

## НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕКРОТИЧЕСКОГО ЭНТЕРОКОЛИТА ОТ СЕПСИСА У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ: ИССЛЕДОВАНИЕ СЛУЧАЙ-КОНТРОЛЬ

Маммадова Т.А.

*Научно-исследовательский институт педиатрии имени К.Я. Фараджевой Азербайджана, Баку, e-mail: tukaz.mammadova@gmail.com*

Некротический энтероколит (НЭК) является одним из наиболее тяжелых приобретенных заболеваний желудочно-кишечного тракта неонатального периода. В связи с отсутствием достоверных биомаркеров своевременное выявление и дифференциальная диагностика НЭК остается трудной задачей. Для определения правильной стратегии ведения и лечения болезни важно дифференцирование НЭК от других патологических состояний, имеющих сходные признаки. Целью исследования было выявление диагностической значимости биомаркеров оксида азота (NO), эритропоэтина (ЭПО) и иона кальция ( $Ca^{+2}$ ) в дифференциации НЭК от сепсиса у доношенных новорожденных. 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 НЭК 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. Исследование проводилось с января 2017 по май 2019 г. Были обследованы 100 больных доношенных новорожденных с НЭК. Масса тела детей колебалась в пределах от 2500 до 4400 граммов. В крови у них были определены уровни NO, ЭПО и  $Ca^{+2}$ . У 83 больных с НЭК наблюдалось повышение уровня NO, ЭПО и понижение  $Ca^{+2}$ . Тогда как у 17 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. NO является маркером, который можно использовать для проведения дифференциальной диагностики НЭК от сепсиса.

Ключевые слова: НЭК, сепсис, доношенные новорожденные, гипоксия, оксид азота, эритропоэтин.

## NOVEL BIOMARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS FROM SEPSIS IN FULL-TERM NEWBORNS: A CASE-CONTROL STUDY

Mammadova T.A.

*Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Y. Faradzhevoy of Azerbaijan, Baku, e-mail: tukaz.mammadova@gmail.com*

Necrotizing enterocolitis (NEC) is one of the most severe acquired diseases of the gastrointestinal tract of the neonatal period. Due to the lack of reliable biomarkers, early and differential diagnosis of NEC remains difficult. Differentiation of NEC from other pathological conditions with similar symptoms is important for determination of a strategy for the treatment of the disease. 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. 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. The study was conducted between January 2017 and May 2019. 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. Therefore, NO can be used as a biomarker for differential diagnosis of NEC from Sepsis.

Keywords: NEC, sepsis, full-term newborns, hypoxia, Nitric oxide, erythropoietin.

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 госпиталя Научно-исследовательского института 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 наш госпиталь в первые две недели постнатальной жизни, большинство из которых были в раннем неонатальном возрасте. Сбор данных и соответствующие анализы у младенцев, в возрасте старше двух недель, не проводились. 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 был выполнен 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 плазме 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 исследования и их обсуждение.** Исследование было проведено с января 2017 по май 2019 г. Были обследованы 100 больных доношенных новорожденных с НЭК I (53 больных), НЭК II (30 больных), НЭК III (17 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 от 37 до 42 недель. Масса тела детей колебалась в пределах от 2500 до 4400 граммов. 36 новорожденных принадлежали женскому полу, а 64 – мужскому. У 83 пациентов был диагностирован НЭК без септического осложнения течения болезни. У 17 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 мекониальный 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 отёчностью передней стенки, рвота с желчью, неустойчивый стул. Однако в клинике у пациентов с НЭК II и НЭК III доминировало проявление гипоксического фактора - со стороны центральной нервной системы (внутричерепное кровоизлияние у 18, судороги - 19, тяжёлое нарушение сознания – 15 больных), сердечно-сосудистой системы (у 10 врожденные пороки развития), респираторные нарушения. Тогда как у больных с НЭК+сепсис особенностью клиники являлось

превалирование проявления инфекционного фактора, то есть наличие очагов инфекции в различных органах и системах (вентрикулит, перитонит, остеомиелит, омфалит, пневмония). Нужно отметить, 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 плазме крови у больных доношенных новорожденных были определены уровни NO, ЭПО и Ca<sup>+2</sup>. У 83 пациентов с НЭК наблюдалось повышение уровней NO, ЭПО и снижение показателей Ca<sup>+2</sup>. У 17 больных с НЭК+сепсис были выявлены низкие значения NO, ЭПО и Ca<sup>+2</sup>. Нужно отметить, что у пациентов с НЭК с септическим осложнением NO ниже даже его значения, чем при I стадии болезни ( $p_1 < 0.001$ ). Уровень ЭПО также низкий 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<sup>+2</sup> наблюдается незначительное повышение только по сравнению его показателей с НЭК III ( $p_9 = 0.16$ ). То есть наибольшее изменение уровней биомаркеров в плазме у больных наблюдалось только в значении показателей NO.

Для выявления статистически значимой разницы уровней NO, ЭПО, Ca<sup>+2</sup> 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<sup>+2</sup> у больных с НЭК и НЭК+сепсис

Показатели	НЕК I (n = 49)	НЭК II (n = 27)	НЭК III (n = 7)	НЭК + сепсис (n=17)
NO (мкмоль/л)	54.40 [43.70; 78.90] ( $p_1 < 0.001$ )	81.90 [53.23; 101.55] ( $p_2 < 0.001$ )	117.90 [115.35; 127.00] ( $p_3 < 0.001$ )	35.60 [32.10; 49.90]
ЭПО (ммоль/л)	17.80 [14.90; 19.70] ( $p_4 < 0.50$ )	19.50 [15.90; 21.55] ( $p_5 < 0.09$ )	23.10 [19.35; 26.00] ( $p_6 < 0.01$ )	18.50 [14.50; 20.10]
Ca <sup>+2</sup> (ммоль/л)	1.68 [0.81; 1.90] ( $p_7 < 0.11$ )	0.80 [0.69; 1.26] ( $p_8$ <0.40)	0.80 [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 плазменных уровней ЭПО, NO, Ca<sup>+2</sup> были использованы также для построения ROC-кривой. В связи с тем что развернутая 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<sup>+2</sup>. Так как в показателях ППК комбинаций NO+ ЭПО и NO, ЭПО, Ca<sup>+2</sup> нет никакой значимой разницы, следовательно, Ca<sup>+2</sup> 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.

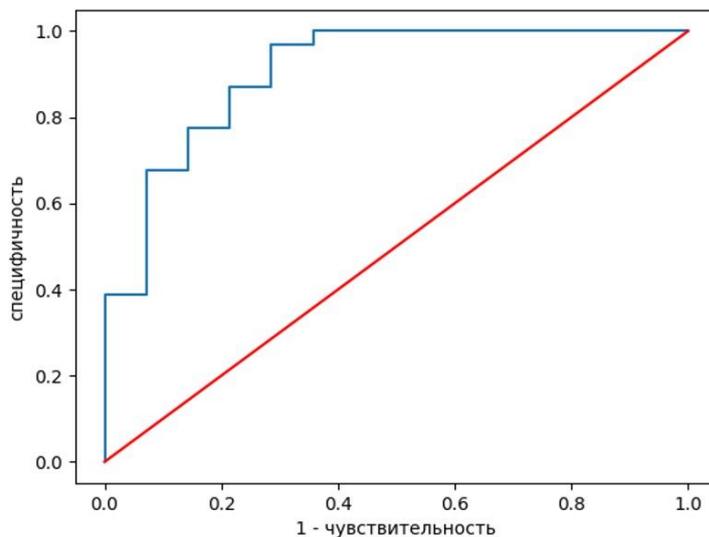
Таблица 2

Значимость биомаркеров и их комбинаций в дифференциальной диагностике НЭК и НЭК+сепсис

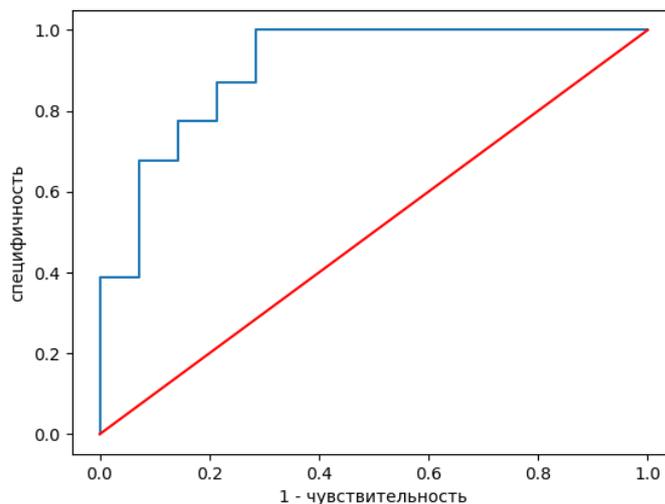
Биомаркеры	ППК, %	Чувствительность, %	Специфичность, %	ВО	ЛП	ЛО	ВП
NO	79,3	87,1	71,4	10	4	4	27
ЭПО	57,5	93,5	21,5	3	11	2	29
NO, ЭПО	81,2	83,9	78,6	11	3	5	26
NO, ЭПО, Ca <sup>+2</sup>	81,2	83,9	78,6	11	3	6	26

Примечания: ППК – наибольшая диагностическая ценность биомаркеров; ВО – верно отрицательный; ЛП – ложно положительный; ЛО – ложно отрицательный; ВП – верно положительный.

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 (рис. 1). Диагностическая ценность NO незначительно повышается при комбинации с ЭПО, а при дополнительном сочетании их с Ca<sup>+2</sup> никаких изменений не наблюдается (рис. 2).



*Рис. 1. ROC-кривая чувствительности и специфичности NO в дифференциальной диагностике НЭК с НЭК+сепсис*



*Рис. 2. ROC-кривая чувствительности и специфичности NO, ЭПО, Ca<sup>+2</sup> в дифференциальной диагностике НЭК с НЭК+сепсис*

В этом проспективном одноцентровом исследовании случай-контроль мы стремились выявить диагностическую ценность NO, ЭПО и Ca<sup>+2</sup> в дифференциации НЭК и НЭК+сепсис в отдельности и их комбинаций. При НЭК было обнаружено повышение сывороточных уровней NO, ЭПО и понижение Ca<sup>+2</sup>, тогда как при НЭК+сепсис наблюдались низкие значения этих биомаркеров. Уровень NO в плазме крови у группы случай-контроль был ниже, чем у больных с НЭК I, НЭК II, НЭК III. Согласно нашему исследованию, изменение уровня NO в плазме 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, способствует 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; 9]. Это осуществляется путем компенсаторной вазоконстрикции 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 [10; 11]. 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 mRNA – messenger ribonucleic acid в макрофагах, подверженных действию бактериального эндотоксина [12]. По этой причине мы ожидали повышение уровней ЭПО и NO и снижение уровня иона  $Ca^{+2}$  при НЭК, что нами и наблюдалось. Однако в крови у детей с НЭК+сепсис наблюдается низкий уровень NO в отличие от другой группы. Согласно литературным данным и нашему исследованию, 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 вызывает снижение продукции NO, что наблюдается при сепсисе [13].

**Заключение.** Результаты нашего исследования показывают, что NO является биомаркером, который может быть использован для проведения дифференциальной диагностики некротического энтероколита от сепсиса у доношенных новорожденных. Гиперпродукция NO при НЭК, вызванная гипоксическим поражением центральной нервной системы и мезентериальной гипоперфузией, ускоряет эпителиальное повреждение кишечника, притупляет 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 ведет к разворачиванию полной клинической картины НЭК. Гипопродукция NO, вызванная eNOS, при генерализации инфекционного процесса тоже способствует повреждению кишечника у новорожденных. Следовательно, повышенная при НЭК и пониженная при НЭК+сепсис продукция NO является показателем 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.

### Список литературы

1. Ahle M., Drott P., Elfvin A., Andersson R.E. Maternal, fetal and perinatal factors associated with necrotizing enterocolitis in Sweden. A national case-control study. PLoS One. 2018. Vol. 13 (3). P. e0194352. DOI:10.1371/journal.pone.0194352.
2. Gephart S.M., 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. Vol. 14 (3). P. 201-210. DOI: 10.1097/ANC.0000000000000063.
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. Vol. 3(1). P. 1-9. DOI: 10.4103/2249-4847.128717.
4. Li Q.Y., 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. Vol. 7. P. 43042. DOI: 10.1038/srep43042.
5. Khalid N. Necrotizing enterocolitis – some things old and some things new: A comprehensive review. 2016. Vol. 5. Is. 2. P. 79-90.

6. Stefanutti G. Novel experimental therapies for intestinal ischaemia and reperfusion injury. Doctoral thesis submitted for a PhD in Pediatric Surgery, UCL (University College London). 2011. P. 22-24.
7. Маммадова Т.А. Факторы риска некротического энтероколита у доношенных новорожденных // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2020. № 6. С. 45-49.
8. Cokic B.B., Cokic V.P., Suresh S., Wirt S., Noguchi C.T. Nitric oxide and hypoxia stimulate erythropoietin receptor via MAPK kinase in endothelial cells. *Microvasc Res.* 2014. Vol. 92. P. 34-40. DOI: 10.1016/j.mvr.2014.01.009.
9. Watkins D.J., Besner G.E. The Role of the Intestinal Microcirculation in Necrotizing Enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2013. Vol. 22 (2). P. 83-87. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2013.01.004
10. Upperman J.S., Potoka D., Grishin A., Hackam D., Zamora R., Ford H.R. Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2005. Vol. 14 (3). P. 159-166. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2005.05.004.
11. Drucker N.A., Jensen A.R., Winkel Jan P. Te, Ferkowicz M.J., Markel T.A. Loss of endothelial nitric oxide synthase exacerbates intestinal and lung injury in experimental necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr Surg.* 2018. Vol. 53 (6). P. 1208-1214. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2018.02.087.
12. Korhonen R., Kankaanranta H., Lahti A., Lähde M., Knowles R.G., Moilanen E. Bi-directional effects of the elevation of intracellular calcium on the expression of inducible nitric oxide synthase in J774 macrophages exposed to low and to high concentrations of endotoxin. *Biochem. J.* 2001. Vol. 354 (2). P. 351-358.
13. Dzik J.M., Dobrzanska A., Gruszfild 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. Vol. 44 (4). P. 368-375.