

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-119-126

Цитокиновый профиль кала недоношенных новорожденных в диагностике некротизирующего энтероколита: результаты пилотного исследования

Е.Е. Костерина¹, Е.Н. Балашова¹, А.М. Красный¹, А.Р. Киртбая^{1,2}, А.А. Рудакова¹, А.А. Садекова^{1,3}, В.В. Вторушина¹, Л.В. Кречетова¹, О.В. Ионов^{1,2,4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

²ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

³Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва

⁴ГБУЗ МО «Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области», Москва

Цель исследования: определить уровень фекальных цитокинов у глубоко недоношенных новорожденных при развитии неспецифических клинических проявлений некротизирующего энтероколита (НЭК) и дискинезии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Исследование одобрено этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. Информированное согласие об участии в исследовании было получено от родителей всех пациентов. Исследование проведено на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России в период с июня 2020 г. по декабрь 2022 г. Образцы кала недоношенных новорожденных гестационного возраста 32 недели и менее, проходивших лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии им. проф. А.Г. Антонова, собирались ежедневно на протяжении первых 14 дней жизни. Для анализа были выбраны образцы от 46 новорожденных: образцы кала в день возникновения эпизода инtolерантности к энтеральной нагрузке и контрольные образцы кала новорожденных, не развивших неспецифические клинические проявления НЭК и дискинезии ЖКТ, соответствующие дню достижения объема энтерального питания 100 мл/кг/сут. Ретроспективно по результатам диагностики НЭК и дискинезии ЖКТ образцы кала были разделены на 3 группы: группа НЭК ($n = 8$), группа дискинезии ЖКТ ($n = 14$) и группа контроля ($n = 24$). В образцах кала глубоко недоношенных новорожденных с НЭК II стадии и выше в день возникновения начальных симптомов заболевания отмечается значимое повышение уровней IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α . При этом цитокиновый профиль кала новорожденных из группы дискинезии ЖКТ достоверно не отличался от группы контроля ни по одному показателю. При развитии НЭК на стадии возникновения инtolерантности к энтеральному питанию в кале выявляются высокие уровни IL-6, IL-8, IL-10 и TNF- α , что может свидетельствовать о перспективности метода определения про- и противовоспалительного профиля цитокинов кала в дифференциальной диагностике НЭК и дискинезии ЖКТ у глубоко недоношенных новорожденных. **Ключевые слова:** недоношенный новорожденный, энтеральное питание, очень низкая масса тела, экстремально низкая масса тела, некротизирующий энтероколит, фекальные цитокины

Костерина Е.Е. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (1): 119–26. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-119-126

Fecal cytokine profile in preterm infants in the diagnosis of necrotizing enterocolitis: pilot study results

E.E. Kosterina¹, E.N. Balashova¹, A.M. Krasnyi¹, A.R. Kirtbaya^{1,2}, A.A. Rudakova¹, A.A. Sadekova^{1,3}, V.V. Vtorushina¹, L.V. Krechetova¹, O.V. Ionov^{1,2,4}

¹National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (the Sechenov University), Moscow

³Research Institute of Molecular and Cellular Medicine of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

⁴Research Clinical Institute of Childhood of the Ministry of Healthcare of the Moscow Region, Moscow

In this study, we sought to determine fecal cytokine levels in very preterm newborns at the onset of non-specific clinical symptoms of necrotizing enterocolitis (NEC) and decreased gastrointestinal (GI) motility. The study was approved by the Ethics Committee and the Scientific Council of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Each patient's parents gave their informed consent to their child's participation in the study. The study was conducted at the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov over the period from June 2020 to December 2022. Fecal samples from preterm neonates with gestational age ≤ 32 weeks treated at the A.G. Antonov ICU were collected daily over their first 14 days of life. Samples from 46 newborns were selected for analysis: fecal samples collected on the day of an enteral feeding intolerance episode and fecal samples from controls who had not developed non-specific clinical symptoms of NEC or decreased GI motility, collected on the day when enteral intake reached 100 ml/kg/day. Based on the results of NEC and decreased GI motility diagnosis, stool samples were retrospectively divided into 3 groups: an NEC group ($n = 8$), a decreased GI motility group ($n = 14$) and a control group ($n = 24$). In the fecal samples of the very preterm newborns with NEC stage \geq II, there was a significant increase in IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α levels at the onset of initial symptoms of the disease. At the same

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 05.12.2023

Принята к печати 16.01.2024



EDN: NBGDCZ

Контактная информация:

Костерина Екатерина Евгеньевна, врач-анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии им. проф. А.Г. Антонова Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4
E-mail: kosterinka@list.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPO»

Received 05.12.2023

Accepted 16.01.2024

Correspondence:

Ekaterina E. Kosterina, anesthesiologist-intensivist at the A.G. Antonov Intensive Care Unit of the Institute of Neonatology and Pediatrics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 4 Akademika Oparina St., Moscow 117997, Russia
E-mail: kosterinka@list.ru

time, the cytokine profile of the feces of the decreased GI motility patients did not differ significantly from the control group in any of the parameters. In cases of NEC, high IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α levels were detected in the patients' stool at the onset of enteral feeding intolerance, suggesting that the method under investigation (aimed at determining the pro- and anti-inflammatory profile of fecal cytokines) may be a promising new tool for differentiating NEC from decreased GI motility in very preterm newborns.

Key words: *preterm newborn, enteral feeding, premature newborns, very low birth weight, extremely low birth weight, necrotizing enterocolitis, fecal cytokines*

Kosterina E.E., et al. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2024; 23 (1): 119–26.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-119-126

Некротизирующий энтероколит (НЭК) – воспалительное заболевание кишечника, возникающее в основном у недоношенных новорожденных детей, занимает одну из лидирующих позиций в структуре неонатальной смертности. Среди глубоко недоношенных новорожденных с экстремально и очень низкой массой тела летальность от НЭК достигает 30–50% и 10–30% соответственно и не имеет тенденции к снижению в последние 20 лет [1]. Неспецифичность первых клинических проявлений, быстрое прогрессирование заболевания в сочетании с высоким уровнем смертности определяют особую актуальность исследований, посвященных поиску эффективных биомаркеров повреждения кишечника. Своевременная диагностика на этапе неспецифичных клинических проявлений и, соответственно, раннее патогенетическое лечение имеют решающее значение для выживания глубоко недоношенных новорожденных.

Цитокины являются эндогенными химическими медиаторами, которые регулируют воспалительный ответ, включая хемотаксис нейтрофилов, пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток, а также восстановление после повреждения слизистой оболочки [2]. По данным литературы, сывороточный уровень цитокинов не только достоверно коррелирует с НЭК и сепсисом [3–5], но и отражает тяжесть течения НЭК [6, 7].

Изучению цитокинового профиля кала новорожденного как органоспецифичного маркера повреждения кишечника в отличие от сывороточного профиля посвящены единичные работы, а их данные противоречивы [8, 9].

Так, J. Lemme-Dumit и соавт. провели анализ фекальных цитокинов 40 глубоко недоношенных новорожденных в зависимости от специфических изменений микробиоты кишечника и созревания кишечного барьера [10]. M. Gomez и соавт. исследовали иммунный профиль кала 16 недоношенных новорожденных, включая уровень цитокинов, в зависимости от возраста (меконий, 21 день, 2 года) и микробной ассоциации [9]. M. Richter и соавт. изучали концентрацию TNF- α в кале доношенных и недоношенных новорожденных в зависимости от субстрата вскармливания [11].

Часть исследователей использовали цитокиновый профиль кала как маркер состояния кишечной стенки

в целях оценки безопасности и эффективности применения различных интервенционных методик. Так, F. Indrio и соавт. отметили, что раннее применение пробиотиков вызывало снижение фекальных провоспалительных цитокинов IL-17, IL-8 и TNF- α и увеличение противовоспалительного цитокина IL-10 [12]. Исследование, проведенное B. Balachandran и соавт., продемонстрировало тенденцию к увеличению фекального IL-6 у недоношенных детей, получавших коровье молоко [13].

Тем не менее ряд авторов признают неоспоримое преимущество цитокинового профиля кала как маркера повреждения кишечной стенки и активации местного воспалительного ответа в виде не только очевидной органоспецифичности, но и возможности неинвазивной диагностики различных воспалительных заболеваний кишечника [10, 12, 14].

Целью данного исследования является определение уровня фекальных цитокинов у глубоко недоношенных новорожденных при развитии неспецифичных клинических проявлений НЭК и дискинезии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России в период с июня 2020 г. по декабрь 2022 г. Исследование одобрено этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. Информированное согласие об участии в исследовании было получено от родителей всех пациентов.

Образцы кала недоношенных новорожденных гестационного возраста (ГВ) 32 недели и менее, проходивших лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии им. проф. А.Г. Антонова в период с июня 2020 г. по декабрь 2022 г., собирались ежедневно на протяжении первых 14 дней жизни.

Критериями исключения являлись наследственная патология обмена веществ, отечная форма гемолитической болезни, множественные врожденные пороки развития, летальный исход до начала энтерального питания (ЭП).

Неспецифичными клиническими проявлениями НЭК и дискинезии ЖКТ являлись вздутие и напряжение живота, болезненность при пальпации,

обильное срыгивание, увеличение объема остаточного содержимого желудка более 50% от разового объема кормления, темно-зеленое окрашивание желудочного аспирата.

Новорожденным с клиническими проявлениями НЭК и дискинезии ЖКТ проводилось стандартное обследование для установки диагноза: клинический анализ крови, сывороточные маркеры воспаления (С-реактивный белок, уровень прокальцитонина), ультразвуковое исследование органов брюшной полости, обзорная рентгенограмма брюшной полости.

Диагноз НЭК устанавливался при выявлении лабораторных признаков системного воспалительного ответа в сочетании с инструментальными признаками: ультразвуковыми – в виде участков отека, ригидности, пневматоза кишечной стенки, асцита, газа в сосудах системы воротной вены печени; рентгенологическими – парез кишечника с отеком стенки, пневматоз, газ по ходу ветвей воротной вены, пневмоперитонеум [15]. Оценка тяжести течения НЭК проводилась по шкале Bell [16].

Диагноз дискинезии ЖКТ устанавливался при наличии признаков интолерантности к энтеральной нагрузке, требующей полной отмены ЭП на срок более 24 ч, но не диагностированной как НЭК II и III стадии по Bell.

Все образцы были заморожены сразу после взятия пробы кала при температуре -80°C и хранились в лаборатории биобанка. Всего было собрано 356 образцов. Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ и TNF- α проводили мультиплексным методом с использованием стандартной 8-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-plex Assay (Bio-Rad, США) на проточном лазерном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, США). Результаты обрабатывали с помощью приложения Bio-Plex Manager 6.0 Properties (Bio-Rad, США). Непосредственно перед исследованиями образцы кала новорожденных размораживали на льду. Далее отбирали 0,1 г образца, в который добавляли 0,9 г ледяного раствора BPS. После этого полученный раствор гомогенизировался при помощи вортексирования. Все процедуры проводили на льду. Далее гомогенизированный раствор центрифугировали 15 000g 15 мин при температуре 4°C . Отобранный супернатант использовали в мультиплексном анализе. Содержание цитокинов представлено в пикограммах на миллилитр (пг/мл).

Для анализа были выбраны образцы от 46 новорожденных: образцы кала в день возникновения эпизода интолерантности к энтеральной нагрузке (период от взятия пробы кала до возникновения эпизода интолерантности не более 36 ч) и сравнительные образцы кала у новорожденных, не развивших неспецифичные клинические проявления НЭК и дискинезии ЖКТ,

соответствующие дню достижения объема энтерального питания 100 мл/кг/сут.

Ретроспективно по результатам диагностики НЭК и дискинезии ЖКТ образцы кала были разделены на 3 группы: 1-я группа – пациенты с НЭК ($n = 8$), 2-я группа – новорожденные с дискинезией ЖКТ ($n = 14$) и 3-я – группа контроля ($n = 24$).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы IBM SPSS Statistics v26 и StatTech v2.8.3. Перед проведением сравнительного анализа количественных данных в исследуемых группах проверяли соответствие нормальному распределению (тест Колмогорова–Смирнова, графический анализ данных). Учитывая полученное ненормальное распределение, статистический анализ проводился непараметрическим методом. Количественные переменные для каждого параметра представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (IQR) 25–75-го перцентилей. Для качественных данных определяли показатель частоты (%).

Для сравнения количественных данных в нескольких группах использовался критерий Краскела–Уоллиса, при последующем попарном сравнении применялся U-критерий Манна–Уитни с поправкой на множественность Бонферрони. Сравнение дихотомических данных и установление статистически значимых различий между ними проводили с помощью метода χ^2 Пирсона (для его вычисления прибегали к построению таблицы 2×2), а также использовали точный критерий Фишера для небольших выборок. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые группы достоверно отличались по массе тела, что объясняется большей распространенностью НЭК у детей с меньшей массой тела при рождении. Характеристика групп пациентов, включенных в исследование, представлена в *таблице 1*.

В 1-й группе ($n = 8$) НЭК диагностирован II–III стадий. Распределение по стадиям отражено на *рисунке 1*.

Уровни цитокинов кала в группах НЭК и дискинезии ЖКТ в день развития интолерантности к ЭП и в группе контроля (достижение объема ЭП 100 мл/кг) представлены в *таблице 2* и на *рисунке 2*.

Достоверно отличались концентрации IL-6, IL-8, IL-10 и TNF- α . Наибольшие различия наблюдались в концентрациях IL-8 и TNF- α , в группе НЭК медиана превышает значения группы контроля и группы дискинезии ЖКТ больше чем в 21 и 12 раз соответственно. Медиана концентрации IFN- γ при развитии НЭК аналогично превышает значения группы сравнения более чем в 5 раз, однако различия между

Таблица 1
Характеристика групп исследования

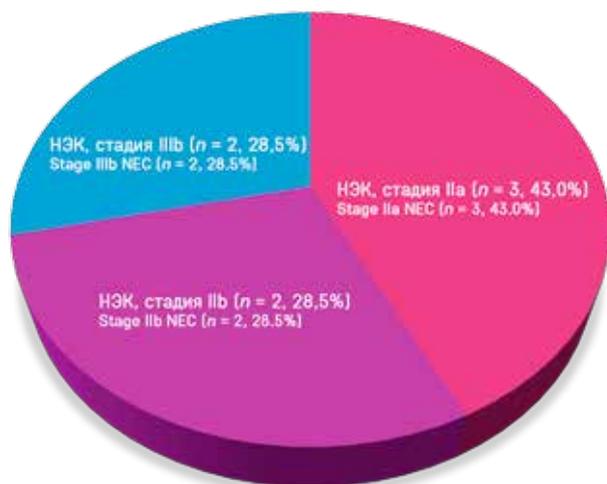
Table 1
Characteristics of the study groups

Параметр Parameter	Группа НЭК (1-я; n = 8) NEC group (#1; n = 8)	Группа дискинезии ЖКТ (2-я; n = 14) Decreased GI motility group (#2; n = 14)	Группа сравнения (3-я; n = 24) Control group (#3; n = 24)	p
ГВ, Ме (IQR), недели GA, Me (IQR), weeks	30,5 (27,0–31,6)	30,4 (28,5–31,5)	30,6 (30,0–31,5)	0,555
Масса тела, Ме (IQR), г Body weight, Me (IQR), g	720 (551–1149)	1083 (950–1460)	1615 (1177–1765)	0,001* $p_{1-2} = 0,096$ $p_{2-3} = 0,013*$ $p_{1-3} = 0,001*$
Длина, Ме (IQR), см Body length, Me (IQR), cm	32,5 (30,0–33,8)	35,3 (33,0–37,5)	36,7 (35,8–38,7)	0,06
Пол, мальчики/девочки, n Gender, boys/girls, n	4/4	8/6	11/13	0,354

Примечание. Здесь и в таблице 2: различия показателей значимы по критерию Краскелла–Уоллиса при $p < 0,05$, при апостериорном анализе в попарных сравнениях использовали критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, различия признавали значимыми при $p < 0,017$.
Notes. Here and in Table 2: the values differ significantly at $p < 0,05$ according to the Kruskal–Wallis test; in a post-hoc analysis, Mann–Whitney test with Bonferroni correction was used for pairwise comparison, differences were considered significant at $p < 0,017$. NEC – necrotizing enterocolitis; GI – gastrointestinal; GA – gestational age; Me – median; IQR – interquartile range.

Рисунок 1
Распределение случаев НЭК по тяжести согласно классификации Bell

Figure 1
Distribution of NEC cases according to disease severity classified using Bell criteria



3 группами не были достоверными, что, вероятно, обусловлено малым размером выборки. При этом цитокиновый профиль кала новорожденных группы дискинезии ЖКТ достоверно не отличался от группы контроля ни по одному показателю.

Также достоверно отличалось в исследуемых группах соотношение IL-10/IL-8 как показатель соотношения про- и противовоспалительных цитокинов: в группе контроля концентрация IL-10 в 2 раза превышает концентрацию IL-8, в группе дискинезии ЖКТ соотношение практически равное. При развитии НЭК резко возрастает концентрация IL-8, что демонстрирует снижение соотношения (рисунок 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Незрелость иммунной системы и ЖКТ может играть ключевую роль в восприимчивости недоно-

шенных детей к инфекциям. Ткани кишечника человека содержат разнообразную популяцию основных иммунных клеток, расположение, взаимодействие и функция которых контролируются опосредованными клеточными контактами, а также различными цитокинами и медиаторами [17]. Цитокины играют стимулирующую роль, способствуя созреванию слизистой оболочки у недоношенных детей, однако они могут приводить к повреждению кишечника при НЭК, способствуя развитию воспаления [6]. Состав и количество цитокинов и хемокинов у недоношенных новорожденных остаются в значительной степени неохарактеризованными, что оставляет значительный пробел в понимании раннего созревания кишечного барьера [4]. Анализ иммунологических биомаркеров традиционно включает тестирование крови или сыворотки. Такой метод является инвазивным и ограничивается циркулирующими уровнями иммунных маркеров, что ценно для оценки системного иммунитета, но не репрезентативно для воспалительного процесса, локализованного в кишечной стенке [10]. Профилирование цитокинов кала может дать представление о состоянии слизистой оболочки кишечника. Хотя этот подход не может полностью воспроизвести иммунологические процессы, происходящие в тканях кишечника, включая взаимодействие с микробами, он обеспечивает разумную и практическую альтернативу инвазивным методам диагностики.

Нами получены достоверные результаты, демонстрирующие значимое повышение уровней IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α у глубоко недоношенных новорожденных с НЭК II стадии и выше в образцах кала в день возникновения начальных симптомов заболевания.

Аналогичные результаты получены E. Westerbeek и соавт. [18] в исследовании, включавшем 113 новорожденных ГВ менее 32 недель и массой тела при рождении менее 1500 г. Авторами были изучены

Таблица 2

Цитокиновый профиль в исследуемых группах на момент возникновения интолерантности к ЭП

Table 2

Cytokine profile in the study groups at the onset of enteral feeding intolerance

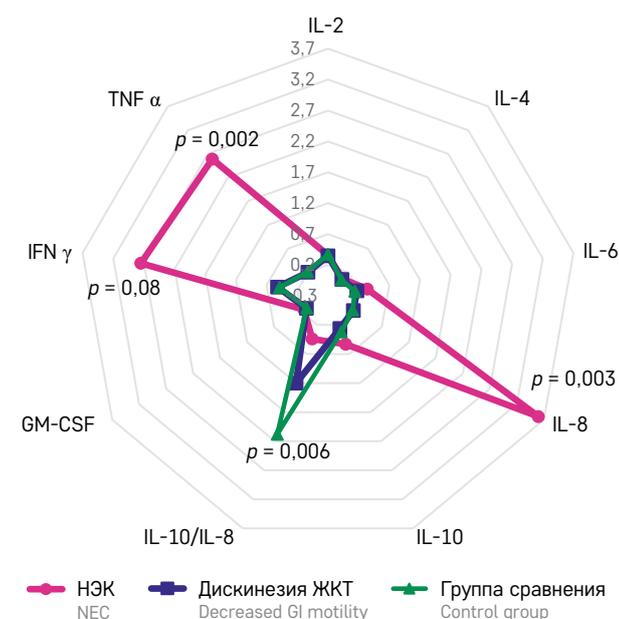
Параметр Parameter	Группа НЭК (1-я; n = 8) NEC group (#1; n = 8)	Группа дискинезии ЖКТ (2-я; n = 14) Decreased GI motility group (#2; n = 14)	Группа контроля (3-я; n = 24) Control group (#3; n = 24)	p	p (парное сравнение) p (pairwise comparison)
IL-2, Ме (IQR), пг/мл IL-2, Me (IQR), pg/ml	0,36 (0,27–0,45)	0,35 (0,27–0,48)	0,37 (0,33–0,47)	0,7	$p_{1-2} = 0,54$ $p_{2-3} = 0,44$ $p_{1-3} = 0,96$
IL-4, Ме (IQR), пг/мл IL-4, Me (IQR), pg/ml	0,06 (0,062–0,16)	0,049 (0,0043–0,0074)	0,04 (0,0037–0,062)	0,059	$p_{1-2} = 0,044$ $p_{2-3} = 0,64$ $p_{1-3} = 0,025$
IL-6, Ме (IQR), пг/мл IL-6, Me (IQR), pg/ml	0,34 (0,25–1,3)	0,17 (0,011–0,36)	0,14 (0,13–0,38)	0,047*	$p_{1-2} = 0,04$ $p_{2-3} = 1,0$ $p_{1-3} = 0,016*$
IL-8, Ме (IQR), пг/мл IL-8, Me (IQR), pg/ml	3,6 (0,3–610,8)	0,17 (0,16–0,25)	0,16 (0,14–0,17)	0,003*	$p_{1-2} = 0,02$ $p_{2-3} = 0,082$ $p_{1-3} = 0,002*$
IL-10, Ме (IQR), пг/мл IL-10, Me (IQR), pg/ml	0,53 (0,38–0,78)	0,26 (0,11–0,38)	0,32 (0,14–0,43)	0,039*	$p_{1-2} = 0,026$ $p_{2-3} = 0,482$ $p_{1-3} = 0,022$
IL-10/IL-8, Ме (IQR)	0,44 (0,003–1,07)	1,2 (0,47–1,97)	2,08 (0,7–2,59)	0,006*	$p_{1-2} = 0,076$ $p_{2-3} = 0,11$ $p_{1-3} = 0,002*$
GM-CSF, Ме (IQR), пг/мл GM-CSF, Me (IQR), pg/ml	0,146 (0,069–2,3)	0,1 (0,08–0,61)	0,095 (0,084–0,11)	0,579	$p_{1-2} = 0,6$ $p_{2-3} = 0,46$ $p_{1-3} = 0,39$
IFN- γ , Ме (IQR), пг/мл IFN- γ , Me (IQR), pg/ml	2,75 (0,5–5,6)	0,52 (0,21–2,11)	0,49 (0,29–0,56)	0,081	$p_{1-2} = 0,08$ $p_{2-3} = 0,86$ $p_{1-3} = 0,025$
TNF- α , Ме (IQR), пг/мл TNF- α , Me (IQR), pg/ml	2,59 (0,81–11,3)	0,2 (0,16–0,42)	0,21 (0,17–0,38)	0,002*	$p_{1-2} = 0,003*$ $p_{2-3} = 0,89$ $p_{1-3} = 0,001*$

Рисунок 2

Уровни цитокинов в кале у глубоко недоношенных новорожденных с НЭК и дискинезией ЖКТ по сравнению с контрольной группой

Figure 2

Cytokine levels in the feces of the very preterm newborns with NEC and decreased GI motility compared to the control group



фекальные уровни IL-8 и кальпротектина в динамике на 7, 14 и 30-е сутки жизни. Недоношенные новорожденные, у которых развился НЭК, имели значительно повышенные уровни IL-8. Необходимо отметить, что

повышение уровня IL-8 соответствовало увеличению фекального кальпротектина – маркеру, доказавшему свою эффективность для диагностики НЭК. Помимо этого, более высокие уровни IL-8 отмечались у детей меньшего ГВ, с низкой массой при рождении, а также при наличии инфекционного процесса. При этом авторы не указывают о временной взаимосвязи между возникновением НЭК и изменениями уровней фекальных цитокинов. Патогенетически повышенные уровни IL-8 могут отражать увеличение количества нейтрофилов и моноцитов в просвете кишечника и могут быть частично объяснены повышенной проницаемостью кишечной стенки у недоношенных детей [18].

С. Zenner и соавт. получили данные о повышении уровня большого спектра фекальных цитокинов в группах новорожденных с НЭК I стадии и НЭК II–III стадии по сравнению с группой контроля (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ) [14]. Наибольшее значение для диагностики НЭК II–III стадии имели IL-4, IL-6 и IL-10 в образцах, собранных за 5–10 дней до манифестации НЭК.

Повышение уровней IL-6 и TNF- α в крови новорожденных с НЭК неоднократно описано в литературе [5, 19, 20], в то время как о фекальном уровне этих цитокинов подобных данных нет. Ассоциация изменений уровней этих цитокинов, вероятно, обусловлена иммунологической взаимосвязью. TNF- α , продуцируемый мононуклеарными клетками, играет

ключевую роль в стимуляции воспаления, включая продукцию IL-1 и IL-6, пролиферацию фибробластов, экспрессию молекул адгезии [21]. Определено, что грамотрицательные бактерии, такие как кишечная палочка, связываются с трансмембранным белком TLR4 на эпителии кишечника, что приводит к опосредованному через NF-κB высвобождению IL-6, IL-1β, TNF-α наряду с оксидом азота, а также IL-17 и IL-22 [22]. При этом избыток TNF-α изменяет целостность эпителия, индуцируя апоптоз в эпителиальных кишечных клетках, ослабляя барьерную функцию [23], что может провоцировать миграцию микробов через эпителий и приводить к развитию НЭК [11]. Так, обнаружено, что TNF-α повышен в биопсийных материалах тканей кишечника пациентов с НЭК [24]. L. Hui и соавт. представили доказательства того, что экспрессия TNF-α в резецированных образцах кишечника с помощью иммуногистохимии была повышена у новорожденных пациентов с НЭК ГВ 28–29 недель по сравнению с контрольной группой, перенесшей операцию по поводу атрезии кишечника [25].

Также доказано значение повышенного уровня TNF-α в генезе воспалительных заболеваний кишечника у взрослых (язвенный НЭК и болезнь Крона) [26]. Помимо этого, терапия анти-TNF-препаратами этих заболеваний широко распространена и эффективна [27]. В исследовании С. Тауман и соавт. введение анти-TNF-препарата (инфликсимаб) значительно уменьшило воспаление кишечника и повреждение тканей в модели НЭК у крыс, что делает его потенциальной мишенью не только для диагностики, но и для терапии НЭК [28].

Кроме этого, M. Richter и соавт. отмечают, что способ родоразрешения, прием антибиотиков, а также субстрат питания не влияли на концентрацию TNF-α в кале [11]. Эти особенности подчеркивают диагностическую ценность фекального TNF-α как маркера повреждения кишечной стенки.

IL-10 оказывает противовоспалительное регулирующее действие, его повышение может свидетельствовать об усилении фазы иммунного ответа, характеризующей снижением интенсивности воспалительных реакций, обуславливающих развитие НЭК. С. Zenner и соавт. отмечают повышение уровня IL-10 в образцах кала, собранных за 5–10 дней до манифестации НЭК [14]. Y. Seo и соавт. получили аналогичные данные о повышении сывороточного уровня IL-10 при НЭК, не потребовавшего хирургического лечения. Авторы предполагают, что повышенная продукция IL-10 может играть протективную роль, уменьшая степень воспаления кишечника, тем самым препятствуя прогрессированию НЭК и уменьшая необходимость хирургического вмешательства. Исследования на животных показали, что у мышей с дефицитом IL-10 чаще развивался энтероколит

[18], и дефицит IL-10 усугублял степень воспаления кишечника, сопровождающего НЭК [29].

Помимо этого, полученные нами данные демонстрируют отсутствие влияния дискинезии ЖКТ на цитокиновый профиль кала. Показатели пациентов группы дискинезии ЖКТ достоверно не отличались от группы контроля ни по одному показателю. Это позволит проводить дифференциальную диагностику между НЭК и интолерантностью к энтеральной нагрузке другого генеза, в том числе инфекционного, но без прямого вовлечения кишечника. К аналогичным выводам пришли E. Westerbeek и соавт.: показатели фекального IL-8 были значительно выше у детей с НЭК, чем у детей с инфекционным процессом другой локализации [18]. Однако, по данным С. Zenner и соавт., возможно проведение дифференциальной диагностики между НЭК I стадии и НЭК II–III стадии по уровню фекальных IL-1α, IL-10 и IL-5 [14].

Нами выявлено достоверное изменение соотношения IL-10/IL-8 между всеми 3 группами пациентов, отражающие дисбаланс в системе про- и противовоспалительных цитокинов. В группе сравнения концентрация противовоспалительного IL-10 в 2 раза превышает концентрацию провоспалительного IL-8, в группе дискинезии ЖКТ соотношение приближается к единице, а при развитии НЭК резко возрастает концентрация провоспалительного цитокина IL-8, что приводит к снижению соотношения. E. Конникова и соавт. также использовали это соотношение для характеристики реактивности кишечной стенки глубоко недоношенных новорожденных в зависимости от времени начала ЭП [30]. По их результатам, позднее начало ЭП (после 3-х суток жизни) ассоциировано с воспалением кишечника и повышением фекальных маркеров, а именно IL-8, и значительным снижением соотношения IL-10/IL-8.

Преимуществом нашего исследования является изучение цитокинового профиля кала в период возникновения интолерантности к ЭП, что особенно актуально для ранней диагностики НЭК. Кроме того, цитокиновый профиль возможно использовать в дифференциальной диагностике дискинезии ЖКТ и НЭК, что, в свою очередь, позволит сократить неоправданное назначение антибиотиков на этапе развития интолерантности к ЭП, расцененного как подозрение на развитие НЭК.

Ограничением проведенного нами пилотного исследования является малый объем выборки. В настоящее время продолжается набор пациентов в исследование. В перспективе развития данной темы представляют интерес параллельное исследование фекальных и сывороточных цитокинов, зависимость уровня цитокинов кала от субстрата ЭП и изучение

взаимоотношения микробной колонизации ЖКТ новорожденного и цитокинового профиля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при развитии НЭК на стадии возникновения интолерантности к ЭП в кале определяются высокие уровни IL-6, IL-8, IL-10 и TNF- α в отличие от дискинезии ЖКТ, что может свидетельствовать о перспективности метода определения про- и противовоспалительного профиля цитокинов кала в дифференциальной диагностике НЭК и дискинезии ЖКТ при возникновении интолерантности к ЭП у глубоко недоношенных новорожденных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания, регистрационный номер НИОКТР: 121040600433-6 «Совершенствование подходов к энтеральному питанию глубоко недоношенных детей».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Kosterina E.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2058-1864>

Balashova E.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3741-0770>

Krasnyi A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7883-2702>

Kirtbaya A.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8157>

Rudakova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2105-8909>

Sadekova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4726-7477>

Vtorushina V.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8406-3206>

Krechetova L.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5023-3476>

Ionov O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4153-133X>

Литература

- Fitzgibbons S.C., Ching Y., Yu D., Carpenter J., Kenny M., Weldon C., et al. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg* 2009; 44 (6): 1072–5; discussion 1075–6. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.02.013
- MohanKumar K., Namachivayam K., Ho T.T.B., Torres B.A., Ohls R.K., Maheshwari A. Cytokines and growth factors in the developing intestine and during necrotizing enterocolitis. Vol. 41, *Seminars in Perinatology*. W.B. Saunders; 2017. Pp. 52–60.
- Lodha A., Howlett A., Ahmed T., Moore A.M. The Role of Interleukin-6 and Interleukin-8 Circulating Cytokines in Differentiating between Feeding Intolerance and Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Am J Perinatol* 2017; 34 (13): 1286–92. DOI: 10.1055/s-0037-1603329
- Benkoe T.M., Mechtler T.P., Weninger M., Pones M., Rebhandl W., Kasper D.C. Serum levels of interleukin-8 and gut-associated biomarkers in diagnosing necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr Surg* 2014; 49 (10): 1446–51. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2014.03.012
- Martin C.R., Bellomy M., Allred E.N., Fichorova R.N., Leviton A. Systemic inflammation associated with severe intestinal injury in extremely low gestational age newborns. *Fetal Pediatr Pathol* 2013; 32 (3): 222–34. DOI: 10.3109/15513815.2012.721477
- Seo Y.-mi, Lin Y.K., Im S.A., Sung I.K., Youn Y.A. Interleukin 8 may predict surgical necrotizing enterocolitis in infants born less than 1500 g. *Cytokine* 2021; 137: 155–63. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155343
- Wisgrill L., Weinhandl A., Unterasinger L., Amann G., Oehler R., Metzelder M.L., et al. Interleukin-6 serum levels predict surgical intervention in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2019; 54 (3): 449–54. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2018.08.003
- Duffy L.C., Zielezny M.A., Carrion V., Griffiths E., Dryja D., Hilty M., et al. Concordance of bacterial cultures with endotoxin and interleukin-6 in necrotizing enterocolitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42 (2): 359–65. DOI: 10.1023/a:1018826204819
- Gómez M., Moles L., Espinosa-Martos I., Bustos G., de Vos W.M., Fernández L., et al. Bacteriological and Immunological Profiling of Meconium and Fecal Samples from Preterm Infants: A Two-Year Follow-Up Study. *Nutrients* 2017; 9 (12): 1293. DOI: 10.3390/nu9121293
- Lemme-Dumit J.M., Song Y., Lwin H.W., Hernandez-Chavez C., Sundararajan S., Viscardi R.M., et al. Altered Gut Microbiome and Fecal Immune Phenotype in Early Preterm Infants With Leaky Gut. *Front Immunol* 2022; 13: 815046. DOI: 10.3389/fimmu.2022.815046
- Richter M., Topf H.G., Gröschl M., Fröhlich T., Tzschoppe A., Wenzl T.G., Köhler H. Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human β -defensin 2 and tumor necrosis factor- α . *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 51 (1): 103–5. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181cd26f9
- Indrio F., Riezzo G., Tafuri S., Ficarella M., Carlucci B., Bisceglia M., et al. Probiotic supplementation in preterm: Feeding intolerance and hospital cost. *Nutrients* 2017; 9 (9): 965. DOI: 10.3390/nu9090965
- Balachandran B., Dutta S., Singh R., Prasad R., Kumar P. Bovine colostrum in prevention of necrotizing enterocolitis and sepsis in very low birth weight neonates: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *J Trop Pediatr* 2017; 63 (1): 10–7. DOI: 10.1093/tropej/fmw029
- Zenner C., Chalklen L., Adjei H., Dalby M.J., Mitra S., Cornwell E., et al. Noninvasive Fecal Cytokine and Microbiota Profiles Predict Commencement of Necrotizing Entero-

- colitis in a Proof-of-Concept Study. *Gastro Hep Adv* 2023; 2 (5): 666–75. DOI: 10.1016/j.gastha.2023.03.003
15. Дорофеева Е.И., Подуровская Ю.Л., Буров А.А., Рюмина И.И., Нароган М.В., Грошева Е.В. и др. Диагностика и консервативное лечение новорожденных с некротизирующим энтероколитом (проект клинических рекомендаций). *Неонатология: Новости. Мнения. Обучение* 2014; 2 (4): 84–92. [Dorofeyeva E.I., Podurovskaya Yu.L., Burov A.A., Ryumina I.I., Narogan M.V., Grosheva E.V., et al. Diagnosis and conservative treatment of necrotizing enterocolitis in newborn (project of clinical practice guidelines). *Neonatology: News, Opinions, Training* 2014; 2 (4): 84–92. (In Russ.)].
 16. Walsh M.C., Kliegman R.M. Necrotizing enterocolitis: Treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986; 33 (1): 179–201. DOI: 10.1016/s0031-3955(16)34975-6
 17. van Belkum M., Mendoza Alvarez L., Neu J. Preterm neonatal immunology at the intestinal interface. *Cell Mol Life Sci* 2020; 26 (7):1209–27. DOI: 10.1007/s00018-019-03316-w
 18. Westerbeek E.A.M., Mørch E., Lafeber H.N., Fetter W.P.F., Twisk J.W.R., van Elburg R.M. Effect of Neutral and Acidic Oligosaccharides on Fecal IL-8 and Fecal Calprotectin in Preterm Infants. 2011. [Electronic resource] URL: www.controlled-trials.com (accessed 02.02.2024).
 19. Harris M.C., D'Angio C.T., Gallagher P.R., Kaufman D., Evans J., Kilpatrick L. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: Correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pediatr* 2005; 147 (4): 462–8. DOI: 10.1016/j.jpeds.2005.04.037
 20. Ebach D.R., Newberry R., Stenson W.F. Differential Role of Tumor Necrosis Factor Receptors in TNBS Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11 (6): 533–40. DOI: 10.1097/01.mib.0000163698.34592.30
 21. Tatiya-Aphiradee N., Chatuphonprasert W., Jarukamjorn K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2018; 30 (1): 1–10. DOI: 10.1515/jbcpp-2018-0036
 22. Duess J.W., Sampah M.E., Lopez C.M., Tsuboi K., Scheese D.J., Sodhi C.P., Hackam D.J. Necrotizing enterocolitis, gut microbes, and sepsis. *Gut Microbes* 2023; 15 (1): 2221470. DOI: 10.1080/19490976.2023.2221470
 23. Pott J., Kabat A.M., Maloy K.J. Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. *Cell Host Microbe* 2018; 23 (2): 191–202.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2017.12.017
 24. Baregamian N., Song J., Bailey C.E., Papaconstantinou J., Evers B.M., Chung D.H. Tumor Necrosis Factor- α and Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Control Reactive Oxygen Species Release, Mitochondrial Autophagy and C-Jun N-Terminal Kinase/P38 Phosphorylation During Necrotizing Enterocolitis. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2 (5): 297–306. DOI: 10.4161/oxim.2.5.9541
 25. Hui L., Dai Y., Guo Z., Zhang J., Zheng F., Bian X., et al. Immunoregulation effects of different $\gamma\delta$ T cells and toll-like receptor signaling pathways in neonatal necrotizing enterocolitis. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96 (8): e6077. Doi: 10.1097/MD.0000000000006077
 26. Friedrich M., Pohin M., Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity* 2019; 50 (4): 992–1006. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.017
 27. Gareb B., Otten A.T., Frijlink H.W., Dijkstra G., Kosterink J.G.W. Review: Local Tumor Necrosis Factor- α Inhibition in Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutics* 2020; 12 (6): 539. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060539
 28. Tayman C., Aydemir S., Yakut I., Serkant U., Ciftci A., Arslan E., Koç O. TNF- α Blockade Efficiently Reduced Severe Intestinal Damage in Necrotizing Enterocolitis. *J Invest Surg* 2016; 29 (4): 209–17. DOI: 10.3109/08941939.2015.1127449
 29. Emami C.N., Chokshi N., Wang J., Hunter C., Guner Y., Goth K., et al. Role of interleukin-10 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Am J Surg* 2012; 203 (4): 428–35. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2011.08.016
 30. Konnikova Y., Zaman M.M., Makda M., D'Onofrio D., Freedman S.D., Martin C.R. Late enteral feedings are associated with intestinal inflammation and adverse neonatal outcomes. *PLoS One* 2015; 10 (7): e0132924. DOI: 10.1371/journal.pone.0132924