

НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БИОМАРКЁРЫ КАК ИНСТРУМЕНТ РАННЕГО РАСПОЗНАВАНИЯ БИЛИРУБИНОВОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД И КЛИНИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Салихова К.Ш., Бахромов Ш.М., Абдурахманова Ф.Р., Худоёрова З.С.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр
педиатрии, г. Ташкент

XULOSA

Tadqiqot maqsadi. Bilirubin ensefalopatiyasi bo'lgan yangi tug'ilgan chaqaloqlarda biomarkerlarning diagnostik ahamiyati va ularning markaziy asab tizimi shikastlanishini erta aniqlashdagi rolini baholash.

Materiallar va usullar. Og'ir konyugatsiyalanmagan giperbilirubinemiya bo'lgan 105 bola va 20 sog'lom chaqaloqni tekshirish materiali asosida immunoferment tahlil usulida aniqlangan neyronspezifika enolaza (NSE), qon tomir endoteliy o'sish omili (VEGF) va miya neyrotrofik omili (BDNF) darajalari hamda ularning bilirubin konsentratsiyasi bilan bog'liqligi baholangan.

Natijalar. Pigment yuklamasining ortishi neyronal shikastlanish va tomir-yallig'lanish javobi markerlarining ko'tarilishi bilan kechishi, ayni paytda neyrotrofik himoyaning susayishi ko'rsatilgan. NSE/VEGF/BDNF panelini an'anaviy bilirubin monitoringiga qo'shimcha sifatida qo'llash asab tizimining subklinika zararlanishini aniqlash va davolashni o'z vaqtida tuzatish imkonini berishi asoslangan.

Kalit so'zlar: yangi tug'ilgan chaqaloqlar, giperbilirubinemiya, bilirubin ensefalopatiyasi, neyrospezifika biomarkerlar, erta tashxis.

SUMMARY

Objective. To evaluate the diagnostic significance of biomarkers in newborns with bilirubin encephalopathy and their role in the early detection of central nervous system (CNS) injury.

Materials and methods. Drawing on the examination of 105 infants with severe unconjugated hyperbilirubinemia and 20 healthy neonates, the authors assess the levels of neuron-specific enolase (NSE), vascular endothelial growth factor (VEGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), measured by enzyme-linked immunosorbent assay, together with their relationship to bilirubin concentration.

Results. A rising pigment load is shown to be accompanied by an increase in markers of neuronal injury and of the vascular-inflammatory response, while neurotrophic protection is simultaneously suppressed. The paper substantiates the value of the NSE/VEGF/BDNF panel as a supplement to routine bilirubin monitoring, allowing subclinical injury of the nervous system to be detected and treatment adjusted in good time.

Keywords: neonates, hyperbilirubinemia, bilirubin encephalopathy, neurospecific biomarkers, early diagnosis.

Желтуха знакома практически каждому неонатологу. У большинства детей она безобидна и уходит сама, по мере того как созревают ферментные системы печени. Проблема начинается там, где концентрация неконъюгированного билирубина переходит индивидуальный порог токсичности. Свободная фракция пигмента липофильна, она беспрепятственно минует гематоэнцефалический барьер и избирательно накапливается в базальных ганглиях, ядрах ствола, гиппокампе и мозжечке [1,3]. Такая избирательность и определяет узнаваемую клинику билирубинового поражения вплоть до ядерной желтухи.

Почему нервная ткань столь уязвима? Билирубин нарушает целостность плазматических, митохондриальных и эндоплазматических мембран, запускает эксайтотоксические реакции, обедняет энергетический ресурс митохондрий, повышает внутриклеточный кальций и усиливает окислительный стресс; финалом каскада становится апоптоз [2,3,13]. У новорожденного дело осложняется незрелостью самого

барьера, который в норме должен был бы пигмент задержать. Нейроны страдают заметно сильнее глии, и именно этим объясняется стойкость последствий у выживших детей: атетодная форма церебрального паралича, нейросенсорная тугоухость, глазодвигательные расстройства [1,2].

Однако в повседневной практике врач располагает довольно грубым инструментарием. Общий билирубин, номограммы Bhutani, неврологический осмотр [1,6] говорят о риске, но молчат о том, началось ли повреждение нейронов. Когда симптоматика разворачивается, изменения нередко уже необратимы. Отсюда и запрос на лабораторные показатели, которые улавливали бы субклиническое повреждение и служили бы сигналом к усилению терапии [14].

Таковыми показателями всё чаще называют нейроспецифические маркёры. Нейронспецифическая энлаза (NSE) представляет собой гликолитический фермент нейронов и нейроэндокринных клеток; её появление в кровотоке означает, что нейрональные

мембраны утратили целостность, поэтому NSE давно рассматривается как индикатор острого повреждения нейронов [5,7]. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) отражает иную сторону процесса, гипоксически-ишемическую и нейровоспалительную, и тесно сопряжён с проницаемостью гематоэнцефалического барьера [8,10]. Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) отвечает за выживание нейронов и синаптическую пластичность, и его убыль сигнализирует об истощении нейротрофической защиты [11]. Взятые вместе, три показателя описывают не только сам факт повреждения, но и его направленность. Работ, где эта триада изучалась бы именно при гипербилирубинемии, пока немного [15].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить диагностическую значимость сывороточных биомаркёров NSE, VEGF и BDNF и характер их связи с уровнем билирубина при билирубиновой энцефалопатии у новорождённых.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы обследовали 125 новорождённых, находившихся под наблюдением в Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре педиатрии. Основную группу составили 105 детей с тяжёлой неконъюгированной гипербилирубинемией и клиническими признаками билирубиновой энцефалопатии. В контрольную группу вошли 20 здоровых новорождённых сопоставимого гестационного возраста, без желтухи и неврологической симптоматики.

По гестационному возрасту ($38,2 \pm 1,1$ и $38,5 \pm 0,9$ нед.) и массе тела при рождении (3150 ± 280 и 3220 ± 260 г) группы не различались. Это позволило снять вопрос о влиянии недоношенности и задержки внутриутробного развития на итоговые цифры. Каждому ребёнку выполняли общеклиническое и неврологическое обследование, определяли общий билирубин и его фракции.

Концентрацию NSE, VEGF и BDNF в сыворотке измеряли методом иммуноферментного анализа коммерческими тест-системами по инструкции производителя. Кровь брали в условиях, сводящих гемолиз к минимуму: гемолизированная проба завышает NSE и делает результат непригодным [7]. Данные представлены в формате $M \pm \sigma$. Межгрупповые различия оценивали по t-критерию Стьюдента, связь билирубина с маркёрами – корреляционным анализом Пирсона (r). Порог значимости приняли равным $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические характеристики детей приведены в таблице 1. По антропометрии и срокам гестации группы оказались однородны. Различие касалось билирубина: в основной группе он более чем втрое превышал контрольные значения ($256,9 \pm 21,7$ против $78,4 \pm 10,2$ мкмоль/л; $p < 0,001$). Это уровень, отвечающий критериям тяжёлой гипербилирубинемии с реальным риском нейротоксичности [1,6].

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных новорождённых

Показатель	Основная группа (n=105)	Контрольная группа (n=20)
Возраст, дни	14–45	5–10
Гестационный возраст, нед.	$38,2 \pm 1,1$	$38,5 \pm 0,9$
Масса тела при рождении, г	3150 ± 280	3220 ± 260
Общий билирубин, мкмоль/л	$256,9 \pm 21,7$	$78,4 \pm 10,2^*$

Примечание: * – $p < 0,001$ по сравнению с основной группой.

Анализ маркёров дал отчётливую картину (табл. 2). У детей с билирубиновой энцефалопатией NSE превысила контроль более чем втрое ($28,6 \pm 5,4$ против $9,2 \pm 1,8$ нг/мл; $p < 0,001$). Такой прирост логично связать с разрушением нейрональных мембран и выходом внутриклеточного фермента в кровь. Полученные нами данные согласуются с наблюдениями Çeltik C. и соавт. [5], а также Kelen D. и соавт. [9], где NSE показала себя чувствительным индикатором острого нейронального повреждения при перинатальной патологии ЦНС. Обращала на себя внимание и клиническая параллель: у детей с наиболее высокими значениями NSE чаще регистрировались угнетение ЦНС, снижение двигательной активности, изменения мышечного тонуса, задержка формирования ранних рефлексов. Это косвенно подтверждает дозозависимый характер билирубиновой нейротоксичности [15].

тором острого нейронального повреждения при перинатальной патологии ЦНС. Обращала на себя внимание и клиническая параллель: у детей с наиболее высокими значениями NSE чаще регистрировались угнетение ЦНС, снижение двигательной активности, изменения мышечного тонуса, задержка формирования ранних рефлексов. Это косвенно подтверждает дозозависимый характер билирубиновой нейротоксичности [15].

Таблица 2

Уровень нейроспецифических биомаркёров в исследуемых группах

Показатель	Основная группа (n=105)	Контрольная группа (n=20)	p
NSE, нг/мл	$28,6 \pm 5,4$	$9,2 \pm 1,8$	$< 0,001$
VEGF, пг/мл	$312,4 \pm 41,7$	$185,6 \pm 28,3$	$< 0,001$
BDNF, нг/мл	$14,8 \pm 3,1$	$26,3 \pm 4,2$	$< 0,001$

Примечание: p – достоверность различий с контрольной группой (t-критерий Стьюдента).

VEGF в основной группе также был достоверно выше ($312,4 \pm 41,7$ против $185,6 \pm 28,3$ пг/мл; $p < 0,001$). Здесь речь идёт уже о другой стороне процесса: о росте проницаемости гематоэнцефалического барьера и ангиогенном ответе на фоне билирубиновой агрессии [8,10]. Одновременно мы зафиксировали значимое падение BDNF ($14,8 \pm 3,1$ против $26,3 \pm 4,2$ нг/мл; $p < 0,001$), то есть угасание нейротрофической поддержки и сужение репаративных возможно-

стей нервной ткани [12].

Чтобы уточнить патогенетическую роль изученных показателей, мы соотнесли их с общим билирубином (табл. 3). Связь билирубина с NSE оказалась сильной и прямой ($r = +0,72$; $p < 0,001$), с VEGF – прямой, средней силы ($r = +0,65$; $p < 0,001$). Проще говоря, чем выше пигментная нагрузка, тем выраженнее и повреждение нейронов, и сосудисто-воспалительный ответ.

Таблица 3

Корреляционные связи между уровнем билирубина и биомаркерами (коэффициент Пирсона, r)

Параметры	r	Характер связи	p
Билирубин – NSE	+0,72	сильная прямая	< 0,001
Билирубин – VEGF	+0,65	прямая средней силы	< 0,001
Билирубин – BDNF	-0,68	сильная обратная	< 0,001

Примечание: r – коэффициент корреляции Пирсона; p – уровень статистической значимости.

С BDNF картина перевернулась: сильная обратная корреляция ($r = -0,68$; $p < 0,001$). Растёт билирубин, падает нейротрофическая защита. Разнонаправленность связей для нас принципиальна. Она означает, что три маркера не дублируют друг друга, а освещают разные звенья одного процесса: цитолиз нейронов, нарушение сосудистой проницаемости, ослабление нейротрофической поддержки. Близкие по знаку и силе соотношения между NSE, BDNF и билирубином были получены нами ранее и на другой выборке новорождённых [12].

Полученная картина хорошо укладывается в современные представления о молекулярных основах билирубиновой нейротоксичности [2,13]. Проникнув в мозг, неконъюгированный билирубин вызывает митохондриальную дисфункцию, ломает энергетический обмен, провоцирует окислительный стресс. Отдельного упоминания заслуживает реакция астроцитов. По данным Brites D. [4] и Bortolussi G. и соавт. [3], их активация двойственна: поначалу она защищает нейроны, но при избыточной стимуляции оборачивается против них, поддерживая нейровоспаление и вторичную гибель клеток. В этой системе координат рост NSE отражает степень нейрональной деструкции, повышение VEGF – сосудисто-воспалительный компонент, снижение BDNF – угнетение нейропротективных и нейропластических механизмов. Ценность панельного подхода как раз в том, что ни один из этих маркеров по отдельности такой полноты не даёт.

Что это значит для клиники? Панель NSE/VEGF/BDNF способна дополнить рутинный мониторинг билирубина. Она позволяет увидеть субклиническое повреждение и обосновать усиление лечения (фототерапия, инфузионная терапия, заменное переливание крови) до того, как изменения станут необратимыми. Схожую логику предлагают авторы, включающие лабораторные предикторы в модели риска острой билирубиновой энцефалопатии [5,13].

Работа не лишена ограничений. Контрольная группа сравнительно невелика, а маркеры измеря-

лись однократно, вне динамики. Логичным продолжением нам видится изучение их изменений на фоне терапии и сопоставление с отдалёнными неврологическими исходами, тем более что прогностический потенциал BDNF в этом отношении выглядит наиболее многообещающим [11,12].

ВЫВОДЫ

1. У новорождённых с билирубиновой энцефалопатией сывороточные нейроспецифические маркеры достоверно смещены: NSE растёт до $28,6 \pm 5,4$ нг/мл, VEGF до $312,4 \pm 41,7$ пг/мл, тогда как BDNF падает до $14,8 \pm 3,1$ нг/мл ($p < 0,001$ в сравнении со здоровыми детьми).

2. Билирубин сильно и прямо связан с NSE ($r=+0,72$), умеренно и прямо – с VEGF ($r = +0,65$) и сильно обратно с BDNF ($r = -0,68$). По мере усиления гипербилирубинемии нейрональное повреждение нарастает, а нейротрофическая защита истощается.

3. Совместное определение NSE, VEGF и BDNF охватывает разные звенья патогенеза билирубиновой нейротоксичности и может служить перспективной панелью для ранней диагностики билирубиновой энцефалопатии и своевременной коррекции терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bhutani V.K., Johnson L. A proposal to prevent severe neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus. J Perinatol. 2009; 29(Suppl 1):S61-S67.
2. Boskabadi H., Zakerihamidi M., Bagheri F. Outcomes of neonatal hyperbilirubinemia and its neurodevelopmental sequelae: a review. Iran J Neonatol. 2018;9(1):91-99.
3. Bortolussi G., Codarin E., Antoniali G., et al. Inflammatory signature of cerebellar neurodegeneration during neonatal hyperbilirubinemia in Ugt1-/- mouse model. J Neuroinflammation. 2015; 12:148.
4. Brites D. The evolving landscape of neurotoxicity by unconjugated bilirubin: role of glial cells and inflammation. Front Pharmacol. 2012;3:88.
5. Çeltik C., Acunaş B., Öner N., Pala O. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and out-

- come of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev.* 2004;26(6):398-402.
6. Chang P.W., Newman T.B., Maisels M.J. Update on predicting severe hyperbilirubinemia and bilirubin neurotoxicity risks in neonates//*Curr Pediatr Rev.* 2017;13(3):181-187.
 7. Isgro M.A., Bottoni P., Scatena R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects//*Adv Exp Med Biol.* 2015; 867:125-143.
 8. Jayanti S., Ghersi-Egea J.F., Strazielle N., Tiribelli C. Severe neonatal hyperbilirubinemia and the brain: the old but still evolving story//*Pediatr Med.* 2021; 4:37.
 9. Kelen D., Andorka C., Szabó M., et al. Serum copeptin and neuron-specific enolase are markers of neonatal distress and long-term neurodevelopmental outcome. *PLoS One.* 2017; 12(9):e0184593.
 10. Le Y.Z., Xu B., Chucair-Elliott A.J., et al. VEGF mediates retinal Müller cell viability and neuroprotection through BDNF in diabetes//*Biomolecules.* 2021;11(5):712.
 11. Numakawa T., Odaka H., Adachi N. Actions of brain-derived neurotrophic factor in neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases// *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3650.
 12. Salikhova K.Sh., Bakhromova S.M., Agzamkhodzhaeva B.U., Abdurakhmanova F.R., Ishniyazova N.D. Neuromolecular markers of brain damage in newborns with severe hyperbilirubinemia. *Pediatrics (Uzbekistan).* 2024.
 13. Watchko J.F. Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns// *Neuromolecular Med.* 2006;8(4):513–529.
 14. Watchko J.F., Tiribelli C. Bilirubin-induced neurologic damage: mechanisms and management approaches//*N Engl J Med.* 2013;369(21):2021–2030.
 15. Zadvornov A.A., Golomidov A.V., Grigoriev E.V. Biomarkers of perinatal injury of the central nervous system in newborns//*Neonatology: News, Opinions, Training.* 2017; (1):47–57.
-