NESTIN IN NEONATAL HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

Thesis Submitted for Partial Fulfillment of Master Degree in Pediatrics

By

Alaa Fathy Mahmoud Salama

M.B.B.Ch 2005

Faculty of Medicine- Ain Shams University

Under Supervision of

Prof. Dr. Sahar Mohamed Ahmed Hassanein

Professor of Pediatrics and Neonatology
Faculty of medicine- Ain Shams University

Prof. Dr. Hanna Ahmed Amer

Professor of Clinical Pathology
Faculty of medicine- Ain Shams University

Dr. Rania Ali Hassan El-Farrash

Lecturer of Pediatrics
Faculty of medicine- Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams University
2011

Summary

Perinatal hypoxia/ischemia (H/I) is the leading cause of neurologic injury resulting from birth complications. Recent advances in critical care have dramatically improved the survival rate of infants suffering this insult, but-50% of survivors will develop neurologic sequelae such as cerebral palsy, epilepsy or cognitive deficits.

Nestin is a recently discovered intermediate filament found in neurons and astrocytes, its cellular expression is up-regulated in response to situations of cellular stress and/or induced proliferation in the nervous system.

The aim of the present analysis is to provide an evidence of neural stem progenerator cells response that proceeds to the increase in neurogenesis after a preinatal H/I insult and expresses nestin as an immature multipotent precursors.

This was achieved by flow cytometric detection of nestin expressing stem cells in the umbilical cord blood of 20 full term neonates suffering from prenatal hypoxic ischemia and 20 non-asphyxiated full term neonates as control group.

In the current study, we found a significant increase in the nestin^{+} cells in asphyxiated neonates compared to non-asphyxiated neonates.

No significant difference between the three Sarant stages of asphyxiated group, as regards the percent of nestin $^{+}$ cells. No significant difference between survivor and non survivor of asphyxia group as the percent of regards nestin $^{+}$ cells.

Correlation studies revealed no significant relation between any of the clinical and laboratory data and percent of nestin^{+} cells.

Acknowledgement

*First, thanks are all due to **Allah** for Blessing this work until it has reached its end, as a part of his generous help throughout our life.*

*I am deeply grateful to **Prof. Dr. Sahar Mohamed Ahmed Hassanein**, Professor of Pediatrics and Neonatology, Faculty of Medicine, Ain Shams university for her great supervision, great help, available advises, continuous encouragement and without her support it was impossible for this study to be achieved in this form. I had the privilege to benefit from her great knowledge, and it is an honor to work under her guidance and supervision.*

*I am also greatly indebted to **Prof. Dr. Hanna Ahmed Amer**, Professor of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Ain-Shams University, for sponsoring this work, and her keen supervision.*

*I would like to direct my special thanks to **Dr. Rania Ali Hassan El-Farrash**, Lecturer of Pediatrics, Faculty of Medicine, Ain Shams University, for her invaluable help, fruitful advice, continuous support offered to me and guidance step by step till this essay finished.*

*I am want also to thank **my family and my husband** for supporting me throughout my life.*

Alaa Fathy Mahmoud Salama

List of Tables

Table	Title	Page
1	Causes of fetal Hypoxic-Ischemic Insult.	7
2	Sarnat and Sarnat Stages of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy.	17
3	Examples of stem cells Markers.	49
4	Apgar scoring system.	65
5	Descriptive hematological data of HIE patients.	72
6	The main clinical characteristics of HIE and control group.	73
7	Comparison of percent of nestin^{+} cells between HIE patients and healthy neonates.	75
8	Comparison of percent of nestin^{+} cells between healthy neonates (control group) and different Sarant Stages.	76
9	Comparison between non-survivors and survivors as regard percent of nestin^{+} cells.	78
10	Correlation between percent of nestin^{+} cells and different clinical and laboratory data among HIE patients.	80

List of Figures

Fig.	Title	Page
1	Neurogenesis persists throughout life.	34
2	Mobilization of endogenous neural stem cells.	40
3	Examples of stem cell markers.	50
4	Structure of intermediate filament.	57
5	Immunohistochemistry of rat brain tissue showning nestin (green and red.	59
6	Classification of HIE patients by Sarant staging system.	74
7	Percent of nestin^{+} cells in HIE Patients and healthy neonates.	75
8	Percent of nestin^{+} cells in healthy neonates (control) and HIE subgroups.	77
9	Percent of nestin^{+} cells in non-survivors and survivors	79

List of Abbreviations

6-OHDA	:	6-hydroxy dopamine
ATPase	:	Adinasone triphosphate
BDNF	:	Brain derived neurotrophil factor
bFGF	:	Basic fibroblast growth factor
bP	:	Base pair
Brdu	:	Bromo deoxyuridine
CBC	:	Complete blood count
CBF	:	Cerebral blood flow
CK-BB	:	Serum creatine kinse Brain Bound fraction
CK-MB	:	Creatnine kinase myocardial bound fraction
CNS	:	Central nervous system
CP	:	Cerebral palsy
CT	:	Computed tomography
CTNI	:	Cardiac tropnin I
CTNT	:	Cardiac trophin T
DCX	:	Double cortix
DG	:	Dentate gyrus
DIC	:	Dissemented intravascular coagulation
EDTA	:	Ethylenediaminetetra acetic acid
EEG	:	Electroencephalogram
EGF	:	Epidermal growth factor
eNOS	:	Endothelial nitric oxide synsythase
EPO	:	Erythropiotin
ES	:	Embryonic stem cell
FITC	:	Fluroscein isothyocyntate
G-CSF	:	Granulocyte colony stimulating factor
GFAP	:	Glial fibrillary acidic protein
GFP	:	Green fluroscent proteiu
GZ	:	Granular zone
hES	:	Human embryonic stem cell
HIE	:	Hypoxic ischemic encephalopathy
HR	:	Heart rate

List of Abbreviations (Cont.)

HSC	:	Hematopiotic stem cell
IF	:	Intermediate filament
IGF-I	:	Insulin like growth factor-I
iNOS	:	Inducible nitric oxide synthase
MCA	:	Middle cerebral artery
MRI	:	Magnetic resonance imaging
MRS	:	Magnetic resonance spectroscopy
MSC	:	Mesenchymal stem cell
NEC	:	Necerotizing enterocolitis
NMDA	:	N-mythl-D-aspartate
nNOS	:	Neuronal nitric oxide synsythase
NO	:	Nitric oxide
NOS	:	Nitric oxide synsythase
NSCs	:	Neural stem cells
NSPS	:	Nural stem progenirator cells
PCR	:	Polymerase chain reaction
PNS	:	Peripheral nervous system
PPHN	:	Presistant pulmonary hypertension
PPV	:	Posterior periventricle
RBC	:	Red blood cell
RDS	:	Respiratory distress syndrome
RMS	:	Rostral migratory stream
SCZ	:	Subcallosal zone
SGZ	:	Subgranular zone
SVZ	:	Subventricular zone
TGF	:	Transforming growth factor
UCB	:	Umbilical card blood
ULF	:	Unite-length filaments
VEGF	:	Vascular endothelial growth factor

List of Contents

	Page
Acknowledgement	-
List of Abbreviations	I
List of Tables	III
List of Figures	IV
Introduction and Aim of The Work	1
Review of Literature	4
Perinatal Asphyxia	4
Ischemia-induced neurogenesis	33
Neural Stem Cells Markers	46
Patients and Methods	64
Results	71
Discussion	81
Summary	88
Conclusion	89
Recommendations	90
References	91
Arabic Summary	--

نستين في الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين في حديثي الولادة

رسالة

توطئة للحصول على درجة الماجستير في **طب الأطفال**

مقدمة من

الطبيبة / آلاء فتحي محمود سلامة

بكالوريوس الطب والجراحة . جامعة عين شمس (٢٠٠٥)

تحت إشراف

الأستاذة الدكتورة / سحر محمد أحمد حسنين

أستاذ طب الأطفال

كلية الطب . جامعة عين شمس

الأستاذة الدكتورة / هناء أحمد عامر

أستاذ الطب المعملي

كلية الطب . جامعة عين شمس

الدكتورة / رانيا على حسن الفراش

مدرس طب الأطفال

كلية الطب . جامعة عين شمس

كلية الطب

جامعة عين شمس

٢٠١١

الملخص العربي

المقدمة :

يعتبر الاعتلال الدماغي متلازمة تظهر نتيجة اضطرابات عصبية نلحظها في الأيام الأولى من الأطفال حديثي الولادة كاملين النمو والتي تؤدى إلى أن يعاني الأطفال الأعراض التالية : صعوبة في بدء ومواصلة التنفس، تشنجات عصبية، انخفاض في مستوى الوعى وضعف أو إختفاء في ردود الأفعال العصبية، وهذا يحدث نتيجة لنقص الأكسجين الواصل للدماغ الذي يؤدى إلى الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين في حديثي الولادة بعد الاختناق الوليدي.

إن حدوث الاعتلال الدماغي في حديثي الولادة يعتبر من أكثر الأمراض العصبية شيوعاً في الأطفال ويرتبط حدوث الاعتلال بالأحداث قبل وأثناء وبعد الولادة حيث تمثل أحداث ما قبل الولادة وأثناء الولادة ٩٠% من الأسباب.

ويعتبر الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين في الأجنة حديثي الولادة بعد الاختناق الوليدي سبب من الأسباب الهامة في معدل الوفيات ومعدل الاعتلال والإعاقات العصبية الدائمة.

ومن المعلوم أن الاعتلال الدماغي هو ما يؤدى إلى الشلل الدماغي وذلك نتيجة اختلال في مناطق المخ المسئولة عن الوضع والحركة ويقسم حسب عدد الأطراف المصابة على سبيل المثال (شلل نصفي . رباعي) ونوع من الاختلال الحركي.

كما أن الخلايا العصبية تنتج من خلايا موجودة في الأنبوبة العصبية ويعتبر النستين بروتين عصبي حامض يوجد في الخلايا العصبية ويستخدم للتعريف بها ويوجد أيضاً على الخلايا الجذعية الموجودة بالجهاز العصبي المركزي ويتحكم في وجود النستين وجود إثارات أو اضطرابات داخلية عصبية.

الهدف من الدراسة :

هدف الدراسة الحالية هو البحث وتقييم أهمية ارتفاع مستويات النستين وقيمته التشخيصية في حالات الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين في الأجنة حديثي الولادة بعد الاختناق الوليدي.

خطة البحث وطرقه :

تم إجراء هذه الدراسة على عينات من الدم في الحبل السري لعدد من ٢٠ طفل حديثي الولادة ممن يعانون من الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين بعد الاختناق الوليدي، وتم مقارنتهم بـ ٢٠ طفل حديثي الولادة مكتملي النمو في وحدة العناية المركزة لحديث الولادة بمستشفى النساء والتوليد بجامعة عين شمس ، وتم تقييم النسبة المئوية لخلايا النستين في العينات بواسطة تحليل التدفق السيتوميتري الطيفي لعينة منفصلة منفردة النواة من الخلايا وذلك باستخدام الأجسام المضادة للنستين ، وتم أيضاً دراسة أثر الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين على النسبة المئوية لهذه الخلايا، إضافة لذلك تم تتبع كافة حالات الأطفال المولودة والتي تعرضت للاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين وذلك لتقييم العلاقة بين درجة المرض ونسبة هذه الخلايا.

النتائــج :

أثبتت الدراسة وجود ارتفاع بدرجة ذات دلالة إحصائية في النسبة المئوية للخلايا الموجبة للنستين بدم الحبل السري عند الأطفال حديثي الولادة الذين يعانون من الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين مقارنة بالأطفال حديثي الولادة ولم يتعرض للاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين.

تم تقييم الأطفال الذين عانوا من الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين إلى ثلاث فئات طبقاً لنظام سارنات إلى : ٤ أطفال يعانون من اعتلال

خفيف معتدل ناتج عن نقص الأكسجين (٢٠%)، ٧ أطفال يعانون من اعتلال معتدل ناتج عن نقص الأكسجين (٣٥%) و ٩ أطفال يعانون من اعتلال حاد ناتج عن نقص الأكسجين.

كما لوحظ أنه لا يوجد أى فرق بدرجة ذات دلالة إحصائية في النسبة المئوية للخلايا الموجبة للنستين بدم الحبل السري عند فئات الأطفال الذين يعانون من الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين والأطفال حديثي الولادة ولم يتعرضوا للاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين.

وكما لوحظ أيضاً أنه لا يوجد فر ق بدرجة ذات دلالة إحصائية بين الأطفال الذين تمكنوا من النجاة من أعراض ومضاعفات الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين والأطفال الذين لم يتمكنوا من النجاة من أعراض ومضاعفات الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين.

ولوحظ عدم وجود علاقة بين مختلف البيانات العملية والمعملية والنسبة المئوية للخلايا الموجبة للنستين.

استخلص من البحث :

من النتائج السابقة من الممكن أن نستنتج الأتي : عدد الخلايا الكاملة للنستين في الحبل السري تكون أعلى في الأطفال حديثي الولادة الذين يعانون من الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين مقارنة بالأطفال حديثي الولادة الذين لم يعانوا من الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين.

أوصى البحث :

- استخدام الاختبارات والتحاليل التقييمية مباشرة بعد الولادة لكافة الأطفال حديثي الولادة لتحسب وجود عوامل خطورة قد تعرض لها الطفل أثناء

الـولادة ممـا قـد يـؤدى لحـدوث وظهـور أعـراض ومضـاعفات الاعـتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين.

- استخدام نظـام سـارنات لتقيـيم وتحديـد الأعـراض وعلامـات المـرض ممـا يسـهل ويحسـن المسـتوى الطبـي العلاجـي الـلازم ولتقيـيم درجـة المـرض وتشخيصه بدقة.

- اسـتخدام دم الحبـل السـري كوسـيلة غنيـة لإجـراء دراسـات موسـوعة عـن الخلايا الجذعية العصبية للأطفال حديثي الولادة.

- محاولـة لإضـافة توضـيح لاسـتخدام الخلايـا العصـبية المتولـدة مـن الجهـاز العصبي عند حدوث أى نوع من أنواع الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسـجين ممـا يسـاعد مستقبلاً فـي إنتـاج علامـات مبنيـة علـى إنتـاج هذه الخلايا وزيادة إنتاجها عن طريق المخ للتقليل أو لتفادي أعراض الاعتلال الدماغي الناتج عن نقص الأكسجين بعد الاختناق الوليدي.

Introduction

Neonatal encephalopathy is a clinically-defined syndrome of disturbed neurologic function that is seen in the first days of life of a term or near-term infant, and is manifested by "difficulty with initiating and maintaining respirations, depression of tone and reflexes, subnormal level of consciousness, and often, seizures" Neonatal encephalopathy that results from systemic hypoxemia and decreased cerebral perfusion leading to ischemia is termed hypoxic-ischemic encephalopathy ***(Nelson and Leviton, 1991).*** Hypoxic ischemic encephalopathy is an important cause of neonatal mortality and morbidity and permanent neurological disabilities ***(Hagberg et al., 2001).***

Neurons and glial cells are derived from proliferating and differentiating neuroepithelial progenitor cells of the neural tube ***(Morshead et al., 1994).***

Nestin is an intermediate filament protein related to neurofilaments and glial fibrillary acidic protein, which are found in neurons and astrocytes, respectively. Nestin is predominantly expressed in the dividing neuroepithelial cells of the newly closed neural tube and has been extensively used to identify the population of central nervous system (CNS) progenitor cells in rodents ***(Teranishi et al., 2007).*** In addition, it has been shown that the stem cells of the adult CNS also express nestin ***(Reynolds and Weiss, 1992)***.

The expression of nestin is up-regulated in response to situations of cellular stress and/or induced proliferation in the nervous system. Thus, nestin is reexpressed in CNS tumors ***(Tohyama et al., 1992)*** and in immortalized cell lines derived from emberyonic cells of nervous tissue ***(Redies et al., 1991).***

Little is yet known about the expression of nestin during human fetal and postnatal development, but it has been

demonstrated that cells in the germinal matrix of the human fetus at 17 and 20 weeks gestational age and some morphologically immature subependymal cells at 40 weeks gestational age express nestin ***(Tohyama et al., 1992).***