

О.В. Воробьева

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИММУНОЦИТОКИНОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ С НЕКРОТИЗИРУЮЩИМ ЭНТЕРОКОЛИТОМ

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Украина

Реферат. В статье представлен результат исследования показателей уровней интерлейкина-1 β , фактора некроза опухоли и противовоспалительного иммуноцитокина-10 в периферической крови у недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом, а также их корреляционные взаимосвязи с тяжестью течения заболевания. Для диагностики третьей стадии некротизирующего энтероколита значимы высокий уровень интерлейкина-10 и умеренно повышенный интерлейкин-1 β в периферической крови у новорожденных как до 8, так и через 24 часа с момента начала заболевания.

Ключевые слова: некротизирующий энтероколит, недоношенные, иммуноцитокينات.

Некротизирующий энтероколит новорожденного (НЭК) — одно из наиболее тяжелых и часто встречающихся заболеваний неонатального периода. Успех в лечении НЭК зависит от многих факторов, в том числе и от своевременной диагностики перехода заболевания из «терапевтической» в «хирургическую» стадию, трудность которой на начальной стадии НЭК в большей мере заключается в субъективной оценке неспецифических клинических данных и индивидуальном опыте врача [2, 3]. Рекомендованные современные лабораторные и инструментальные критерии диагностики НЭК неравнозначны при установлении заболевания на ранней стадии.

По данным зарубежных авторов, при НЭК происходит повышение концентрации как про-, так и противовоспалительных иммуноцитокينات (в том числе, интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-10 (ИЛ-10), фактора некроза опухоли (ФНО- α) в периферической крови, особенно на более поздних стадиях заболевания [1, 4, 5]. Рутинное применение этого диагностического теста ограничено. В отечественной литературе подобные исследования не описаны. В настоящей работе представлены собственные данные.

Цель исследования: определить уровни провоспалительных (ИЛ-1 β , ФНО- α) и противовоспалительного (ИЛ-10) иммуноцитокينات в периферической крови у недоношенных новорожденных с НЭК и установить корреляционные взаимосвязи этих показателей с тяжестью заболевания.

Материалы и методы

Определение выбранных регуляторов неспецифического звена иммунитета осуществляли в сыворотке периферической крови у недоношенных новорожденных в течение первых 8 и через 24 часа после установления диагноза НЭК.

Иммунологические исследования проводились в лаборатории фундаментальных исследований ИНВХ им. В. К. Гусака АМН Украины (зав. лабораторией Гнилорыбов А. Н.). Для определения уровней цитокинов в сыворотке крови применялся метод иммуноферментного анализа с использованием реактивов American International pls. Для реализации этого варианта использовались два моноклональных антитела с разной этиотропной специфичностью. Интенсивность окраски продукта ферментативной реакции количественно оценивали на ридере PR2100 SANOFI DIAGNOSTI PASTEUR (Франция). Концентрация цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-10, ФНО- α) определялась по стандартному калиброванному графику. Результаты выражали в пг/мл.

Для чистоты эксперимента, с целью исключения активации цитокинов в ответ на бактериальную инфекцию (БИ), в исследование включали только новорожденных с НЭК и известными на время забора крови отрицательными результатами бактериологического посева крови и кала. В основную группу вошли 29 недоношенных новорожденных с НЭК разных стадий. Группу сравнения составили 14 недоношенных с клинически и лабораторно подтвержденной внутриутробной БИ, а контроля — 8 условно здоровых недоношенных новорожденных, которые находились на совместном пребывании с матерями и имели относительно гладкое течение раннего неонатального периода.

Оценены следующие показатели: среднее арифметическое значение (M), квадратичное отклонение (s), ошибка средней арифметической величины или средняя квадратичная ошибка (m), показатель важных расхождений (t). На основании значения t и числа наблюдений с помощью таблицы Стьюдента определяли достоверность отличий (P). Отличия считались достоверными, начиная с значения $p < 0,05$, то есть если правильность вывода о наличии отличий среди величин могла быть подтверждена в более чем 95% случаев. Коэффициенты корреляции (r) и равные (p) их значимости рассчитывали с помощью пакета программ STATISTICA for WINDOWS.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены показатели средних значений иммуноцитокينات и их стандартных отклонений в динамике для каждой стадии НЭК, групп с БИ и контроля. Обнаружено, что в группе контроля ни при первом заборе крови, ни в динамике через 24 часа не установлена активация им-

Таблица. Показатели иммуноцитокринов периферической крови у недоношенных новорожденных в течение 8 часов и через 24 часа с момента установления диагноза некротизирующего энтеро-

Группы	Срок определения	ИЛ-1 β , пг/мл	ФНО- α , пг/мл	ИЛ-10, пг/мл
Контроль (n=8)	до 8 часов	0	0	0
	через 24 часа	0	0	0
БИ (n=14)	до 8 часов	3,7 \pm 0,8	6,2 \pm 0,7*	11,8 \pm 2,5
	через 24 часа	2,8 \pm 0,7***	4,4 \pm 0,2*	16,7 \pm 3,2
НЭК I (n=11)	до 8 часов	0,6 \pm 0,2***	0,5 \pm 0,2*	1,5 \pm 0,6*
	через 24 часа	1,1 \pm 0,4**,**	0,6 \pm 0,4*	1,8 \pm 0,4*
НЭК II (n=11)	до 8 часов	1,8 \pm 0,6*	0,8 \pm 0,5*	1,7 \pm 0,3*
	через 24 часа	2,3 \pm 0,5*	0,7 \pm 0,3*	1,9 \pm 0,5*
НЭК III (n=7)	до 8 часов	5,8 \pm 1,2	2,4 \pm 0,3	14,6 \pm 3,8
	через 24 часа	6,2 \pm 0,4	3,2 \pm 0,6	18,4 \pm 2,6

Примечания: * - различия показателей с НЭК III, $p < 0,02$;

** - различия данных в динамике и с НЭК III, $p < 0,05$;

*** - различие показателя с НЭК III, $p < 0,05$.

муноцитокринов, что свидетельствует об отсутствии ведущих причин, стимулирующих выработку медиаторов системного воспалительного ответа.

Анализ показателей интерлейкинов, исследованных в первые 8 часов после установления диагноза, выявил достоверное повышение начального уровня ИЛ-1 β в зависимости от тяжести НЭК и значительно более высокую его концентрацию на последней стадии. При сравнении показателя с ранними стадиями заболевания, отмечается 3-кратное увеличение ИЛ-1 β при НЭК II стадии (0,06 \pm 0,2 пг/мл, $p < 0,02$) и при НЭК III стадии (1,8 \pm 0,6 пг/мл, $p < 0,02$), а при НЭК III стадии 4-кратное увеличение (5,8 \pm 1,2 пг/мл, $p < 0,02$). Значение интерлейкина при БИ достоверно не отличалось от НЭК III стадии, $p > 0,05$ (табл.).

Аналогичные результаты получены при исследовании первичной концентрации ИЛ-10 в периферической крови. Отмечено резкое его повышение при НЭК III стадии (14,6 \pm 3,8 пг/мл) по сравнению с I и II стадиями, причем достоверных различий между ранними стадиями заболевания не выявлено (1,5 \pm 0,6 пг/мл против 1,7 \pm 0,3 пг/мл, $p > 0,05$). У новорожденных с внутриутробной БИ произошла активация ИЛ-10, концентрация которого была относительно ниже, но не достоверно, чем при III стадии НЭК (11,8 \pm 2,5 пг/мл, $p > 0,05$) (табл.).

В динамике через 24 часа после установления диагноза значение ИЛ-1 β у детей с I и II стадиями НЭК незначительно повысились и достоверно не отличались от первоначальных показателей и составляли, соответственно, 1,1 \pm 0,4 и 2,3 \pm 0,5 пг/мл, $p > 0,05$, однако различия между группами сохранились, $p < 0,05$. При анализе концентрации ИЛ-1 β при III стадии заболевания отмечена тенденция к повышению по времени сбора – 6,2 \pm 0,4 пг/мл, $p > 0,05$. При сравнении его уровня с первыми двумя группами и третьей группой НЭК, по-прежнему сохранялось повышение показателя более чем в 2 раза, $p < 0,05$ (табл.).

Согласно данным исследования, у недоношенных в группе БИ в динамике наблюдалось недостоверное снижение уровня ИЛ-1 β от первичного результата (2,8 \pm 0,7 пг/мл, $p > 0,05$), но

отличное от значения интерлейкина при III стадии НЭК, $p > 0,05$.

Для ИЛ-10 в динамике через 24 часа на ранних стадиях НЭК (табл.) установлено отсутствие различий как внутри каждой группы, так и между ними, $p > 0,05$, с НЭК I стадии (1,8 \pm 0,4 пг/мл) и НЭК II стадии (1,9 \pm 0,5 пг/мл). Значимые изменения концентрации ИЛ-10 состоялись при тяжелой стадии заболевания. Отмечена тенденция к резкому повышению показателя в динамике (18,4 \pm 2,6 пг/мл) и относительно первых двух стадий НЭК, $p > 0,05$. Сравнительно уровня ИЛ-10 в группе БИ у новорожденных в динамике внутри группы наблюдалась такая же особенность повышения показателя до 16,7 \pm 3,2 пг/мл, но при этом $p > 0,05$. Достоверных различий между группами БИ и НЭК также не обнаружено.

Отдельно остановимся на оценке результатов исследования ФНО- α (табл.). В группах новорожденных с НЭК мы не получили предполагаемой значимой активации фактора некроза опухолей. Достоверных различий между ранними стадиями заболевания и внутри групп как при первичном заборе крови, так и в динамике не установлено – 0,5 \pm 0,2 пг/мл и 0,8 \pm 0,5 пг/мл; 6,0 \pm 0,4 пг/мл и 0,7 \pm 0,3 пг/мл, $p > 0,05$, соответственно, на I и II стадиях НЭК.

На поздней стадии НЭК отмечалось достоверное повышение начального и последующего показателей ФНО- α по сравнению с результатами первых двух групп ($p < 0,05$). В группе недоношенных с НЭК III стадии достоверных различий между значениями ФНО- α в динамике не обнаружено: 2,4 \pm 0,8 пг/мл и 3,2 \pm 0,6 пг/мл, соответственно, $p > 0,05$ (табл.).

Более значительная и достоверно отличимая от НЭК всех стадий активация ФНО- α состоялась в группе новорожденных с внутриутробной БИ (табл.). При первичном исследовании его уровень был 6,2 \pm 0,7 пг/мл, а через 24 часа после установления диагноза – 4,4 \pm 0,2 пг/мл, $p < 0,05$ в группе, а между группами с НЭК $p < 0,02$.

Анализируя полученные результаты, отличные от ожидаемых показателей, хотелось бы упомянуть следующие литературные данные. Эксперимен-

тальные модели НЭК продемонстрировали, что поврежденная ишемией кишка может быть основным источником циркулирующих иммуноцитокінов даже без какой-либо бактериальной адгезии транслокации из ее просвета при системной инфекции после того, как произошли значимые изменения в стенке кишечника [1, 2].

Кроме того, энтероциты кишки способны производить широкий спектр иммуноцитокінов при различных воспалительных заболеваниях кишечника и экспериментальных воспалительных состояниях [1, 4, 5]. В то же время повышенные концентрации цитокинов оказываются у новорожденных с сепсисом, шоком, синдромом полиорганной недостаточности всегда имеют место на поздних стадиях некротизирующего энтероколита.

Поскольку в нашем исследовании мы намеренно исключили из групп НЭК недоношенных новорожденных с клинически и лабораторно подтвержденной тяжелой системной бактериальной инфекцией и бактеремией, полученные результаты уровней иммуноцитокінов позволили предположить преобладающее участие каждого из них в общем инфекционном процессе и/или гипоксически-ишемическом повреждении кишечника.

Так, И-1 и И-10 равно активируются при запуске воспалительной реакции как вследствие системной бактериальной инфекции, так и вследствие локального ишемического повреждения кишки с НЭК, без достоверных различий между группами, но со значимым преимуществом в группе III стадии НЭК. Однако отмечается прямая корреляция этих показателей в зависимости от тяжести НЭК (с I и II стадиями) при первичном и повторном заборе крови ($r = 0,72$, $r = 0,68$ и $r = 0,74$, $r = 0,62$, соответственно, $p < 0,02$).

Поскольку ИЛ-10 – мощный противовоспалительный регулятор, выявление его в очень высоких концентрациях на третьей стадии НЭК свидетельствует о сильном подавлении воспаления в кишечнике, то парентеральное введение ИЛ-10 может быть предложено как профилактический метод при прогрессировании заболевания.

Концентрация фактора некроза опухолей в периферической крови, наоборот, значительно повышается только при бактеремии. Установлена слабая прямая корреляционная зависимость его уровня от тяжести НЭК в динамике – $r = 0,44$, $r = 0,32$, $p < 0,05$.

Возможно, неадекватно низкая патологическому процессу в кишечнике выработка ИЛ-1 β и ФНО- α у недоношенных новорожденных с НЭК связана с морфологическим повреждением слизистой оболочки кишки (некроз, отслойка) и, соответственно, энтероцитов, которые в этих условиях не могут полноценно участвовать в иммунных реакциях.

Полученные результаты не противоречат работам, посвященным исследованию ИЛ-6 и ФНО- α у недоношенных новорожденных с различными стадиями НЭК [1, 4, 5]. Авторы нашли значительное повышение ИЛ-6 в зависимости от стадий заболевания в течение 48 часов с момента уста-

новления диагноза (в нашем исследовании – ИЛ-1 β). При этом установлена диагностическая неэффективность определения ФНО, который не менял свою концентрацию не только при прогрессировании заболевания, но и вне зависимости от наличия или отсутствия бактеремии [1, 4, 5].

Обнаруженный дисбаланс между системой провоспалительных и противовоспалительных регуляторов системного ответа в пользу подавления воспалительной реакции, связанный с физиологически несостоятельным иммунным ответом у недоношенных новорожденных, должен «смягчать» тяжесть течения заболевания, в частности НЭК. Несмотря на это, при высоких уровнях противовоспалительных интерлейкинов клинически состояние новорожденных расценивалось как крайней степени тяжести, а это выглядит парадоксальным. Они не защищают кишку, не уменьшают глубину ее повреждения, не отражают характер поражения кишечника (прерывистое, непрерывное), так как всем новорожденным с третьей стадией НЭК показано хирургическое лечение. К сожалению, нет литературных данных, свидетельствующих о способности противовоспалительных интерлейкинов (в том числе и ИЛ-6) влиять на процессы репарации в кишечнике.

Кроме того, отсутствие информации о зависимости уровней провоспалительных иммуноцитокінов от срока гестации ребенка не позволяют нам на сегодняшний день объяснить причину различий этих показателей при системной бактериальной инфекции и НЭК тяжелой стадии.

Таким образом, для диагностики только третьей стадии НЭК значимы высокий уровень ИЛ-10 и умеренно повышенный – ИЛ-1 β в периферической крови у новорожденных как до 8, так и через 24 часа с момента начала заболевания, но при этом морфологические изменения в кишечнике приобретают уже необратимый характер. По медицинским причинам это поздно, а по экономическим в условиях наших клиник – не оправдано.

O.V. Vorobjova

Diagnostic Importance Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Premature Infants with Necrotizing Enterocolitis

The article presents the results of research performance levels of interleukin-1 β , tumor necrosis factor and anti-immunocytokine-10 in peripheral blood of preterm infants with necrotizing enterocolitis, as well as their correlations with the severity of the disease. A third step for diagnosing necrotizing enterocolitis significant higher level of interleukin-10 and moderately elevated interleukin-1 β in the peripheral blood of the newborn as up to 8, and 24 hours from the onset of the disease. (Arch. Clin. Exp. Med. – 2014. – Vol. 23, No. 2. – P. 176-179)

Keywords: necrotizing enterocolitis, premature, immunocytokines.

О.В. Воробйова

Діагностична значимість про- та протизапальних імунітокінів у недоношених новонароджених з некротизуючим ентероколітом

У статті представлений результат дослідження показників рівнів інтерлейкіна-1 β , фактора некрозу пухлин і протизапального імунітокіна-10 у периферичній крові у недоношених новонароджених з некротизуючим ентероколітом, а також їхні кореляційні взаємозв'язки з важкістю перебігу захворювання. Для діагностики третьої стадії некротизуючого ентероколіта значимий високий рівень інтерлейкіна-10 і помірковано підвищений інтерлейкін-1 β у периферичній крові у новонароджених як до 8, так і через 24 години з моменту початку захворювання. (Арх. клін. експ. мед. – 2014. – Т. 23, № 2. – С. 176-179)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ahmed S.* Cytokines and cytokine receptors in healthand diasease /S.Ahmed, K.Ihara, Y.Sasaki // *Exp. Clin. Immunogenet.* – 2000. – Vol. 17, No. 11. – P. 18-22.
2. *Epelman M.* Necrotizing Enterocolitis: review of state-of-the-art imaging findings with pathologic correlation / M. Epelman, A. Daneman, O. M. Navarro // *Radio Graphics.* – 2007. – Vol. 27, No. 2. – P. 285-305.
3. *Nowicki P. T.* Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how / P. T. Nowicki // *Semin Pediatr. Surg.* – 2005. – Vol. 14, No. 4. – P. 152-158.
4. *Salvatore G.* Effects of in vivo treatment with interleukins 1beta and 6 on rat mesenteric vascular bed reactivity / G. Salvatore, M. A. Salvia, A. L. Piepoli // *Auton Autacoid. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 23, No. 4. – P. 125-131.
5. *Sharma R.* Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis / R. Sharma, M. L. Hudak, D. L. Mollitt // *J. Pediatr. Surg.* – 2007. – Vol. 43, No. 4. – P. 454-461.

Надійшла до редакції: 27.02.2014