0 (95CI: 50,2–69,8)	12,0 (95CI: 5,5–18,5)	p<0,01
vârfuri grupate, periodic generalizate, %	0 (95CI: 5,5–18,5)	0 (95CI: 30,2–49,8)	12,0 (95CI: 5,5–18,5)	40,0 (95CI: 30,2–49,8)	p<0,05
vârf undă lentă, spike undă lentă, %	0 (95CI: 19,2–37,0)	0 (95CI: 38,0–58,0)	28,0 (95CI: 19,2–37,0)	48,0 (95CI: 38,0–58,0)	p<0,01
<i>Concluzie imagistică</i>					
aspect normal, %	100,0 (95CI: 22,7–41,3)	32,0 (95CI: 22,7–41,3)	–	–	p>0,05
semne de mielinizare incompletă, %	– ușor, %	68,0 (95CI: 58,7–77,3) –	60,0 (95CI: 50,2–69,8) 28 (95CI: 19,0–37,0)	–	p<0,05 p>0,05
dilatarea ventriculilor cerebrali, grad mediu, %	– sever, %	– –	20,0 (95CI: 12,0–28,0)	20,0 (95CI: 12,0–28,0)	p<0,05 p>0,05
atrofie corticală, %	–	–	16,0 (95CI: 8,7–23,3)	68,0 (95CI: 58,7–77,3)	p<0,05
atrofie hipocampală, %	–	–	12,0 (95CI: 5,5–18,5)	24,0 (95CI: 15,5–32,5)	p<0,05
chisturi glio-ependimale, %	–	–	20,0 (95CI: 12,0–28,0)	36,0 (95CI: 26,4–45,6)	p<0,01
chisturi atrofice intracerebrale, %	–	–	–	20,0 (95CI: 12,0–28,0)	p>0,05
cavitați porencefalice, %	–	–	–	12,0 (95CI: 5,5–18,5)	p>0,05
porencefalie difuză, %	–	–	–	8,0 (95CI: 2,6–13,4)	p>0,05
encefalomalacie multichistică, %	–	–	–	4,0 (95CI: 0,1–7,9)	p>0,05

Table 1. General presentation of study groups.

Parameters	Group Almost healthy	Group Light PCLH	Group Moderate PCLH	Group Severe PCLH	p / r _{xy}
Age of gestation, weeks	40 (95CI: 39–41)	39 (95CI: 38–40)	39 (95CI: 37–41)	38 (95CI: 36–40)	p<0.001
Body weight, kg	3.6 (95CI: 3.0–4.3)	3.8 (95CI: 2.9–4.6)	3.3 (95CI: 2.8–3.8)	3.1 (95CI: 2.4–3.8)	p<0.05
Apgar at birth, points	9 (95CI: 8–10)	6 (95CI: 5–7)	5 (95CI: 4–6)	2 (95CI: 1–4)	p<0.001 r _{xy} -0.74
Chronic intrauterine hypoxia, %	-	12 (95CI: 5.5–17.5)	68 (95CI: 58.7–77.3)	92 (95CI: 86.6–97.4)	p<0.001 r _{xy} -0.85
Asphyxia at birth, %	-	32 (95CI: 22.7–41.3)	48 (95CI: 38.0–58.0)	68 (95CI: 58.7–77.3)	p<0.001 r _{xy} -0.74
Prematurity, %	-	-	-	9.3 (95CI: 5.9–12.7)	p>0.05 r _{xy} -0.22
Placenta pathology, %	-	12 (95CI: 5.5–18.5)	24 (95CI: 15.5–32.5)	44 (95CI: 34.1–53.9)	p<0.05 r _{xy} -0.39
Premature rupture of membranes, %	-	8 (95CI: 2.6–13.4)	20 (95CI: 12–28)	36 (95CI: 26.4–45.6)	p>0.05 r _{xy} -0.24
Ombilical cord pathology, %	4 (95CI: 0.1–7.9)	8 (95CI: 2.6–13.4)	12 (95CI: 5.5–17.5)	20 (95CI: 12–28)	p<0.05 r _{xy} -0.51

La vîrstă de sugar și copil mic, diagnosticul neurologic este evolutiv, grație proceselor mai intense de maturăție cerebrală la această vîrstă. Astfel, până la vîrstă de 2 ani, s-au stabilit diagnoze sindromologice (exprimate prin tulburări de dezvoltare): tulburări cognitive ușoare – 21 (95CI: 16,93–25,07%) cazuri, tulburări de dezvoltare motorie – 16 (95CI: 12,33–19,67%) cazuri, tulburări mixte de dezvoltare – 13 (95CI: 9,64–16,36%) cazuri, tulburări globale de dezvoltare – 10 (95CI: 7,0–13,0%) cazuri, sindrom epileptic – 19 (95CI: 15,08–22,92%) cazuri.

După vîrstă de 2 ani, s-au confirmat diagnozele fixe: sănătos – 31 (95CI: 26,38–35,62%) de cazuri: (25 de cazuri, sau 80,6% [95CI: 73,5–87,7] – din LPS și 6 cazuri, sau 19,4% [95CI: 12,3–26,5] – din LCPH ușoare); TR minore – 37 (95CI: 32,17–41,83%) de cazuri: (19 cazuri, sau 51,4% [95CI: 43,18–59,62] – din LCPH ușoare; 15 cazuri, sau 40,5% [95CI: 32,43–48,57] – din LCPH medii; 3 cazuri, sau 8,1% [95CI: 3,61–12,59] – din LCPH severe); TR majore – 32% (95CI: 27,34–36,66) de cazuri (10 cazuri, sau 31,3% [95CI: 23,1–39,49] – din LCPH medii și 22 de cazuri, sau 68,8% [95CI: 60,61–76,99] – din LCPH severe).

TR minore au fost reprezentate de tulburări de conduită – 7 cazuri (18,9% [95CI: 12,46–25,34]), tulburări de atenție și hiperkinetice – 12 cazuri (32,4% [95CI: 24,7–40,1]), balbism tonico-clonic – 3 cazuri (8,1% [95CI: 3,61–12,59]), tulburări de ticuri – 3 cazuri (8,1% [95CI: 3,61–12,59]), tulburări de limbaj și comunicare – 5 cazuri (13,5% [95CI: 7,88–19,12]), tulburări motorii ușoare – 7 cazuri (18,9% [95CI: 12,46–25,34]).

TR majore au fost reprezentate de paralizie cerebrală – 13 cazuri (40,6% [95CI: 31,92–49,28]), epilepsie simptomatică – 9 cazuri (28,1% [95CI: 20,15–36,05]) și paralizie cerebrală cu epilepsie simptomatică – 10 cazuri (31,3% [95CI: 23,11–39,49]).

Diagnozele stabilite după vîrstă de 2 ani, au corelat cu se-

At the age of infants and toddlers, neurologic diagnosis is evolutionary, thanks to intense cerebral maturation processes occurring at this age. Thereby, until the age of 2 y.o., syndromological diagnosis have been established (expressed by development disorders): mild cognitive disorders – 21 (95CI: 16.93–25.07%) cases, motor development disorders – 16 (95CI: 12.33–19.67%) cases, mixed development disorders – 13 (95CI: 9.64–16.36%) cases, global development disorders – 10 (95CI: 7.0–13.0%) cases, epileptic syndrome – 19 (95CI: 15.08–22.92%) cases.

After the age of 2 y.o., fixed diagnoses were confirmed: healthy – 31 (95CI: 26.38–35.62) cases: (25 cases, or 80.6% [95CI: 73.5–87.5] – from HC and 6 cases, or 19.4% [95CI: 12.3–26.5] – from light PCLH); minor RD – 37 (95CI: 32.17–41.83) cases: (19 cases, or 51.4% [95CI: 43.18–59.62] – from light PCLH; 15 cases, or 40.5% [95CI: 32.43–48.57] – from moderate PCLH; 3 cases, or 8.1% [95CI: 3.61–12.59] – from severe PCLH); major RD – 32% (95CI: 27.34–36.66) cases (10 cases, or 31.3% [95CI: 23.1–39.49] from moderate PCLH and 22 cases, or 68.8% [95CI: 60.61–76.99] – from severe PCLH).

Minor DR were characterized by behavior disorders – 7 cases (18.9% [95CI: 12.46–25.34]), attention and hyperkinetic disorders – 12 cases (32.4% [95CI: 24.7–40.1]), tonic clonic stutter – 3 cases (8.1% [95CI: 3.61–12.59]), tic disorders – 3 cases (8.1% [95CI: 3.61–12.59]), language and communication disorders – 5 cases (13.5% [95CI: 7.88–19.12]), mild motor skills disorders – 7 cases (18.9% [95CI: 12.46–25.34]).

Major DR were characterized by cerebral palsy – 13 cases (40.6% [95CI: 31.92–49.28]), symptomatic epilepsy – 9 cases (28.1% [95CI: 20.15–36.05]) and cerebral palsy with symptomatic epilepsy – 10 cases (31.3% [95CI: 23.11–39.49]).

Diagnoses set after the age of 2 y.o. correlated with the

Table 2. Main investigations results of study groups.

Parameters	Group Almost healthy	Group Light PCLH	Group Moderate PCLH	Group Severe PCLH	p
<i>Scores</i>					
Denver II, points	0.3 (95CI: 0.0–0.6)	1.8 (95CI: 0.9–2.7)	2.9 (95CI: 2.3–3.5)	4.3 (95CI: 3.8–4.8)	p<0.05
Amiel-Tison and Gosselin, points	0.2 (95CI: 0.0–0.4)	0.5 (95CI: 0.2–0.8)	1.2 (95CI: 0.8–1.6)	1.7 (95CI: 1.4–2.0)	p<0.05
minor residual disorders, %	0	76.0 (95CI: 67.5–84.5)	60.0 (95CI: 50.2–69.8)	12.0 (95CI: 5.5–18.5)	p<0.01 (mY=0.002)
major residual disorders, %	0	0	40.0 (95CI: 30.2–49.8)	88.0 (95CI: 81.5–94.5)	p<0.01 (mY=0.002)
<i>EEG conclusion</i>					
normal EEG aspect, %	76.0 (95CI: 67.5–84.5)	24.0 (95CI: 15.5–32.5)	0	0	p>0.05
spike or sharp waves, %	24.0 (95CI: 15.5–32.5)	28.0 (95CI: 19.0–37.0)	0	0	p<0.05
slow waves, prevalent deformed theta and intricated with delta, %	0	48.0 (95CI: 38.0–58.0)	60.0 (95CI: 50.2–69.8)	12.0 (95CI: 5.5–18.5)	p<0.01
grouped peaks, periodically generalized, %	0	0	12.0 (95CI: 5.5–18.5)	40.0 (95CI: 30.2–49.8)	p<0.05
slow wave peak, spike slow wave, %	0	0	28.0 (95CI: 19.2–37.0)	48.0 (95CI: 38.0–58.0)	p<0.01
<i>Imagistic conclusion</i>					
normal aspect, %	100.0	32.0 (95CI: 22.7–41.3)	–	–	p>0.05
signs of incomplete myelination, %	–	68.0 (95CI: 58.7–77.3)	60.0 (95CI: 50.2–69.8)	–	p<0.05
light, %	–	–	28 (95CI: 19.0–37.0)	–	p>0.05
dilatation of cerebral ventricles, grade	medium, %	–	20.0 (95CI: 12.0–28.0)	20.0 (95CI: 12.0–28.0)	p<0.05
severe, %	–	–	–	20.0 (95CI: 12.0–28.0)	p>0.05
cortex atrophy, %	–	–	16.0 (95CI: 8.7–23.3)	68.0 (95CI: 58.7–77.3)	p<0.05
hypocampus atrophy, %	–	–	12.0 (95CI: 5.5–18.5)	24.0 (95CI: 15.5–32.5)	p<0.05
glial ependymal cysts, %	–	–	20.0 (95CI: 12.0–28.0)	36.0 (95CI: 26.4–45.6)	p<0.01
atrophyc intracerebral cysts, %	–	–	–	20.0 (95CI: 12.0–28.0)	p>0.05
porous encephalic cavities, %	–	–	–	12.0 (95CI: 5.5–18.5)	p>0.05
diffuse porous encephaly, %	–	–	–	8.0 (95CI: 2.6–13.4)	p>0.05
multicystic encephalomalacia, %	–	–	–	4.0 (95CI: 0.1–7.9)	p>0.05

veritatea EN, diagnosticate la naștere; cu cât mai sever a fost gradul de severitate al LCP, cu atât mai sever a fost diagnosticul confirmat după vîrstă de 2 ani ($r_{xy}=0.74$, mY=0.002) (Tabelul 2).

Modificările electrofiziologice au arătat un exces de unde

severity of NE, diagnosed at birth; the more severe was the degree of PCL, the more severe was the diagnose confirmed at the age >2 y.o. ($r_{xy}=0.74$, mY=0.002) (Table 2).

Electrophysiological modifications showed excessive sharp waves or spikes of high frequency at 28% (95CI: 23.51–

ascuțite sau spike-uri de frecvență înaltă la 28% (95CI: 23,51–32,49) din cazuri, ceea ce semnifică prezența unei activități iritative la copiii cu tulburări de conduită. Hărțile EEG dominate de unde lente de activitate medie, preponderent theta, de frecvență crescută, la 30% (95CI: 25,42–34,48) din cazuri, indică la semne de imaturitate cerebrală, comună copiilor cu TR minore. Traseele dominate de vârfuri grupate, periodic generalizate, la 13% (95CI: 9,64–16,36) din cazuri, semnifică prezența pragului convulsivant scăzut, iar cele dominate de vârf-undă lentă și spike-undă lentă, la 19% (95CI: 15,08–22,92), denotă activitate epileptiformă (Tabelul 2), comune copiilor cu TR majore.

Modificările imagistice, exprimate prin semne de mielinizare incompletă, ceea ce notifică întârzierea maturării cerebrale, au fost depistate la 17 copii din grupul LCPH ușoare și la 15 copii din cel cu LCPH medii. La 7 din ei (LCPH medii) s-a depistat dilatarea ventriculilor cerebraali de grad ușor. Toți acești copii au fost diagnosticați după vîrstă de 2 ani cu TR minore. La 7 copii cu epilepsie din lotul LCPH medii, tablourile imagistice au fost dominate de atrofie hipocampală (3 cazuri), atrofie corticală (2 cazuri), atrofie corticală cu dilatarea ventriculilor cerebraali de grad mediu și chisturi gloependimale minore (2 cazuri). La copiii cu paralizie cerebrală din acest lot (3 cazuri), modificările imagistice s-au prezentat sub formă de dilatare a ventriculilor cerebraali de grad mediu și chisturi gloependimale.

La copiii din LCPH severe, modificările imagistice s-au prezentat cu următoarele tablouri: dilatarea ventriculilor cerebraali de grad mediu (3 cazuri) – copii cu TR minore; chist atrofic intracerebral, asociat cu atrofie hipocampală (2 cazuri) – copii cu epilepsie. În paraliziile cerebrale: atrofie corticală, chisturi gloependimale, dilatarea ventriculilor de grad mediu (2 cazuri); atrofie corticală și dilatarea ventriculilor de grad sever (5 cazuri); atrofie corticală și chisturi gloependimale (3 cazuri). În paralizia cerebrală și epilepsie: chisturi gloependimale, atrofie corticală și atrofie hipocampală (4 cazuri); atrofie corticală și chisturi atrofice intracerebrale (3 cazuri); cavități porencefalice (3 cazuri); porencefalie difuză (2 cazuri); encefalomalacie multicistică (1 caz).

Concentrațiile serice de CNTF la vîrstă de 1-3 luni și la cea de 12 luni, sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Concentrațiile serice medii ale CNTF (pg/mL).

Vîrstă	Lot Practic sănătos (n=25)	Lot LCPH ușoare (n=25)	Lot LCPH medii (n=25)	Lot LCPH severe (n=25)
1-3 luni	8,1 (95CI: 8,02–8,18)	6,2* (95CI: 6,18–6,22)	4,9* (95CI: 4,85–4,95)	2,9* (95CI: 2,82–2,98)
12 luni	9,6 (95CI: 9,54–9,66)	6,7* (95CI: 6,68–6,72)	5,8* (95CI: 5,78–5,82)	4,3* (95CI: 4,21–4,39)

Notă: * – p<0,001

Variabilitatea valorilor absolute ale CNTF este mare în funcție de vîrstă și de gradul de severitate al LCP. Cele mai înalte valori absolute ale CNTF s-a observat în lotul „practic să-

32,49) of cases, that signifies the presence of irritative activity in children with behavior disorders. EEG maps dominated by slow waves of medium activity, predominantly theta, of elevated frequency, in 30% of cases (95CI: 25,42–34,48), indicate signs of cerebral immaturity, common in children with minor RD. Tracks dominated by group peaks, periodically generalized, in 13% of cases (95CI: 9,64–16,36), signify a low threshold from seizures, and those dominated by peak-slow wave and spike-slow wave, in 19% of cases (95CI: 15,08–22,92), signify epileptiform activity (Table 2), common in children with major RD.

Imagistic modifications, expressed by signs of incomplete myelination, which notifies a delay in cerebral maturation, were found in 17 children from the light PCLH group and in 15 children from the moderate PCLH group. Dilation of cerebral ventricles of light degree was found in 7 children from the moderate PCLH group. All these children were diagnosed after the age of 2 y.o. with minor RD. In 7 children with epilepsy from the moderate PCLH group, the imagistic pictures were dominated by hippocampus atrophy (3 cases), cortex atrophy (2 cases), cortex atrophy with dilation of cerebral ventricles of moderate degree and minor gloependymal cysts (2 cases). In children with cerebral palsy from this group (3 cases), imagistic modifications were presented as dilation of cerebral ventricles of moderate degree and gloependymal cysts.

In children with severe PCLH, imagistic modifications presented the following scenarios: dilation of cerebral ventricles of moderate degree (3 cases) – children with mild RD; intracerebral atrophic cyst associated with hippocampus atrophy (2 cases) – children with epilepsy. In cerebral palsy: cortex atrophy, gloependymal cysts, dilation of ventricles of moderate degree (2 cases); cortex atrophy and dilation of ventricles of severe degree (5 cases); cortex atrophy and gloependymal cysts (3 cases). In cerebral palsy and epilepsy: gloependymal cysts, cortex atrophy and hippocampus atrophy (4 cases); cortex atrophy and intracerebral atrophic cysts (3 cases); porous encephalic cavities (3 cases); diffuse porous encephaly (2 cases), multicyclic encephalomalacia (1 case).

Seric concentrations of CNTF at the age of 1-3 months and at 12 months, are presented in Table 3.

Table 3. Seric mean concentrations of CNTS (pg/mL).

Age	Almost healthy group (n=25)	Light PCLH group (n=25)	Moderate PCLH group (n=25)	Severe PCLH group (n=25)
1-3 months	8.1 (95CI: 8.02–8.18)	6.2* (95CI: 6.18–6.22)	4.9* (95CI: 4.85–4.95)	2.9* (95CI: 2.82–2.98)
12 months	9.6 (95CI: 9.54–9.66)	6.7* (95CI: 6.68–6.72)	5.8* (95CI: 5.78–5.82)	4.3* (95CI: 4.21–4.39)

Note: * – p<0,001

The variability of absolute values of CNTF is high depending on age and severity degree of PCL. Highest absolute values of CNTF were observed in the “almost healthy” group, at

nătos”, la vîrstă de 12 luni, iar cele mai scăzute – în LCPH severe, la vîrstă de 1-3 luni (Figurile 3, 4). Nivelele serice de CNTF au corelat negativ cu gradul de severitate al LCP ($p<0,001$, $r_{xy}=-0,921$) la vîrstă de 3 luni; la fel, s-a stabilit o corelație directă ($r_{xy}=0,857$) dintre vîrstă copilului și valorile CNTF.

Concentrațiile CNTF au variat în funcție de severitatea LCP. Nivelele medii de CNTF la copiii cu grad ușor de afectare (LCPH ușoare) erau mai scăzute, comparativ cu lotul „practic sănătos” cu 1,9 pg/mL (sau, 23,5% [95CI: 8,61–38,39]) la 1-3 luni și cu 2,9 pg/mL (sau, 30,2% [95CI: 15,38–45,02]) – la 12 luni.

În grupul cu LCPH medii, nivelele medii de CNTF erau scăzute, comparativ cu lotul „practic sănătos”, cu 3,2 pg/mL (sau, 39,5% [95CI: 22,32–56,68]) la 1-3 luni și cu 3,8 pg/mL (sau, 39,6% [95CI: 23,82–55,38]). Nivelele CNTF, în valori relative, au crescut cu 15,5% la 12 luni, comparativ cu 1-3 luni ($p<0,001$), rămânând, totuși, scăzute față de lotul „practic sănătos”.

Subiecții din lotul LCPH severe, au înregistrat cele mai scă-

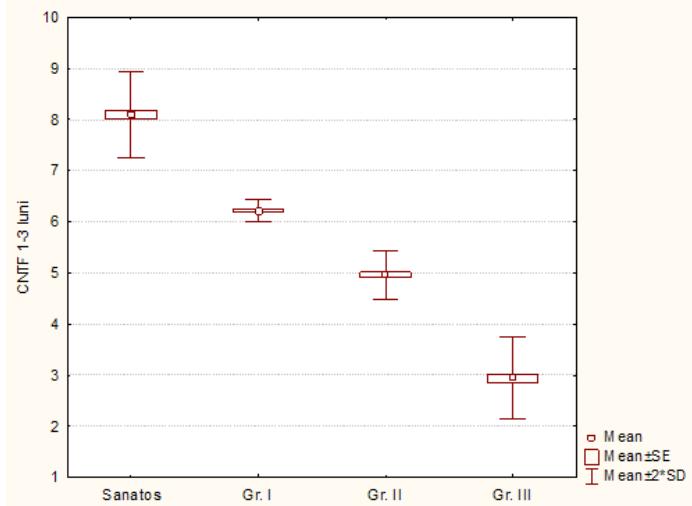


Fig. 3 Concentrațiile serice ale CNTF (pg/mL) la vîrstă de 1-3 luni: sănătos – LPS, Gr. I – LCPH ușoare; Gr. II – LCPH medii, Gr. III – LCPH severe.

Fig. 3 Seric concentrations of CNTF (pg/mL) at the age of 1-3 months: healthy – HC, Gr. I – light PCLH; Gr. II – moderate PCLH, Gr. III – severe PCLH.

zute valori circulante de CNTF. La 1-3 luni, nivelele medii erau cu 5,2 pg/mL (sau, 64,2% [95CI: 47,35–81,05]), iar la 12 luni – cu 5,3 pg/mL (sau, 55,2% [95CI: 39,15–71,25]) mai scăzute, în comparație cu grupul „practic sănătos”. Nivele joase de CNTF au fost depistate la prematuri (2,5 pg/mL [95CI: 2,1–2,9]) la 3 luni și (3,7 pg/mL [95CI: 3,2–4,2], $p<0,001$) – la 12 luni. Concentrațiile de CNTF, în acest grup, au crescut odată cu vîrstă în valori relative (32,6% [95CI: 10,0–55,2]), rămânând, totuși, scăzute în valori absolute, comparativ cu lotul „practic sănătos”.

Astfel, la vîrstă de 12 luni, în lotul general cu LCP s-a apreciat o creștere a nivelor circulante de CNTF, comparativ cu vîrstă de 1-3 luni (18,5%) – superioară, în valori relative, în comparație cu copiii sănătoși (15,6%). O creștere mai mare s-a depistat în LCPH severe (32,6%). Cu toate acestea, nivelele se-

the age of 12 months, and lowest – in severe PCLH, at the age of 1-3 months (Figures 2 and 4). Seric levels of CNTG negatively correlated with the severity degree of PCL ($p<0.001$, $r_{xy}=-0.921$) at the age of 3 months; also, a direct relation was established between the age of the child and CNTF values ($r_{xy}=0.857$).

CNTF concentrations differed depending on the severity of PCL. Comparatively with the “almost healthy” group, mean levels of CNTF in children with light PCLH were lower by 1.9 pg/mL at the age of 1-3 months (or 23.5% [95CI: 8.61–38.39]) and by 2.9 pg/mL at the age of 12 months (or 30.2% [95CI: 15.38–45.02]).

Comparatively with the “almost healthy” group, mean levels of CNTF in children with moderate PCLH were lower by 3.2 pg/mL at the age of 1-3 months (or 39.5% [95CI: 22.32–56.68]) and by 3.8 pg/mL at the age of 12 months (or 39.6% [95CI: 23.82–55.38]). In relative values, the levels of CNTF increased

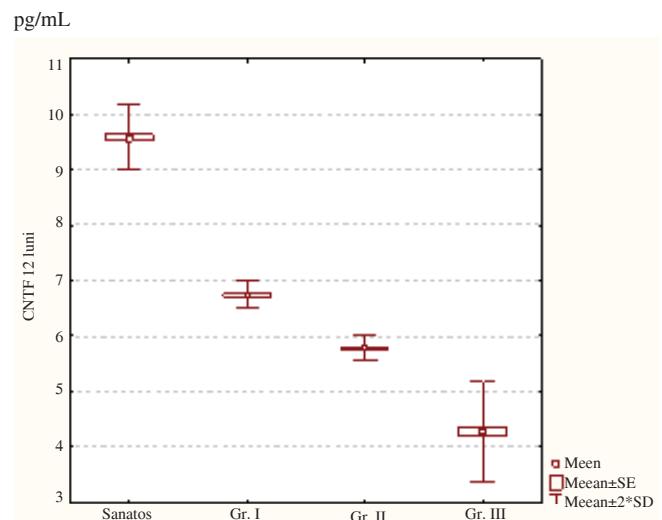


Fig. 4 Concentrațiile serice ale CNTF (pg/mL) la vîrstă de 12 luni: sănătos – LPS, Gr. I – LCPH ușoare; Gr. II – LCPH medii, Gr. III – LCPH severe.

Fig. 4 Seric concentrations of CNTF (pg/mL) at the age of 12 months: healthy – HC, Gr. I – light PCLH; Gr. II – moderate PCLH, Gr. III – severe PCLH.

with 15.5% at the age of 12 months comparatively with levels at the age of 1-3 months ($p<0.001$), but however, remaining lower comparatively with the “almost healthy” group.

Subjects from the group of severe PCLH, had the lowest values of CNTF. At the age of 1-3 months, mean values were lower by 5.2 pg/mL (or 64.2% [95CI: 47.35–81.05]) at the age of 1-3 months, and by 5.3 pg/mL (or 55.2% [95CI: 39.15–71.25]) at the age of 12 months comparatively with the “almost healthy” group. Low levels of CNTF were found in premature newborns (2.5 pg/mL [95CI: 2.1–2.9]) at the age of 1-3 months and (3.7 pg/mL [95CI: 3.2–4.2], $p<0.001$) at the age of 12 months. Concentrations of CNTF in this group, raised together with age in relative values (32.6% [95CI: 10.0–55.2]), but remaining lower in absolute values compared with the „almost

rice de CNTF în valori absolute rămâneau scăzute față de copiii sănătoși.

Nivelele serice scăzute ale CNTF, de comun cu anomaliiile electroencefalografice și cele imagistice, depistate la copiii cu LCP, au avut semnificație importantă pentru un diagnostic corect și prognosticul bolii. La copiii cu vîrstă de 1-3 luni din grupul cu LCPH ușoare, valorile CNTF (6,2 [95CI: 6,18-6,22] pg/mL) au corelat cu tablourile EEG ($r_{xy} = -0,22$) și cele imagistice ($r_{xy} = -0,29$), $p < 0,05$, ce semnifică întârzierea maturării cerebrale și deficit de neuroplasticitate; la aceștea a fost notificată o evoluție favorabilă a bolii și un risc relativ minor de probabilitate a bolii (RR=1,2-1,6).

La cei din cu LCPH medii, valorile CNTF la vîrstă de 1-3 luni (4,9 [95CI: 4,85-4,95] pg/mL), au fost în corelație cu anomaliiile EEG ($r_{xy} = -0,39$) și cele imagistice ($r_{xy} = -0,34$, $p < 0,01$); s-a notat un risc relativ mediu de probabilitate a bolii (RR=1,7-2,5). Iar la copiii cu LCPH severe, corelațiile dintre CNTF (2,9 [95CI: 2,82-2,98] pg/mL) cu modificările EEG ($r_{xy} = -0,74$) și cele imagistice ($r_{xy} = -0,71$, $p < 0,01$) au fost strânse și au semnificat un risc major (RR=2,5-3,5) de dezvoltare a TR majore (paralizie cerebrală și epilepsie).

Au fost interesante, de asemenea, corelațiile dintre formele epilepsiei, modificările EEG și nivelele CNTF. În epilepsia rezolvată, valorile CNTF (4,68 [95CI: 4,48-4,88] pg/mL) au avut o corelație slabă cu forma bolii ($r_{xy} = -0,22$, $p > 0,05$); în epilepsia controlată medicamente, CNTF (3,13 [95CI: 2,89-3,37] pg/mL) – o corelație medie ($r_{xy} = -0,39$, $p < 0,01$); iar în epilepsia farmacorezistentă, CNTF (2,28 [95CI: 2,0-2,56] pg/mL) – o corelație strânsă ($r_{xy} = -0,74$, $p < 0,01$). Valorile extrem de scăzute ale CNTF (<2,9 pg/mL, la 1-3 luni), au corelat cu anomalii structurale cerebrale severe: atrofie corticală, chisturi intracerebrale, cavități porencefalice, porencefalie difuză ($r_{xy} = -0,68$, $p < 0,01$) (Figura 5).

În funcție de gradul de severitate al LCP și nivelele circulante ale CNTF la vîrstă de 1-3 luni, putem prezice riscul de dezvoltare al TR (sechelelor neurologice, asociate cu retard neuropsihic și motor important) după vîrstă de 2 ani. S-a stabilit o variație statistică semnificativă dintre nivelele CNTF și sechele neurologice grave la vîrstă de 1 an. La fel, s-a stabilit o corelație puternică negativă dintre nivelele CNTF și severitatea declinului neurologic. Astfel, copiii cu LCPH severe, vor dezvolta sechele neurologice severe, cum sunt epilepsia și paralizia cerebrală. În Figura 5, observăm variația nivelelor serice ale CNTF la 1-3 luni, relaționate cu diagnosticul stabilit după vîrstă de 2 ani. S-a stabilit o corelație negativă puternică: cu cât nivelele CNTF au fost mai joase, cu atât diagnosticul a fost mai sever și funcțiile neurodevelopmentale – mai afectate ($r_{xy} = -0,934$, $p < 0,001$). Astfel, copiii care au dezvoltat paralizia cerebrală, au avut valorile medii cele mai scăzute de CNTF (3,8 pg/mL) la 1-3 luni, acestea crescând semnificativ la 12 luni, cu 22,4% (95CI: 3,55-40,9). S-a observat că la copiii cu risc sporit de dezvoltare a epilepsiei, valorile medii de CNTF la 1-3 luni erau scăzute semnificativ (3,8 pg/mL), dar la vîrstă de 12 luni, au crescut cu 26% (95CI: 6,38-45,62) (Figura 5). Deasemenea, valorile medii de CNTF, înregistrate la 1-3 luni la copiii cu paralizie cerebrală și epilepsie, erau cele mai scăzute

healthy" group.

Thus, at the age of 12 months, in the general group of PCL, a rise of circulating levels of CNTF was observed, comparatively with the age of 1-3 months (18.5%) – superior in relative values compared to healthy children (15.6%). A bigger rise was observed in severe PCLH (32.6%). Nevertheless, seric levels of CNTF in absolute values remained lower compared to healthy children.

Low seric levels of CNTF, together with EEG and imagistic anomalies, found in children with PCL, had an important significance for correct diagnosis and prognosis. In children of 1-3 months from the light PCLH group, CNTF values (6.2 [95CI: 6.18-6.22] pg/mL) correlated with the EEG picture ($r_{xy} = -0.22$) and with imagistic picture ($r_{xy} = -0.29$), $p < 0.05$, which signifies a delay in cerebral maturation and neuroplasticity deficit; in these children a favorable evolution of the disease was observed, with a minor relative risk of disease probability (RR=1.2-1.6).

Among those with moderate PCLH, CNTF values at the age of 1-3 months (4.9 [95CI: 4.85-4.95] pg/mL correlated with EEG ($r_{xy} = -0.39$) and imagistic abnormalities ($r_{xy} = -0.34$, $p < 0.01$); a medium relative risk of disease probability was noted (RR=1.7-2.5). In children with severe PCLH, correlations between CNTF (2.9 [95CI: 2.82-2.98] pg/mL) with EEG modifications ($r_{xy} = -0.74$) and imagistic abnormalities ($r_{xy} = -0.71$, $p < 0.01$) were strong and signified a major risk (RR=2.55-5.5) of developing major RD (cerebral palsy and epilepsy).

Also, interesting correlations were noted between epilepsy forms, EEG modifications and CNTF levels. In solved epilepsy, CNTF values (4.98 [95CI: 4.48-4.88] pg/mL) had a weak correlation with the disease form ($r_{xy} = -0.22$, $p > 0.05$); in medically controlled epilepsy, CNTF (3.13 [95CI: 2.89-3.37] pg/mL) – medium correlations were observed ($r_{xy} = -0.39$, $p < 0.01$); and in drug resistant epilepsy, CNTF (2.28 [95CI: 2.0-2.56] pg/mL) – a strong correlation was observed ($r_{xy} = -0.74$, $p < 0.01$). Extremely low values of CNTF (<2.9 pg/mL at 1-3 months) correlated with severe cerebral structural abnormalities: cortex atrophy, intracerebral cysts, porous encephalic cavities, diffuse porous encephaly ($r_{xy} = -0.68$, $p < 0.01$) (Figure 5).

Depending on the severity degree of HC and circulating levels of CNTF at the age of 1-3 months, we can predict the risk of RD development (neurological sequelae, associated with neuropsychiatric and important motor delay) after the age of 2 y.o. A significant statistic variation was established between CNTF levels and severe neurological sequelae at the age of 1 y.o. Also, a strong negative correlation was established between CNTF levels and the severity of neurologic decline. Thus, children with severe PCLH will develop severe neurologic sequelae, such as epilepsy and cerebral palsy. In figure 5 we observe the variation of seric levels of CNTF at 1-3 months, related to diagnosis established at the age of 2 y.o. A strong negative correlation was established: the lower CNTF levels, the more severe was the diagnosis and affected neurodevelopmental functions ($r_{xy} = -0.934$, $p < 0.001$). Thereby, children that developed cerebral palsy, had lowest mean values of CNTF levels (3.8 pg/mL) at 1-3 months, which significantly rose at 12 months with 22.4% (95CI: 3.55-40.9). It was no-

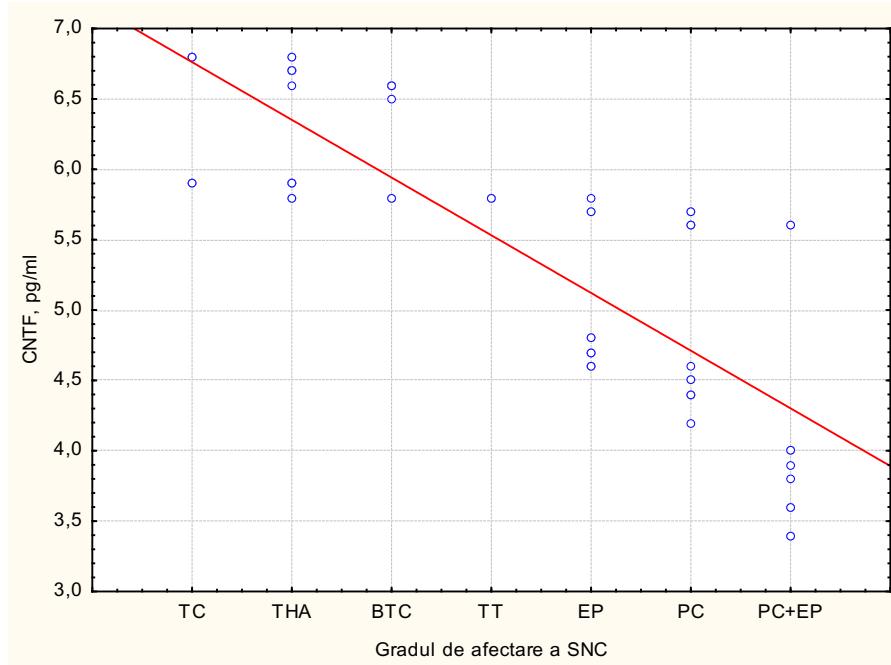


Fig. 5 Nivelele serice de CNTF, în funcție de entitățile încadrate în noțiunea de „tulburări reziduale”.

Note: TC – tulburări de conduită și comportamentale; TAH – tulburări de atenție și hiperkinetice; BTC – balbism tonico-clonic; TT – tulburări de ticuri; PC – paralizie cerebrală; EP – epilepsie; PC+EP – paralizie cerebrală cu epilepsie.

Fig. 5 Seric levels of CNTF, depending on entities included in the „residual disorders” category.

Note: TC – behavior disorders; TAH – attention and hyperkinetic disorder; BTC – tonic clonic stuttering; TT – tic disorders; PC – cerebral palsy; EP – epilepsy; PC+EP – cerebral palsy with epilepsy.

(2,9 pg/mL), dar au crescut cel mai mult în valori relative – cu 29,3% (95CI: 6,83–51,77). Idem, unii copii care au suportat LCP, au dezvoltat TR minime după vîrstă de 2 ani: CNTF <8,1 pg/mL ($p<0,001$, $r_{xy}=-0,739-0,987$) (Figura 5).

noticed that at children with high risk of epilepsy development, mean values of CNTF at 1-3 months were significantly low (3.8 pg/mL), and at 12 months, rose with 26% (95CI: 6.38–45.62) (Figure 5). Also, mean values of CNTF, registered at 1-3 months

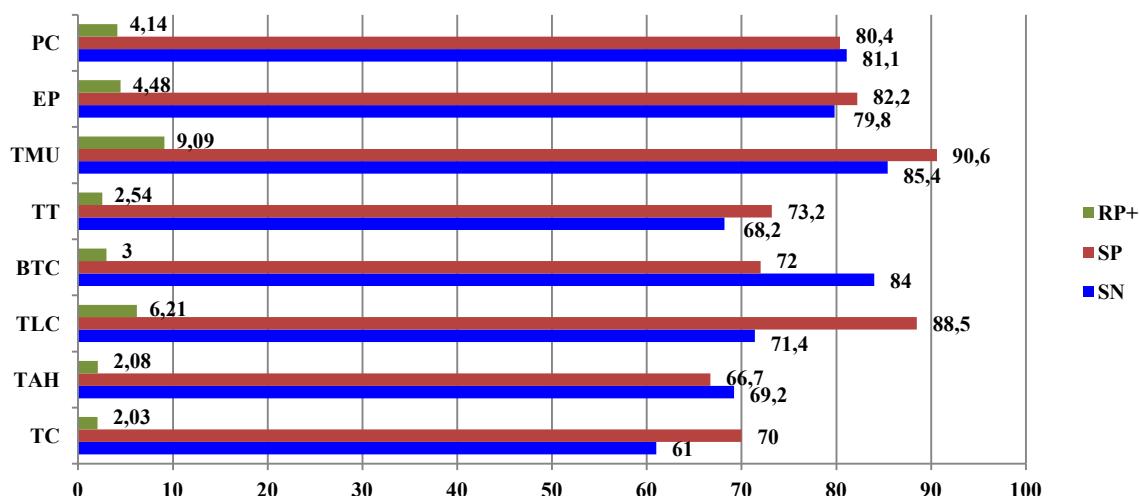


Fig. 6 Sensibilitatea, specificitatea și raportul de probabilitate al nivelului CNTF pentru entitățile încadrate în noțiunea de „tulburări reziduale”.

Note: TC – tulburări comportamentale; TAH – tulburări de atenție și hiperkinetice; TLC – tulburări de limbaj și comunicare; TMU – tulburări motorii ușoare; BTC – balbism tonico-clonic; TT – tulburări de ticuri; PC – paralizie cerebrală; EP – epilepsie.

Fig. 6 Sensibility, specificity and probability ratio of CNTF levels was for entities included in „residual disorders”.

Note: TC – behavior disorders; TAH – attention and hyperkinetic disorder; TLC – language and communication disorder; TMU – light motor disorders; BTC – tonic clonic stuttering; TT – tic disorders; PC – cerebral palsy; EP – epilepsy. Thus, based on statistical calculations described, we observe a strong correlation between seric values of CNTF ($r_{xy}=0.844$, $p<0.001$) and the level of CNS affection.

S-a calculat sensibilitatea, specificitatea și raportul de probabilitate al nivelului CNTF pentru entitățile încadrate în noțiunea de „tulburări reziduale” (Figura 6), precum și curba ROC pentru modelul de prognozare a TR în LCP relaționate cu CNTF la 1-3 luni și la 12 luni (Figura 7).

Astfel, în baza calculelor statistice descrise, constatăm o corelație puternică dintre valorile serice de CNTF ($r_{xy} = 0,844$, $p < 0,001$) și gradul de afectare al SNC.

in children with cerebral palsy and epilepsy, were lower (2.9 pg/mL), but mostly rose in relative values – with 29.3% (95CI: 6.83–51.77). Identically, some children that suffered from HC, developed minimal RD after the age of 2 y.o.: CNTF < 9.1 pg/mL ($p < 0.001$, $r_{xy} = -0.739-0,987$) (Figure 5).

Sensibility, specificity and probability ratio of CNTF levels was calculated for entities included in „residual disorders” (Figure 6), as well as ROC curve for the prognosis model of RD in PCL in relation with CNTF at 1-3 months and 12 months (Figure 7).

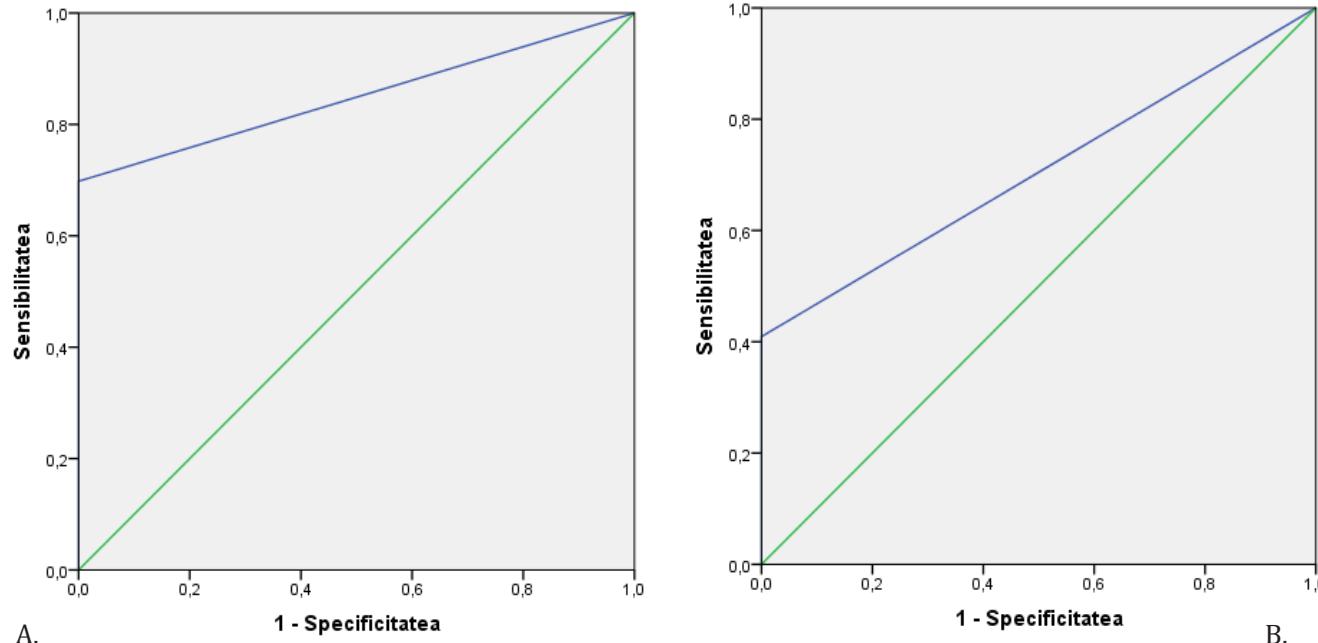


Fig. 7 Curba ROC pentru modelul de prognozare al TR în LCP, relaționate cu CNTF la 1-3 luni (A) (AUC=0,849; 95CI: 0,830–0,868, $p < 0,014$) și la 12 luni (B) (AUC=0,705; 95CI: 0,677–0,732, $p < 0,013$).

Fig. 7 ROC curve for the model of prediction of RD in PCL, in relation with CNTF at 1-3 months (A) (AUC=0.849; 95CI: 0.830–0.868, $p < 0.014$) and at 12 months (B) (AUC=0.705; 95CI: 0.677–0.732, $p < 0.013$).

Discuții

Mai multe studii, în special experimentale, sunt inițiate pentru a cerceta rolul CNTF și efectele lui asupra celulelor nervoase. În unul din studiile experimentale, realizat pe șobolanii cu vârstă de 30-40 de zile, s-a observant că nivelurile proteinei CNTF și receptorilor ei cresc în absența unui prejudiciu neuronal. S-a constatat că CNTF crește posibilitățile de supraviețuire a fotoreceptorilor, susține supraviețuirea celulelor ganglionare retiniene și promovează creșterea axonală. Autorii au sugerat că CNTF acționează printr-un mecanism autocrin pentru a spori, în mod indirect, supraviețuirea neuronală și germinarea axonală a neuronilor [19].

Un alt studiu preclinic complex, realizat pe șobolani prin utilizarea mai multor metode imagistice, a constatat scăderea semnificativă a nivelurilor de metaboliți neuronalni (N-acetil-aspartat, N-acetil-aspartil-glutamat și glutamat) după expresia CNTF. Aceste rezultate au determinat influența CNTF asupra remodulării metabolismului creierului și au sugerat scăderea concentrațiilor de metaboliți neuronalni în absența disfuncțiilor neuronale [20].

Discussion

Several studies, especially experimental studies, are initiated in order to research the role of CNTF and its effects on the nervous cell. In one of the experimental researches, held on rats with age ranging between 30 and 40 days, it was observed that levels of CNTF and its receptors rise in absence of neuronal damage. It was established that CNTF enhances the survival possibilities of photoreceptors, maintains survival or retina ganglion cells and promotes axonal growth. Authors suggested that CNTF has an apocrine mechanism of action that indirectly promotes neuronal survival and axonal germination of neurons [19].

Another pre-clinic complex study, held on rats, using many imagistic methods, established a significant drop in the level of neuronal metabolites (N-acetyl-aspartate, N-acetyl-aspartate-glutamate and glutamate) after CNTF expression. These results determined the influence of CNTF on remodeling of brain metabolism and suggested a decline of neuronal metabolites concentrations in the absence of neuronal dysfunction [20].

Creșterea nivelurilor de CNTF cu 15,6% la 12 luni, în comparație cu 1-3 luni la copiii „practic sănătoși” din studiu, dar și la cei cu LCP (cu 18,5%), confirmă implicarea acestui FN în procesele de maturare și de neurodezvoltare în perioada de creștere. Aceste rezultate confirmă implicarea CNTF în procesele de neurodezvoltare și de susținere a proceselor metabolice cerebrale.

În unul din studiile realizate pe șoareci de un grup de cercetători, s-au apreciat efectele CNTF și ale Peptidei 6. Aceasta din urmă, este compusă din resturi de aminoacizi și corespunde ca și structură CNTF-ului. Ambele au capacitatea de regenerare a creierului și de îmbunătățire a neurogenzei [6].

În studiul realizat de noi, a fost observată creșterea nivelurilor de CNTF la 12 luni, în comparație cu 1-3 luni, în valori absolute, la copiii cu LCP, în paralel cu ameliorarea funcțiilor neuropsihologice. Aceste rezultate confirmă implicarea activă a CNTF în procesele de neurodezvoltare și de susținere a neurogenzei, dar și în procesele de neuroregenerare la copiii cu LCP.

Variatiile mari ale CNTF în valori relative odată cu vîrsta (la 12 luni comparativ cu 1-3 luni) în lotul cu LCP (18,5%), în special la cei cu LCPH severă (32,6%), semnifică implicarea acestei citochine nu numai în procesele de maturare și de regenerare ale țesutului nervos, dar și confirmă rezultatele obținute în alte cercetări. Totodată, aceste rezultate sugerează intensitatea mare a metabolismului cerebral la copiii cu LCP. Oricum, concentrațiile serice de CNTF în acest grup de pacienți au crescut odată cu vîrsta, dar erau mai mici în valori absolute, comparativ cu grupul de copii sănătoși.

Din datele obținute de noi, se proiectează clar legătura dintre concentrațiile serice ale CNTF și gradul tulburărilor neurodevelopmentale la sugari și copiii de vîrstă mică. Nivelurile serice ale CNTF erau cu atât mai scăzute, cu cât severitatea afectării SNC era mai mare. Astfel că, la copiii cu LCP severe, nivelurile CNTF erau cele mai scăzute. Analizând datele expuse anterior, sugerăm existența unei interrelații dintre nivelurile CNTF și creșterea probabilității bolii; autenticitatea și disponibilitatea testului este mare pentru toate TR diagnosticate. Probabilitatea aprecierii sechelelor neurologice minore și majore se mărește semnificativ, odată cu dozarea nivelului de CNTF.

Concentrațiile înalte ale CNTF la 3 luni, la copiii din lotul „practic sănătoși”, semnifică un indiciu de „sănătate cerebrală”; în schimb, nivelurile scăzute ale CNTF, în valori absolute față de lotul de control, rezultă în tulburări reziduale minore (<7,76 pg/mL), exprimate prin: tulburări de atenție, comportamentale, de vorbire și limbaj etc., sau majore (<5,37 pg/mL): paralizie cerebrală și epilepsie. Valorile circulante scăzute ale CNTF (în special, în formele severe) denotă un risc crescut de dezvoltare a PC. În acest context, CNTF se prezintă drept un biomarker lezional al SCN, având influență nu numai asupra proceselor de neurodezvoltare, dar și asupra dezvoltării fizice (troficitatea musculară și dezvoltarea scheletului).

Un alt studiu, realizat pe șoareci adulți, confirmă că CNTF exogen reduce cu 50% depresia sinaptică în timpul stimulării repetitive (40 Hz, 2 min). Acest studiu notifică că CNTF exogen nu modulează eliberarea acută locală a transmițătorilor la nivelul sinapsei neuromusculare mamifere, dar poate proteja plăcile terminale mature din activitatea indusă de depresia sinaptică [12]. Iar studiul realizat de Seong Su Kang *et al.*

Elevation of CNTF levels by 15.6% at 12 months, comparatively with almost healthy children from our study at the age of 1-3 months, and in those with PCL (by 18.5%), confirm the influence of this neuronal factor in such processes like maturation and neurodevelopment during growing period. These results confirm the implication of CNTF in processes of neurodevelopment and support of cerebral metabolic processes.

In one of the studies held on mice, effects of CNTF and peptide 6 were appreciated. The last, is composed of amino acid remnants and structurally corresponds to CNTF. Both of them have the capacity to regenerate the brain and enhance neurogenesis [21].

In our study, we observed the rise of CNTF levels at 12 months, comparatively with 1-3 months, in absolute values, in children with PCL, with improvement of neuropsychological functions as well. These results confirm the active implication of CNTF in processes of neurodevelopment and sustaining of neurogenesis, neuroregeneration in children with PCL.

Large variations of CNTF in relative values with age (12 months compared to 1-3 months) in the PCL group (18.5%), especially in children with severe PCLH (32.6%) signifies the implication of this cytokine not only in processes like maturation, regeneration but also confirms the obtained results of other authors. Meantime, this results suggest the big intensity of the cerebral metabolism in children with PCL. However, seric concentrations of CNTF in this group of patients elevated with age, but were reduced in absolute values, comparatively with the group of healthy children.

From data obtained by us, we can underline the connection between seric concentrations of CNTF and the degree of neurodevelopmental disorders in newborns and infants. Lowest seric levels of CNTF corresponded with higher severity of CNS affection. Thus, children with severe PCL had the lowest levels of CNTF. Analyzing data previously displayed, we suggest an interrelation between CNTF levels and the rise of disease probability; authenticity and availability if the test are large for all diagnosed RD. The probability of minor and major sequelae appreciation significantly increases once the level of CNTF is appreciated.

High concentrations of CNTS at 3 months, in children from the “almost healthy” group signifies an indicator of “cerebral health”, instead, low levels of CNTF, in absolute levels compared to the control group, results in minor residual disorders (<7.76 pg/mL), expressed by: attention / behavior /language disorders etc., or major (<5.37 pg/mL): cerebral palsy and epilepsy. Low circulating levels of CNTF (especially in severe forms) denote an elevated risk of CP development. In this context, CNTF represents a lesional biomarker of the CNS, influencing both neurodevelopmental processes and physical development as well (muscular trophicity and skeleton development).

Another study, held on adult mice, confirms that exogenous CNTF reduces by 50% synaptic depression during repetitive stimulus (40 Hz, 2 min). This study shows that exogenous CNTF does not modulate acute local release of transmitters in the neuromuscular synapse in mammals, but can protect mature terminal plates from induced activity of synaptic depression [22]. The study made by Seong Su Kang *et al.* (2013), sug-

(2013), sugerează că CNTF endogen mediază accidentul vascular cerebral la şoareci adulți prin ameliorarea neurogenезei. CNTF fiind exprimat aproape exclusiv în sistemul nervos, reglementează structurile normale în neurogeneză. Astfel că, stimularea farmacologică cu CNTF endogen ar putea fi o strategie terapeutică bună pentru înlocuirea de celule după accidentul vascular cerebral [12]. Un alt studiu promovează o strategie terapeutică împotriva tulburărilor cognitive și regenerarea creierului prin administrarea Peptidei 6, luând în vedere unele efecte ale CNTF [21].

În unele abordări, efectuate pe celulele retiniene cocultivate în ser fetal bovin de 1%, care conțineau diferite concentrații de CNTF uman recombinant, s-au rezumat caracteristicile generale ale CNTF și funcțiile sale asupra NSCs în perspectiva elaborării unor strategii terapeutice importante de tratare a tulburărilor neurologice [6].

Într-un studiu, realizat pe şobolanii cu prejudicii neuronale, s-a observat că transplantul de celule stem-neuronale are rezultat terapeutic limitat, cu o slabă supraviețuire a acestor celule. Iar adăugarea zilnică de CNTF solubil pe transplantul de celule stem-neuronale în zona lezată a SNC, a facilitat supraviețuirea, migrația, proliferarea și diferențierea acestor celule. Se consideră că CNTF poate fi folosit pentru a ameliora micromediul în zona lezată a SNC [23]. Un alt studiu, argumentează efectele CNTF asupra miokinelor, influențând legătura bidirectională dintre mușchi și oase [24].

În studiul nostru, majorarea nivelelor serice de CNTF, odată cu creșterea copiilor sănătoși, dar mai mult – la copiii cu LCP, certifică această teorie și explică faptul că procesele intense de mielinizare la copiii sănătoși, dar, în special, la cei cu LCP, necesită administrare exogenă de CNTF pentru a grăbi maturarea cerebrală și a ameliora metabolismul cerebral al proteinelor.

Nivelurile scăzute de CNTF, după cum s-a constatat în studiu, evocă necesitatea administrării acestui FN la copiii cu LCP și argumentează importanța terapiilor neuroprotectoare la etape precoce la cei care au suportat EN, cu scop de reducere a handicapului neuropsihic și motor.

Prin urmare, găsirea unei relații dintre compartimentele studiate: LCP precoce, apărute drept consecință a EN, TR tardive și nivelurile scăzute ale CNTF, permit înțelegerea mai promtă a polimorfismului clinic al acestora, dar și unele aspecte patogenetice și terapeutice ale LCP.

Punctul forte al studiului nostru este că acesta a permis înțelegerea laturilor patogenetice ale LCP induse de EN, identificarea precoce a copiilor cu risc de dezvoltare a TR ale SNC și susținerea practicării terapiilor neuroprotectoare. Însă, sunt necesare studii clinice de amploare, în special, pe nou-născuți, care vor permite consolidarea concluziilor cu privire la mecanismele de intervenție, referitoare la plasticitatea creierului.

Concluzii

- 1) Concentrațiile serice de CNTF sunt scăzute semnificativ la copiii cu LCP, cu vîrstă între 1-3 și 12 luni, comparativ cu copiii practic sănătoși și coreleză cu modificările neurofiziologice și neuroimagistice.
- 2) Odată cu creșterea copilului, cresc concentrațiile serice de CNTF, notificând implicarea sa în procesele de neurodezvoltare atât la copilul practic sănătos, cât și la cel cu LCP.

gests that endogenous CNTF mediates stroke in adult mice by ameliorating neurogenesis. Being expressed exclusively in the CNS, CNTF regulates normal structures in neurogenesis. Thus, pharmacologic stimulation with endogenous CNTF could become a good therapeutic strategy for cell replacement after strokes [12]. Another study promotes a therapeutic strategy against cognitive disorders and brain regeneration by administering peptide 6, taking into consideration some effects of CNTF [21].

In some approaches, mad on retinal cells co-cultivated in 1% fetal bovine serum, that contained different amounts of human recombinant CNTF, general characteristics of CNTF and its effects on NSCs were summarized in the perspective of elaboration of new important therapeutical strategies in treating neurologic disorders [6].

In a study held on mice with neurological damage, it was noticed that neuronal stem cell transplant has limited therapeutic effect, with weak survival of the cells. Daily adding of soluble CNTF on NSCs in the damaged zone of the CNS, facilitated survival, migration, proliferation and differentiation of the cells. It is considered that CNTF can be used for ameliorating the micro-environment in the damaged zone of the CNS [23]. Another study supports the effects of CNTF on myokines, influencing the bi-directional bond between muscles and bones [24].

In our study, most of the seric levels of CNTF, together with healthy children growth and even more in children with PCL, certifies this theory and explains the fact that intense myelination processes in healthy children and especially in children with PCL, require exogenous administration of CNTF in order to enhance cerebral maturation and ameliorate cerebral and protein metabolism.

Low CNTF levels, as it was found in the study, recalls the necessity of administration of this NF in children with PCL and underlines the importance of neuro-protective therapies at early stages in patients that suffered from NE, in order to reduce neuropsychic and motor disabilities.

Therefore, finding a relation between studied compartments (early PCL, appeared as a consequence from NE, late RD and low levels of CNTF) allow us to better understand PCL clinical polymorphism and some therapeutical and pathogenetic aspects of PCL.

The strong points of our study is the fact that it allowed us to better understand pathogenetic aspect of PCL in NE, early identify children with risk of RD development and support neuroprotective therapies. But, further greater studies are required, especially held on newborns that will allow to consolidate conclusions regarding mechanisms of brain's plasticity.

Conclusions

- 1) Seric concentrations of CNTF are significantly low in children with PCL, with ages of 1-3 months and 12 months, compared to healthy children and correlates with neurophysiological and neuroimaging modifications.
- 2) Together with children's growth, seric concentrations of CNTF rise, notifying its implication in processes of neurodevelopment both in healthy children and in children with PCL.

3) Creșterea semnificativă a nivelurilor de CNTF la copiii cu paralizie cerebrală notifică importanța sa în procesele de neuroregenerare, iar la cei cu epilepsie – implicarea în procesele de epileptogeneză. Aceste rezultate sugerează necesitatea terapiilor neuroprotectoare (administrarea de CNTF) la etapele precoce ale leziunii.

Mulțumiri

Cercetarea dată a fost posibilă datorită unui grant individual de cercetare, oferit de compania „HOMEOFARM” SRL, care a asigurat logistica necesară pentru dozarea CNTF a 100 de copii.

Declarația de conflict de interese

Autorul declară lipsa conflictului de interese financiare în legătură cu această cercetare. Compania „HOMEOFARM” SRL a asigurat logistica necesară pentru dozarea CNTF în loturile de studiu.

Referințe / references

1. Amiel-Tison C., Gosselin J. Neurological development from birth to six years. *Guide for Examination and Evaluation*, 2001, 126.
2. Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr. Res. Anesthesiol.*, 1953; 32: 360.
3. Askvig J., Leiphon L., Watt J. Neuronal activity and axonal sprouting differentially regulate CNTF and CNTF receptor complex in the rat supraoptic nucleus. *Exp. Neurol.*, 2012; 233: 243-252.
4. Badr Zahr L., Purdy I. Brain injury in the infant: the old, the new, and the uncertain. *J. Perinat. Neonatal. Nurs.*, 2006; 20: 163-177.
5. Bhattacharya S., Das A., Mallya K., Ahmad I. Ciliary neurotrophic factor-mediated signaling regulates neuronal versus glial differentiation of retinal stem cells/progenitors by concentration-dependent recruitment of mitogen-activated protein kinase and Janus Kinase-Signal transducer and activator of transcription pathways in conjunction with notch signaling. *Stem Cells*, 2008; 26 (10): 2611-2624.
6. Blanchard J., Chohan M., Li B. *et al.* Beneficial effect of a CNTF tetrapeptide on adult hippocampal neurogenesis, neuronal plasticity, and spatial memory in mice. *J. Alzheimers Dis.*, 2010; 21: 1185-1195.
7. Brigadski T., Lebmann V. BDNF: a regulator of learning and memory processes with clinical potential. *e-Neuroforum*, 2014; 5(1): 1-11.
8. Carrillo-de-Sauvage M., Flament J., Bramoullé Y. *et al.* The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: an *in vivo* multimodal magnetic resonance imaging study. *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2015; 35: 917-921.
9. Ding J. *et al.* Role of ciliary neurotrophic factor in the proliferation and differentiation of neural stem cells. *J. Alzheimer's disease*, 2013; 37: 587-592.
10. Eerden P., Bernstein P. Summary of the publication „*Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy: Defining the Pathogenesis and Pathophysiology*” by the ACOG Task Force on Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy, 2003.
11. Frankenburg W. *et al.* The Denver II: a major revision and restandardization of the Denver Developmental Screening test. *Pediatrics*, 1992; 89: 91.
12. Garcia N., Santafe M., Toma's M. *et al.* Exogenous ciliary neurotrophic factor (CNTF) reduces synaptic depression during repetitive stimulation. *J. Peripheral Nerv. System*, 2012; 17 (3): 312-323.
13. Hamrick M., McNeil P., Patterson S. Role of muscle-derived growth factors in bone formation. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 2010; 10: 64-70.
14. Helgren M., Squinto S., Davis H. *et al.* Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell*, 1996; 76: 493-504.
15. Hossmann A. *et al.* Effect of BDNF and CNTF treatment on infarct volume after middle cerebral artery occlusion of rat: relationship to apoptotic cell injury. *J. Kriegstein (Ed): Pharmacology of Cerebral Ischemia*, 1998; 361-370.
16. Su K., Keasey M., Arnold S. *et al.* Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice. *Neurobiol.*, 2013; 49: 68-78.
17. Mineyko A., Kirton A. The black box of perinatal ischemic stroke pathogenesis. *J. Child. Neurol.*, 2011; 26: 1154-1162.
18. Mureșanu D. Factorii neurotrofici. *Libripress, București*, 2002, 85-113, 131-151, 163-168, 223-299.
19. Rachelle W. *et al.* Myokines (muscle-derived cytokines and chemokines) including ciliary neurotrophic factor (CNTF) inhibit osteoblast differentiation. *Bone*, 2014; 64: 1-10.
20. Rockenstein E., Ubhi K., Doppler E. *et al.* Regional comparison of the neurogenic effects of CNTF-derived peptides and cerebrolysin in A β PP transgenic mice. *J. Alzheimers Dis.*, 2011; 27 (4): 743-52.
21. Scharfman H., Goodman J. *et al.* Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.*, 2002; 174 (2): 201-14.
22. Talbott J., Cao Q., Bertram J. *et al.* CNTF promotes the survival and differentiation of adult spinal cord-derived oligodendrocyte precursor cells *in vitro* but fails to promote remyelination *in vivo*. *Exp. Neurol.*, 2007; 204: 485-489.
23. Vasiljevic B., Maglajlic-Djukic S., Gojnic M. *et al.* New insights into the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr. Int.*, 2011; 53: 454-62.
24. Wagener E., Matthias A., Samadhi A. *et al.* The amino acid exchange R28E in Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) abrogates interleukin-6 receptor-dependent but retains CNTF receptor-dependent signaling via Glycoprotein 130 (gp130)/Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR). *J. Biological Chemistry*, 2014; 289 (26): 18442-50. Yang Z., Qiao H., Li X. Effects of the CNTF-collagen gel-controlled delivery system on rat neural stem/progenitor cells behavior. *Sci. China Life Sci.*, 2010; 53: 504-10.

Acknowledgement

The present study was possible due to the individual research grant, offered by the “HOMEOFARM” LTD that provided with necessary logistics for CNTF dosing in 100 children.

Declaration of conflicting interests

The author declares no conflict of interest regarding this research. “HOMEOFARM” LTD provided with necessary logistics for CNTF dosing in the study groups.