

УДК 616.348-002:616-053.3

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО, КЛИНИЧЕСКОГО И ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ПРИ НЕКРОТИЧЕСКОМ ЭНТЕРОКОЛИТЕ У НОВОРОЖДЕННЫХ

Мехтиева С.А.

*Научно-исследовательский институт педиатрии имени К.Я. Фараджевой, Баку,
e-mail: sevinc.mehdiyeva.74@mail.ru*

Цель исследования: оценить диагностическую, клиническую и прогностическую значимость матриксных металлопротеиназ при некротическом энтероколите у новорожденных. Исследования были проведены в Научно-исследовательском институте педиатрии имени К.Я. Фараджевой. Основную группу составили 110 новорожденных с НЭК, поступивших в отделение реанимации и интенсивной терапии в возрасте от 1 до 60 дней. Все обследованные новорожденные были разделены на три группы по стадиям НЭК. I группу составили новорожденные с НЭК I стадии, II группу – новорожденные с НЭК II стадии, III группу – новорожденные с НЭК III стадии. На основании клиничко-рентгенологических признаков I стадия НЭК отмечалась у 49 (40,5%), II стадия у 48 (39,7%), а III стадия у 13 (10,7%) новорожденных. Контрольную группу составили 30 условно здоровых новорожденных. У 50 детей с НЭК иммуноферментным анализом был определен уровень матриксных металлопротеиназ 2, 9 и 17. В результате проведения сравнительного анализа было установлено, что уровень ММП-2 у новорожденных в I группе увеличивался в 6,9 раза, во II группе в 8,3 раза, а в III группе в 10,7 раза новорожденных по сравнению с новорожденными контрольной группы ($p = 0,015$; $F = 4,686$). Аналогичным образом, уровень ММП-9 повышался в 3 раза в I группе, в 3,4 раз в II группе, в 4,5 раз в III группе ($p < 0,001$; $F = 13,617$). Концентрация ММП-17 у новорожденных в группах I и II была почти одинаково повышена в среднем 2,5 раза, а в III группе – в 3,6 раза по сравнению с контролем ($p = 0,007$; $F = 13,617$). Выраженность изменений уровня этих металлопротеиназ коррелирует с тяжестью течения НЭК. Изменение уровня матрикс металлопротеиназ показывает возможность использовать этих маркеров диагностики и прогнозирования НЭК.

Ключевые слова: новорожденные, недоношенные дети, некротический энтероколит, матриксная металлопротеиназа

EVALUATION OF CLINICAL DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUES OF MATRIX METALLOPROTEINASES DURING NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN NEWBORN

Mekhtieva S.A.

*Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Ya. Faradzheva, Baku,
e-mail: sevinc.mehdiyeva.74@mail.ru*

Purpose of the study: assess the clinical, diagnostic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in neonatal necrotizing enterocolitis. The studies were conducted at the Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Y. Farajova. The main group consisted of 110 newborns with NEC who were admitted to the intensive care unit at the age of 1 to 60 days. The examined newborns were divided into three groups according to the stages of the NEC. The first group consisted of newborns with stage I NEC, Group II – newborns with stage II NEC, Group III were newborns with stage III NEC. According to the clinical and radiological signs, stage I of the NEC was observed in 49 (40.5%), stage II in 48 (39.7%), and stage III in 13 (10.7%) newborns. The control group included 30 conditionally healthy babies. The level of matrix metalloproteinases 2, 9 and 17 was determined by ELISA for 50 children with NEC. The study found that the level of MMP-2 in neonates in the 1st group increased 6.9 times, 8.3 times in Group II, while in the Group III 10.7 times compared to newborn infants in the control group ($p = 0,015$; $F = 4,686$). Similarly, the level of MMP-9 in increased 3 times in the 1st group, 3.4 times in Group II, 4.5 times in Group III ($p < 0,001$; $F = 13,617$). MMP-17 concentrations in neonates in Groups I and II were almost identical on average increased 2.5 times, at Group III in 3.6 times as compared with the control ($p = 0,007$; $F = 13,617$). The severity of changes in the level of the studied metalloproteinases correlates with the severity of NEC. The change in the level of matrix metalloproteinases shows the possibility of using them as predictors in the diagnosis and prediction of NEC.

Keywords: newborns, premature babies, necrotic enterocolitis, matrix metalloproteinase

Некротический энтероколит (НЭК) – тяжёлое полиэтиологическое, неспецифическое, воспалительное заболевание, которое часто осложняется перфорацией кишечника, перитонитом, спаечной кишечной непроходимостью, инфильтратом брюшной полости и сепсисом [1]. НЭК встречается

с частотой 2,4:10000 новорожденных, что составляет 2,1–4% среди всех детей, поступающих в неонатальное отделение реанимации. Несмотря на многочисленные теоретические, клинические, инструментальные исследования, патогенез НЭК изучен не до конца [2, 3]. В основе патогенеза

НЭК лежат сосудистые расстройства, которые приводят к некрозу стенки желудочно-кишечного тракта разной степени, глубины и протяженности. Под действием гипоксии и асфиксии происходит централизация кровообращения, спазм мезентеральных сосудов с кровоизлияниями в кишечную стенку, колонизацией патогенной бактериальной флорой, воспаление, активизирующее провоспалительные медиаторы, что в итоге приводит к изъязвлению слизистого слоя, некрозу и перфорации [2, 4, 5]. В последние годы частота встречаемости НЭК у новорожденных увеличилась, что связано со значительными успехами в неонатологии, позволяющими выхаживание маловесных детей. Установлено, что уровень заболеваемости и смертности НЭК прямо пропорционален сроку гестации новорожденного. Это связано с интенсивным развитием неонатологии и реаниматологии, что позволяет выхаживать глубоконедоношенных детей [3, 4].

В настоящее время дискутируется вопрос об использовании новых биохимических агентов в качестве маркеров выраженности воспалительной реакции и предикторов прогноза при различных заболеваниях у новорожденных детей [6–8]. Среди них важное место занимают система матричных металлопротеиназ, кальпротектин, лактоферрин и другие маркеры [7].

Как известно, ключевым фактором, определяющим активность воспаления и выраженность повреждений кишки у недоношенных детей, является нарушение баланса между синтезом и разрушением белков внеклеточного матрикса [8]. Этот прогрессирующий процесс контролируют ферменты – матричные металлопротеиназы, активность которых подавляется их тканевыми ингибиторами. Мателлопротеиназы принадлежат к семейству цинксодеждащих матриксинов, являющихся основными компонентами базальной мембраны, разрушение которой способствует развитию перфораций кишечной стенки [9]. Учитывая многообразие эффектов компонентов системы матричные металлопротеиназы и тканевыми ингибиторами в тканях, их изучение в качестве факторов диагностики, прогноза и оценки течения НЭК у детей представляется актуальным.

Цель исследования: оценить диагностическую, клиническую и прогностическую значимость матричных металлопротеиназ при некротическом энтероколите у новорожденных.

Материалы и методы исследования

Обследования новорожденных проводились на базе Научно-исследовательского института педиатрии имени К.Я. Фараджевой (Баку, Азербайджан)

в период с 2016 по 2018 гг. В основную группу вошли 110 новорожденных с НЭК, поступивших в отделение реанимации и интенсивной терапии в возрасте от 1 до 28 дней. Все обследованные новорожденные были разделены на три группы по стадиям НЭК. I группу составили новорожденные с НЭК I стадии, II группу – новорожденные с НЭК II стадии, III группу – новорожденные с НЭК III стадии. Согласно клинико-рентгенологическим признакам I стадия НЭК отмечалась у 49 (40,5%), II стадия у 48 (39,7%), а III стадия у 13 (10,7%) новорожденных. Контрольную группу составили 30 условно здоровых новорожденных, без внутриутробной инфекции и врожденных пороков развития. Мальчики составили 56,4% от общего числа детей (62 младенца), а девочки 43,6% (48 младенцев).

Диагноз был поставлен на основании анамнестических, клиническо-лабораторных и инструментальных методов исследования. Стадия заболевания определялась согласно классификации Walsh и Kliegman.

Масса тела новорожденных составила в среднем $2231 \pm 71,7$ г. В группе наблюдавшихся больных было 62 ($56,4 \pm 4,7\%$) мальчиков и 48 ($43,6 \pm 4,7\%$) девочек. Срок гестации новорожденных варьировал в пределах 22–37 недель. Так, гестационный возраст у 3 ($2,7 \pm 1,6\%$) недоношенных составил 22–28 недель, у 13 ($11,8 \pm 3,1\%$) недоношенных 29–31 неделю, у 25 ($22,7 \pm 4,0\%$) 32–34 недели, у 69 ($62,7 \pm 4,8\%$) свыше 35 недель.

Всем детям проводилось комплексное лабораторно-инструментальное исследование: общие анализы крови и мочи, биохимические показатели крови, определение кислотно-основного состояния газов крови, посев крови и кала, иммуноферментный анализ и инструментальные методы – обзорное рентгенологическое обследование брюшной полости, нейросонография, ультразвуковое исследование брюшной полости, эхокардиографическое обследование.

У 50 детей с НЭК был определен уровень матричных металлопротеиназ 2, 9 и 17 (ММП-2, ММП-9 и ММП-17). Концентрации ММП-2, – 9–17 определяли в сыворотке крови новорожденных с НЭК при поступлении в реанимационное отделение и в динамике через 7 дней после лечения.

Определение матричных металлопротеиназ выполняли иммуноферментным анализом с набором реактивов фирмы «CUSABIO BIOTECH» на анализаторе Elisys Uno Human (Германия).

Полученные цифровые данные подверглись статистической обработке методами медицинской статистики с учетом современных требований. Применены методы вариационного – U-Манна – Уитни, KU-Краскеля – Уоллиса, дисперсионного – ANOVA – F-Фишер, FS-Фишер – Снедекор, дискриминантного чувствительность и специфичность и ROC-анализов. Вычисления проводились на электронной таблице EXCEL-2010 и SPSS-20.

Принимая во внимания многообразие факторов риска развития НЭК, нами был проведен анализ анамнестических данных, антенатальных и интранатальных факторов риска в группах.

Возраст матерей основной группы с НЭК колебался от 19 до 43 лет и составил в среднем $26,4 \pm 0,5$ лет, из них матерей в возрасте до 30 лет было 88 (80%), а старше 30 лет 22 (20%) женщин. Большинство матерей были в возрасте от 19 до 30 лет.

Акушерский анамнез матерей был отягощен во всех группах. В основной группе у 93 (84,5 ± 3,4%) матерей отмечались проявления гестоза первой половины беременности, у 35 (31,8 ± 4,4%) матерей гестоз второй половины беременности, у 70 (63,6 ± 4,6%) матерей анемия. Оперативные роды были у 57 (51,8 ± 4,8%) матерей.

Результаты исследования и их обсуждение

Болезнь началась остро у всех детей. Признаки интоксикации были у всех детей (100%). У детей наблюдалась желчная рвота и нарушение кала. Было выявлено, что у 47 детей (42,7 ± 7,7%) нормальное, а у 63 детей (57,3 ± 4,7%) высокое температура. Так, у 22 больных (20 ± 3,8%) была отмечена субфебрильная, у 20 детей (18,2 ± 3,7%) фебрильная, у 3 больных (2,7 ± 1,6%) пиретическая, у 2 больных (1,8 ± 1,3%) гиперпиретическая температура.

В рентгенологическом обследовании брюшной полости у 69 (62,7 ± 4,6%) детей обнаружен метеоризм, у 42 (38,2 ± 4,6%) детей – утолщение кишечных петель, у 34 (30,9 ± 4,4%) детей – пневматоз, у 12 (10,9 ± 3%) детей – свободный воздух в брюшной полости.

У новорожденных I группы 72,4 ± 6,5 % детей наблюдался метеоризм во время обзорного рентгенологического обследования. У 21 (42,9 ± 7,1 %) пациентов было обнаружено утолщение кишечных петель, у 8 (16,3 ± 5,3 %) пациентов – пневматоз. У пациентов II группы метеоризм обнаружен у 30 (62,5 ± 7%) больных, у 15 (31,3 ± 6,7%) – утолщение кишечных петель у 22 (45,8 ± 7,2%) – пневматоз кишечника. А в III группе ситуация

несколько иная, тяжелее. Так, при этом у всех пациентов, входящих в группу, наблюдался свободный воздух в брюшной полости, что является обязательным показанием к хирургической операции. Метеоризм у 4 (30,8 ± 12,8%) пациентов, утолщение кишечных петель у 6 пациентов (46,2 ± 13,8%), пневмония у 4 (30,8 ± 12,8%) пациентов.

У всех больных проведено бактериологическое обследование кала. При этом патологическая микрофлора обнаружена у 42 (45,3 ± 1,0%) пациентов. У 27 больных выявлен (24,5 ± 4,1%) *Stafilococcus aureus*. А у других больных обнаружен *Stafilococcus epiderm.* (10,9 ± 3%), *Psevd. aeruginosa* (4,1 ± 2,8%), *Klebsiella* (4,5 ± 2,0%), *Prot. mirabilis* (2,0 ± 2,0%), *Candida* (6,1 ± 3,4%).

У всех новорожденных с НЭК при поступлении обнаружены разное по степени выраженности увеличение ММП-2, ММП-9, ММП-17 в сыворотке крови в зависимости от стадии заболевания по сравнению с контрольной группой (таблица).

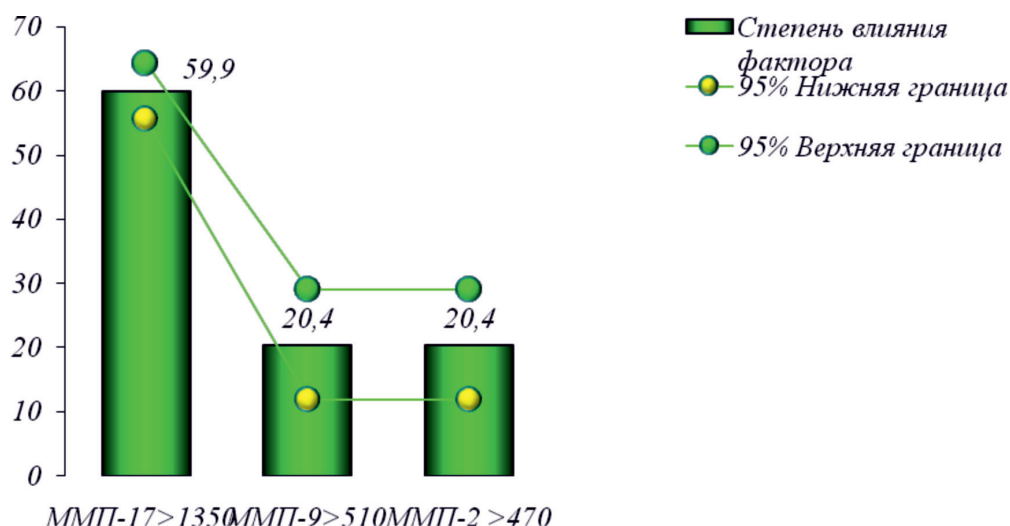
В результате проведения сравнительного анализа было установлено, что уровень ММП-2 у новорожденных в I группе увеличивался в 6,9 раза, во II группе в 8,3 раза, а в III группе в 10,7 раза по сравнению с новорожденными контрольной группы ($p = 0,015$; $F = 4,686$). Уровень ММП-9 тоже увеличивался в 3 раза в I группе, в 3,4 раз в II группе, в 4,5 раз в III группе ($p < 0,001$; $F = 13,617$). Концентрация ММП-17 у новорожденных в группах I и II была почти одинакова, повышена в среднем в 2,5 раза, а в III группе в 3,6 раза по сравнению с контролем ($p = 0,007$; $F = 13,617$).

Концентрация матрикс металлопротеиназ у новорожденных с некротическим энтероколитом на различных стадиях

Маркеры	Контрольная группа (n = 10)	I группа (n = 16)	II группа (n = 16)	III группа (n = 8)	P(KY)	F; p
ММП-2, нг/мл	44,8 ± 1,8 (35–52)	309,4 ± 15,4 (249–519)**	374,1 ± 23,4 (270–598)***	480,8 ± 87,8 (285–950)***	$p = 0,040$	$F = 4,686$ $p = 0,015$
ММП-9, нг/мл	122,1 ± 2,7 (102–131)	367 ± 20,5 (233–502)***	412,3 ± 19,7 (284–522)***	544,1 ± 25,4 (484–671)*** ^{##^}	$p = 0,001$	$F = 13,617$ $p < 0,001$
ММП-17, нг/мл	397,2 ± 23,1 (317–580)	983,6 ± 75,7 (521–1444)***	1016,1 ± 74,3 (533–1497)***	1426,6 ± 142,5 (749–1989)*** ^{##^}	$p = 0,035$	$F = 5,666$ $p = 0,007$

Примечание:

- В скобках указан 95 % доверительный интервал (нижняя и верхняя границы).
- Результаты непараметрического критерия Манна – Уитни: статистическая значимая разница: – с контрольной группой * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; – с I группой # – $p_1 < 0,05$; ## – $p_1 < 0,01$; ### – $p_1 < 0,001$; – с II группой ^ – $p_2 < 0,05$; ^^ – $p_2 < 0,01$; ^^ – $p_2 < 0,001$.
- p (KY) – результаты одностороннего вариационного анализа по критерию Краскела – Уоллиса (сравнение трех групп).
- F ; p – результаты однофакторного дисперсионного анализа по критерию Фишера (сравнение трех групп).



Степень влияния каждого фактора на исход новорожденных с НЭК

Достоверные изменения с различной степенью ММП-2, ММП-9 и ММП-17 наблюдались у новорожденных II, III групп по сравнению с новорожденными I группы ($p_1 < 0,001$; $p_1 < 0,001$; $p_1 < 0,01$).

С помощью корреляционного анализа р-Спирмена у новорожденных с некротическим энтероколитом выявлена связь между матрикс металлопротеиназ и тяжестью болезни:

- прямая средней силы корреляционная связь с ММП-9 ($\rho_s = 0,578$, $p = 0,001$),
- обратная связь слабой силы с ММП-17 ($\rho_s = 0,337$, $p = 0,033$) и ММП-2 ($\rho_s = 0,401$, $p = 0,010$).

Для более полного отражения и взаимосвязи матрикс металлопротеиназ с некротическим энтероколитом, нами проводилась оценка полученных показателей с помощью ROC-анализа. Вычислены площадь ROC-кривой, стандартная ошибка, определены 95%-ные верхние и нижние границы площади и асимптотические значения (достоверность результата). Согласно значениям ММП-2 $S = 0,610 \pm 0,153$ (95%ДИ: 0,310–0,911; $p = 0,039$), ММП-9 $S = 0,716 \pm 1,22$ (95%ДИ: 0,477–0,954; $p = 0,096$), ММП-17 $S = 0,863 \pm 0,66$ (95%ДИ: 0,734–0,992; $p < 0,005$).

На основании координат ROC-кривой определены Cut of Point (точки отсечения), когда сумма значений чувствительности и специфичности достигает максимального уровня. Применение данного диагностического метода даёт возможность оценить прогностическую ценность положительных и отрицательных результатов.

Оптимальной «точкой отсечения» для ММП-17 является величина 1350 пг/мл. В этой точке чувствительность равна (Se) $83,3 \pm 15,2\%$, специфичность (Sp) $88,2 \pm 5,5\%$; для ММП-9 ≥ 510 пг/мл – Se = $50,0 \pm 20,4\%$, Sp = $91,2 \pm 4,9\%$, ММП-2 ≥ 470 пг/мл Se = $50,0 \pm 20,4\%$, Sp = $91,2 \pm 4,9\%$.

Общий диагностический вес тест составляет для ММП-17 87,5%, ММП-9 85%, а у ММП-9 85%, что свидетельствует об их хорошей диагностической эффективности.

С помощью дисперсионного анализа ANOVA (FS-Фишер-Снедекор) мы оценили степень влияния каждого фактора (СВФ) на исход новорожденных с НЭК (рисунок).

Как видно из рисунка, наиболее значимое влияние на исход заболевания выявлено при повышенной концентрации ММП-17 СВФ = 59,9 (95%ДИ: 64,2–55,5; $p < 0,001$), ММП-9 СВФ = 20,4 (95%ДИ: 29,0–11,8; $p < 0,001$), ММП-2 СВФ = 20,4 (95%ДИ: 29,0–11,8; $p < 0,001$).

Заключение

У новорожденных детей с НЭК выявлена различная динамика уровня ММП-2, ММП-9 и ММП-17 в зависимости от стадии болезни. Выраженность изменений уровня этих металлопротеиназ коррелирует с тяжестью течения НЭК. Изменение уровня матрикс металлопротеиназ показывает возможность использовать этих маркеров диагностике и прогнозировании НЭК. Дальнейшее изучение эти маркеры как потенциальных маркеров реализации НЭК и предикторов их исходов у новорожденных.

Список литературы

1. Головки О.К., Левицкая Е.М., Линчевский Г.Л. Особенности ведения новорожденных с некротизирующим энтероколитом // Архив клинической и экспериментальной медицины. 2002. № 11. С. 241–244.
2. Федоров Д.А. Хирургическое лечение некротизирующего энтероколита у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Омск, 2012. 23 с.
3. Kathleen M., Moss L. Necrotizing enterocolitis. Clinics in perinatology. 2012. P. 387–401.
4. Parigi G.B. Pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis. Dept. Research Hospital; Pavia. 2010. no. 11.
5. Караваева С.А. Диагностика и особенности клинического течения некротического энтероколита у детей // Вестник хирургии. 2002. № 4. С. 41–46.
6. Бениова С.Н., Фиголь С.Ю., Маркелова Е.В. Клиническое значение определения матриксных металлопротеиназ у новорожденных с врожденной герпетической инфекцией // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2016. № 1. С. 46–50.
7. Кучеров Ю.И., Жиркова Ю.В., Шишкина Т.Н., Михалев И.А., Арса А.В., Чеботаева Л.И. Диагностика и лечение некротического энтероколита у недоношенных // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2014. № 6. С. 18–24.
8. 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. Vol. 49. no. 10. P. 1446–1451. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2014.03.012.
9. Хворостов И.Н., Дамиров О.Н., Смирнов И.Е. Кальпротектин и матриксные металлопротеиназы при язвенно-некротическом энтероколите у новорожденных детей // Российский педиатрический журнал. 2013. № 6. С. 37–43.