



Вплив miR-155 грудного молока на стан здоров'я недоношених новонароджених

For citation: Child`s Health. 2022;17(7):347-353 doi: 10.22141/2224-0551.17.7.2022.1539

Резюме. Актуальність. Грудне молоко (ГМ) — важливе джерело мікроРНК (miR). МікроРНК мають високу стійкість до впливу ферментів шлунково-кишкового тракту і добре всмоктуються в кишечнику. Однією з найбільш представлених miR у ГМ є miR-155. На сьогодні практично не вивчений вплив miR-155 ГМ на стан здоров'я передчасно народжених немовлят. **Мета дослідження:** встановити вплив miR-155 ГМ на стан здоров'я недоношених новонароджених дітей. **Матеріали та методи.** Нами обстежено 74 новонароджених, які проходили лікування в неонатальних відділеннях. Нами визначено рівень miR-155 у ГМ 44 матерів дітей, які перебували на виключно грудному вигодовуванні (ГВ). Паралельно проводилось визначення експресії генів фактора транскрипції FOXP3 у зскрібку букальної слизової оболонки всіх новонароджених. Було виділено три групи порівняння: першу становили новонароджені до 37 тижнів гестації на ГВ (32 дитини); другу — недоношені новонароджені на штучному вигодовуванні (ШВ) (30 дітей); контрольну — доношені новонароджені на ГВ (12 дітей). **Результати.** Медіана гестаційного віку дітей 1-ї групи становила 33 (31; 34) тижні; 2-ї — 32,5 (32; 35) тижня і була вищою в групі контролю ($p < 0,001$) — 40 (39; 41) тижнів. Неонатальна енцефалопатія як основний діагноз зустрічалась частіше серед доношених новонароджених ($p < 0,001$). Діти 1-ї та 2-ї груп суттєво не відрізнялись за частотою випадків респіраторного дистрес-синдрому й тривалістю необхідної респіраторної підтримки ($p > 0,05$). У 2-ї групі порівняно з 1-ю вірогідно частіше ($p < 0,05$) зустрічались прояви некротизуючого ентероколіту (НЕК): $30,0 \pm 8,4\%$ проти $9,4 \pm 5,2\%$. Результати оцінки рівня експресії miR-155 у ГМ матерів 1-ї групи доводять перевищення відповідного показника в контрольній групі в середньому в 6,2 раза ($p < 0,001$). Аналіз рівня FOXP3 у зскрібку букальної слизової оболонки немовлят показав, що в усіх недоношених дітей рівень FOXP3 був вірогідно нижчий, ніж у доношених ($p < 0,001$). Проте в немовлят 2-ї групи експресія цього фактора була найнижчою ($< 0,001$): $0,08$ (0,04; 0,16) ум.од. у 2-ї групі проти $0,21$ (0,14; 0,38) ум.од. у 1-ї групі. Нами виявлено прямий помірний зв'язок між рівнями експресії miR-155 ГМ і експресією FOXP3 у клітинах слизової оболонки недоношених новонароджених, які перебували на ГВ: $r = 0,442$ ($p = 0,014$). Нами встановлено вірогідне зниження експресії FOXP3 у дітей з виявленим НЕК ($0,11$ (0,04; 0,25) ум.од.) порівняно з новонародженими без такої патології ($0,22$ (0,09; 0,91) ум.од.) ($p < 0,05$). **Висновки.** Результати дослідження підтверджують меншу кількість випадків НЕК серед недоношених дітей на ГВ. ГМ матерів, чії діти народились передчасно, має вищий рівень експресії miR-155, що сприяє експресії FOXP3 слизових оболонок. Отже, miR-155 ГМ вірогідно стимулює дозрівання й підтримує рівень T-reg-клітин слизових оболонок, що перешкоджає розвитку НЕК у недоношених немовлят.

Ключові слова: miR-155; FOXP3; недоношені діти; некротизуючий ентероколіт

Актуальність

Молоко матері — єдиний природний фактор, вплив якого на стан дитини неможливо переоцінити. На сьогодні доведено, що серед великої кількості біологічно активних агентів жіночого молока мікроРНК (miR)

являють собою ключову групу безпосередніх негативних регуляторів трансляції білка або активаторів деградації мРНК. МікроРНК зв'язують комплементарні послідовності вихідної ділянки в 3'-нетрансльованих локусах специфічних мРНК-мішеней, що призводить

© 2022. The Authors. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY, which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для кореспонденції: Абатуров Олександр Євгенович, доктор медичних наук, професор, завідувачий кафедрою педіатрії 1 та медичної генетики, Дніпровський державний медичний університет, вул. Вернадського, 9, м. Дніпро, 49044, Україна; e-mail: alexandraborturov56@gmail.com

For correspondence: Aleksandr Abatur, MD, PhD, Professor, Head of the Department of pediatrics 1 and medical genetics, Dnipro State Medical University, Vernadsky st., 9, Dnipro, 49044, Ukraine; e-mail: alexandraborturov56@gmail.com

Full list of authors information is available at the end of the article.

до пригнічення продукції білка. Кожна miR має потенціал репресії декількох мРНК-мішеней [1, 2].

Вважають, що головними клітинами, які продукують miR і насичують ними грудне молоко, є клітини молочної залози й імунцити. Найбільш висока концентрація в грудному молоці характерна для let-7a-5p, let-7b-5p, let-7f-5p, miR-21-5p, miR-22-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-146b-5p, miR-148a-3p, miR-155, miR-200a-3p [3–7].

МікроРНК мають високу стійкість до впливу ферментів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) і добре всмоктуються в кишечнику. Вважають, що після потрапляння в організм дитини вони інгібують експресію ключових факторів транскрипції імунцитів і мають прямий вплив на функціонування імунної системи [8, 9]. МікроРНК 155 є представником групи miR, які мають значний вплив на стан імунної системи. Встановлено, що miR-155 є регулятором активності запального процесу [10].

На сьогодні практично не вивчений вплив miR-155 грудного молока матері на стан здоров'я передчасно народжених немовлят.

Мета дослідження: встановити вплив miR-155 грудного молока матері на стан здоров'я новонароджених недоношених дітей.

Матеріали та методи

Дослідження проводилось у рамках науково-дослідної роботи «Прогнозування розвитку дитячих захворювань, асоційованих з цивілізацією» (номер держреєстрації 0120U101324) кафедри педіатрії 1 та медичної генетики Дніпровського державного медичного університету. Дослідження проведено згідно із сучасними науковими стандартами, передбачено заходи щодо забезпечення здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до Гельсінської декларації, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Загальної декларації про біоетику і права людини ЮНЕСКО, відповідних законодавчих актів України (Конституції України (ст. 3, 21, 24, 28, 32), Основ законодавства України про охорону здоров'я (ст. 43.1, 44.1), Закону України «Про лікарські засоби» (ст. 7, 8)).

Дослідження проводили на базі відділення для постінтенсивного догляду й виходжування новонароджених Комунального підприємства «Дніпропетровський обласний перинатальний центр зі стаціонаром» ДОР» і відділення для недоношених новонароджених Комунального некомерційного підприємства «Міська багатопрофільна клінічна лікарня матері та дитини ім. проф. М.Ф. Руднева» Дніпровської міської ради за 2021–2022 роки.

Для досягнення поставленої мети було залучено 74 дитини й відібрані зразки грудного молока 44 матерів, діти яких були в групі спостереження й перебували на грудному вигодовуванні. *Критеріями включення* були: виключно грудне (ГВ) або виключно штучне вигодовування (ШВ) з моменту народження, вік на момент обстеження до 21 дня. *Критерії виключення:* тяжкий і клінічно нестабільний стан новонароджених; змішане

харчування або зміна харчування в анамнезі; вік немовляти понад 21 день; наявність запальних захворювань матері, що потребували медикаментозного втручання; наявність запальних ознак запалення слизової оболонки ротової порожнини, носо- і ротоглотки немовлят; змішане харчування дитини.

Нами було відібрано 3 групи дітей:

— перша група — 32 дитини, які народились передчасно і мали виключно грудне вигодовування, і 32 їхні матері (ГВ);

— друга група — 30 дітей, які народились передчасно і годувались виключно адаптованими сумішами (ШВ);

— контрольна група — 12 доношених новонароджених дітей на виключно грудному вигодовуванні і 12 їхніх матерів.

Причиною початку ШВ у всіх випадках була гіполактія матері.

Молекулярно-генетичні методи дослідження включали визначення експресії генів фактора транскрипції FOX P3 (Forkhead Box P3) у зскрібку букальної слизової оболонки новонароджених, визначення екстрацелюлярної miR-155 грудного молока матерів методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу. Для визначення мікроРНК використовували сертифікований набір Applied Biosystems™ TaqMan™ Small RNA Assays. Для статистичного аналізу розраховано нормалізовані рівні експресії miR-155 у грудному молоці матерів першої групи та експресії FOX P3 слизових оболонок немовлят 1-ї і 2-ї груп дослідження щодо групи контролю, де рівень експресії визначених факторів прийнято за 1.

Молекулярно-генетичні методи дослідження проведено в сертифікованій лабораторії PCR lab Interdepartmental Training and Research Laboratory (ITRL) Тернопільського національного медичного університету, яку очолює д.м.н., проф. кафедри мікробіології, вірусології та імунології Олександр Камишний.

Статистичну обробку результатів здійснено за допомогою програмного продукту Statistica 6.1 (StatSoft Inc., серійний номер AGAR909E415822FA). Аналіз отриманих даних з оцінкою статистичної вірогідності відмінностей проведено за допомогою параметричних і непараметричних методів статистики. За умови нормального розподілу кількісних даних (критерій Шапіро — Уїлка) використовували середню арифметичну (M), її стандартну похибку ($\pm m$), дисперсійний аналіз ANOVA з апостеріорним порівнянням за критерієм Тьюкі, при аномальному розподілі — медіану (Me) з міжквартильним розмахом (25 %; 75 %), непараметричний аналіз Краскала — Уолліса з попарним порівнянням за критерієм Данна і Манна — Уїтні. Для характеристики й порівняння відносних величин використовували показник частоти з похибкою ($F \pm m$ %), критерій згоди Пірсона (χ^2) і двосторонній точний критерій Фішера. Оцінку зв'язків між різними факторами проводили за коефіцієнтом рангової кореляції Спірмена (r). Критичний рівень статистичної значущості при перевірці всіх нульових гіпотез прийнято рівним 0,05 (5 %).

Результати

Новонароджені діти основної і контрольної груп суттєво відрізнялись за гестаційним віком і антропометричними показниками ($p < 0,001$). Медіана гестаційного віку дітей першої групи становила 33 (31; 34) тижні, другої — 32,5 (32; 35) тижня, у той час як у групі контролю вона становила 40 (39; 41) тижнів. Також відрізнявся вік немовлят на момент забору матеріалу й термін перебування пацієнтів у стаціонарі. Середній вік доношених дітей на момент забору матеріалу був вірогідно менший, ніж дітей 1-ї і 2-ї груп ($p < 0,05$): 6,5

(5,5; 7,0) дня проти 9,0 (6,5; 13,5) дня в 1-й групі і 11,5 (7,0; 16,0) дня у 2-й групі, що можливо пояснити швидшою адаптацією і стабільним станом дітей контрольної групи. Відмінностей між способами розродження в групах порівняння не було ($p > 0,05$).

Особливості клініко-анамнестичних даних відображено в табл. 1.

Діти 1-ї, 2-ї і контрольної груп суттєво не відрізнялись за результатами оцінки за шкалою Апгар ($p > 0,05$). У 1-й і 2-й групах не було різниці в частоті випадків респіраторного дистрес-синдрому ($p > 0,05$).

Таблиця 1. Клініко-анамнестичні особливості груп порівняння

Показник	Групи дослідження			Значимість різниці між групами
	1-ша (n = 32)	2-га (n = 30)	Контрольна (n = 12)	
Гестаційний вік, тижні, Me (25 %; 75 %)	33 (31; 34)	32,5 (32; 35)	40 (39; 41)	$p_{1-2} = 1,00$ $p_{1-к} < 0,001$ $p_{2-к} < 0,001$
Маса тіла при народженні, г, Me (25 %; 75 %)	1925 (1490; 2200)	1890 (1450; 2250)	3600 (3050; 4100)	$p_{1-2} = 1,00$ $p_{1-к} < 0,001$ $p_{2-к} < 0,001$
ОАШ 1 хв, бал, Me (25 %; 75 %)	6 (4; 7)	6 (5; 7)	6 (5; 7)	$p_{1-2} = 0,818$ $p_{1-к} = 1,00$ $p_{2-к} = 1,00$
ОАШ 5 хв, бал, Me (25 %; 75 %)	6 (5,5; 7)	7 (6; 7)	7 (6; 7)	$p_{1-2} = 0,132$ $p_{1-к} = 0,201$ $p_{2-к} = 1,00$
Вік на момент забору матеріалу, дні, Me (25 %; 75 %)	9,0 (6,5; 13,5)	11,5 (7,0; 16,0)	6,5 (5,5; 7,0)	$p_{1-2} = 1,00$ $p_{1-к} = 0,043$ $p_{2-к} = 0,005$
Початок ентерального годування, дні, Me (25 %; 75 %)	1 (1; 1)	1 (1; 3)	1 (1; 1)	$p_{1-2} = 0,008$ $p_{1-к} = 1,00$ $p_{2-к} = 0,081$
Оперативне розродження (КР), n/(F ± m %)	12/(37,5 ± 8,6)	17/(56,7 ± 9,0)	4/(33,3 ± 13,6)	$p_{1-2} = 0,131^{\dagger}$ $p_{1-к} = 0,798$ $p_{2-к} = 0,172$
РДС, n/(F ± m %)	21/(65,6 ± 8,4)	15/(50,0 ± 9,1)	—	$p_{1-2} = 0,303^{\circ}$ $p_{1-к} < 0,001$ $p_{2-к} = 0,003$
Загальна тривалість респіраторної підтримки, дні, Me (25 %; 75 %)	3 (1; 11)	2 (1; 6)	2 (1; 6)	$p_{1-2} = 1,00$ $p_{1-к} = 0,673$ $p_{2-к} = 1,00$
НЕК, n/(F ± m %)	3/(9,4 ± 5,2)	9/(30,0 ± 8,4)	—	$p_{1-2} = 0,041^{\circ}$ $p_{1-к} = 0,551$ $p_{2-к} = 0,041$
Неонатальна енцефалопатія, n/(F ± m %)	10/(31,3 ± 8,2)	9/(30,0 ± 8,4)	11/(91,7 ± 8,0)	$p_{1-2} = 1,00$ $p_{1-к} < 0,001$ $p_{2-к} < 0,001$
Тривалість перебування в стаціонарі, дні, Me (25 %; 75 %)	19,5 (13; 32)	31,5 (13; 38)	11,0 (9,5; 13,5)	$p_{1-2} = 0,359$ $p_{1-к} = 0,004$ $p_{2-к} < 0,001$

Примітки: † — за критерієм χ^2 Пірсона; $^{\circ}$ — за двостороннім точним критерієм Фішера, в інших випадках — за критерієм Данна; p_{1-2} , $p_{1-к}$, $p_{2-к}$ — рівень статистичної значимості відмінностей показників між відповідними групами: 1-ша, 2-га, контрольна; ОАШ — оцінювання за шкалою Апгар; КР — кесарів розтин; РДС — респіраторний дистрес-синдром; НЕК — некротизуючий ентероколіт.

Новонароджені в усіх групах не мали відмінностей у тривалості необхідної респіраторної підтримки. У дітей 1-ї і 2-ї груп різниці в частоті цієї патології як основної не було ($p > 0,05$). Тривалість перебування в стаціонарі була довшою в групах недоношених дітей ($p < 0,01$), що пов'язано з особливостями розвитку й адаптації пацієнтів цих груп.

Розвиток клініки некротизуючого ентероколіту (НЕК) вірогідно частіше спостерігався в групі недоношених новонароджених на штучному вигодовуванні ($p < 0,05$).

При оцінці рівня *miR-155* у грудному молоці матерів 1-ї групи встановлено, що він перевищував відповідний показник у контрольній групі в 0,5–15,3 раза, у середньому в 6,2 раза ($p < 0,001$). Аналіз експресії *FOXP3* у зскрібку букальної слизової оболонки немовлят показав, що в усіх недоношених дітей відносний рівень експресії *FOXP3* був суттєво нижчим, ніж у доношених ($p < 0,001$) (табл. 2).

Проте в новонароджених, які перебували на штучному вигодовуванні, нормалізована експресія цього фактора була найнижчою ($p < 0,001$): так, у дітей 1-ї підгрупи вона становила 0,21 (0,14; 0,38) ум.од., а в дітей 2-ї підгрупи — 0,08 (0,04; 0,16) ум.од. (рис. 1).

За результатами кореляційного аналізу встановлено прямий помірний зв'язок між рівнями експресії *miR-155* грудного молока матері та гена *FOXP3* у клітинах слизової оболонки недоношених новонароджених, які перебували на ГВ: $r = 0,442$ ($p = 0,014$) (рис. 2).

Нами досліджено взаємозв'язок між експресією *FOXP3*⁺ Treg у зскрібку букальної слизової оболонки і розвитком НЕК у недоношених новонароджених. Встановлено вірогідне зниження експресії *FOXP3* у дітей з виявленим НЕК (0,11 (0,04; 0,25) ум.од.) порівняно з новонародженими без такої патології (0,22 (0,09; 0,91) ум.од.) при $p = 0,038$ за критерієм Манна — Уїтні. Від'ємний коефіцієнт кореляції підтверджує наявність оберненого зв'язку між даними факторами — $r = -0,246$ ($p = 0,037$).

Обговорення

Відомо, що в недоношених дітей відмічається більш високий ризик розвитку НЕК, який характеризується запаленням

кишечника й розвивається в 5–20 % немовлят, які народились передчасно [11, 12]. Патолофізіологічною основою розвитку НЕК у недоношених дітей є *TLR4*-асоційований запальний процес слизової оболонки кишечника [13].

Нами продемонстровано, що вірогідно більша кількість випадків з клінічними ознаками НЕК спостерігалась у групі недоношених, які отримували суміш із народження. Такі результати підтверджують дані світових літературних джерел про нижчий ризик розвитку НЕК у дітей на ГВ [14–18]. У проведеному дослідженні нами виявлена вірогідно вища концентрація імуномодуючої *miR-155* у грудному молоці матерів дітей, які народились передчасно, порівняно з концентрацією в грудному молоці матерів, діти яких народились відповідно до очікуваного строку. Високий рівень *miR-155* у грудному молоці матері поєднувався з посиленою експресією *FOXP3* у букальному епітелії новонароджених недоношених дітей ($p < 0,001$).

Доведено, що *miR-155* має значний імуномодуючий вплив. Зокрема, *miR-155* пригнічує активність *TLR4/Myd88/IRAK1/NF-κB*-асоційованого прозапального сигналу за рахунок інгібування експресії кінази 1, що асоційована з рецептором інтерлейкіну-1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1 — *IRAK1*) у кишечнику новонародженого [13]. Проте, згідно з даними інших дослідників, *miR-155* може сприяти розвитку *TLR*-асоційованого запального процесу кишечника [19]. МікроРНК-155 інгібує експресію ключової адаптерної молекули *TLR/IL-1* сигнального шляху *TAB2* і пригнічує спроможність дендритних клітин моноцитарного походження виробляти *IL-1β* у відповідь на *LPS*-опосередковану активацію [20].

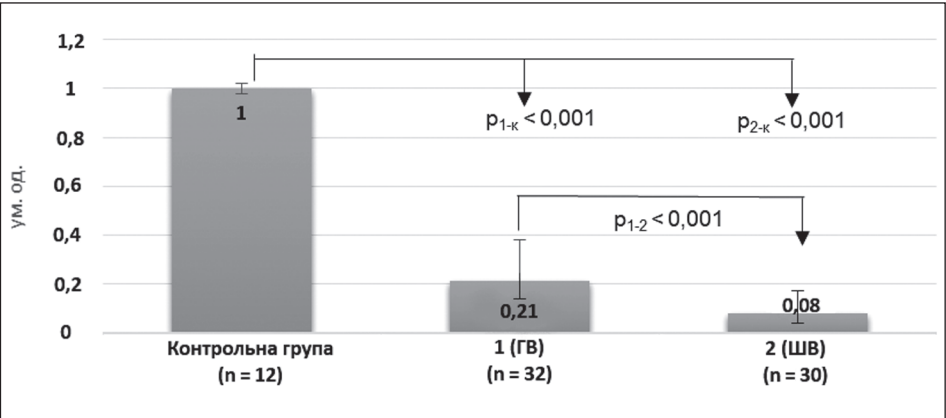


Рисунок 1. Середні рівні нормалізованих показників експресії гена *FOXP3* у клітинах букального епітелію недоношених немовлят

Таблиця 2. Рівні *miR-155* у грудному молоці матері та експресії *FOXP3* у зскрібку букальної слизової оболонки новонароджених

Показник	Групи дослідження			Значимість різниці між групами
	1-ша	2-га	Контрольна	
<i>miR-155</i> , Ме (25 %; 75 %)	6,2 (4,1; 9,2)	–	1,0	$p_{1-к} < 0,001$
<i>FOXP3</i> , Ме (25 %; 75 %)	0,212 (0,14; 0,38)	0,078 (0,04; 0,16)	1,0	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-к} < 0,001$ $p_{2-к} < 0,001$

Літературні джерела свідчать, що miR-155 є однією з miR, які беруть участь у процесі диференціювання наївних Т-лімфоцитів. Численні свідчення підтверджують сприяння miR-155 розвитку Treg-клітин, яким притаманна експресія фактора транскрипції FOXP3 і які визначають рівень імунологічної толерантності [21].

Згідно з результатами експериментальних досліджень, miR-155 необхідна для підтримання гомеостазу Treg-клітин і їхньої конкурентної спроможності. Доведено, що miR-155 пригнічує експресію негативного регулятора передачі цитокінового сигналу (suppressor of cytokine signaling 1 — SOCS1). МікроРНК-155-опосередковане інгібування експресії SOCS1 в акти-

вованих CD4⁺ Т-клітинах сприяє принаймні частковій активації сигнальних шляхів IL-2/STAT5 і IL-6/STAT3 та індукції цитодиференціювання наївних Th-клітин у Treg- і Th₁₇-клітини. Інгібування miR-155 експресії SOCS1 призводить до експресії рецептора IL-2 Treg-клітинами. Отже, miR-155 відіграє ключову роль у підвищенні чутливості Treg-клітин до їхнього основного фактора виживання й росту — IL-2. МікроРНК-155 сприяє посиленню експресії фактора транскрипції FOXP3, що визначає диференціювання Treg-клітин. У свою чергу, Treg-клітини спроможні інгібувати активність ефektorних Т-клітин. Делеція гена *miR-155* призводить до зменшення кількості Treg-клітин у тимусі й периферичних тканинах мишей [22–25].

МікроРНК-155 визнана однією з найбільш висококонцентрованих miR у Treg-клітинах. Фактор транскрипції FOXP3 сприяє експресії miR-155, яка забезпечує ефективне фосфорилювання STAT5 у присутності обмеженої кількості IL-2 і таким чином підвищує рівень пристосування субпопуляції Treg-клітин у конкурентному середовищі [22, 26]. Необхідно підкреслити, що miR-155 не індукує вивільнення IL-10 і TGF-β₁ Treg-клітинами [23].

З іншого боку, miR-155 являє собою прозапальний фактор, який, пригнічуючи експресію SOCS1, підвищує продукцію прозапальних цитокінів і хемокінів, посилюючи активність запального процесу. МікроРНК-155-опосередковане інгібування SOCS1 сприяє активації фактора транскрипції STAT3 і продукції IL-17, IL-22 [27–29].

Аналіз отриманих результатів дає підстави вважати, що miR-155 грудного молока матері перешкоджає розвитку запального процесу в кишечнику недоношених новонароджених дітей за рахунок підтримання Treg-клітин. На нашу думку, інгібування експресії SOCS1

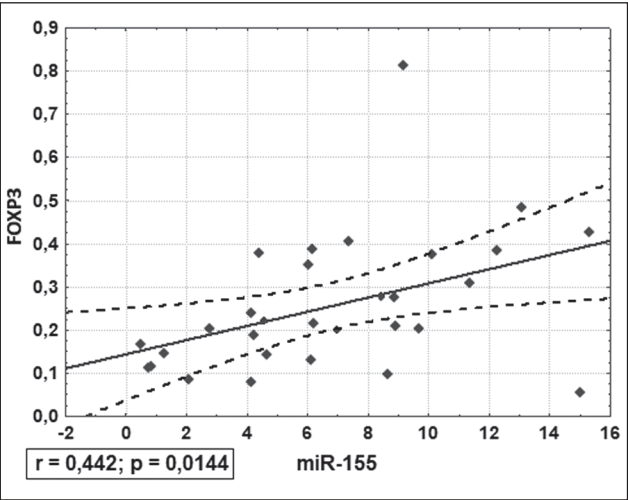


Рисунок 2. Взаємозв'язок між відносними рівнями експресії miR-155 грудного молока матері та гена FOXP3 у клітинах слизової оболонки недоношених новонароджених, які перебували на ГВ

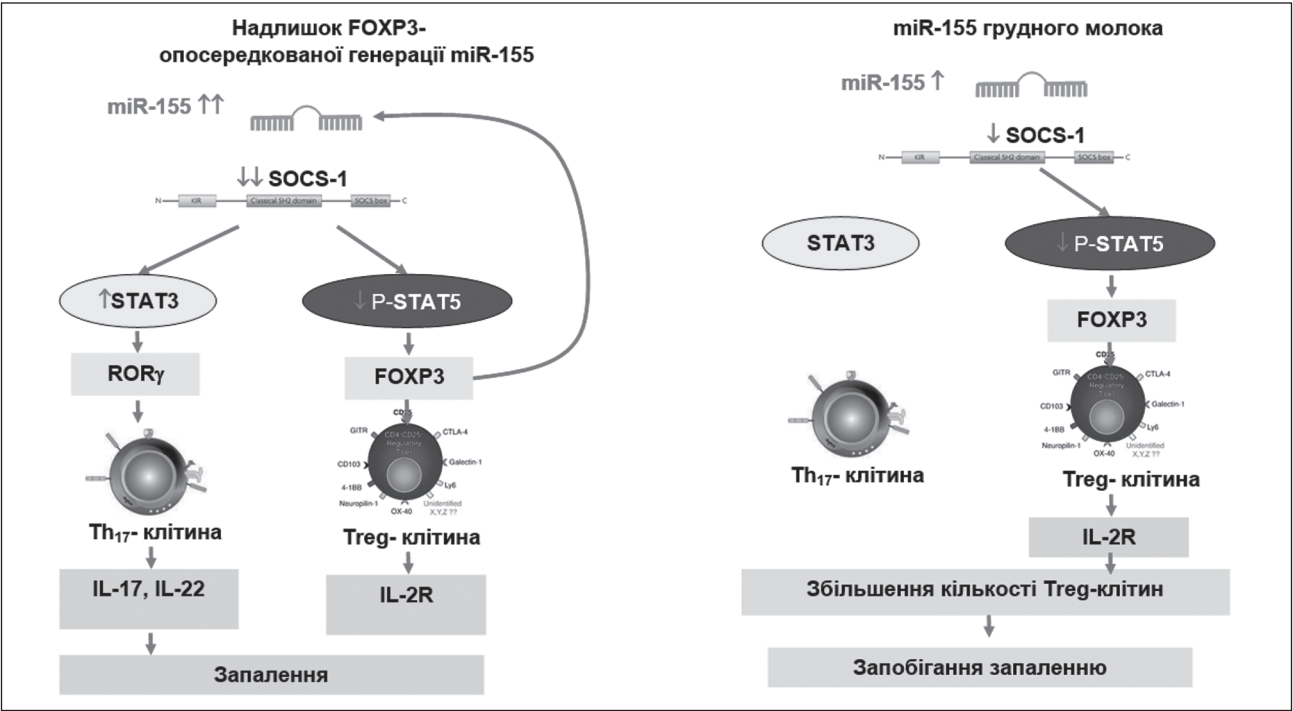


Рисунок 3. Вплив ендогенної та екзогенної miR-155 на розвиток запалення

через вплив miR-155 грудного молока матері індукує експресію IL-2R Treg-клітин. Проте кількість miR-155, що потрапляє в організм дитини з грудним молоком матері, не викликає такого пригнічення експресії SOCS1, яке б могло призвести до активації експресії прозапальних цитокінів і хемокинів, що спостерігається при FOXP3-опосередкованій генерації (рис. 3).

Отже, miR-155 грудного молока матері має протекторні властивості й запобігає розвитку НЕК у недоношених новонароджених.

Висновки

1. У недоношених новонароджених на грудному вигодовуванні рідше спостерігається розвиток клініки НЕК.

2. У грудному молоці матерів недоношених новонароджених концентрація miR-155 вища порівняно з грудним молоком матерів, діти яких народились відповідно до очікуваного терміну гестації.

3. Рівень експресії FOXP3 у слизових оболонках недоношених дітей нижче, ніж у доношених. Проте найнижча експресія FOXP3 спостерігається в недоношених дітей на штучному вигодовуванні.

4. Нижча експресія FOXP3 відмічається в новонароджених з ознаками НЕК.

5. МікроРНК-155 грудного молока матері сприяє експресії фактора транскрипції FOXP3, що, у свою чергу, вірогідно підвищує рівень диференційованих Treg-клітин у слизових оболонках ШКТ, що сприяє посиленню імунної толерогенності й перешкоджає розвитку запальної реакції в кишечнику.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів і власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

References

1. Zemleni J, Sukreet S, Zhou F, Wu D, Mutai E. Milk-Derived Exosomes and Metabolic Regulation. *Annu Rev Anim Biosci.* 2019 Feb 15;7:245-262. doi:10.1146/annurev-animal-020518-115300.
2. Carr LE, Virmani MD, Rosa F, et al. Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Front Immunol.* 2021 Feb 12;12:604080. doi:10.3389/fimmu.2021.604080.
3. Golan-Gerstl R, Elbaum Shiff Y, Moshayoff V, Schechter D, Leshkowitz D, Reif S. Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Mol Nutr Food Res.* 2017 Oct;61(10). doi:10.1002/mnfr.201700009.
4. Toscano M, De Grandi R, Grossi E, Drago L. Role of the Human Breast Milk-Associated Microbiota on the Newborns' Immune System: A Mini Review. *Front Microbiol.* 2017 Oct 25;8:2100. doi:10.3389/fmicb.2017.02100.
5. Rubio M, Bustamante M, Hernandez-Ferrer C, et al. Circulating miRNAs, isomiRs and small RNA clusters in human plasma and breast milk. *PLoS One.* 2018 Mar 5;13(3):e0193527. doi:10.1371/journal.pone.0193527.
6. Ting L, Ahlberg E, Johansson L, et al. Non-Coding RNAs in Human Breast Milk: A Systematic Review. *Front Immunol.* 2021 Sep 1;12:725323. doi:10.3389/fimmu.2021.725323.
7. Lokossou GAG, Kouakanou L, Schumacher A, Zenclussen AC. Human Breast Milk: From Food to Active Immune Response With Disease

Protection in Infants and Mothers. *Front Immunol.* 2022 Apr 5;13:849012. doi:10.3389/fimmu.2022.849012.

8. Rodríguez-Galán A, Fernández-Messina L, Sánchez-Madrid F. Control of Immunoregulatory Molecules by miRNAs in T Cell Activation. *Front Immunol.* 2018 Sep 25;9:2148. doi:10.3389/fimmu.2018.02148.

9. Hatmal MM, Al-Hatamleh MAI, Olaimat AN, et al. Immunomodulatory Properties of Human Breast Milk: MicroRNA Contents and Potential Epigenetic Effects. *Biomedicines.* 2022 May 24;10(6):1219. doi:10.3390/biomedicines10061219.

10. Mahesh G, Biswas R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2019 Jun;39(6):321-330. doi:10.1089/jir.2018.0155.

11. Cuna A, George L, Sampath V. Genetic predisposition to necrotizing enterocolitis in premature infants: Current knowledge, challenges, and future directions. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018 Dec;23(6):387-393. doi:10.1016/j.siny.2018.08.006.

12. Alsaied A, Islam N, Thalib L. Global incidence of Necrotizing Enterocolitis: a systematic review and Meta-analysis. *BMC Pediatr.* 2020 Jul 13;20(1):344. doi:10.1186/s12887-020-02231-5.

13. Yu W, Haque I, Venkatraman A, et al. SIGIRR Mutation in Human Necrotizing Enterocolitis (NEC) Disrupts STAT3-Dependent microRNA Expression in Neonatal Gut. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2022;13(2):425-440. doi:10.1016/j.jcmgh.2021.09.009.

14. Patel AL, Kim JH. Human milk and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2018 Feb;27(1):34-38. doi:10.1053/j.semped-surg.2017.11.007.

15. Thai JD, Gregory KE. Bioactive Factors in Human Breast Milk Attenuate Intestinal Inflammation during Early Life. *Nutrients.* 2020 Feb 23;12(2):581. doi:10.3390/nu12020581.

16. Carrillo-Lozano E, Sebastián-Valles F, Knott-Torcal C. Circulating microRNAs in Breast Milk and Their Potential Impact on the Infant. *Nutrients.* 2020 Oct 8;12(10):3066. doi:10.3390/nu12103066.

17. Melnik BC, Stremmel W, Weiskirchen R, John SM, Schmitz G. Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules.* 2021 Jun 7;11(6):851. doi:10.3390/biom11060851.

18. Guo MM, Zhang K, Zhang JH. Human Breast Milk-Derived Exosomal miR-148a-3p Protects Against Necrotizing Enterocolitis by Regulating p53 and Sirtuin 1. *Inflammation.* 2022 Jun;45(3):1254-1268. doi:10.1007/s10753-021-01618-5.

19. Guo J, Liao M, Wang J. TLR4 signaling in the development of colitis-associated cancer and its possible interplay with microRNA-155. *Cell Commun Signal.* 2021 Sep 3;19(1):90. doi:10.1186/s12964-021-00771-6.

20. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 24;106(8):2735-2740. doi:10.1073/pnas.0811073106.

21. Alivernini S, Gremese E, McSharry C, et al. MicroRNA-155-at the Critical Interface of Innate and Adaptive Immunity in Arthritis. *Front Immunol.* 2018 Jan 5;8:1932. doi:10.3389/fimmu.2017.01932.

22. Lu LF, Thai TH, Calado DP, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity.* 2009 Jan 16;30(1):80-91. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.010.

23. Yao R, Ma YL, Liang W, et al. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PLoS One.* 2012;7(10):e46082. doi:10.1371/journal.pone.0046082.

24. Kunze-Schumacher H, Krueger A. The Role of MicroRNAs in Development and Function of Regulatory T Cells - Lessons for a Better Un-

derstanding of MicroRNA Biology. *Front Immunol.* 2020 Sep 9;11:2185. doi:10.3389/fimmu.2020.02185.

25. Weinberg SE, Singer BD. Toward a Paradigm to Distinguish Distinct Functions of FOXP3+ Regulatory T Cells. *Immunohorizons.* 2021 Dec 10;5(12):944-952. doi:10.4049/immunohorizons.2100046.

26. Naqvi RA, Datta M, Khan SH, Naqvi AR. Regulatory roles of MicroRNA in shaping T cell function, differentiation and polarization. *Semin Cell Dev Biol.* 2022 Apr;124:34-47. doi:10.1016/j.semcdb.2021.08.003.

27. Xu M, Zuo D, Liu X, et al. MiR-155 contributes to Th17 cells differentiation in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mice via Jarid2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jun 17;488(1):6-14. doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.143.

28. Motaie J, Yaghmaie M, Ahmadvand M, Pashaiefar H, Kerachian MA. MicroRNAs as Potential Diagnostic, Prognostic, and Predictive Biomarkers for Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Dec;25(12):e375-e386. doi:10.1016/j.bbmt.2019.08.004.

29. Zhang Y, Xie Y, Zhang L, Zhao H. MicroRNA-155 Participates in Smoke-Inhalation-Induced Acute Lung Injury through Inhibition of SOCS-1. *Molecules.* 2020 Feb 25;25(5):1022. doi:10.3390/molecules25051022.

Отримано/Received 07.10.2022

Рецензовано/Revised 19.10.2022

Прийнято до друку/Accepted 28.10.2022 ■

Information about authors

Aleksandr Abaturov, MD, PhD, Professor, Head of the Department of pediatrics 1 and medical genetics, Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-6291-5386>
Anna Tovarnytska, assistant the Department of Obstetrics, Gynecology and Pediatrics, Limited Liability Company, "Dnipro Medical Institute of Traditional and Non-traditional Medicine", Dnipro, Ukraine; <http://orcid.org/0000-0002-3486-3475>

Conflicts of interests. Authors declare the absence of any conflicts of interests and their own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of their manuscript.

O.E. Abaturov¹, A.O. Tovarnytska²

¹Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine

²Dnipro Medical Institute of Traditional and Non-Traditional Medicine, Dnipro, Ukraine

Impact of breast milk miR-155 on the health of preterm neonates

Abstract. Background. Breast milk (BM) is an important source of microRNAs (miRs). MicroRNAs are highly resistant to gastrointestinal enzymes and are well absorbed in the intestine. MiR-155 is one of the most expressed miR of BM. Currently, the effect of miR-155 of BM on the health of preterm neonates has not been almost studied. The objective was to determine the effect of miR-155 of BM on the health of preterm neonates. **Materials and methods.** We examined 74 newborns, who were treated in neonatal departments. We determined the level of miR-155 in the BM of 44 mothers of exclusively breastfed children. In parallel, we evaluated gene expression of the transcription factor FOXP3 in buccal smears of all neonates. Three comparison groups were selected: group 1 consisted of 32 newborns of up to 37 weeks of gestation; group 2 — of 30 preterm newborns on artificial feeding; control group — of 12 full-term breastfed newborns. **Results.** The gestational age median in group 1 was 33 (31; 34) weeks; in group 2 — 32.5 (32; 35) weeks; it was higher in the control group ($p < 0.001$) — 40 (39; 41) weeks. Neonatal encephalopathy as the main diagnosis occurred more often among full-term newborns ($p < 0.001$). Children of groups 1 and 2 did not differ significantly in the frequency of respiratory distress syndrome and the duration of the necessary respiratory support ($p > 0.05$). In group 2 compared to group 1, manifestations of necrotizing enterocolitis were detected significantly more often ($p < 0.05$): 30.0 ± 8.4 %

vs 9.4 ± 5.2 %. The results of evaluating the miR-155 expression level in the BM of mothers of group 1 children prove that the corresponding indicator in the control group was exceeded by an average of 6.2 (4.1; 9.2) times ($p < 0.001$). Analysis of FOXP3 levels in buccal smears showed that all preterm newborns had significantly lower FOXP3 levels than that of full-term neonates (< 0.001). However, the expression of this factor was the lowest in group 2 (< 0.001): 0.08 (0.04; 0.16) c.u. in group 2 vs 0.21 (0.14; 0.38) c.u. in group 1. We found a direct moderate correlation between the expression levels of miR-155 of the BM and the FOXP3 in the mucosal cells of breastfed preterm neonates: $r = 0.442$ ($p = 0.014$). A significant decrease was noted in the expression of FOXP3 in children with necrotizing enterocolitis (0.11 (0.04; 0.25) c.u.) compared to newborns without such pathology (0.22 (0.09; 0.91) c.u.) ($p < 0.05$). **Conclusions.** The results of the study confirm a lower number of necrotizing enterocolitis cases among preterm breastfed babies. BM of mothers, whose children were born prematurely, has a higher level of miR-155 expression, which promotes FOXP3 expression of mucous membranes. Thus, it is likely that miR-155 of BM stimulates maturation and maintains the level of T-reg cells of the mucous membranes that prevents the development of necrotizing enterocolitis in premature infants.

Keywords: miR-155; FOXP3; preterm neonates; necrotizing enterocolitis