

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ОКСИДА АЗОТА В ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ НЕКРОТИЧЕСКОГО ЭНТЕРОКОЛИТА ОТ СЕПСИСА У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ: ИССЛЕДОВАНИЕ СЛУЧАЙ-КОНТРОЛЬ.

Маммадова Т.А.

Научно-Исследовательский Институт Педиатрии имени К.Я. Фараджевой,
Баку, Азербайджан

Целью исследования было выявление диагностической значимости биомаркеров оксида азота (NO), эритропоэтина (ЭПО) и иона кальция (Ca^{+2}) в дифференциации некротического энтероколита (НЭК) от сепсиса у доношенных новорожденных. Материал/пациенты. Данное проспективное исследование случай-контроль проводилось в отделениях интенсивной терапии и патологии доношенных новорожденных госпиталя Научно-Исследовательского Института Педиатрии имени К.Я. Фараджевой, в городе Баку Азербайджана. В исследование были включены младенцы с гестационным возрастом $37 \leq$ недель. Демографические и клинические данные были собраны у пациентов, которые имели соответствующие абдоминальные и системные симптомы. Для проведения дифференциальной диагностики НЭК и НЭК+Сепсис нами были выбраны биомаркеры NO, ЭПО и Ca^{+2} . ROC-curve анализ был применен для расчета диагностической ценности этих биомаркеров. Результаты. Обследованы 100 больных доношенных новорожденных с НЭК. Вес тела детей колебался в пределах 2500–4400 граммов. В крови у них были определены уровни NO, ЭПО и Ca^{+2} . У 83-х больных с НЭК наблюдалось повышение уровней NO, ЭПО и понижения Ca^{+2} . Тогда как у 17-ти больных, у которых было септическое осложнение течения болезни, результаты анализов были противоположны значениям показателей предыдущей группы ($p < 0.001$). У этих детей уровень NO был ниже даже его значения при НЭК I. Выводы. NO является маркером, которого можно использовать для проведения дифференциальной диагностики НЭК от Сепсиса.

Ключевые слова: некротический энтероколит, сепсис, доношенные новорожденные, оксид азота.

Введение. Некротический энтероколит является тяжелым приобретенным заболеванием желудочно-кишечного тракта неонатального периода. В последние годы наблюдается тенденция увеличения этого заболевания не только среди недоношенных, но и у доношенных новорожденных. Хотя во многих научно-исследовательских работах основная роль в этиологии НЭК отводится недоношенности, тенденция повышения частоты встречаемости НЭК среди доношенных новорожденных ставит под сомнение эту гипотезу [1]. Этиология НЭК является многофакторной и зависит от гестационного возраста пациента. Высокий процент смертности среди новорожденных при НЭК (30%) и Сепсисе (70%) способствует более глубокому изучению и проведению дифференциальной диагностики этих двух патологических состояний [2].

Необходимо выявление новых биомаркеров, которые могли бы помочь в проведении дифференциации НЭК от болезней со схожими симптомами [3,4]. Дифференциальную диагностику НЭК важно провести с сепсисом, спонтанной перфорацией кишечника, вирусным энтероколитом, энтероколитом, индуцированным молочным белком. Эти заболевания имеют похожие клинические симптомы, но различаются по патогенезу и методам лечения [5].

Цель исследования: выявить диагностическую значимость биомаркеров NO, ЭПО и Ca^{+2} в дифференциации некротического энтероколита от сепсиса у доношенных новорожденных.

Методы и материалы исследования.

Проспективное исследование случай-контроль проводилось в отделениях интенсивной терапии и патологии доношенных

новорожденных клики НИИ Педиатрии имени К.Я. Фараджевой, в городе Баку Азербайджана. Обследуемые новорожденные были приняты в нашу клинику из родильных домов города Баку и других районов Азербайджана. Критериями включения в группу исследования были наличие соответствующих клинических абдоминальных (вздутие живота, рвота с желчью, гиперемия передней стенки или болезненность живота, отсутствие или учащение стула, кровь в стуле) и системных признаков (нарушение сознания различной степени, дыхательная недостаточность, сердечно-сосудистая недостаточность, мраморность или цианотичность кожи) НЭК у доношенных новорожденных. Сбор данных проводился у больных, поступивших в стационар в первые две недели постнатальной жизни, большинство из которых были в раннем неонатальном возрасте. Группы исследования формировали методом «случай-контроль», при этом статистически значимых межгрупповых различий по возрасту, полу, акушерскому и соматическому анамнезу матерей не было. Первую группу составили 83 новорожденных с НЭК, вторую – 17 пациентов с септическим осложнением течения болезни.

Анализы и статистическая обработка результатов исследования были проведены с использованием Python 3 – sklearn 0.22 и scipy 1.6.1. Статистический анализ полученных цифровых данных были выполнены по критерию Манна Уитни и ROC-curve (receiver operating characteristic curve) анализа. Мы определили медиану, а также 1 и 3 квартили (Median [Q1; Q2]).

У новорожденных в сыворотке крови были определены уровни NO колориметрическим методом (Caymans Nitrate\Nitrite Colorimetric Assay Kit, Canada) на приборе ELISYS UNO HUMAN, ЭПО иммуноферментным анализом Human (EPO) ELISA Kit (Canada). Уровень ионов кальция был определен фотометрическим тестом на аппарате BioScreen MS -2000. Показатели Ca^{+2} были взяты из медицинских карт пациентов.

Результаты и их обсуждения. Исследование было проведено с января 2017 по май 2019 гг. Были обследованы 100 больных доношенных новорожденных с НЭК I

(53 больных), НЭК II (29 больных), НЭК III (18 больных) стадиями болезни по классификации M. J. Bell. При поступлении в стационар для каждого больного были составлены медицинские карты с подробным описанием анамнестических и клинических данных, клинического диагноза, результатов проведенных обследований. У новорожденных гестационный возраст был в пределах 37-42 недели. Вес тела детей колебался в пределах 2500–4400 граммов. 36 новорожденных принадлежали к женскому полу, а 64 – мужскому. У 83-х пациентов был диагностирован НЭК без септического осложнения течения болезни. У 17-ти больных было выявлено септическое осложнение течения некротического энтероколита. НЭК+Сепсис наблюдался у новорожденных с НЭК I (4 больных), НЭК II (3 больных) и НЭК III (10 больных). У троих детей с НЭК I+Сепсис, беременность матерей протекала на фоне внутриутробной инфекции, а у одного был выявлен меконниальный илеус. У больных с НЭК I заболевание проявилось в виде неспецифических признаков общей интоксикации (нарушение деятельности нервной, сердечной и дыхательной систем) и гастроинтестинальных проявлений (вздутие живота и рвота с желчью), рентгенологически - метеоризма и расширения кишечных петель. В клинической картине НЭК II, НЭК III и НЭК +Сепсис имеются одинаковые симптомы такие, как: расстройство сознания, вялость и адинамия, дыхательная недостаточность, гипертермия, вздутие живота с отечностью передней стенки, рвота с желчью, неустойчивый стул. Однако, в клинике у пациентов с НЭК II и НЭК III доминировал проявление гипоксического фактора - со стороны центральной нервной системы (внутричерепное кровоизлияние у 18-ти, судороги - 19-ти, тяжёлое нарушение сознания – 15-ти больных), сердечно-сосудистой системы (у 10-ти врожденные пороки развития), респираторные нарушения. Тогда, как у больных с НЭК+Сепсис особенностью клиники являлась превалирование проявления инфекционного фактора, то есть наличие очагов инфекции в различных органах и системах (венитрит, перитонит, остеомиелит, омфалит, пневмония). Нужно отме-

титель, что случаи смерти среди детей с септическим осложнением были больше, чем с НЭК III. В нашем исследовании смертность среди новорожденных с НЭК II и НЭК III составляет 8.4%, а с НЭК+Сепсис 47%.

В сыворотке крови у больных доношенных новорожденных были определены уровни NO, ЭПО и Ca^{+2} . У 83-х пациентов с НЭК наблюдалось повышение уровней NO, ЭПО и снижение показателей Ca^{+2} . У 17-ти больных с НЭК+Сепсис были выявлены низкие значения NO, ЭПО и Ca^{+2} . Нужно отметить, что у пациентов с НЭК с септическим осложнением, NO ниже даже его значения, чем при I-ой стадии болезни ($p_1 < 0.001$). Уровень ЭПО также низкое по

сравнению с его значением у больных с НЭК II ($p_5 = 0.09$) и НЭК III ($p_6 = 0.01$) стадиями, а в уровне Ca^{+2} наблюдается незначительное повышение, только по сравнению его показателем с НЭК III ($p_9 = 0.16$). То есть наибольшее изменение уровней биомаркеров в сыворотке у больных наблюдалось только в значении показателей NO.

Для выявления статистической значимой разницы уровней NO, ЭПО, Ca^{+2} у больных с НЭК и НЭК + Сепсис, мы провели тест по критерию Манна-Уитни, результаты которого продемонстрированы в таблице 1.

Таблица 1.

Значение уровней NO, ЭПО и Ca^{+2} у больных с НЭК и НЭК+Сепсис.

Показатели	НЕК I (n = 49)	НЭК II (n = 26)	НЭК III (n = 8)	НЭК+Сепсис (n=17)
NO (мкмоль/л)	54.40[43.70; 78.90] (p_1 <0.001)	81.90 [53.23; 101.55] (p_2 <0.001)	116.70 [115.35; 127.00] ($p_3 < 0.001$)	35.60 [32.10; 49.90]
ЭПО (ммоль/л)	17.80 [14.90; 19.70] ($p_4 < 0.50$)	19.45 [15.90; 21.55] ($p_5 < 0.09$)	22.50 [19.35; 26.00] ($p_6 < 0.01$)	18.50 [14.50; 20.10]
Ca^{+2} (ммоль/л)	1.71 [0.81; 1.90] ($p_7 < 0.11$)	0.80 [0.69; 1.26] ($p_8 < 0.40$)	0.78 [0.46; 0.88] ($p_9 < 0.16$)	0.97 [0.66; 1.87]

Примечание – p - уровень статистической значимости различий по критерию Манна-Уитни между данной группой и НЭК + Сепсис.

Цифровые данные уровней ЭПО, NO, Ca^{+2} были использованы также для построения ROC кривой. В связи с тем, что клиническая картина НЭК II, НЭК III и НЭК+Сепсис имеют сходства, для проведения ROC анализа были сравнены эти группы больных. ROC анализ проведен с учетом разных комбинаций биомаркеров у больных с НЭК+Сепсис. Путем расчета площади под кривой (ППК) были получены лучшая точка отсечения, специфичность, чувствительность. В нашем исследовании наибольшая диагностическая ценность наблюдается при использовании NO и комбинаций NO+ ЭПО, NO+ ЭПО+ Ca^{+2} . Так

как в показателях ППК комбинаций NO+ ЭПО и NO, ЭПО, Ca^{+2} нет ни какой значимой разницы, следовательно Ca^{+2} можно не применять для проведения дифференциальной диагностики этих двух патологий. А значение ЭПО не оказывает существенного влияния на результаты анализа. Таким образом, для проведения дифференциации НЭК от сепсиса достаточно использовать NO. Результаты теста, отражающие статистическую значимость биомаркеров и их комбинаций в дифференциальной диагностике НЭК и НЭК+Сепсис, показаны в таблице 2.

Таблица 2.

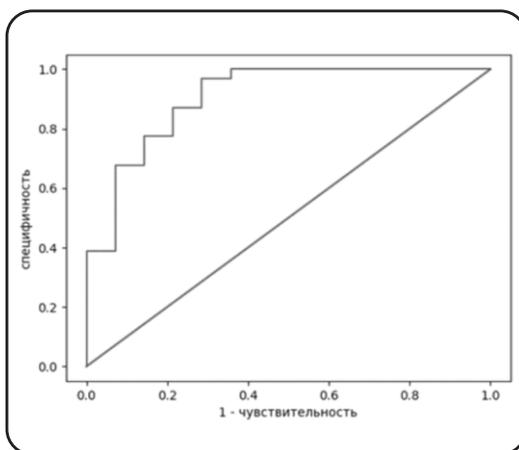
Значимость биомаркеров и их комбинаций в дифференциальной диагностике НЭК и НЭК+Сепсис.

Биомаркеры	ППК	Чувствительность	Специфичность
NO	82.42%	58.82%	93.98%
ЭПО	57,02%	41,18%	77,11%

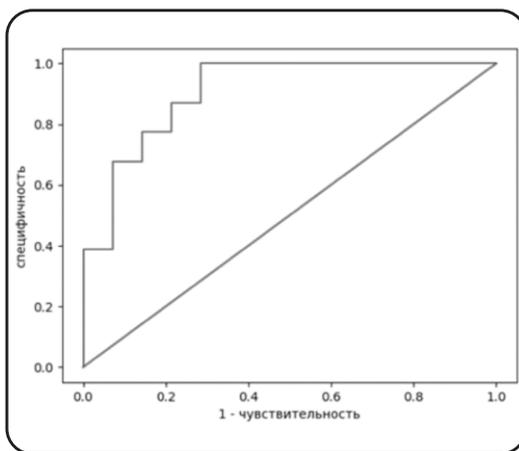
Ca ⁺²	51,81%	92,86%	17,81%
NO, ЭПО	83,56%	70,59%	91,57%
NO, Ca ⁺²	86,69%	71,43%	95,89%
ЭПО, Ca ⁺²	61,79%	42,86%	84,93%
NO, ЭПО, Ca ⁺²	86,89%	71,43%	95,89%

Примечание - ППК – Площадь под кривой, наибольшая диагностическая ценность биомаркеров.

На основе значений чувствительности и специфичности построена характеристическая ROC-кривая, количественная оценка которой определяется площадью под кривой. В проведении дифференциации НЭК от НЭК+Сепсис у доношенных новорожденных NO был выявлен в качестве эффективного предиктора по показателям чувствительности и специфичности (рисунок 1). Диагностическая ценность NO незначительно повышается при комбинации с ЭПО, а при дополнительном сочетании их с Ca⁺² никаких изменений не наблюдается (рисунок 2).



Рисок 1. ROC-кривая чувствительности и специфичности NO в дифференциальной \ диагностике НЭК с НЭК+Сепсис.



Рисок 2. ROC-кривая чувствительности и специфичности NO, ЭПО, Ca⁺² в дифференциальной диагностике НЭК с НЭК+Сепсис.

В этом исследовании случай-контроль, мы стремились выявить диагностическую ценность NO, ЭПО и Ca⁺² в дифференциации НЭК и НЭК+Сепсис в отдельности и их комбинаций. При НЭК было обнаружено повышение сывороточных уровней NO,

ЭПО и понижение Ca⁺², тогда как при НЭК+Сепсис наблюдались низкие значения этих биомаркеров. Уровень NO в крови у группы случай-контроль был ниже, чем у больных с НЭК I, НЭК II, НЭК III. Согласно нашему исследованию, изменение уровня

NO в сыворотке у пациентов с некротическим энтероколитом и с септическим осложненным течением болезни можно использовать в дифференциальной диагностике этих двух патологических состояний. Связь этих биомаркеров с НЭК можно объяснить, исходя из факторов риска развития и патогенеза заболевания. Гипоксически-ишемическое поражение центральной нервной системы и мезентериальная гипоперфузия считаются основными патогенетическими механизмами развития НЭК у доношенных новорожденных [6]. Оксид азота и эритропоэтин являются медиаторами гипоксии [7]. Взаимосвязанное повышение уровней этих биомаркеров является одной из причин дисфункции эндотелия мезентериальных сосудов и нарушения кишечного кровообращения у новорожденного, способствующее формированию патогенеза НЭК. Вследствие гипоксии, снижение уровня кислорода в крови вызывает уменьшение мозгового кровообращения. Для улучшения кровоснабжения и обеспечения метаболических потребностей головного мозга происходит централизация кровообращения за счет вазоконстрикции и снижение периферического кровотока [8]. Это осуществляется путем компенсаторной вазоконстрикцией сосудов, которой способствует повышение уровня ЭПО в плазме крови. В результате этого процесса возникает мезентериальная ишемия, занимающая важную роль в патогенезе НЭК. В качестве защитной реакции ишемия кишечника способствует вазодилатации, которая реализуется повышением синтеза NO. Гиперпродукция NO, вызванная ферментом - индуцибельной синтазой (iNOS), приводит к персистирующей барьерной недостаточности слизистой оболочки кишечника и создает условия для бактериальной инвазии, в результате чего разворачивается полная клиническая картина НЭК [9]. Одновременно, под воздействием этой повышенной продукции NO, происходит внутриклеточная миграция ионов кальция (цитозольный кальций), чем и объясняется снижение его уровня в плазме. Известно также, что внутриклеточный ион Ca^{+2} ингибирует производство NO, путем стабилизации m R NA – messenger ribonucleic acid в

макрофагах, подверженных действию бактериального эндотоксина. По этой причине мы ожидали повышение уровней ЭПО и NO и снижение уровня иона Ca^{+2} при НЭК, что и нами наблюдалось. Однако, в крови у детей с НЭК+Сепсис наблюдается низкий уровень NO в отличие от другой группы. Согласно литературным данным и нашему исследованию известно, что инфекция тоже является немаловажным фактором риска развития НЭК. Под воздействием инфекционного агента иммунными и тканевыми клетками вырабатывается NO ферментами - синтазой оксида азота – конституциональной эндотелиальной синтазой (eNOS). eNOS экспрессируется в кишечной сосудистой сети и отвечает за низкие уровни NO, для активации которого требуются ионы Ca^{+2} . NO, продуцируемый eNOS, оказывает сосудорасширяющее действие в кишечнике новорожденного, диффундирует в соседние клетки сосудов гладкомышечных тканей. При длительном воздействии инфекции, eNOS индуцирует гипопродукцию NO, что наблюдается при сепсисе [10]. В связи с этим и при сепсисе наблюдается незначительное повышение в сыворотке уровня ионов Ca^{+2} .

Заключение. Результаты нашего исследования показывают, что NO является биомаркером, который может быть использован для проведения дифференциальной диагностики НЭК от сепсиса у доношенных новорожденных. Гиперпродукция NO при НЭК, индуцированной iNOS, вызванная мезентериальной гипоперфузией, ускоряет эпителиальное повреждение кишечника, подавляет восстановительные механизмы путем супрессии пролиферации и миграции энтероцитов. Дисбаланс между повреждающими и восстанавливающими механизмами приводит к персистирующей барьерной недостаточности, бактериальной инвазии, устойчивой активации воспалительных медиаторов, что приводит к развитию НЭК. Гипопродукция NO, вызванная eNOS, при генерализации инфекционного процесса тоже способствует повреждению кишечника у новорожденных. Следовательно, повышенная при НЭК и пониженная при НЭК+Сепсис продукции NO являются показателями патологического процесса в

кишечнике новорожденного. Соответствующие пограничные значения уровней NO для каждого патологического процесса

могут применяться в дифференциальной диагностике некротического энтероколита от сепсиса у доношенных новорожденных.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ahle M, Drott P, Elfvin A, Andersson RE. Maternal, fetal and perinatal factors associated with necrotizing enterocolitis in Sweden. A national case-control study. PLoS One. 2018; 13(3):e0194352. doi:10.1371/journal.pone.0194352
2. Gephart SM., Wetzel C., Krisman B. Prevention and early recognition of necrotizing enterocolitis, a tale of two tools. Adv Neonatal Care: official journal of the National Association of Neonatal Nurses. 2014 V 14 (3). P. 201-210. DOI: 10.1097/ANC.000000000000063.
3. Markel T.A., Engelstad H., Poindexter B.B. Predicting disease severity of necrotizing enterocolitis: how to identify infants for novel therapies. J Clin Neonatal. 2014 Jan; 3(1): 1-9. Doi: 10.4103/2249-4847.128717.
4. Li QY, An Y, Liu L, et al. Differences in the Clinical Characteristics of Early- and Late-Onset Necrotizing Enterocolitis in Full-Term Infants: A Retrospective Case-Control Study. Sci Rep. 2017; 7: 43042. Published 2017 Feb 17. doi:10.1038/srep43042
5. Khalid N. Necrotizing enterocolitis – some things old and some things new: A comprehensive review. 2016, Vol. 5\issue:2\ P: 79-90.
6. Маммадова Т.А. Факторы риска некротического энтероколита у доношенных новорожденных. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2020. № 6. С. 45-49. URL: <http://applied-research.ru/ru/article/view?id=13087> (дата обращения: 04.09.2020).
7. Cokic BB, Cokic VP, Suresh S, Wirt S, Noguchi CT. Nitric oxide and hypoxia stimulate erythropoietin receptor via MAPK kinase in endothelial cells. Microvasc Res. 2014; 92:34-40. doi:10.1016/j.mvr.2014.01.009
8. Watkins D.J., Besner G.E. The Role of the Intestinal Microcirculation in Necrotizing Enterocolitis. Semin Pediatr Surg. 2013. V 22 (2). P. 83-87. Doi: 10.1053/j.sempedsurg.2013.01.004
9. N.A. Drucker, A.R. Jensen, Jan P Te Winkel, M.J. Ferkowicz, T.A. Markel. Loss of endothelial nitric oxide synthase exacerbates intestinal and lung injury in experimental necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 2018; 53(6): 1208-1214. Doi:10.1016/j.jpedsurg.2018.02.087. Epub 2018 Mar 8.
10. Dzik J.M., Dobrzanska A., Gruszfeld D., Walajtys-Rode E. Nitric oxide metabolites in the urine of full-term and preterm infants. Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society. 2002. V. 44(4). P. 368-375.

XÜLASƏ

Vaxtında doğulan yenidoğulanlarda nekrotik enterokolitin sepsisdən differensiasiyasında azot oksidin spesifikliyi: xəstə-kontrol tədqiqatı.

Məmmədova T.Ə.

K.Y.Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutu

Açar sözlər: NEK, sepsis, vaxtında doğulan yenidoğulanlar, azot oksid.

İşin məqsədi NEK-in vaxtında doğulan yenidoğulanlarda sepsisdən fərqlənməsində azot oksidin (NO), eritropoetin (EPO) və kalsium ionlarının (Ca^{+2}) diaqnostik əhəmiyyətini müəyyən etmək idi. **Material/xəstələr.** Bu prospektiv tədqiqatı Azərbaycanın Bakı şəhərində K. Y. Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutunun klinikasının intensiv terapiya və vaxtında doğulan yeni doğulmuş körpələrin patologiyası bölmələrində aparılıb. Tədqiqata 37 həftəlik hamiləlik yaşı olan körpələr daxil edilmişdir. Müvafiq qarın və sistemik simptomları olan xəstələrdə demoqrafik və klinik məlumatlar toplanmışdır. NEK və NEK+sepsisin diferensial diaqnozunu aparmaq üçün NO, EPO və Ca^{+2} seçdik. ROC-curve analiz bu biomarkerlərin diaqnostik dəyərini hesablamaq üçün tətbiq edilmişdir.

Nəticələr. NEK ilə 100 xəstə vaxtında doğulan yenidoğulmuşlar müayinə edildi. Uşaqların bədən çəkisi 2500-4400 qram arasında dəyişdi. Onların qanında NO, EPO və Ca^{+2} səviyyələri müəyyən edilmişdir. NEK olan 83 xəstədə NO, EPO səviyyələrində artım və Ca^{+2} -də azalma müşahidə edildi. Xəstəliyin gedişatının septiki ağırlaşması olan 17 xəstədə test nəticələri digər qrupun göstəricilərinin əksinə idi ($p < 0.001$). Bu uşaqlarda NO səviyyəsi NEK I olan xəstələrin zərdab dəyərindən də aşağı idi. Beləliklə sepsisdən NEK-in diferensial diaqnozunu aparmaq üçün NO istifadə edilə bilən bir markerdir.

SUMMARY

The specificity of nitric oxide in differentiating necrotizing enterocolitis from sepsis in full-term infants: a case-control study.

Mammadova T.A.

Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Y. Farajova.

Key words. NEC; sepsis; full-term newborns; hypoxia; Nitric oxide; erythropoietin.

Purpose of the study. The aim of the study is to identify the diagnostic capability of biomarkers – Nitric Oxide (NO), Erythropoietin (EPO) and Calcium ion (Ca^{+2}) in differentiating NEC from Sepsis in full-term newborns. **Material/patients.** A prospective case-control study was conducted in the intensive care and in the full-term neonatal pathology units of the Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Y. Farajova – Baku, Azerbaijan. The study included infants with a gestational age of $37 \leq$ weeks. Demographic and clinical data were collected from patients with abdominal and systemic symptoms, associated with NEC. To conduct differential diagnosis of NEC from NEC + Sepsis, we chose NO, EPO and Ca^{+2} as potential biomarkers. ROC-curve analysis was used to calculate the diagnostic capability of these biomarkers. **Results.** We examined 100 full-term sick newborns with NEC. The weight of the children ranged between 2500 and 4400 grams. The levels of NO, EPO and Ca^{+2} were determined in the blood of all newborns in our sample. Elevated levels of NO, EPO and decreased levels of Ca^{+2} were observed in 83 patients. Whereas in 17 patients with NEC + Sepsis, that is, with septic complication of the disease, the test results obtained were opposite to those of the other group ($p < 0.001$). Levels of NO in the patients with septic complication were even lower than the patients diagnosed with NEC I. **Conclusions.** Therefore, NO can be used as a biomarker for differential diagnosis of NEC from Sepsis.

Mammadova Tukaz qızı

K.Y. Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutu

E-mail: tukaz.mammadova@gmail.com.

Redaksiyaya daxil olub: 23.02.2023

Çapa tövsiyə olunub: 02.03.2023