

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ТОВАРНИЦЬКА АННА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 616-053.32-036.3:613.953.11/.13(043.3).

**ВИГОДОВУВАННЯ ГРУДНИМ МОЛОКОМ ТА РИЗИК ВИНИКНЕННЯ  
ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ У ПЕРЕДЧАСНО НАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії

галузь знань – 22 «Охорона здоров'я»,

спеціальність – 228 «Педіатрія»

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Підпис здобувача: \_\_\_\_\_ (Анна ТОВАРНИЦЬКА)

Науковий керівник: Абатуров Олександр Євгенович, доктор медичних наук,  
професор, Заслужений діяч науки і техніки України

Дніпро - 2023

## АНОТАЦІЯ

*Товарницька А.О.* Вигодовування грудним молоком та ризик виникнення патологічних станів у передчасно народжених дітей.- Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії, галузь знань 22 «Охорона здоров'я», спеціальність 228 «Педіатрія», Дніпровський державний медичний університет, м. Дніпро, 2023.

Дисертація є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри педіатрії 1 та медичної генетики Дніпровського державного медичного університету: «Генотип-асоційована персоналізація діагностичного та лікувального процесу у дітей з хворобами респіраторної, ендокринної та травної систем», № держреєстрації 0118U006629, термін виконання 12.2020 - 12.2023 р.

Дисертація присвячена вивченню впливу мікроРНК грудного молока на стан здоров'я і розвиток ускладнень при виходжуванні передчасно народжених дітей.

Проблема передчасного народження залишається актуальною по всьому світу. Сталий відсоток пологів, що відбуваються раніше визначеного терміну, та розвиток короткочасних і довготривалих наслідків недоношеності, що виступають однією з найчастіших причин смертності дітей до 5 років і є основою розвитку хронічної патології в старшому віці, визначають необхідність в розробці нових напрямків прогнозування та діагностики цих патологічних станів. Огляд новітніх інформаційних баз виявив активний науковий інтерес відносно можливого впливу стабільних мікроРНК грудного молока на розвиток запалення та імунну відповідь новонароджених немовлят. Особливої актуальності також набуває визначення факторів ризику розвитку патологічних станів, що супроводжують передчасне народження, для вчасної персоніфікованої корекції лікувально-профілактичних заходів.

Тому *метою* нашого дослідження було встановити значущість клініко-біологічних факторів експозома, miR-148a та miR-155 грудного молока матері,

факторів транскрипції T-bet та FOXP3 дитини в прогнозуванні індивідуальної ймовірності розвитку патологічних станів у недоношених новонароджених.

Досягнення поставленої мети відбувалося шляхом послідовного виконання наступних *завдань*: вивчення частоти патологічних станів, асоційованих з недоношеністю, на основі ретроспективного аналізу особливостей періоду новонародженості в передчасно народжених дітей; вивчення факторів ризику розвитку патологічних станів, асоційованих з недоношеністю; дослідження рівня концентрації мікроРНК-148а та мікроРНК-155 у грудному молоці матерів недоношених дітей; встановлення залежності перебігу патологічних станів у недоношених новонароджених від рівня концентрації мікроРНК-148а та мікроРНК - 155 грудного молока їх матерів; вивчення впливу грудного молока матері на рівень експресії факторів транскрипції T-bet та FOXP3 недоношених дітей; розробка прогностичної моделі ризику розвитку патологічних станів у недоношених новонароджених.

Для досягнення поставленої мети було виконано ретроспективний аналіз 300 історій хвороби та проведено проспективне клінічне дослідження 62 пацієнтів (32 дитини на грудному вигодовуванні та 30 дітей на штучному вигодовуванні), що народились до 37 тижнів гестації та потребували стаціонарного лікування в неонатальних відділеннях.

Критеріями включення були: виключно грудне або виключно штучне вигодовування, перебування на стаціонарному лікуванні в неонатальному відділенні, вік на момент обстеження до 28 дня.

Критерії виключення були: клінічно важкий та нестабільний стан новонароджених; змішане харчування або зміна харчування в анамнезі; вік немовляти старше 28 дня; наявність запальних захворювань матері, що потребували медикаментозного втручання; наявність ознак запалення слизової оболонки ротової порожнини, носо- і ротоглотки немовлят.

Верифікація діагнозу проводилась згідно з міжнародними рекомендаціями та чинними постановами МОЗ України. Було визначено рівень експресії факторів транскрипції запалення FOXP3, T-bet в клітинах зішкребу букальної слизової

оболонки всіх обстежених немовлят, концентрацію miR-155 та miR-148a материнського грудного молока новонароджених на грудному вигодовуванні. Визначення рівня експресії факторів транскрипції та концентрації мікроРНК проводилось методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Розрахунок рівню експресії факторів транскрипції та мікроРНК здійснювався відносно рівня експресії цих показників у групі контролю (12 доношених новонароджених у відносно задовільному стані), де їх значення приймалось за усереднену умовну одиницю – 1,0 ум. од. Рівень експресії мікроРНК в сумішах не визначали в зв'язку з потенційним дефіцитом цих молекул.

За даними ретроспективного аналізу, найчастіше недоношеність супроводжували: респіраторний дистрес-синдром (РДС) (57,7 %), харчова інтолерантність (ХІ)/некротизуючий ентероколіт (НЕК) (13,3 %), ретинопатія (23,3 %), анемія (30,7 %), відкрита артеріальна протока (ВАП) (14,7 %), внутрішньошлуночковий крововилив (ВШК) (22,7 %), бронхолегенева дисплазія (БЛД) (9,7 %). Частота РДС, НЕК, анемії, ВАП, БЛД суттєво переважала в групі дітей на штучному вигодовуванні ( $p < 0,05$ ).

Результати дослідження показали, що найсильніше розвитку РДС, ретинопатії, БЛД сприяє гестаційний термін до 32 тижнів, низька маса тіла при народженні, низька оцінка за шкалою Апгар ( $p < 0,05$ ). Тривалість неінвазивної вентиляції легень понад 18 днів виступає значущим фактором ризику ретинопатії та БЛД ( $p < 0,001$ ). Формування хронічної легеневої патології пов'язане з персистенцією ВАП ( $p < 0,001$ ). В свою чергу, функціонування ВАП в 2 рази підвищує ймовірність розвитку порушень харчової толерантності та НЕК в немовлят ( $p < 0,05$ ).

За нашими даними, штучне вигодовування виступає значущим фактором ризику ХІ/НЕК ( $OR = 1,43$ ,  $p = 0,002$ ), БЛД ( $OR = 1,46$ ,  $p = 0,004$ ), персистенції ВАП ( $OR = 1,29$ ,  $p = 0,034$ ), в той час коли годування грудним молоком достовірно перешкоджає розвитку цих патологічних станів ( $OR < 0,55$  при  $p < 0,05$ ). Хоча діти, що отримували адаптовану молочну суміш, мали швидший щоденний темп набору маси тіла (14,5 (5,0; 22,0) г на грудному вигодовуванні проти 21,4 (16,7; 27,6) г на штучному вигодовуванні при  $p < 0,001$ ), тривалість часткового парентерального харчування та

інфузійної підтримки в таких немовлят була довша (6,0 (3,0; 13,0) днів на грудному вигодовуванні проти 10,0 (6,0; 17,0) днів на штучному вигодовуванні при  $p=0,001$ ).

FOXP3 – фактор транскрипції, що опосередковано пригнічує вивільнення прозапальних цитокінів, знижує рівень ефекторних клітин та активує Treg–лімфоцити в кишечнику, сприяє підтриманню імунологічної толерантності. За нашими даними, недоношені діти порівняно з доношеними мають нижчий рівень експресії FOXP3 (0,14 (0,06; 0,31) ум. од.,  $p<0,001$ ). При цьому найнижча концентрація FOXP3 спостерігалась в передчасно народжених немовлят на штучному вигодовуванні – 0,08 (0,04; 0,16) ум. од. проти 0,21 (0,14; 0,38) ум. од. у недоношених дітей на грудному вигодовуванні ( $p<0,05$ ). Результати нашого дослідження вказують на наявність зворотного зв'язку рівня експресії FOXP3 з розвитком ХІ/НЕК:  $r = -0,246$ ;  $p=0,037$ .

T-bet – фактор транскрипції, який сприяє вивільненню прозапальних цитокінів, стимулює дозрівання ефекторних клітин. Підвищення його рівня асоціюється з раннім ураженням кишечника. В проведеному дослідженні середня концентрація T-bet у недоношених дітей вдвічі перевищувала показник контрольної групи (2,02 (1,40; 3,74) ум. од.,  $p<0,001$ ) з найвищим рівнем у дітей, що отримували суміш – 2,4 (1,98; 3,84) ум. од. на штучному вигодовуванні проти 1,48 (1,13; 2,22) ум. од. в групі недоношених дітей на грудному вигодовуванні ( $p<0,05$ ). Нами був доведений прямий кореляційний зв'язок рівня експресії T-bet з наявними клінічними ознаками ХІ/НЕК:  $r = 0,271$ ;  $p=0,021$ .

Аналіз рівня експресії miR-155 у материнському грудному молоці виявив шестикратне підвищення концентрації цієї мікроРНК у грудному молоці матерів, що народили передчасно, порівняно з групою контролю (6,18 (4,13; 9,16) ум. од.,  $p<0,001$ ). Рівень експресії miR-155 в грудному молоці матерів підвищувався зі зниженням гестаційного віку дитини:  $r = -0,421$ ,  $p=0,020$ . Вища концентрація miR-155 асоціювалась з підвищенням рівня експресії FOXP3 в немовлят:  $r = 0,442$ ,  $p=0,014$ .

Рівень експресії miR-148a був нижчий в материнському грудному молоці дітей, що народились передчасно, і в середньому становив 0,089 (0,048; 0,142) ум. од. ( $p<0,001$ ). Встановлено зниження рівня експресії T-bet в дитини при посиленні експресії miR-148a в материнському грудному молоці:  $r = -0,371$ ;  $p=0,043$ .

У даному дослідженні вперше вивчалась концентрація miR-155 та miR-148a в материнському молоці недоношених новонароджених з проблемами адаптації та її вплив на перебіг патологічних станів, що супроводжують недоношеність. Уперше встановлено особливості експресії факторів транскрипції FOXP3 та T-bet в недоношених новонароджених, зміни її рівня при розвитку ХІ/НЕК та під впливом мікроРНК грудного молока. Вперше доведено діагностичну цінність визначення рівню експресії факторів транскрипції FOXP3 та T-bet для ранньої діагностики ХІ/НЕК у передчасно народжених немовлят.

На підставі багатофакторного аналізу виявлених клініко-анамнестичних предикторів розвитку небажаних наслідків недоношеності побудовані зручні моделі прогнозування та діагностики РДС, ретинопатії, БЛД та ХІ/НЕК. В основі моделі ХІ/НЕК запропоновано також неінвазивне визначення рівню експресії факторів FOXP3 та T-bet. Високі показники валідності моделей та простота використання дозволяють рекомендувати їх для рутинного застосування в практиці неонатологів та педіатрів.

Результати даної наукової роботи підтверджують позитивний протекторний вплив материнського грудного молока на адаптацію новонародженої дитини, мінливість та відповідність його складу нагальним індивідуальним потребам немовляти, наявність продовженого зв'язку матері з новонародженою дитиною. Вивчення варіацій експресії мікроРНК грудного молока відкриває нові перспективи природної модуляції запалення в новонароджених на грудному вигодовуванні.

**Ключові слова:** *передчасно народжені діти, недоношені діти, новонароджені, грудне вигодовування, грудне молоко, мікроРНК, miR-155, miR-148a, фактори транскрипції, FOXP3, T-bet, харчова інтолерантність, некротизуючий ентероколіт, НЕК, респіраторний дистрес-синдром, РДС, ретинопатія, бронхолегенева дисплазія, БЛД, рання діагностика, прогнозування.*

## ANNOTATION

*Tovarnytska A.O.* Breast milk feeding and risk of pathological states in preterm children.- – The dissertation for the Doctor of Philosophy degree in the specialty 228 "Pediatrics"). – Dnipro State Medical University, Dnipro, 2023.

The dissertation work was performed at the Department Pediatrics 1 and Medical Genetics of the Dnipro State Medical University (DSMU). The dissertation is a fragment of the research work of the at the Department Pediatrics 1 and Medical Genetics of the Dnipro State Medical University "Genotype-associated personalization of the diagnostic and treatment process in children with diseases of the respiratory, endocrine, and digestive systems ", state registration number 0118U006629, completion date 12.2020 - 12.2023.

The dissertation is devoted to the study of the influence of microRNA in breast milk on the state of health and the development of complications during the upbringing of prematurely born children.

The problem of premature birth remains relevant throughout the world. The percentage of births occurring before the specified term remains constant. The development of short-term and long-term outcomes of prematurity is one of the most frequent causes of mortality in children under 5 years old. It is the basis of developing chronic pathology at an older age. Therefore, there is a need for new directions for the prognosis and diagnosis of these pathological conditions. The updated information sources review revealed an active scientific interest regarding the possible impact of stable breast milk microRNAs on the development of inflammation and the immune response of newborn infants. Identifying risk factors for the development of complications of prematurity for the timely personalized correction of treatment and preventive measures also becomes especially topical.

Thus, the aim of our study was to establish the significance of the clinical and biological factors of the exposome, miR-148a and miR-155 of the mother's breast milk, the transcription factors T-bet and FOXP3 of the child in predicting the individual probability of developing pathological conditions in premature newborns.

To achieve the set goal we consistently performed the following tasks: studying the frequency of pathological conditions associated with prematurity, based on a retrospective

analysis of the neonatal period peculiarities in prematurely born children; studying the risk factors for the pathological conditions development associated with prematurity; determining the miRNA-148a and miRNA-155 concentration level in the breast milk of mothers of premature babies; establishing the dependence of the course of pathological conditions in premature newborns on the miRNA-148a and miRNA-155 concentration level in the breast milk of their mothers; studying of the maternal breast milk impact on the expression level of transcription factors T-bet and FOXP3 in premature babies; elaboration of a predictive model of the risk of pathological conditions development in premature newborns.

In the course of the research, a retrospective analysis of 300 case histories was performed, and a prospective clinical study of 62 patients (32 breastfed and 30 formula-fed) patients born before 37 weeks of gestation and requiring inpatient treatment in neonatal departments was conducted.

Inclusion criteria were exclusively breastfeeding or exclusively artificial feeding, stay in hospital treatment in the neonatal department, age at the time of examination up to 28 days.

Exclusion criteria were clinically severe and unstable condition of newborns; mixed diet or change in diet in the anamnesis; the age of the baby is older than 28 days; the presence of inflammatory diseases of the mother that required medical intervention; the presence of signs of inflammation of the mucous membrane of the oral cavity, nasopharynx and oropharynx of infants.

Verification of the diagnosis was carried out in accordance with the international recommendations and current regulations of the Ministry of Health of Ukraine. The level of expression of the inflammatory transcription factors FOXP3, T-bet in the scraped cells of the buccal mucosa of all examined infants, the concentration of miR-155 and miR-148a in the breast milk of breastfed newborns was determined. We detected the expression level of the transcription factors and the microRNAs concentration by the polymerase chain reaction method in real-time. We calculated the expression level of the transcription factors and microRNAs relative to the expression level of these indicators in the control group (12 full-term newborns in a relatively satisfactory condition), where their value was taken as an



averaged conditional unit - 1.0 con. un. We did not determine microRNA expression level in the formula due to the potential deficiency of these molecules.

Retrospective data show that prematurity was most often accompanied by: respiratory distress syndrome (RDS) (57,7 %), food intolerance (FI)/necrotizing enterocolitis (NEC) (13,3 %), retinopathy (23,3 %), anemia (30,7 %), patent ductus arteriosus (PDA) (14,7 %), intraventricular hemorrhage (IVH) (22,7 %), bronchopulmonary dysplasia (BLD) (9,7 %). The frequency of RDS, FI/NEC, anemia, PDA, and BPD significantly prevailed in the group of formula-fed children ( $p < 0,05$ ).

The results of the study showed that gestational age up to 32 weeks, low birth weight, and low Apgar score ( $p < 0,05$ ) contribute most to the development of RDS, retinopathy, and BPD. The duration of non-invasive lung ventilation for more than 18 days is a significant risk factor for retinopathy and BPD ( $p < 0,001$ ). The formation of chronic lung pathology is associated with the persistence of VAP ( $p < 0,001$ ). In turn, the functioning of the VAP increases the probability of developing food tolerance disorders and NEC in infants by two times ( $p < 0,05$ ).

According to our data, artificial feeding is a significant risk factor for FI/NEC (RR = 1.43,  $p = 0,002$ ), BPD (RR = 1,46,  $p = 0,004$ ), and PDA persistence (RR = 1,29,  $p = 0,034$ ), while feeding breast milk reliably prevents the development of these pathological conditions (RR < 0,55 at  $p < 0,05$ ). Although formula-fed infants had a faster daily rate of body weight gain (14,5 (5,0; 22,0) g breastfed versus 21.4 (16,7; 27,6) g formula-fed at  $p < 0,001$ ), the duration of partial parenteral nutrition and infusion support in such infants was longer: (6,0 (3,0; 13,0) days on breastfeeding versus 10,0 (6,0; 17,0) days on artificial feeding at  $p = 0,001$ ).

FOXP3 is a transcription factor that indirectly suppresses the release of pro-inflammatory cytokines, reduces the level of effector cells, and activates Treg lymphocytes in the intestine, helping to maintain immunological tolerance. According to our research data, compared to full-term children, premature children have a lower FOXP3 expression level (0,14 (0,06; 0,31) con. un.,  $p < 0,001$ ). We observed the lowest FOXP3 concentration in premature infants on artificial feeding – 0,08 (0,04; 0,16) con. un. in the group on artificial feeding versus 0,21 (0,14; 0,38) con. un. in premature babies on breastfeeding ( $p < 0,05$ ). The

results of our study indicate the presence of an inverse correlation between the FOXP3 expression level and FI/NEC development:  $r = -0,246$ ;  $p=0,037$ .

T-bet is a transcription factor that promotes the release of pro-inflammatory cytokines and stimulates the maturation of effector cells. An increase in its level is associated with early intestinal damage. In the performed study, the average concentration of T-bet in premature children was twice as high as in the control group (2,02 (1,40; 3,74) con. un.,  $p<0,001$ ), and the highest level T-bet was observed in children who received the mixture – 2.4 (1,98; 3,84) con. un. in premature babies on artificial feeding against 1,48 (1,13; 2,22) con. un. in the group of premature babies on breast-feeding ( $p<0,05$ ). We proved a direct correlation between the level of T-bet expression and the existing clinical signs of FI/NEC:  $r = 0,271$ ;  $p=0,021$ .

The miR-155 expression level analysis in maternal breast milk revealed a six fold increase in the concentration of this microRNA in the maternal breast milk of premature infants compared to that in control group (6,18 (4,13; 9,16) con. un.,  $p<0,001$ ). The miR-155 expression level in maternal breast milk increased with neonatal gestational age decreasing:  $r = - 0,421$ ,  $p=0,020$ . Higher miR-155 concentration was associated with the increase of FOXP3 level expression in infants:  $r = 0,442$ ,  $p=0,014$ .

The miR-148a expression level was lower in the maternal breast milk of children born prematurely and the average one was 0.089 (0,048; 0,142) con. un. ( $p<0,001$ ). We determined a decrease in the T-bet expression level in a child with an increase of the miR-148a expression in maternal breast milk:  $r = -0,371$ ;  $p=0,043$ .

In this study, for the first time, we explored the miR-155 and miR-148a concentration in the maternal breast milk of premature newborns with adaptation problems and its influence on the course of pathological conditions accompanying prematurity. Newly, the peculiarities of the FOXP3 and T-bet transcription factors expression in premature newborns, and changes in its level during the development of FI/NEC and under the influence of breast milk microRNAs were established. Originally, the diagnostic value of FOXP3 and T-bet transcription factors expression level determination for the early FI/NEC diagnosis in premature infants was proven.

Based on the multifactorial analysis of the identified clinical and anamnestic predictors of the development of undesirable consequences of prematurity, convenient models for the prediction and diagnosis of RDS, retinopathy, BPD, and FI/NEC were elaborated. A non-invasive determination of the expression level of FOXP3 and T-bet factors is also proposed as the basis of the FI/NEC model. High validity indicators of the models and ease of use allow for recommending them for the routine use in the practice of neonatologists and pediatricians.

This scientific work results confirm the positive protective impact of maternal breast milk on the adaptation of a neonate, the variability and correspondence of its composition to the urgent individual needs of the infant, and the presence of a prolonged connection between the mother and the newborn child. The study of microRNA breast milk expression variations opens up new perspectives for the natural modulation of inflammation in breastfed newborns.

**Key words:** *premature, preterm infants, neonates, newborns, breastfeeding, breast milk, miR, microRNA, miR-155, miR-148a, transcription factors, FOXP3, T-bet, feeding intolerance, necrotizing enterocolitis, NEC, respiratory distress syndrome, RDS, retinopathy, bronchopulmonary dysplasia, BPD, early diagnosis, prediction.*

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Наукові роботи, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації*

1. Abaturov OE, Tovarnytska AO. Anti-inflammatory effect of breast milk miR-148a on the state of mucous membranes in premature newborns. Child's Health (Ukraine), 2023, 18 (1). С. 59-66. ISSN 2224-0551 (print), 2307-1168 (online). <https://doi.org/10.22141/2224-0551.18.1.2023.1556>. *(Дисертантом особисто проведено набір матеріалу для досліджень; проведено статистичну обробку та написання роботи, аналіз даних проводився спільно зі співавтором.)*
2. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Вплив miR-155 грудного молока на стан здоров'я недоношених новонароджених. Child's Health (Ukraine), 2022,17(7), 347–353. ISSN 2224-0551 (print), ISSN 2307-1168 (online). <https://doi.org/10.22141/2224-0551.17.7.2022.1539>. *(Дисертантом самостійно проведено набір пацієнтів для виконання дослідження, проведено клінічне обстеження, забір матеріалу для лабораторних аналізів, статистично опрацьовано результати, підготовлено матеріал для публікацій, аналіз і інтерпретацію даних проводили разом із співавтором.)*
3. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Фактор транскрипції T-bet — діагностичний маркер розвитку некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених. Сучасна педіатрія (Україна). 2022, 8 (128). С. 6-11. ISSN 2663-7553 (print); 2706-6134 (online). doi 10.15574/SP.2022.128.6. *(Дисертантом особисто здійснено теоретичне обґрунтування дизайну дослідження, проведено клінічне обстеження хворих, набрано матеріал для лабораторної діагностики, статистично опрацьовано результати, обґрунтовано висновки роботи, здійснено підбір літератури і її узагальнення.)*
4. Товарницька А.О. Вплив грудного вигодовування на закриття відкритої артеріальної протоки в недоношених новонароджених. Здоров'я дитини (Україна). 2022, 17(4), 184–191. SSN 2224-0551 (print), ISSN 2307-1168 (online). doi: 10.22141/2224-0551.17.4.2022.1515. *(Дисертантом особисто здійснено теоретичне обґрунтування дизайну дослідження, проведено набір матеріалу, статистично*

опрацьовано результати, обґрунтовано висновки роботи, здійснено підбір літератури і її узагальнення)

*Наукові праці, які засвідчують апробацію дисертації.*

1. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Прогностична значимість впливу мікроРНК грудного молока на імунну відповідь новонародженого із затримкою внутрішньоутробного розвитку. Сучасна педіатрія (Україна). 2021, 1 (113). С. 53-61. ISSN 2663-7553 (print); 2706-6134 (online). Doi 10.15574/SP.2021.113.53. *(Дисертантом самостійно проведено відбір та аналіз сучасних джерел літератури за темою. Аналіз результатів, формування висновків та написання статті виконано спільно зі співавтором)*

2. Tovarnytska A., Samokhina I., Bogomolna L. Anti-inflammatory impact of miR-148a of breast milk on neonatal immune response. Modern Rends of Scientific development, Vancouver, Canada, Jan 2022. ISBN: 978-1-68564-505-2. doi: 10.46299/ISG.2022.I.II/

3. Tovarnytska A. MiR-155 in maternal breast milk is a natural modulator of inflammatory response for preterm neonates. XXI International Scientific and Practical Conference “Information, modern and recent theories of development”, Madrid, Spain, 29-31 May, 2023. <https://eu-conf.com/events/informational-modern-and-recent-theories-of-development/>.

4. Абатуров О.Є. Товарницька А.О. Усна доповідь, тези. Епігенетичний вплив грудного молока на імунну толерантність в передчасно народжених дітей. Науково-практична конференція з міжнародною участю: «ХІ наукова сесія інституту гастроентерології НАМН України. Новітні технології в теоретичній та клінічній гастроентерології» м. Дніпро, 14-15 червня 2023.

5. Товарницька А.О. Постерна доповідь «Вплив мікроРНК молока матері на рівень експресії прозапальних факторів транскрипції дитини». ХХІІІ Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання педіатрії» (Сидельниковські читання), м.Київ, 15-17 вересня 2021 р..

6. Товарницька А.О. Усна доповідь «Вплив мікроРНК-155 грудного молока на імунну відповідь новонародженої дитини». Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена пам'яті академіка Б.Я. Резника «Новітні технології в педіатричній науці, практиці та освіті», м. Одеса, 28-29 жовтня 2021 р..

7. Товарницька А.О. Постерна доповідь «Вплив мікроРНК-148а грудного молока на імунну відповідь новонароджених дітей». Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Педіатричні здобутки сьогодення», м. Харків, 13-14 січня 2022 р.

8. Товарницька А.О. Постерна доповідь «Т-bet – індикатор розвитку НЕК в новонароджених дітей». Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена пам'яті академіка Б.Я. Резника «Сучасні новітні технології в педіатричній науці, практиці, сімейній медицині та освіті», м. Одеса 24-25 листопада 2022р..

9. Tovarnytska A. Oral presentation “Connection of neonatal RDS and miR-148a expression level in maternal breast milk”. 2d International conference on Pediatrics and Neonatology, Rome, 13-14 February 2023.

	<b>ЗМІСТ</b>	<b>С.</b>
	<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ</b>	<b>19</b>
	<b>ВСТУП</b>	<b>21</b>
<b>РОЗДІЛ 1</b>	<b>ПАТОЛОГІЧНІ СТАНИ, ПОВ'ЯЗАНІ З НЕДОНОШЕНІСТЮ. ВПЛИВ ГРУДНОГО МОЛОКА НА ПЕРЕБІГ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ</b>	
	1.1. Поширеність та наслідки недоношеності. Фактори ризику розвитку ускладнень	29
	1.2. Особливості імунної відповіді недоношених новонароджених	33
	1.3. Роль компонентів грудного молока у формування імунного захисту	35
	1.4. МікроРНК грудного молока і його вплив на розвиток запалення в немовляти	36
	1.5. Захворюваність, патогенез, клінічні особливості розвитку харчової інтолерантності та НЕК в новонароджених. Можливі молекулярні мішені епігенетичного впливу на розвиток запалення кишечника	48
<b>РОЗДІЛ 2</b>	<b>МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	
	2.1. Загальна характеристика обстежених недоношених дітей	62
	2.2. Ретроспективний аналіз історій хвороби дітей, що народилися передчасно	65
	2.3. Методи дослідження патологічних станів в недоношених дітей, що були обстежені	66
	2.4. Методи статистичного аналізу отриманих результатів	75
<b>РОЗДІЛ 3</b>	<b>КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСТЕЖЕНИХ ДІТЕЙ</b>	
	3.1. Клініко-анамнестичні особливості новонароджених дітей, що народились передчасно	

	3.1.1. Особливості материнського анамнезу в дітей груп спостереження	77
	3.1.2. Особливості перебігу пологів	79
	3.1.3. Клініко-анамнестичні дані періоду новонародженості	81
	3.2. Експресія факторів транскрипції в дітей груп обстеження	
	3.2.1. Експресія фактору транскрипції FOXP3	88
	3.2.2. Експресія фактору транскрипції T-bet	90
	3.3. Експресія мікроРНК у грудному молоці матерів новонароджених груп порівняння	91
	3.3.1. Експресія miR-155 в грудному молоці матерів новонароджених груп порівняння	92
	3.3.2. Експресія miR-148a в грудному молоці матерів новонароджених груп порівняння	93
РОЗДІЛ 4	РЕТРОСПЕКТИВНИЙ АНАЛІЗ ПЕРЕБІГУ НЕОНАТАЛЬНОГО ПЕРІОДУ В ДІТЕЙ, ЩО НАРОДИЛИСЬ ПЕРЕДЧАСНО	
	4.1. Клініко-анамнестичні особливості недоношених дітей з груп ретроспективного аналіз	
	4.1.1. Клініко-анамнестичні особливості загальної групи недоношених новонароджених	96
	4.1.2. Порівняння клініко-анамнестичних особливостей групи недоношених дітей на грудному вигодовуванні та недоношених дітей на штучному вигодовуванні	99
	4.1.3. Клінічні ускладнення недоношеності в неонатальному періоді	105
	4.2. Тривалість стаціонарного лікування в групах порівняння	108



	4.3. Оцінка ризиків розвитку ускладнень недоношеності на основі аналізу клініко-анамнестичних даних	109
РОЗДІЛ 5	МАТЕМАТИЧНІ МОДЕЛІ ДІАГНОСТИКИ ТА ЙМОВІРНОСТІ РОЗВИТКУ РЕСПІРАТОРНОГО ДИСТРЕС-СИНДРОМУ, РЕТИНОПАТІЇ, БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ ДИСПЛАЗІЇ НА ОСНОВІ РЕТРОСПЕКТИВНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ	
	5.1. Математична модель ймовірності розвитку та діагностики респіраторного дистрес-синдрому в передчасно народжених новонароджених	119
	5.2. Математична модель ймовірності розвитку та діагностики ретинопатії в передчасно народжених новонароджених	122
	5.3. Математична модель ймовірності розвитку та діагностики бронхолегеневої дисплазії в передчасно народжених новонароджених	127
РОЗДІЛ 6	МАТЕМАТИЧНЕ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ХАРЧОВОЇ ІНТОЛЕРАНТНОСТІ/НЕКРОТИЗУЮЧОГО ЕНТЕРОКОЛІТУ В ПЕРЕДЧАСНО НАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ НА ОСНОВІ КЛІНІКО-АНАМНЕСТИЧНИХ ДАНИХ ТА РІВНІВ ФАКТОРІВ ТРАНСКРИПЦІЇ	133
	6.1. Визначення валідних факторів ризику розвитку ХІ/НЕК	134
	6.2. Побудова математичної моделі оцінки ймовірності розвитку ХІ/НЕК у недоношених новонароджених	142
РОЗДІЛ 7	АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	149
ВИСНОВКИ		162

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	164
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	165
ДОДАТКИ	197

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АБП - антибактеріальні пептиди

АТФ - аденозинтрифосфорна кислота

БЛД – бронхолегенева дисплазія

ВАП – відкрита артеріальна протока

ГМ – грудне молоко

ДВС - синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання

ДК – дендритні клітини

ЕВ – екстрацелюлярні везикули

кДНК – комплементарна ДНК

мРНК – матрична РНК

НЕК – некротизуючий ентероколіт

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РДС – респіраторний дистрес-синдром

АР-1 – активатор протеїну- 1

XI – харчова інтолерантність

CaMKII $\alpha$  - кальціум/калмодулін-залежна протеїн-кіназа II $\alpha$

CARMA1 - CARD-вмісний MAGUK протеїн 1

DNMT1 - ДНК-метилтрансфераза 1

FOXP3 - білок Forkhead box P3

IFN - інтерферон

I $\kappa$ b – інгібітор нуклеарного фактору каппа В

IKK – інгібітор кінази нуклеарного фактору каппа В

IL – інтерлейкін

ILC – вроджені лімфоїдні клітини

Ig – імуноглобулін

LPS – ліпополісахариди

miR – мікроРНК

NFAT - ядерний фактор активованих Т-клітин

NF-κB - нуклеарний фактор каппа В

P38MARK – P38 мітоген-активована протеїнкіназа

PAF – фактор активації тромбоцитів

PC – плазмоцити, що продукують антитіла

RISC - РНК-індукований сайленсор

ROR - орфанний ядерний рецептор ретиноєвої кислоти

SHIP - SH2-вмісна інозол-5-фосфатаза

SIRT1 - сиртуїн 1

SOCS1 - білок-супресор цитокінового шляху-1

STAT – фактор транскрипції сигнального трансдуктора і активатора транскрипції

T-bet - фактор транскрипції T-box 21

TCR – рецептори Т-клітин

TGF - трансформуючий фактор зростання

Th – Т-лімфоцити хелпери

TNF - фактор некрозу пухлин

TLR – Toll-подібні рецептори

Treg – Т-регуляторні лімфоцити

NK – натуральні (природні) кілери

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми.** За даними ВООЗ щороку близько 15 млн дітей у світі народжуються передчасно [1]. В Україні з 2019 року відсоток недоношених новонароджених є відносно сталим – 5,2 - 5,7 % [2-3]. Згідно з численними дослідженнями, недоношеність асоційована з високим ризиком розвитку різних патологічних станів. Серед найчастіших наслідків недоношеності залишаються респіраторні порушення, бронхолегенева дисплазія (БЛД); харчова інтолерантність (ХІ); некротизуючий ентероколіт (НЕК); ретинопатія; персистуюча відкрита артеріальна протока (ВАП) [4-7]. Ці патологічні стани недоношених дітей можуть стати причиною летального наслідку і негативно впливають на якість життя дитини в старшому віці [3, 8-11]. Встановлення внеску факторів, що визначають ймовірність розвитку цих асоційованих із передчасним народженням дитини захворювань, може підвищити ефективність лікувально-профілактичних заходів.

Одним з найпотужніших протекторних факторів, що підтримують стан здоров'я дитини, є грудне молоко матері, яке використовується для ентерального харчування в передчасно народжених немовлят [12-17]. За результатами попередніх досліджень, грудне молоко перешкоджає розвитку БЛД [18-20], ретинопатії [21], НЕК [22-27]. В даний час продемонстровано, що грудне молоко, крім різних біологічно активних протеїнів, ліпідів, вуглеводів містить різні мікроРНК (miR), які безпосередньо модулюють експресію таргетних молекул. Відомо, що деякі miR, у тому числі miR-148a та miR-155, мають імуномодулюючу дію, впливаючи на експресію факторів транскрипції імунокомпетентних клітин [28-33]. На сьогодні бракує даних стосовно концентрації цих miR в материнському грудному молоці недоношених дітей і за їх вплив на перебіг патологічних станів, що супроводжують недоношеність.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана в межах комплексної науково-дослідної роботи кафедри педіатрії 1 та медичної генетики Дніпровського державного медичного університету: «Генотип-асоційована персоналізація діагностичного та лікувального процесу у дітей з хворобами респіраторної, ендокринної та травної систем», №

держреєстрації 0118U006629, термін виконання 12.2020 - 12.2023 р. Тема дисертації затверджена Вченою радою ДЗ «ДМА», протокол № 4 від 26 листопада 2020 року.

**Мета роботи:** встановити значущість клініко-біологічних факторів ескпозома, miR-148a та miR-155 грудного молока матері, факторів транскрипції T-bet та FOXP3 дитини в прогнозуванні індивідуальної ймовірності розвитку патологічних станів у недоношених новонароджених.

**Завдання дослідження:**

1. Вивчити частоту патологічних станів, асоційованих з недоношеністю, на основі ретроспективного аналізу особливостей періоду новонародженості в передчасно народжених дітей.
2. Визначити фактори ризику розвитку патологічних станів, асоційованих з недоношеністю.
3. Дослідити рівень концентрації мікроРНК-148a та мікроРНК-155 у грудному молоці матерів недоношених дітей.
4. Встановити залежність перебігу патологічних станів у недоношених новонароджених від рівня концентрації мікроРНК-148a та мікроРНК -155 грудного молока їх матерів.
5. Вивчити вплив грудного молока матері на рівень експресії факторів транскрипції T-bet та FOXP3 недоношених дітей.
6. Розробити прогностичну модель ризику розвитку патологічних станів у недоношених новонароджених.

*Об'єкт дослідження:* недоношеність у новонароджених дітей.

*Предмет дослідження:* клінічний перебіг та важкість патологічних станів, що супроводжують недоношеність; рівень концентрації miR-148a, miR-155 у грудному молоці матерів, чиї діти народились передчасно, та рівень експресії факторів транскрипції T-bet та FOXP3 в недоношених новонароджених.

*Критеріями включення* були: виключно грудне або виключно штучне вигодовування дітей, перебування на стаціонарному лікуванні в неонатальному відділенні, вік на момент обстеження до 28 дня; наявність інформованої згоди з боку їхніх батьків чи опікунів.

*Критерії виключення:* клінічно важкий та нестабільний стан новонароджених; змішане харчування або зміна харчування в анамнезі; вік немовляти старше 28 дня; наявність запальних захворювань матері, що потребували медикаментозного втручання; наявність ознак запалення слизової оболонки ротової порожнини, носо- і ротоглотки немовлят.

*Методи дослідження:* ретроспективний аналіз хвороб дітей, клініко-анамнестичні, загальноклінічні (загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, визначення С-реактивного протеїна), молекулярно-генетичні (визначення miR-155, miR-148a; рівня експресії T-bet, FOXP3), інструментальні (УЗД органів черевної порожнини, серця; нейросонографія, рентгенографія органів грудної клітини), математичні параметричні та непараметричні статистичні методи виконувались за допомогою програм статистики STATISTICA v.6.1 (Statsoft Inc., США) (ліцензійний №AGAR909E415822FpA), LibreOffice та R (версія 4.1.2), MedCalc Statistical Software trial version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023).

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Уперше визначено рівень концентрації екстрацелюлярної miR-148a та miR-155 в грудному молоці матерів передчасно народжених дітей з проблемами адаптації, що дозволило вивчати вплив цих miR на перебіг патологічних процесів, притаманних недоношеним новонародженим.

Уперше встановлено наявність взаємозв'язку між рівнем концентрації miR в грудному молоці матерів та клініко-анамнестичними особливостями перебігу патологічних станів, притаманних недоношеним новонародженим.

Уперше продемонстровано, що підвищення концентрації miR-155 в грудному молоці матері сприяє посиленню експресії фактору транскрипції FOXP3 та перешкоджає розвитку НЕК у недоношених новонароджених. Уперше виявлено, що підвищення рівня miR-148a сприяє зниженню експресії фактору транскрипції T-bet, що також чинить протекторний вплив на стінки кишечника.

Уперше доведено прямий взаємозв'язок рівня експресії фактору транскрипції T-bet та зворотній взаємозв'язок рівня експресії фактору транскрипції FOXP3 в

імуноцитах зішкребу букальної слизової оболонки новонароджених з клінічним розвитком НЕК.

Виділені фактори ризику та критерії діагностики та розроблені математичні моделі ймовірності розвитку та діагностики РДС, ретинопатії, НЕК, БЛД у недоношених новонароджених.

*Наукова новизна* підтверджена нововведенням в сфері охорони здоров'я «Спосіб персоніфікованого прогнозування розвитку некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених» / О.Є. Абатуров, А.О. Товарницька / Реєстр № 84/9/23 в Переліку наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я від 20.03.2023 р. Установа-розробник: Дніпровський державний медичний університет. Поданий до Укрмедпатентінформ МОЗ України. Підстава: рішення ЕПК «Педіатрія».

### **Практичне значення одержаних результатів**

Виділені найбільш інформативні фактори ризику та критерії діагностики, розроблені математичні моделі ймовірності розвитку та діагностики некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених дітей. Установлена діагностична значимість рівня експресії факторів транскрипції FOXP3 та T-bet в клітинах зішкребу букальної слизової оболонки новонароджених, що має важливе практичне значення в ранній діагностиці некротизуючого ентероколіту в передчасно народжених дітей (нововведення в сфері охорони здоров'я, реєстр № 84/9/23). На епігенетичному рівні обґрунтовано необхідність підтримки грудного вигодовування недоношених новонароджених дітей

*Впровадження результатів роботи в практику.* Одержані результати впроваджено у практичну діяльність неонатальних та педіатричних відділень обласних та міських дитячих лікарень: Міська багатопрофільна клінічна лікарня матері та дитини ім. М.Ф. Руднева ДМР; КП «Регіональний медичний центр родинного здоров'я ДОР».



### **Особистий внесок здобувача**

Дисертація є самостійною науковою роботою, виконаною здобувачкою під керівництвом доктора медичних наук, професора, Заслуженого діяча науки і техніки України Абатурова Олександра Євгеновича. Автором самостійно проведено патентно-інформативний пошук, проведено аналіз та узагальнення вітчизняних та закордонних літературних даних, визначено мету та завдання дослідження, розроблено план проведення дослідження та його загальну методологію. Дисертантом виконано відбір хворих, сформовано групи спостереження, проведено аналіз результатів клініко-лабораторних та інструментальних досліджень з подальшим узагальненням. Здобувачкою взято участь у заборі матеріалу для молекулярно-генетичних досліджень, організовано доставку біологічного середовища з дотриманням правил перевезення біоматеріалів та проведенні полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з визначенням рівня експресії екстрацелюлярних miR-148a, miR-155 в грудному молоці матерів; рівня експресії факторів транскрипції FOXP3 та T-bet у клітинах зішкребу букальної слизової оболонки новонароджених. Дисертантом розроблені схеми діагностики, лікування та оцінені отримані результати терапії. Створено комп'ютерну базу даних, проведено статистичну обробку та аналіз отриманих результатів. Автором забезпечено впровадження розробок наукових досліджень у клінічну практику. Здобувачкою самостійно написано всі розділи дисертації, сформульовано висновки та практичні рекомендації, підготовлено виступи на конференціях, опубліковано наукові статті та тези, видано 1 інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я України.

### **Апробація результатів дослідження.**

Основні ідеї та результати дослідження докладались та обговорювались на науково-практичних конференціях та конгресах: XXIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання педіатрії» (Сидельниковські читання) (м.Київ, 15-17 вересня 2021 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій пам'яті академіка Б.Я. Резника «Новітні технології в педіатричній науці, практиці та освіті» (м. Одеса, 28-29 жовтня 2021 р.);

Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Педіатричні здобутки сьогодення» (м. Харків, 13-14 січня 2022 р.); II International Scientific and Practical Conference “Modern Trends of Scientific Development” (Vancouver, 18-21 January, 2022); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій пам'яті академіка Б.Я. Резника «Сучасні новітні технології в педіатричній науці, практиці, сімейній медицині та освіті» (м. Одеса 24-25 листопада 2022 р.); 2d International conference on Pediatrics and Neonatology (Rome, 13-14 February 2023); XXI International Scientific and Practical Conference “Information, modern and recent theories of development”( Madrid, Spain, 29-31 May, 2023); науково-практична конференція з міжнародною участю: «XI наукова сесія інституту гастроентерології НАМН України. Новітні технології в теоретичній та клінічній гастроентерології.» (м. Дніпро, 14-15 червня 2023 р.).

### **Публікації**

Основні положення дисертації опубліковано в 4 друкованих працях, з яких 4 цитуються в базах даних Scopus, 3 – в матеріалах і тезах науково-практичних конференцій, в тому числі міжнародних.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація викладена українською мовою на 201 сторінці друкованого тексту. Роботу ілюстровано 21 таблицею та 22 рисунками. Текст дисертації складається зі вступу, аналітичного огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 3 розділів за результатами власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій та списку використаних літературних джерел. Список літератури містить 328 найменувань (22 кирилицею, 306 латиницею). Бібліографічний опис джерел літератури розміщено на 32 сторінках. Дисертація містить 2 додатки, що займають 2 сторінки.

## РОЗДІЛ І

### ПАТОЛОГІЧНІ СТАНИ, ПОВ'ЯЗАНІ З НЕДОНОШЕНІСТЮ. ВПЛИВ ГРУДНОГО МОЛОКА НА ПЕРЕБІГ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

#### 1.1. Поширеність та наслідки недоношеності. Фактори ризику розвитку ускладнень

В Україні з 2019 року відсоток недоношених новонароджених є відносно сталим і становить 5,2 -5,7 %, що відповідає середнім показникам у [2-3, 5]. Доведено, що ранній гестаційний вік та незрілість новонароджених є факторами несприятливого прогнозу [3, 34-41].

За останніми літературними даними найчастішими наслідками недоношеності є респіраторний дистрес-синдром (РДС) - до 95 %, некротизуючий ентероколіт (НЕК) - до 12 %, ретинопатія - до 39 %, відкрита артеріальна протока (ВАП) - до 39 %, внутрішньоплуночковий крововилив (ВШК) - до 35 %, бронхолегенева дисплазія (БЛД) - до 35 %, перивентрикулярна лейкомаляція - до 8 %. Найвищі відсотки частоти цих патологічних станів зустрічаються в когорті новонароджених з екстремально низькою вагою при народженні.[4-7, 42]. Небажані наслідки недоношеності обумовлюють необхідність в тривалішому періоді виходжування в стаціонарі, що суттєво підвищує ризик розвитку пізнього неонатального сепсису в недоношених немовлят [43].

В майбутньому передчасно народжені діти більш схильні до бронхообструктивного синдрому, астми, функціональних легеневих порушень [10]. В підлітковому періоді та ранньому дорослому віці вони частіше страждають на цереброваскулярні порушення і ішемічну хворобу серця [44]. У зв'язку з необхідністю фільтраційної компенсації незрілими нефронами в неонатальному віці в таких дітей значно частіше спостерігається хронічна хвороба нирок. Вони частіше мають ендокринні порушення, а саме цукровий діабет, метаболічний синдром та ожиріння [8].

На сьогодні науковий інтерес викликає психо-неврологічний розвиток передчасно народжених немовлят. Передчасно народжені діти більш схильні до затримки мовного, когнітивного, сенсо-моторного розвитку. В них частіше спостерігаються розлади уваги, депресії, аутизм, антисоціальна поведінка [45]. За даними Battajon N. та співавт., серед дітей до 2 років з дуже низькою масою при народженні 31 % мають мінімальні, 9 % - значні рухові, когнітивні, соціальні порушення. Був доведений зв'язок цих порушень з неонатальним сепсисом, БЛД, ретинопатією та тривалістю госпіталізації. Після 2-х років життя на психо-неврологічний розвиток негативно впливала наявність БЛД та тривале перебування в стаціонарі в неонатальному віці [46].

***Фактори ризику розвитку та основні ланки патогенезу небажаних наслідків недоношеності.***

Респіраторний дистрес-синдром – основна причина дихальної недостатності в новонароджених дітей, проявляється протягом кількох годин після народження і в основі своїй має кількісний або якісний дефіцит сурфактанту [47]. Однією з патогенетичних ланок розвитку РДС є недостатність або деактивація сурфактанту під дією оксидантного стресу, механічної травми легень, вмісту продуктів запалення, меконію, крові в альвеолах [48]. У наслідку дефіциту сурфактанту розвивається інтрапульмональне шунтування крові, яке призводить до гіпоксії, гіперкапнії, метаболічного ацидозу. Додатковим чинником може виступати баротравма під час вентиляційної підтримки, що призводить до вивільнення прозапальних цитокінів і пошкодження ендотеліальних судин [49]. Таким чином виділяють прямий (безпосереднє ураження легень) та непрямий (травматизація ендотелію судин) РДС [50]. Прямий РДС в недоношених немовлят пов'язаний з кращим прогнозом [51].

Серед основних факторів ризику РДС відносять: малий гестаційний термін та низьку вагу при народженні, низьку оцінку за шкалою Апгар на 1-й хвилині життя, народження шляхом кесарева розтину, преєклампсію матері [52-53].

Ретинопатія недоношених – одна з найчастіших причин порушень зору та сліпоти в дітей [54] Етіологія ретинопатії мультифакторіальна, але серед найбільш значущих факторів ризику виділяють малий гестаційний термін, тривалу

респіраторну підтримку, призначення сурфактанта, розвиток сепсису [55-56]. Некротизуючий ентероколіт, ВАП та БЛД підвищують ризик ретинопатії. Доведено зниження вірогідності розвитку патології сітківки при грудному вигодовуванні [57]. Патогенетичною основою розвитку цього ускладнення є вплив негативних факторів, а саме гіпотензії, гіпоксії або гіпероксії, на васкуляризацію сітківки, що призводить до фібро- та неоваскуляризації з подальшим спотворенням та відшарування сітківки. Перший скринінг на ретинопатію проводять у віці 30 тижнів постконцептуального віку або через 4 тижні після народження [58-59]. Отже актуальною залишається розробка методів раннього прогнозування цього захворювання для виділення пацієнтів груп ризику та проведення лікувально-превентивних заходів.

Бронхолегенева дисплазія – хронічна хвороба легень, що переважно вражає недоношених дітей. Незважаючи на прогрес у перинатальній медицині, захворюваність на БЛД не знижується [60]. Розвиток БЛД пов'язаний з аберантною репаративною відповіддю на антенатальну та повторну постнатальну травматизацію легеневої тканини, що розвивається [61]. Гіпоксія, баротравма, волютравма, біотравма, шунтування крові повз високорезистентну легеневу тканину, інфекція призводять до зменшення та неефективності альвеоло-капілярних мембран; зміни вазореактивності, запаленню та дисфункції ендотеліальних клітин; ремоделюванню та гіперреактивності дихальних шляхів [62]. Доведено, що однією з найважливіших ланок розвитку змін дихальної системи при БЛД є розвиток запалення [61].

БЛД розвивається при необхідності продовження кисневої підтримки на 28 добу життя або 36 тижнів постконцептуального віку. Таким чином, встановлення наявної хронічної хвороби легень проводиться дітям до 32 тижнів гестаційного віку на 28 день життя, дітям з гестаційним віком понад 32 тижні – в проміжку 28-56 днів життя [63]. Фактори ризику БЛД різняться в різних авторів, але найсуттєвішими є: малий гестаційний вік, мала маса тіла при народженні, необхідність в реанімаційних заходах в пологовому залі, респіраторний дистрес-синдром, персистуюча ВАП, розвиток сепсису [64-67]. Декілька досліджень підтверджують протекторний вплив грудного молока на розвиток БЛД [68-70].

Близько 49 % дітей з БЛД в майбутньому вимагають повторної госпіталізації через легеневі ускладнення. В них спостерігається зниження об'єму форсованого видиху, підвищена чутливість до звичайної респіраторної інфекції, гіперреактивність бронхів, тривала легенева гіпертензія [71]. Смертність серед дітей, що мали БЛД в анамнезі, значно вище в порівнянні з загальною популяцією не тільки в ранньому віці, але й шкільному періоді [72]. За даними попередніх досліджень, важчий перебіг БЛД в трьохрічному віці спостерігається в дітей з гемодинамічно значущим ВАП [73].

Відкрита артеріальна протока – судинна комунікація, що з'єднує легеневу артерію і аорту. Це один з фетальних шунтів, що забезпечують фізіологічний кровоток плоду під час вагітності [74]. У більшості немовлят функціональне закриття ВАП настає 24-48 годин після народження, анатомічне – протягом наступного тижня. Тривале функціонування ВАП пов'язують з порушенням харчової толерантності, НЕК, нирковою недостатністю, ВШК, легеневою гіпертензією, хронічною хворобою нирок, підвищеним в 4-7 разів ризиком смерті [75-76]. Серед факторів ризику функціонування ВАП виділяють малий гестаційний термін, жіночу стать, пологи шляхом кесарева розтину, прееклампсію матері, призначення сурфактанта [77]. При аналізі світових джерел у новітніх інформаційних базах нами не знайдено інформації щодо впливу грудного молока на закриття ВАП.

Отже, недоношеність – незмінно поширене явище в сучасній педіатрії і неонатології. Найчастішими короткостроковими наслідками недоношеності є РДС, НЕК, довгостроковими – порушення харчової толерантності, ретинопатія, БЛД. Фактори ризику розвитку патологічних станів недоношеності різняться в залежності від інформаційних джерел. Вплив грудного молока на перебіг наслідків недоношеності до кінця не вивчений. На сьогодні бракує простих прогностичних моделей, які б могли використовуватися рутинно в практичній медицині для чіткого раннього виділення груп ризику ускладнень та корекції лікувально-профілактичних заходів.

## 1.2. Особливості імунної відповіді недоношених новонароджених

Сучасні літературні джерела свідчать, що в основі розвитку більшості ускладнень недоношеності лежить тривалий запальний процес [78]. Тому розуміння особливості імунної відповіді недоношених новонароджених представляє особливий інтерес.

За даними авторів, експресія прозапальних цитокінів інтерлейкіну-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, фактору некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) у відповідь на подразнення ендотоксинами або ліпополісахаридами бактерій в недоношених нижче, в той час коли протизапальна відповідь відрізняється відносно високими титрами IL-10 та трансформуючого фактору зростання-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [41, 79-80]. Водночас описують пізнішу можливу імунну відповідь з надто високим рівнем прозапальних цитокінів TNF, IL-1, IL-6, IL-8 та недостатньої активністю імунносупресивних елементів, таких як IL-10, S100 A8/9, міелоїдні супресорні клітини, регуляторні Т-клітини, CD71+клітини [78, 81-82]. Ці дані свідчать про вірогідну незбалансованість виділення про- і протизапальних цитокінів, незрілість імунної відповіді, її швидке виснаження. При цьому гіперекспресія прозапальних цитокінів на пряму корелює з важкістю клінічних проявів інфекційного процесу. Високий рівень IL-6, IL-1, IL-8 пов'язують з більшою вірогідністю несприятливого прогнозу для життя [83-89].

Антибактеріальні пептиди (АБП)- мультифункціональні пептиди, що мають широкий спектр антибактеріальної активності проти грампозитивних, грам-негативних бактерій, грибів, мікоплазми і вірусів. Основним механізмом дії мембранних АБП є підвищення проникливості мембрани клітини патогена. Немембранні АБП мають різний вплив на внутрішньоклітинні процеси від ДНК/РНК синтезу до зниження АТФ патогенної клітини [90]. Доведено, що рівень АБП, а саме бактерицидного білка, що підвищує проникливість клітинної мембрани; кателицидину LL-37; секреторної фосфоліпази А2;  $\beta$ -дефензина 2, в пуповинній крові недоношених немовлят значно нижчі, що пов'язують зі зниженням активності неспецифічної імунної відповіді [91].

Моноцити недоношених проявлять повільніший хемотаксис та фагоцитоз. Знижена активність регуляції стимулюючими молекулами (МНСII, CD40, CD80,

CD86), що є необхідним для успішної антиген-презентації та активації В- і Т-лімфоцитів [92]. Недоношені мають дещо нижчі рівні нейтрофілів і натуральних кілерів (NK-клітин), що проявляють знижену активність. До того ж, відмічають низький рівень накопичення нейтрофілів, що пояснює схильність до нейтропенії та розвитку бактеріальних ускладнень [91, 93].

Рівень супресорних клітин мієлоїдного походження в передчасно народжених дітей також нижчий ніж у доношених немовлят. Ці клітини продукують імуносупресивний ензим, простагландин E<sub>2</sub>, ряд протизапальних цитокінів, в тому числі IL-10 [81].

У недоношених новонароджених спостерігається значуща лімфопенія (зниження може сягати 50 %) зі зниженням загальної кількості, CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup>лімфоцитів в порівнянні з доношеними новонародженими. Зниження популяції CD8<sup>+</sup>лімфоцитів призводить до збільшення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> [94]. Така зміна в співвідношенні асоціюється зі зниженням активності противірусної відповіді [95].

Імунна система відносно здорових недоношених новонароджених відрізняється вищим рівнем CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg – клітин [96]. Результати досліджень Zahran M. та співавт. вказують на зниження рівня цих клітин з підвищенням гестаційного віку немовлят [97]. Treg є основою імунологічної толерантності. Treg пригнічують активність Т-ефекторних клітин та клітин пам'яті, сприяють десенсибілізації базофілів і тучних клітин, вивільняють супресивні IL-10 та TGF-β [98]. У середовищі запалення під дією IL-1 та IL-6 Treg втрачають FOXP3-експресію і набувають фенотипу ефекторних клітин та проявляють прозапальні властивості [99].

У порівнянні з дітьми з повним строком гестації, недоношені мають нижчі рівні протеїнів комплементу (C1, C2 та фактору В), знижену патоген-дезактивууючу спроможність та дефіцит рецепторів маннозо-зв'язуючого лектина в паттерн-розпізнавальному комплексі [93].

Таким чином, імунна система недоношених новонароджених є незрілою. Нижча кількість і активність імунних клітин і протеїнів сприяють підвищеній чутливості до бактеріальних і вірусних патогенів. Імунна реакція передчасно народжених немовлят характеризується недостатньою регуляцією і балансом,



переважанням неспецифічної відповіді з потенційним зсувом як в бік гіперзапалення, так і в бік недостатньої активності, що пов'язано з гіршим прогнозом для дитини.

### **1.3. Роль компонентів грудного молока у формування імунного захисту**

Науково доведено, що грудне вигодовування – найкраща форма харчування, що унікально підходить для годування як доношених, так і недоношених немовлят і приносить користь в короткочасній і довготривалій перспективі [100]. Молоко матерів, що народили передчасно, в перші тижні відрізняється вищою концентрацією протеїну, жирів, вільних амінокислот. [101].

Грудне молоко (ГМ) – джерело унікальних протеїнів (альфа-лактальбумін, лактоферрин, лізоцим, остеопорин), що мають імуномодулюючу, антибактеріальну дію, сприяють становленню імунокомпетентності [102-103]. Олігосахариди, що присутні у вищих концентраціях в ГМ матерів, що народили передчасно, стимулюють розвиток коменсальної мікробіоти кишечника; інгібують розмноження бактерій, вірусів, деяких паразитів в кишечнику; модулюють деякі імунні реакції. Крім того, грудне молоко – унікальне джерело мікробіому кишечника, що забезпечує близько 25 % кишкової мікробіоти впродовж першого місяця життя [104-105].

Літературні джерела свідчать про позитивний протизапальний вплив довголанцюгових поліненасичених жирних кислот ГМ. Дослідження Lu J. та співавт. довели, що лікування арахідоновою та докозагексаєновою кислотою перешкоджало активації Toll-подібного рецептора-4 [106]. Результати роботи Wijendran V. та співавт. вказують на пригнічення ІЛ-1 $\beta$ -опосередкованої прозапальної відповіді при лікуванні цими жирними кислотами [107]. Для забезпечення позитивного ефекту потрібне дотримання ідеального співвідношення арахідонової та докозагексаєнової кислоти (>1), що характерне для ГМ. Збільшення кількості докозагексаєнової кислоти або відсутність арахідонової кислоти в сумішах може призводити до небажаного впливу на розвиток імунної системи [108].

Відомо, що новонароджені діти мають нижчий пул цитокінів. У ГМ містяться інтерлейкіни ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12, ІЛ-18, інтерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), фактор некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), трансформуючий фактор зростання- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), що

частково покривають цю потребу. Переважаюча активність цитокінів (прозапальна або протизапальна) варіює в різних жінок в залежності від обставин, але частіше рівень прозапальних факторів в ГМ відносно низький [109].

ГМ – джерело захисних імуноглобулінів (Ig) для новонародженого. Імуноглобулін А, який в найбільшій концентрації представлений в ГМ, забезпечує пасивний антимікробний захист: перешкоджає прикріпленню патогена до слизових оболонок, нейтралізує мікробні токсини. Під впливом IgA зменшується ризик атопії в немовляти. Імуноглобуліни М і G в меншій кількості містяться в ГМ, проте проявляють свою захисну імунну активність [93].

Таким чином, ГМ забезпечує дитину комплексом біологічно активних речовин, які мають імунопротекторний та імуномодулюючий безпосередній вплив, проявляють переважно неспецифічну протизапальну активність.

#### **1.4. МікроРНК грудного молока і його вплив на розвиток запалення в немовляти**

Крім різноманітних біологічно активних мікро- і макронутрієнтів, жіноче молоко містить велику кількість молекул мікроРНК. МікроРНК (miR) – малі некодуючі молекули РНК довжиною 21-23 нуклеотиди, що регулюють експресію генів на посттранскрипційному рівні, здійснюють негативну регуляцію трансляції білка або сприяють деградації мРНК [110-116].

Посттранскрипційна дія miR на експресію генів починається, коли провідний ланцюг дволанцюгового дуплекса потрапляє до великого білкового комплексу RISC (РНК-індукований сайленсор; RNA-induced silencing complex). Результат реалізації дії зрілої мікро-РНК у RISC залежить від того, з якою нетрансльованою ділянкою цільової матричної РНК (мРНК) відбувається взаємодія [113, 117-118] (рис. 1.1). Приєднання мікроРНК до 3'-нетрансльованої ділянки цільової мРНК ініціює розщеплення та деградацію молекули цієї мРНК або інгібування трансляції на мРНК. Якщо мікро-РНК взаємодіє з 5'-нетрансльованою ділянкою цільової мРНК, що трапляється значно рідше, відбувається активація трансляції цієї мРНК. Приєднання

miR до менш комплементарних ділянок мРНК викликає пригнічення процесу трансляції і зниження рівня експресії таргетного гена [113, 119-121].

У жіночому грудному молоці miR міститься в екстрацелюлярних везикулах (ЕВ) — мікронаноцелюлярних везикулах. Мембрана ЕВ захищає мікроРНК від руйнування в шлунково-кишковому тракті немовляти і, таким чином, дає змогу досягти таргетних клітинних генів [122-123]. Клітини кишечника поглинають екзосомі різноманітними ендоцитозними шляхами, включаючи клатрин-залежний ендоцитоз і клатрин-незалежні шляхи, такі як опосередковані кавеоліном поглинання, макропіноцитоз, фагоцитоз та опосередкована ліпідним рафтом інтерналізація [28, 124]. Значна частина фракцій мікроекзосом грудного молока накопичується в головному мозку [110], інші розподіляються відповідно до таргетних генів і відповідних тканин дитини. Фракції екзосом, не абсорбовані в кишечнику, безпосередньо впливають на формування мікробіома кишечника [125]. Деякі автори припускають, що підвищена проникність стінок кишечника, знижена кислотність шлунка новонароджених сприяє поглинанню екзосом ГМ, що збагачені на miR [28, 126].

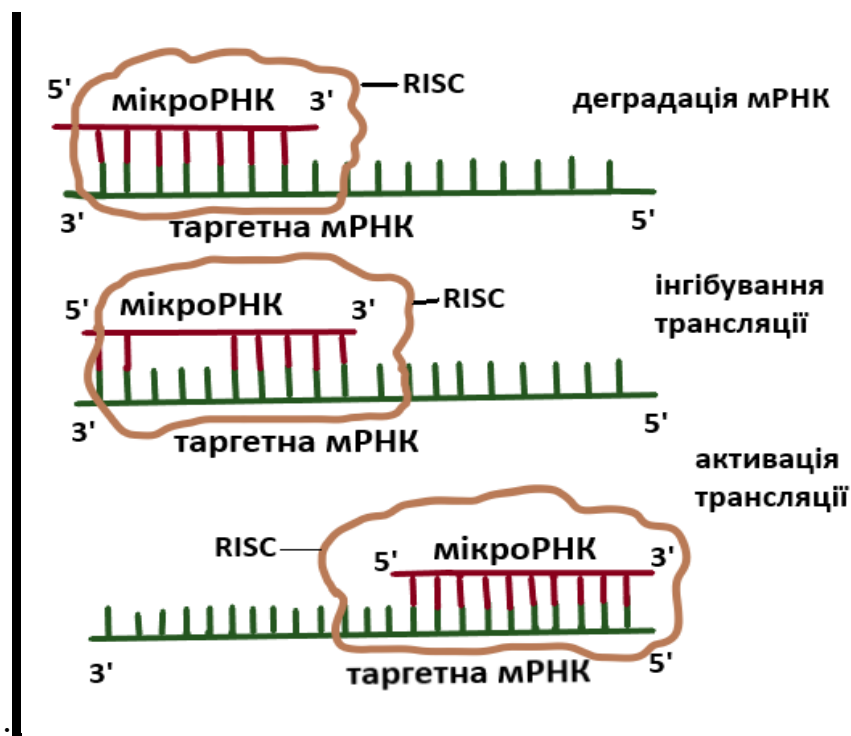


Рис. 1.1. Вплив мікроРНК на таргетну мРНК

Примітка: RISC - РНК-індукований сайленсор; RNA-induced silencing complex.

Незважаючи на відносну стабільність в організмі дитини EB, на їх кількість в грудному молоці негативно впливають: центрифугування, вплив ультразвуку та мікрохвиль [127]. Гомогенізація, холдерна пастеризація та кип'ятіння сприяють деградації miR [128-130]. Згідно з дослідженнями Vélez-Ixta J.M. та співавт., в грудному молоці експресія miR набагато вища, ніж у сумішах [131].

МікроРНК грудного молока жінки мають ендогенну і екзогенну природу. За даними проаналізованих джерел, вплив екзогенних рослинних miR, отриманих із грудного молока, на організм дитини ще не вивчений [112, 132, 133]. Більшість miR грудного молока продукується епітелієм та імунними клітинами молочної залози. Також потенційно miR можуть потрапляти в грудне молоко з інших органів з кровотоком [126-127, 134]. На склад miR грудного молока впливають передчасні пологи, кесарів розтин, тривалість попередньої лактації, дієта матері, застосування нею деяких лікарських препаратів, паління, її індекс маси тіла [135-136].

МікроРНК впливають на становлення обміну речовин (INS, IGF1, CAV1), імунітету (FOXP3, NRA4), адипогенез (FTO, FABP4, CAV1, PPARG2, SREBP1, LPL), міогенне програмування (NR4A3), остеогенез (NRF2) та розвиток епідермісу (NRF2) [132]. Близько 65 % miR грудного молока регулюють імунну відповідь або процеси метаболізму [135]. Літературні джерела свідчать про значний позитивний вплив екзосомальних miR грудного молока на синаптичний розвиток, метаболічні процеси та нейрональне диференціювання головного мозку немовляти [127].

Зі збільшенням терміну лактації відзначається тенденція зміни кількісного переважання miR, що контролюють специфічну імунну відповідь, над miR, що відповідають за нормальне зростання, розвиток, еритропоез, остеосинтез, васкуляризацію тканин [112, 137].

### ***Вплив мікроРНК грудного на імунну відповідь та розвиток запалення.***

Проаналізовані результати досліджень виділення miR грудного молока вказують на різний якісний та кількісний склад, що можна пояснити не тільки особливостями стану матері та дитини, періодом лактації, їжею, що вживає мати, але й чутливістю та специфічністю обраного метода лабораторного аналізу. Проте, в найбільшій кількості виділялись miR, що мають імуномодулюючий ефект, а саме:

miR-148a, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-30, miR-200a, miR-21, miR-17 [122, 125, 131-132, 136, 138-141].

### ***МікроРНК-148a***

МікроРНК-148a - одна з найбільш представлених мікроРНК грудного молока. Zhou Q. і співавт. в своїй роботі зазначили, що при дослідженні грудного молока після 2 місяців лактації близько 35,45 % виділеного транскриптому мікроРНК становила miR-148a [142]. В іншому дослідженні Golan-Gerstl R. та співавт. miR-148a склала 37,59 % від визначеного транскриптому мікроРНК знятого грудного молока жінок після 1 місяця лактації [125]. Літературні дані свідчать про особливо високу кількість miR-148a в молозиві та в ранньому грудному молоці матерів, діти яких народились передчасно [143-144].

МікроРНК-148a є представником сімейства miR-148/miR-152, що складається з трьох висококонсервативних і зрілих мікроРНК (miR-148a, miR-148b і miR-152) із подібними послідовностями, структурами та однаковою початковою ділянкою (UCAGUGCA). Попередник miR-148/miR-152 зі структурою стовбурової петлі розщеплюється серією ферментів у ядрі та цитоплазмі з утворенням послідовностей miR-148a, miR-148b і miR-152 [145].

В організмі людини miR-148a має різні фізіологічні функції, в тому числі контроль як проліферації та диференціювання клітин, так і процесів апоптозу. У таблиці 1.1. представлений список відомих на даний час молекулярних мішеней miR-148a.

*Таблиця 1.1*

### **Молекулярні мішені miR-148a [146]**

<b>Ген</b>	<b>Функціональна група або дія білка</b>	<b>Ефекти miR-148a</b>
<i>BACH2</i>	Фактор транскрипції	Розвиток плазматичних клітин
<i>BCL2/111</i>	Фасилітатор апоптозу	Регулювання імунної толерантності
<i>СаМКIIα</i>	Кіназа	Регулювання реакції на антигени, що презентують дендритні клітини

<i>CAND1</i>	Регулятор убиквітинових лігаз	Просування проліферації клітин
<i>CCKBR</i>	Рецептор, пов'язаний з G-білком	Проліферація клітин
<i>CDC2B</i>	Кіназа	Гальмування росту клітин та виживання
<i>CDKN1B</i>	Циклінозалежний інгібітор кінази 1b	Інгібування клітинного циклу
<i>c-myc</i>	Фактор транскрипції	Залучення до апоптозу клітин
<i>CTNNB1</i>	$\beta$ -катенін	Залучення до апоптозу клітин
<i>DNMT1</i>	ДНК-метил-трансфераза	Інгібування проліферації та міграції клітин, індукція апоптозу
<i>DNMT3b</i>	ДНК-метил-трансфераза	
<i>ERBB3</i>	Кіназа	Інгібування ангиогенезу
<i>Gadd45a</i>	Білок, спричинений пошкодженням ДНК	
<i>HLA-G</i>	Антиген лейкоцитів людини	Гальмування імунного ухилення
<i>HOTAIR</i>	lncRNA	Інгібування клітинної міграції, інвазії, проліферації клітин, прогресування клітинного циклу
<i>HPIP</i>	Гематопоетичний фактор транскрипції пре-B клітинної лейкемії	Пригнічення проліферації клітин, міграції, інвазії
<i>IGF-IR</i>	Рецептор інсуліноподібного фактора росту	Проліферація клітин, утворення колонії, ангиогенез пухлини
<i>IRS1</i>	Субстрат рецептору інсуліну	

<i>ITGA11</i>	Інтегрин	Гальмування міграції
<i>ITGB8</i>	Інтегрин	
<i>MET</i>	Кіназа	Гальмування метастазів
<i>MIG6</i>	Мітоген-індукований ген	Гальмування росту клітин та виживання
<i>MITF</i>	Фактор транскрипції	Розвиток плазматичних клітин
<i>MMP7</i>	Пептидаза 7	Інвазивність пухлини
<i>MSK1</i>	Кіназа	Ослаблення резистентності до ліків
<i>NRP1</i>	Нейропілін 1	Пригнічення метастазування
<i>PTEN</i>	Фосфатаза - супресор пухлини	
<i>QKI</i>	РНК -зв'язування білка	Інгібування клітинної міграції, ангиогенез
<i>ROCK1</i>	Кіназа 1	Пригнічення проліферації клітин, міграції
<i>RUNX3</i>	Фактор транскрипції	Пригнічення пухлинного зростання
<i>SIP1</i>	Рецептор хемоатраканта	Вихід лімфоцитів від первинних до вторинних лімфатичних органів
<i>SKP1</i>	Комплекс убіквітинлігази	Інгібування клітинної міграції, ангиогенезу
<i>SMAD2</i>	Внутрішньоклітинний перетворювач сигналу та транскрипційний модулятор	Інгібування міграції та інвазії клітин
<i>TGIF2</i>	Фактор транскрипції	Проліферація клітин та інвазія
<i>USP4</i>	Убіквітин-специфічна протеаза	Гальмування росту та міграції клітин
<i>VAV2</i>	Фактор обміну гуаніннуклеотидів	

<i>WASL</i>	Білок синдрому Віскотта-Олдрича	
<i>WNT1</i>	Сигнальний білок	Гальмування клітинних метастазів
<i>WNT10B</i>	Сигнальний білок	Гальмування міграції

МікроРНК-148а грає важливу роль у формуванні запальної відповіді. МікроРНК-148а через супресію ДНК-метилтрансферази 1 (DNMT1) підвищує експресію Foxp3+, яка пригнічує NF-κB. МікроРНК-148а безпосередньо негативно впливає на мРНК *SAMK2A*, що кодує кальціум/калмодулін-залежну протеїн-кіназу ІІα (CaMKIIα). CaMKIIα, в свою чергу, фосфорилує CARD-вмісний MAGUK протеїн 1 (CARMA1), що приймає участь в активації ІККα та ІККβ. До того ж, miR-148а безпосередньо впливає на α та β субодиниці інгібітору кінази нуклеарного фактору каппа В (ІККα та ІККβ) і, таким чином, підсилює інгібуючий ефект ІκB на нуклеарний фактор каппа В (NF-κB) [124, 147].

Літературні дані свідчать про гастропротекторний вплив miR-148а. МікроРНК-148а–опосередкована супресія DNMT1 призводить до підвищення рівня сурвініна, який інгібує експресію протеїнів апоптозу. В експериментальному дослідженні Chiba T. та співавт. показали, що зниження експресії miR-148а через подальше підвищення відносного рівня DNMT1 викликало зниження відносного рівня білку щільного з'єднання ZO-1 в кишечнику, що сприяло посиленню парацелюлярної проникності [148-149]. Результати Guo M.M. та співавт. продемонстрували, що імітація miR-148а значно знижує експресію p53 і підвищує рівень НАД-залежної деацетилази сиртуїну 1 (sirtuin 1 - SIRT1) в оброблених ліпополісахаридом (LPS) кишкових епітеліальних клітинах IEC6 [150]. Як результат, підвищується рівень білку SIRT1, що через вплив на різні сигнальні шляхи (інгібування факторів експресії, залучених до запальних шляхів, таких як NF-κB, HIF1α, білок-активатор 1 (AP-1) і P38MAPK – P38 мітоген-активована протеїнкіназа) блокує продукцію прозапальних цитокінів IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α та проявляє виражений протизапальний ефект та може пом'якшити ступінь ураження при надмірній активності імунної системи [151]. Таким чином, miR-148а сприяє виживанню та проліферації ентероцитів, ущільненню



міжклітинних зв'язків, зниженню рівня прозапальних факторів в кишечнику, що перешкоджає розвитку його запалення.

Крім того, Jiang K. та співавт. засвідчили, що гіперекспресія miR-148a знижує експресію Toll-подібних рецепторів-4 (TLR4) та суттєво знижує рівні білків MyD88, IRAK1 і TRAF6, які грають ключову роль в активації TLR/IL-1R сигнального шляху [152-153]. Як результат, гіперекспресія miR-148a знижує рівень IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra), IL-18 (стимулює вивільнення IFN $\gamma$ ), IL-33, IL-36 [154].

Результати досліджень Li G. та співавт. доводять, що miR-148a регулює p38/MAPK-сигнальний шлях в клітинах, які стимулюються ліпополісахаридними антигенами. В експерименті гіперекспресія miR-148a значно знижувала рівень білку p-p38, що призводило до зниження рівня прозапальних цитокінів: TNF- $\alpha$ , інтерлейкінів IL-1 $\beta$  та IL-6 [145]. Крім того, експресія сімейства miR-148/152 знижує експресію матриксної металопептидази 10 (matrix metalloproteinase 10 - MMP10) та MMP13, що в свою чергу перешкоджає активації проведення сигналу NF- $\kappa$ B та дозріванню TNF- $\alpha$  [155].

Доведено, що miR-148a безпосередньо знижує рівень експресії білку GP130, який, в свою чергу, грає важливу роль в проведенні сигналу по IL-6/GP130-STAT3-сигнальному шляху [124]. У результаті зменшується кількість IL-6, IL-21, IL-23, IL-27, IL-10 [156]. До того ж, дослідження Liu X. та співавт. 2010 року довели пригнічення проліферації дендритних клітин, що ініціювалась антигенпрезентацією [147].

За даними Porstner M. та співавт., miR-148a сприяє дозріванню плазмоцитів, що продукують антитіла (PC). МікроРНК-148a підвищує стійкість активованих ліпополісахаридами плазмоцитів, прискорює диференціювання плазмобластів через посилення експресії білків IRF4 та Blimp-1 та знижує кількість IgG1-позитивних В-клітин [157].

Таким чином, можна зробити висновок про імуномодельючий та протизапальний ефект miR-148a.

### ***МікроРНК-155***

У 2010 році Kosaka N. та співавтори вперше зазначили велику кількість miR-155 в грудному молоці в перші 6 місяців лактації. Відповідна кількість цих мікроРНК

містилась в крові матерів [141]. МікроРНК-155 є однією з найперших мікроРНК, які були визнані такими, що мають вплив на імунні клітини та вивільнення прозапальних цитокінів у відповідь на стимуляцію Toll-подібних рецепторів імунних клітин [158]. При цьому miR-155 має як про-, так і протизапальну активність [159].

Прозапальний ефект miR-155 проявляється через пригнічення різних факторів, що блокують розвиток запальної відповіді (рис. 1.2.В). Індукція цієї мікроРНК блокує SH2-вмісну інозол-5-фосфатазу (SHIP), яка, в свою чергу, пригнічує Akt-активацію, що стимулює NF- $\kappa$ B та регуляторний фактор інтерферона-1, які сприяють вивільненню TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\beta$  [151, 160-162]. Цей ефект доповнюється інгібування білка-супресора цитокінового шляху-1 (SOCS1), що також сприяє принаймі частковій активації IL-2/STAT5 і IL-6/STAT3 сигнальних шляхів, диференціюванню Th-клітин в Treg і Th17-клітини, вивільненню прозапальних цитокінів, в тому числі IL-17A.

З іншого боку, блокування SOCS1 сприяє експресії рецептора IL-2 Treg-клітинами. Інтерлейкін-2 – фактор, необхідний для підтримання гомеостазу Treg і їх виживання [158, 163-167]. У результаті блокування SOCS1 посилюється проведення сигналу через TCR, IL-2 та TGF- $\beta$ 1-шляхи, що посилює експресію фактору транскрипції FOXP3 (рис.1.2.А) [128, 132, 168-169].

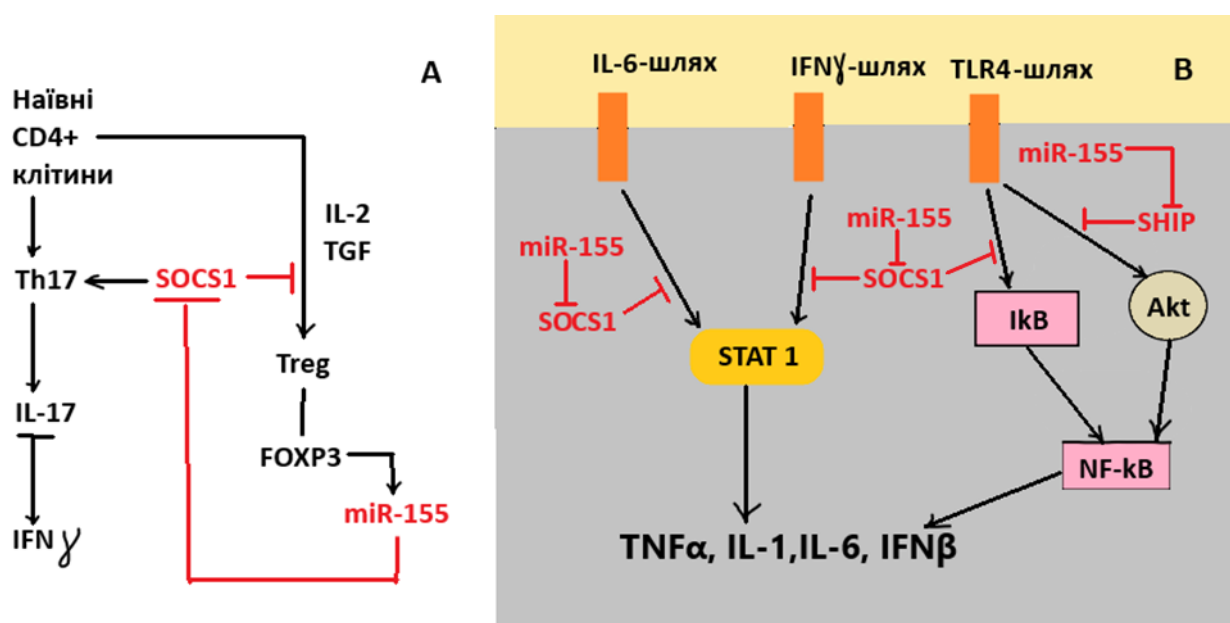


Рис. 1.2. Вплив мікроРНК-155 імунну відповідь: А – посилення експресії FOXP3; В – опосередкована стимуляції продукції прозапальних цитокінів при помірній концентрації мікроРНК-155.

Примітка: SOCS1 - білок-супресор цитокінового шляху-1; SHIP - SH2-вмісна інозол-5-фосфатазу; TLR4 – Toll-подібний рецептор-4; IκB - інгібітор нуклеарного фактору каппа В, STAT1 - фактор транскрипції сигнального трансдуктора і активатора транскрипції 1, Akt- сигнальні протеїни прозапальних шляхів в імунних клітинах; NF-κB – фактор транскрипції прозапального шляху Toll-подібних рецепторів 4; FOXP3 –фактор транскрипції Treg-клітин; IFNβ – інтерферон-β; IFNγ – інтерферон-γ; TNFα – фактор некрозу пухлин-α; IL-1 – інтерлейкін-1; IL-6 – інтерлейкін-6.

При дефіциті miR-155 Foxp3(+) Tregs розвиваються, проте не спроможні підтримувати нормальний імунний гомеостаз [170]. Інтерес викликає той факт, що підвищення FOXP3 індукує експресію miR-155. [169-173].

Hu L. та співавтори в 2019 році висловили гіпотезу про можливе існування «регуляторної петлі» між miR-155, STAT5, and Foxp3, що регулює розвиток T-reg [174].

Літературні джерела свідчать, що експресія miR-155 підвищується на ранній стадії сепсису. Підвищення рівня miR-155 напряму корелює з прогресуванням хвороби, важкістю клінічних проявів сепсису, несприятливим прогнозом [175-176]. З іншого боку, гіперекспресія miR-155 інгібує фактори MyD88, TAB2, IKKε, RIP1 та C/EBPβ і знижує рівень IFNα, IFNβ, IL-6, IL-8, IL-12, TNFα, IL-1 [155, 158, 160, 177-179]. Через miR-155 реалізує свою дію протизапальний IL-10: збільшення кількості якого знижує експресію miR-155 і знімає блокаду SHIP [164, 168, 180].

Результати досліджень Серрі М. та співавт. довели, що miR-155 через низку механізмів контролює TLR/IL-1 сигнальний каскад. Низький рівень miR-155 активує p38 MAPK- шлях в ранній фазі дозрівання дендритних клітин (ДК), що стимулює вивільнення IL-1β. В той же час висока експресія цієї мікроРНК у пізній фазі дозрівання ДК інгібує p38 MAPK активацію, пригнічує продукцію IL-1β. Також високий рівень miR-155 значно знижує експресію сигнальної молекули TAB2, що перешкоджає проведенню сигналу по TLR/IL-1β- каскадному комплексу та вивільненню прозапальних цитокінів [181].

МікроРНК-155 послаблює ІЛ-4-опосередкований синтез ІgЕ через безпосереднє пригнічення факторів транскрипції PU.1 та c-Maf. Доведено, що PU.1 трансактивує  $\alpha$ -ланцюг високоафінного рецептора ІgЕ (Fc $\epsilon$ RI). Fc $\epsilon$ RI грає важливу роль в ІgЕ-опосередкованій atopічній сенсибілізації, в ІgЕ-опосередкованих імунних реакціях. С-Maf супресія посилює активність FoxP3<sup>+</sup> Treg та пригнічує ІЛ-4/Th2-опосередкований шлях розвитку atopічних імунних відхилень [128, 182]. Таким чином, miR-155 перешкоджає розвитку atopії і алергічних реакцій. Вплив miR-155 на вроджений та набутий імунітет висвітлено в табл. 1.2.

Таблиця 1.2

## Таргетні фактори-мішені мікроРНК-155 в імунній системі [183]

Клітини імунної системи	Функція	Мішень
Вроджений імунітет		
Макрофаги	Регуляція M1 та M2 поляризації макрофагів	SOCS1, IL13R $\alpha$ 1
	Зниження експресії трансформуючого фактору зросту- $\beta$ -залежного гена	SMAD2
ДК	Інгібування запальної відповіді ДК	TAB2
	Зниження патоген-зв'язуючої функції ДК	PU.1
	Посилення функції ДК	SHIP1
	Активація спроможності до порушення ауто-толерантності ДК	SOCS1
	Дозрівання та функціонування ДК	c-FOS
НК-клітини	Підвищення продукції IFN $\gamma$	SHIP1
	Проліферація, дозрівання та противірусна відповідь	PMAIP1, SOCS1
Набутий імунітет		
В-лімфоцити	Проліферація та диференціювання В-клітин	JARID2
	Генерація IgG1 <sup>+</sup> В-cell	PU.1
	Стимулювання розвитку зрілих В-клітин	SMAD5

Т-лімфоцити	Стимулювання проліферації Т-клітин	Arginase-2
	Пригнічення диференціювання наївних клітин в Th2 клітини	c-Maf
	Стимулювання диференціювання Treg та Th17	SOCS1
	Індукує перетворення наївних клітин в Th1 клітини	
	Потенціює ефективну CD8 <sup>+</sup> Т-клітинну відповідь	

Примітка: ДК – дендритні клітини; НК – натуральні кілери.

Таким чином, можна говорити про можливий прозапальний і протизапальний ефект miR-155, тонку регуляцію каскадних шляхів в залежності від експресії цієї мікроРНК та стану запальної відповіді на момент впливу.

### **1.5. Захворюваність, патогенез, клінічні особливості розвитку харчової інтолерантності та НЕК в новонароджених. Можливі молекулярні мішені епігенетичного впливу на розвиток запалення кишечника**

Сьогодні увага вчених прикута до вивчення впливу мікроРНК, зокрема miR-148a та miR-155, на стан шлунково-кишкового тракту. Особливий інтерес викликає вплив miR-148a та miR-155 грудного молока на розвиток патології кишечника в новонароджених [124, 150, 184-188].

#### ***Харчова інтолерантність***

Харчова інтолерантність (ХІ) (або «Непереносимість ентерального харчування») – це стан, який проявляється комбінацією клінічних ознак, що вказує на нездатність перетравлювати ентеральну їжу. Цей стан характеризується збільшенням об'єму шлункових залишків (більше ніж на 50%), розтягненням черевної порожнини та/або блювотою і порушенням режиму годування новонародженого [189]. ХІ зустрічається в близько 29% недоношених новонароджених [190].

Серед причин, що викликають ХІ в недоношених немовлят: дискоординація смоктання та ковтання, знижений тонус езофагального сфінктеру, знижена моторика шлунку та кишечника [191]. Недостатня кислотність шлунку, знижена активність

ентерокиназа, панкреатичних протеаз, лактази, нижча концентрація жовчних кислот в дванадцятипалій кишці негативно впливають на процес травлення [192]. Розвиток ХІ пов'язують також з порушенням балансу кишкової мікробіоти: зниженням кількості коменсальних бактерій і колонізацією кишечника умовно-патогенними мікроорганізмами [193]. Кофеїн та індометацин, які використовуються в неонатальній терапії, також затримують спорожнення шлунку [194-195]. Літературні джерела описують можливий розвиток алергічної реакції на білок коров'ячого молока в недоношених дітей з наступним розвитком ХІ [196-198].

ХІ може бути ознакою різних порушень: від незначних і самостійно минулих станів до хвороб, що загрожують життю дитини [199-200]. Клінічні прояви ХІ можуть виступати початковими симптомами НЕК, що розвивається, і вимагати відповідної лікувальної тактики [7,191, 201-202].

### ***Некротизуючий ентероколіт***

Некротизуючий ентероколіт - одна з найчастіших причин смерті новонароджених, зустрічається переважно серед передчасно народжених дітей [203-205]. За опублікованими даними, НЕК вражає близько 5-7 % недоношених дітей; близько 11 % недоношених новонароджених з масою до 1500 г [206-207]. Jones I.H. та співавт. в своєму системному огляді повідомляють про 23,5% смертність серед дітей з підтвердженим НЕК (стадія 2А). Найвища смертність спостерігається серед немовлят з вагою при народженні менше 1000 г, які потребують хірургічного втручання, і складає 50,9 % [208].

Патогенез НЕК мультифакторіальний та зводиться до одночасної присутності незрілості кишкового тракту та імунної системи (підвищена сприйнятливість), тригерів, що призводять до дизбіозу (порушення нормального мікробіому кишечника, що призводить до посиленого росту потенційно патогенних бактерій) та посиленої запальної реакції організму дитини з виділенням цитокінів та хемокінів [7]. Запально-репаративний процес характеризується превалюванням альтерації при неадекватній реакції лейкоцитів на ступінь деструкції і зниженні репаративного потенціалу тканинних елементів слизової оболонки кишки [209]. Незрілість ентероцитів призводить до погіршення тісних зв'язків між оклюдинами та

клаудинами кишкової стінки, що збільшує її проникливість та робить більш чутливою до інвазії патогенами [210]. Однією з ланок патогенезу НЕК є порушення мікроциркуляції та кишкова ішемія. Як результат, ділянки гіпоксії кишечника посилюють прозапальний каскад, погіршуючи ураження кишечника. Опубліковані літературні дані свідчать про негативний вплив гострої гіпоксії, переливання препаратів крові, неонатальної анемії, порушення перфузії кишечника, вад серця на розвиток НЕК [207].

Недоношені новонароджені мають вищий рівень експресії Toll-подібних рецепторів 4 (TLR4). Після того, як TLR4 з'єднується з ліпополісахаридами патогенів, активується нуклеарний фактор транскрипції NF- $\kappa$ B, що провокує вивільнення прозапальних цитокінів та призводить до масивної запальної відповіді. У гіперзапальній реакції при НЕК активуються фактори: фактор активації тромбоцитів (PAF), TNF $\alpha$  та інтерлейкіни IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 та IL-18. У розвитку НЕК окремо виділяють роль цитокінів IFN $\gamma$  та TNF $\alpha$  як факторів стимуляції апоптозу та аутофагії. Відомо, що ці цитокіни викликають раптові негативні зміни в експресії білків щільного епітеліального з'єднання та індукують активацію сигналу клітинної смерті. Такий прозапальний каскад призводить до незворотних змін в тканинах кишечника та може спровокувати подальший розвиток клініки сепсису [211-212].

Активация TLR4 провокує STAT3-опосередковану поляризацію лімфоцитів у бік посилення прозапальних процесів кластер диференціювання (CD) 3+, CD4+, IL-17+ і зниження толерогенності T-регуляторних лімфоцитів Foxp3+ (Tregs). Для розвитку НЕК потрібна активація T-хелперів (Th)-17. В результаті Th17 вивільняють IL-17, який порушує щільні зв'язки ентероцитів, посилює апоптоз ентероцитів та пригнічує проліферацію ентероцитів [212-213]. Для НЕК супроводжується порушенням Treg/Th17 балансу, зниженням рівня та функціональною незрілістю Treg в недоношених новонароджених. В периферичній крові дітей з НЕК спостерігається значно нижчий рівень Treg клітин (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+/hi</sup>FOX3<sup>+</sup>), нижчий рівень IL-10 та TGF- $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T клітин, проте вищий IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T клітин [205, 214].

В останні роки збільшується інтерес до ролі вроджених лімфоїдних клітин (ILC) кишечника в патогенезі НЕК. NKp46<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ILC3 клітини кишечника, які мають

протекторну функцію, значно знижуються при НЕК. В експерименті прозапальна популяція NKp46-ROR $\gamma$ t+Tbet+ ILC3 в стінках кишечника була в 3-додобових мишей з НЕК порівняно з 3-х добовими мишами без НЕК, яких годували материнським молоком, і дорослими контрольними групами [210, 215].

У немовлят <26 тижнів гестації ознаки НЕК виявляються після 23 дня життя, у немовлят <31 тижня гестації симптоми проявляються на другому тижні життя. Клінічні ознаки неспецифічні і включають у себе синдром загальної інтоксикації, кардіо-респіраторний дистрес, гастро-інтестинальні ознаки [204, 216]. У більшості випадків НЕК маніфестує з порушенням харчової толерантності. Серед гастро-інтестинальних симптомів часто спостерігаються: вздуття живота, збільшення резидуального об'єму шлунка, чутливість живота, наявність жовчі в блювотних масах або аспіраті, діарея, наявність крові в калових масах. Маніфестація НЕК може супроводжуватися неспецифічними ознаками: апное, дихальною недостатністю, брадикардією, гіпотензією, сонливістю, млявістю, температурною нестабільністю, порушенням гомеостазу глюкози. До додаткових неспецифічних ознак відносять: еритема черевної стінки, крепітація і напруження черевної стінки. Характерна зміна лабораторних показників: тромбоцитопенія, анемія, метаболічний ацидоз, гіпонатріємія, нейтропенія, лейкоцитоз. У 20-30% розвиток НЕК супроводжується бактеріємією [7, 217-219].

Клінічна тяжкість варіює від легких форм, що супроводжуються порушенням толерантності до їжі, до важких, з повним ураженням кишківника і розвитком клінічної картини шоку [203]. Для клінічної класифікації важкості НЕК найбільш широко використовують шкалу Белла (табл.1.3), яка була впроваджена 1978 року, модифікована 1986 року і понині найбільш часто використовується лікарями по всьому світу для встановлення НЕК [220].



## Модифікована шкала Белла, 1986 [221]

Симптоми	Стадії					
	ІА	ІБ	ІІА	ІІБ	ІІІА	ІІІБ
Температурна нестабільність	+	+	+	+	+	+
Апноє	+	+	+	+	+	+
Брадикардія	+	+	+	+	+	+
Млявість, сонливість	+	+	+	+	+	+
Ацидоз (незначний)				+	+	+
Тромбоцитопенія				+	+	+
Гіпотензія/шок					+	+
Ацидоз (виражений)					+	+
ДВС					+	+
Нейтропенія					+	+
Блювота	+	+	+	+	+	+
Залишки їжі по зонду	+	+	+	+	+	+
Вздуття живота (незначне)	+	+	+	+	+	+
Вздуття живота (значне)					+	+
Позитивний гваяковий аналіз	+	+	+	+	+	+
Гематозезія (прихована)		+	+	+	+	+
Відсутність шумів кишечника			+	+	+	+
Чутливість брюшної стінки			+	+	+	+
Виражена чутливість брюшної стінки					+	+
<b>Рентгенологічні дані</b>						
Норма	+	+				
Розширення петель кишечника	+	+	+	+	+	+

Гіперпневматоз			+	+	+	+
Газ в порталній вені				+	+	+
Асцит				+	+	+
Пневмоперитонеум						+

IA-IB стадії – НЕК, що підозрюється, супроводжуються неспецифічністю клініки з\без наявності крові в калових масах. Для II стадії охоплює ознаки I стадії з відсутністю звуків кишечника, болючістю живота або без неї. При стадії НЕК ІІБ приєднуються метаболічний ацидоз та тромбоцитопенія. III стадія є важкою формою захворювання: наявні гіпотонія, брадикардія, апное, ознаки перитоніту. Стадія ІІІБ супроводжується перфорацією кишечника [7].

На жаль, сучасні діагностичні критерії та визначення не диференціюють класичний НЕК від не-НЕК-захворювань, таких як ішемічний некроз кишечника, синдром ентероколіту, пов'язаний з реакцією на харчовий протеїн, вроджені аномалії кишечника, спонтанна кишкова перфорація, стани, що супроводжують перинатальну асфіксію, цианотичні вади серця. Запропоновані лабораторні маркери НЕК мають низьку (загальний аналіз крові, С-реактивний протеїн, прокальцитонін) та помірну специфічність (фактори трилісника), або низьку чутливість (клаудини), або мають брак попередніх досліджень (амілоїд-А протеїн сироватки; кишкова жирна кислота, що зв'язує протеїн), або пов'язані з проблемним забором матеріалу (резистиноподібна молекула  $\beta$ ) [204, 221].

У результаті НЕК можуть спостерігатися: синдром мальабсорбції, синдром «короткої» кишки, кишкова недостатність. Окремо серед короткострокових ускладнень виділяють неврологічні порушення: внутрішньошлунковий крововилив, перивентрикулярну лейкомаляцію, травмування білої речовини мозку [203]. Гострими ускладненнями НЕК можуть бути також фульмінантний сепсис з розвитком менінгіту, перитоніту та формуванням абсцесів. Можливий розвиток синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВС), кардіоваскулярних ускладнень, респіраторної недостатності, гіпотензивного шоку. 66% летальних випадків трапляються в перші сім днів після встановлення діагнозу НЕК. Одним з

найчастіших довготривалих ускладнень є формування кишкових стриктур та спайок [216]. Доведено, що діти, які перенесли НЕК, в майбутньому частіше мають затримку психо-неврологічного розвитку. Такі немовлята мають підвищений ризик розвитку дитячого церебрального паралічу, когнітивних розладів, важких порушень зору, розладів поведінки. Однією з провідних ланок патогенезу цього зв'язку є вивільнення прозапальних цитокінів та хемокінів, зниження оксигенації та нутритивної підтримки нервової тканини під час активної фази НЕК [218, 219, 222].

### ***Фактор транскрипції FOXP3***

FOXP3 – білок Р3, один із факторів транскрипції сімейства Forkhead box [224]. Його карбоксильний хвіст визначає зв'язування ДНК та локалізацію фактору в ядрі. В залежності від взаємодії з іншими факторами транскрипції, гістон-ацетил-трансферазами, деацетилазами, FOXP3 може виступати в ролі транскрипційного активатора та транскрипційного супресора [224].

FOXP3 через пряму та опосередковану взаємодію з іншими факторами транскрипції знижує рівень продукції прозапальних цитокінів. FOXP3 конкурує з активатором протеїну-1 (AP-1) за приєднання до ядерного фактору активованих Т-клітин (NFAT) та пригнічує активність AP-1. Крім того, FOXP3 приєднується до NFATc2, заміщує Fos та Jun протеїни. Як результат, пригнічується транскрипційна активність NFAT, блокується передача Ca-залежного сигналу від рецепторів Т-клітин (TCR) та подальше вивільнення IL-2, IL-4, IFN $\gamma$ . Гіперекспресія FOXP3 в Т-клітинах пригнічує базальний рівень NF-kB активації, знижує його транскрипційну активність, таким чином знижується рівень NF-kB-залежних прозапальних цитокінів: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  [225-229]. FOXP3 приєднується до Runx1 протеїна і перешкоджає активації генів Il2 та Ifng та подальшій продукції IL-2 та IFN $\gamma$  [230].

Окрема роль відводиться FOXP3 в розвитку і дозріванні Т-reg клітин. Т-reg мають велике значення в підтриманні периферичної імунологічної толерантності та контролі імунної відповіді на дію патогенів і новоутворення [231-232]. Дефіцит FOXP3 пов'язують з розвитком синдрому IPEX (іmunна дисрегуляція, поліендокринопатія, ентеропатія), що має Х-пов'язане наслідування, і якому притаманний розвиток важкого аутоімунного захворювання, алергії, запального

захворювання кишечника [230]. T-reg, що експресують FOXP3, при розпізнаванні антигенів не стимулюють імунної відповіді, проте пригнічують активність інших T-клітин. FOXP3 пригнічує транскрипцію Il2, підвищує експресію CD25 та інших Treg маркерів, сприяє супресивній дії T-клітин CD4+. Foxp3+ Treg складають 10-15 % CD4+-клітин на периферії та 5-6 % CD4+ клітин тимуса. В основному, Treg формуються в тимусі. Проте, експресія FOXP3 стимулюється в периферичних Foxp3-CD4+-клітинах кишечника, або конвенційних, «звичайних» клітинах, під дією харчових антигенів та коменсальних бактерій. Висока експресія FOXP3 також сприяє диференціюванню та дозріванню ефektorних Treg-клітин з високою супресивною активністю. З іншого боку, генетична абляція FOXP3 в CD4+ лейкоцитах призводить до втрати функцій та стабільності Treg: при втраті цих протеїнів Treg продукують велику кількість прозапальних цитокінів IL-17 та IFN $\gamma$  та більше не проявляють супресивну активність [233]. При повній відсутності експресії FOXP3 T-reg можуть перетворюватися на клітини пам'яті або ефektorні клітини, що сприяють розвитку запалення [225, 231, 234]. Проте треба відмітити відносну пластичність CD4+FOXP3+T-клітин, які при активації TCR-шляху та під дією прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-21, IL-23 можуть також перетворюватися на IL-17-продукуючі ефektorні клітини. До того ж, під дією прозапальних факторів та ліпополісахаридів посилюється експресія білку E3 убіквітин лігази фактору STUB1 Treg, що сприяє поліубіквітуванню та деградації FOXP3 [231].

У кишечнику більшість Treg клітин експресують фактор транскрипції орфанного ядерного рецептора ретиноевої кислоти ROR- $\gamma$ t (відомий як Th17-фактор) [235]. Під впливом зв'язування рецепторів T-клітин та TGF- $\beta$  наївні CD4+ T-клітина починають експресію ROR- $\gamma$ t та FOXP3+. При колонізації мікрофлорою кишечника близько 80% FOXP3+ ROR- $\gamma$ t+T-клітин знаходяться в мезентеріальних лімфатичних вузлах, Пейєрових бляшках та власній пластині кишечника [236-237]. При відсутності IL-6, Foxp3 пригнічує диференціювання Th17 шляхом антагонізації функцій ROR $\gamma$ t і ROR $\alpha$ . Однак, надмірна кількість IL-6 у середовищі призводить до посилення експресії Stub1 та зниження експресії USP7, що веде до деградації FOXP3 і індукує розвиток Th17 Treg через активацію STAT3-залежного шляху [225, 238-239]. В свою

чергу, Th17 клітини можуть продукувати IL-17 та IL-21 для захисту від бактеріальної інфекції [225, 240]. Висока ж концентрація TGF- $\beta$  призводить до FOXP3-опосередкованого пригнічення ROR- $\gamma$ t та зниження експресії IL-17, що сприяє розвитку T-reg клітин [236]. Результати дослідження Yang В.Н. та співав. доводять високу супресивну здатність FOXP3+ ROR- $\gamma$ t+T-клітин в кишечнику. Автори продемонстрували практично повну відсутність ураження тканин кишечника при індукованому запаленні в умовах насичення тканин FOXP3+ROR- $\gamma$ t+T-клітинами [237]. В той же час, переважання прозапальних Th17-клітин над регуляторними Treg в кишечнику пов'язують з тенденцією до надмірної запальної відповіді, розвитку НЕК новонароджених та з розвитком запальної хвороби кишечника в дорослих та дітей старшого віку [232, 241-243]. FOXP3 визначають як найточніший маркер Treg [244].

З порушенням стабільності FOXP3 та подальшою зміною балансу між рівнем Treg та T –конвекційних клітин також пов'язують розвиток аутоімунних процесів [245-246]. За результатами своїх досліджень Sardecka-Milewska I. та співавт. пропонують оцінювати вірогідність розвитку толерантності до білків коров'ячого молока у дітей за рівнем експресії FOXP3. Автори підкреслюють найнижчі рівні експресії FOXP3 у дітей перших двох років життя з персистуючою алергією на білок коров'ячого молока. Доведено зворотню кореляцію експресії FOXP3 та рівня IgE [247-248].

Виявлена зміна експресії FOXP3 при грудному вигодовуванні. Дослідження Tong L. та співавт. доводять, що під впливом ЕВ ГМ підвищується рівень IL10+ Foxp3+ Treg в кишечнику, FOXP3+Treg клітин в крові, знижується рівень продукції прозапальних цитокінів (TNF $\alpha$ , IL-2 та IFN $\gamma$ ) в стимульованих моноцитах [243].

Попередні дослідження доводять можливу епігенетичну регуляцію експресії FOXP3. Дані Yao R. та співавт. підтверджують підвищення експресії FOXP3 під впливом miR-155 [249]. В свою чергу, експериментальний дефіцит miR-155 в мишей викликав значне зниження відносної та абсолютної кількості FOXP3+-клітин як в тимусі, так і на периферії [166]. Інший експеримент Zhang J та співавт. підтвердив зниження рівня експресії FOXP3 в В-клітинах при виключенні гена miR-155 [250].

Цікавим є той факт, що підвищення експресії FOXP3 сприяє підвищенню рівня miR-155. В CD4+T-клітинах miR-155 блокує супресор цитокінового сигналу 1 (SOCS1), що підвищує рівень фосфорелювання STAT3 та STAT5, посилює диференціювання Treg та Th17, в конкурентному середовищі, сприяє вивільненню IL-17, IL-22 та інших прозапальних цитокінів та хемокинів [166, 168, 251-252].

У проаналізованих джерелах нами не знайдено досліджень, які б розкривали вплив miR-155 грудного молока матері на рівень експресії FOXP3 слизових оболонок немовляти.

### ***Фактор транскрипції T-bet***

T-bet (фактор транскрипції T-box 21) – фактор транскрипції, що залучений регуляції основних процесів розвитку. Цей фактор грає провідну роль в ініціації розвитку ефektorних Th1 з лінії «наївних» клітин попередників, сприяє експресії IFN $\gamma$  в Th1 та NK-клітинах. T-bet найбільш представлений в кістковому мозку, лімфатичних вузлах, селезінці, апендиксі, шлунку та кишечнику, сечовому міхурі [253].

T-bet має унікальний вплив на диференціювання всіх трьох Th-клітин, сприяючи розвитку Th1 та пригнічуючи протилежні Th2 та Th17. T-bet безпосередньо активує Ifng (який кодує IFN $\gamma$ ), таким чином перенаправляє повністю диференційовані Th2 клітини в пул Th1. При цьому активація рецептору T-клітин (TCR) та індукція IFN $\gamma$ -залежного STAT-шляху сприяє експресії T-bet у прекурсорах T-хелперів. Подальша експресія T-bet керується передачею сигналів IL-12–STAT4 за відсутності стимуляції TCR [254-256].

IFN $\gamma$ , основним стимулятором якого є T-bet, приймає участь в активації, зростанні та диференціювання T-клітин, B-клітин, макрофагів, NK та інших таких типів клітин таких, як ендотеліальні клітини та фібробласти. IFN $\gamma$  стимулює фагоцитоз та експресію рецепторів головного комплексу гістосумісності на поверхні клітин; сприяє вивільненню хемокинів, різних противірусних та антимікробних факторів. Все це робить його життєво важливим для запальної відповіді та клітино-опосередкованої імунної відповіді. Для збереження балансу імунної відповіді між ефективною імунною відповіддю господаря та розвитком аутоімунних захворювань

необхідна контрольована експресія  $IFN\gamma$ . Дефіцит  $IFN\gamma$  викликає підвищену чутливість до бактеріальних, вірусних, внутрішньоклітинних, грибкових інфекцій [257-259]. Гіперпродукція  $IFN\gamma$  спостерігається при деяких потенційно летальних хворобах, пов'язаних з розвитком гіперзапалення та імуноопосередкованих станів (синдром активації макрофагів, синдром вивільнення цитокінів та інші) [260].

T-bet сприяє вивільненню  $IFN\gamma$  також в дендритних клітинах (ДК), регулює продукцію прозапального цитокіну  $IL-1\alpha$  та хемокіну  $CCL3$  в ДК. T-bet забезпечує стабільність та цитотоксичний ефект НК [254-256]

Експресія T-bet в В-клітинах підвищується при вірусних інфекціях, зокрема при грипі, ВІЛ, гепатиті С, що відповідає клінічній гостроті процесу. Високий рівень цих клітин також спостерігається при аутоімунних захворюваннях. Під дією прозапальних факторів Th1-клітин ( $IL-12$ ,  $IL-18$ ), при залученні  $CD40$  T-bet стимулює продукцію  $IFN\gamma$  в В-клітинах. Цьому сприяє активація TLR-7, TLR-9,  $IL-21$  сигнальних шляхів. T-bet також регулює зміну виділення антитіл на  $Ig1$  та  $Ig3$ , що сприяє ефективному залученню НК-клітин та інших ефекторів, а також забезпеченню антитілозалежної клітинної цитотоксичності для подальшого видалення уражених клітин і достатньої гуморальної відповіді на вірусні інфекції [261].

Особливу функцію T-bet має в кишечнику. T-bet пригнічує експресію  $TNF$  в DC кишечника. У вроджених клітинах кишечника (ILC), що мають функціональні атрибути T-ефекторів та забезпечують епітеліальний гомеостаз кишечника, T-bet пригнічує вивільнення  $IL-17A$ . В обох типах клітин під впливом T-bet стимулюється продукція  $IFN\gamma$  [255]. У своєму дослідженні Di Giovangiulio M. та співавт. доводять підвищення концентрації Th1-клітин з високим рівнем експресії T-bet і вивільненням  $IFN\gamma$  навіть при ранніх незначних ознаках запалення кишечника. В експерименті нокаут T-bet викликав порушення Th1-опосередкованої відповіді. Як результат, перебіг коліту в мишей був легший [234]. За даними Cho S.X. та співавт., розвиток НЕК у мишей супроводжувався п'ятикратним підвищенням  $NKp46-ROR\gamma^+Tbet^+ILC3$  клітин в стінках кишечника, що пов'язували з підвищенням експресії  $IFN\gamma$  та  $TNF$  прямо пропорційно до активності запального процесу. При цьому спостерігалось

відносне зниження рівня ILC1 та вірогідно захисних NKp46+ROR $\gamma$ t+ ILC3 з подальшим зниженням рівня захисного IL-22 [210].

Літературні дані свідчать про можливий епігенетичний вплив на рівень експресії T-bet в клітинах. Так, результати досліджень Amado T. та співавт. підтверджують зниження рівня експресії T-bet, гена *Ifng* та, відповідно, цитокіну IFN $\gamma$  при трансфекції miR-181a-5p та miR-451 в клітину.[262]. Норе J.L. та співавт. довели, що підвищення рівня miR-155 в клітині призводить до зниження експресії SHIP1 з подальшим посиленням експресії T-bet [263]. З іншого боку, miR-31 через гальмування STAT1 пригнічує експресію T-bet, диференціювання та активацію CD4+ T-клітин [264].

Проте, в проаналізованих нами літературних джерелах нами не виявлено інформації щодо безпосереднього впливу miR грудного молока на рівень експресії T-bet немовляти.

Отже, результати попередніх досліджень підтверджують вплив miR на процеси запалення та імунну відповідь через вплив на сигнальні молекули та зміну експресії факторів транскрипції. Вивчення зміни рівня експресії факторів транскрипції, що приймають участь в запальному процесі та імунній відповіді, при зміні концентрації miR в материнському грудному молоці передчасно народжених дітей допоможуть визначити участь miR грудного молока в розвитку патологічних станів недоношеності.

### **Висновки до розділу.**

На сучасному етапі вивчення факторів впливу на розвиток патологічних станів, що супроводжують недоношеність (респіраторного дистрес-синдрому, ретинопатії, бронхолегеневої дисплазії, некротизуючого ентероколіту), має високу актуальність в неонатології і педіатрії за рахунок сталого числа передчасних пологів, значної розповсюженості цих патологій серед недоношених новонароджених, довготривалих ускладнень і можливого подальшого зниження якості життя дітей.



Літературні дані свідчать, що в грудному молоці спостерігається висока концентрація мікроРНК, які чинять імунопротекторну та імуномодулюючу дію. Новітні наукові роботи підтверджують відмінність якісного та кількісного складу miR грудного молока в матерів, чії діти народились передчасно. Зниження або підвищення рівня експресії деяких miR в грудному молоці є важливою ланкою адаптації організму матері-дитини та природним способом боротьби з патологічними процесами, які супроводжують недоношеність. Завдяки унікальним умовам стабільності, miR ГМ транспортуються, всмоктуються та регулюють таргетні процеси в організмі немовляти. Одними з найбільш представлених miR ГМ є miR-148a та miR-155, дія яких на становлення стінок кишечника залишається об'єктом сучасних досліджень.

Вивчення зміни рівня експресії miR-148a та miR-155 материнського ГМ недоношених новонароджених з проблемами адаптації (зокрема, з клінікою НЕК), змін рівня експресії факторів транскрипції FOXP3 і T-bet в цих немовлят під впливом відповідних miR материнського ГМ може мати діагностичну значущість для подальшої корекції виходжування і терапії недоношених новонароджених, індивідуального прогнозування розвитку хвороби, профілактики ускладнень, покращення якості життя немовлят і зменшення матеріальних витрат на лікування.

**Матеріали даного розділу дослідження відображені в наступних публікаціях:**

1. Абатуров, О.Є., Товарницька, А.О. Прогностична значимість впливу мікроРНК грудного молока на імунну відповідь новонародженого із затримкою внутрішньоутробного розвитку. Сучасна педіатрія (Україна). 2021, 1 (113). С. 53-61. ISSN 2663-7553 (print); 2706-6134 (online). Doi 10.15574/SP.2021.113.53.

2. Tovarnytska A, Samokhina I, Bogomolna L. Anti-inflammatory impact of miR-148a of breast milk on neonatal immune response. Modern Rends of Scientific development, Vancouver, Canada, Jan 2022. ISBN: 978-1-68564-505-2. doi: 10.46299/ISG.2022.I.II.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Загальна характеристика обстежених недоношених дітей

Для досягнення запланованої мети і вирішення поставлених завдань дисертаційної роботи дослідження проводилось протягом 2021- 2022 років на базі відділення для постінтенсивного догляду та виходжування новонароджених Комунального підприємства «Дніпропетровський обласний перинатальний центр зі стаціонаром» ДОР» (головний лікар – к.мед.н. Л.І. Падалко, з 1.08.2022 р. заклад переіменовано в Комунальне підприємство «Регіональний медичний центр родинного здоров'я» Дніпропетровської обласної ради, головний лікар - д.мед.н., професор О.О. Власов) та відділення для недоношених новонароджених Комунального некомерційного підприємства «Міська багатопрофільна клінічна лікарня матері та дитини імені проф. М.Ф. Руднева» Дніпровської міської ради» (головний лікар- д.мед.н., професор І.О. Македонський). Лабораторні дослідження проводились у сертифікованій лабораторії «PCR lab Interdepartmental Training and Research Laboratory (ITRL)» Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (завідувач лабораторії- д.м.н., професор О.М. Камишний).

Для проведення досліджень було отримано дозвіл комісії з питань біомедичної етики ДЗ «ДМА МОЗ України» (протокол № 6 від 30.09.2020 р. ), голова комісії: д.мед.н., професор В.В. Колдунов. Після завершення досліджень проведено узгодження комісією з питань біомедичної етики ДДМУ (протокол № 10 від 21.06.2023), голова комісії: д.мед.н., професор Шаторна В.Ф. Дозвіл та узгодження комісії свідчили про те, що робота запланована та виконана згідно з нормативними документами (Гельсінська декларація Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2000 рр.), основні положення Якісної клінічної практики (GCP) (1996 р.), Конвенція Ради Європи про права людини і біомедицину (від 4 квітня 1997 р.), *Загальна декларація*

про біоетику і права людини ЮНЕСКО, Конституція України (ст. 3, 21, 24, 28, 32), Основи законодавства України про охорону здоров'я (ст. 43.1, 44.1), Закон України «Про лікарські засоби» (ст. 7, 8)), дотримувалися права, інтереси та особиста гідність пацієнта відповідно до морально-етичних принципів. Батьки чи опікуни пацієнтів надали інформовану письмову згоду на медичні втручання та участь у науковому дослідженні після отримання повної інформації про мету, сутність, обсяг та ризики запропонованих діагностичних та лікувальних заходів.

*Критерії включення:* виключно грудне або виключно штучне вигодовування, вік на момент обстеження до 28 дня; наявність інформованої згоди з боку їхніх батьків чи опікунів.

*Критерії виключення:* клінічно важкий та нестабільний стан новонароджених; змішане харчування або зміна харчування в анамнезі; вік немовляти старше 28 дня; наявність запальних захворювань матері, що потребували медикаментозного втручання; наявність запальних ознак запалення слизової оболонки ротової порожнини, носо- і ротоглотки немовлят.

Під нашим спостереженням знаходилось 74 новонароджених дітей віком від 4,0 до 28 днів. У ході виконання дослідження обстежено 62 дитини (35 (56,5 %) хлопчиків та 27 (43,5 %) дівчаток), які народились до 37 тижня гестації (термін гестації 33 (31; 34) тижні). Середня маса тіла немовлят при народженні склала 1910 (1480; 2200) г. Середній вік дітей на момент обстеження становив 8 (6; 11) днів.

Для порівняння результатів у дослідження було включено 12 практично здорових доношених новонароджених зі строком гестації більше 37 тижнів (термін гестації – 40 (39; 41) тижнів). Середня маса тіла при народженні цих новонароджених складала 3600 (3050; 4100) г. Серед них було 7 хлопчиків (58,3 %) та 5 дівчаток (41,7 %). Ці немовлята склали контрольну групу (КГ). Вірогідних відмінностей за гендерною ознакою в основній і контрольній групах не було ( $p > 0,05$ ), проте суттєво відрізнялися показники терміну гестації та ваги при народженні ( $p < 0,001$ ).

Нами було проведено розділення обстежуваних недоношених новонароджених на дві групи в залежності від виду вигодовування. Першу групу склали 32 недоношені новонароджені дитини (термін гестації – 33 (31; 34) тижні), які з народження

знаходились виключно на грудному вигодовуванні. Друга група була представлена 30 недоношеними немовлятами (термін гестації – 32,5 (32; 35) тижнів), які з народження отримували адаптовану молочну суміш. Ці дві групи не відрізнялись між собою за показниками гестаційного віку, статтю, масою при народженні ( $p > 0,05$ ) (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

**Розподіл новонароджених дітей по групах порівняння за гендерною ознакою та основними анамнестичними даними**

Ознаки		Групи дослідження			Значимість різниці між групами
		На грудному вигодовуванні (n=32)	На штучному вигодовуванні (n=30)	Контрольна група (n=12)	
Стать	Хлопчики, n (%)	19 (59,4)	16 (53,3)	7 (58,3)	† $p_{1-2}=0,632$ $p_{1-к}=0,950$ $p_{2-к}=0,769$
	Дівчатка, n (%)	13 (40,6)	14 (46,7)	5 (41,7)	
Гестаційний вік, тижні, Ме (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, Ме (25%; 75%)		1925 (1490; 2200)	1890 (1450; 2250)	3600 (3050; 4100)	* $p_{1-2}=1,00$ ; $p_{1-к}<0,001$ ; $p_{2-к}<0,001$
Оперативне розродження (КР), n (%)		12 (37,5)	17 (56,7)	4 (33,3)	† $p_{1-2}=0,131$ ; $p_{1-к}=0,798$ ; $p_{2-к}=0,172$
ОША 1 хв., бал, Ме (25%; 75%)		6 (4; 7)	6 (5; 7)	6 (5; 7)	* $p_{1-2}=0,818$ ; $p_{1-к}=1,00$ ; $p_{2-к}=1,00$
ОША 5 хв., бал, Ме (25%; 75%)		6 (5,5; 7)	7 (6; 7)	7 (6; 7)	$p_{1-2}=0,132$ ; $p_{1-к}=0,201$ ; $p_{2-к}=1,00$

Примітки: † – за критерієм  $\chi^2$  Пірсона; ° – за двостороннім точним критерієм Фішера (ТКФ); \* – за критерієм Данна;  $p_{1-2}$ ,  $p_{1-к}$ ,  $p_{2-к}$  – рівень статистичної значимості відмінностей показників між відповідними групами 1-а, 2-а, контрольна; ОША - оцінювання за шкалою Апгар; КР - кесарів розтин.

Діти груп спостереження не відрізнялись також за кількістю випадків оперативного розродження (кесарів розтин) та показниками за шкалою Апгар на 1-й

та 5-й хвилини ( $p > 0,05$ ). Отже, сформовані групи були відносно однорідними за основними показниками та були порівняними.

Вплив способу вигодовування оцінювали після виписки зі стаціонару на підставі динаміки скарг, клінічних особливостей перебігу патологічних станів, тривалості необхідності перебування в стаціонарі і призначення специфічної медикаментозної терапії.

## **2.2. Ретроспективний аналіз історій хвороб дітей, що народилися передчасно**

Для проведення ретроспективного дослідження було проаналізовано 300 випадково відібраних історій хвороби недоношених дітей, які знаходились на стаціонарному лікуванні у відділенні для постінтенсивного догляду та виходжування новонароджених Комунального підприємства «Дніпропетровський обласний перинатальний центр зі стаціонаром» ДОР» та відділенні для недоношених новонароджених Комунального некомерційного підприємства «Міська багатопрофільна клінічна лікарня матері та дитини ім. проф. М.Ф. Руднева» Дніпровської міської ради» в 2020-2021 роках.

*Критеріями включення* були: гестаційний вік немовлят до 37 тижнів, перебування на стаціонарному лікуванні в неонатальному відділенні.

*Критеріями виключення* були: гестаційний вік новонароджених старше 37 тижнів, дуже важкий клінічний стан новонароджених.

Було виділені дві групи порівняння:

- перша група, основна - недоношені новонароджені, які годувались грудним молоком відразу після народження (102 дитини);

- друга група, контрольна - недоношені новонароджені, які в якості першого ентерального годування отримали суміш (198 дитини).

### **2.3. Методи дослідження патологічних станів в недоношених дітей, що були обстежені**

#### ***Клініко-параклінічні методи дослідження***

Для верифікації діагнозу керувалися клінічними настановами платформи UpToDate, яка Наказом МОЗ України від 29.12.2016 № 1422 «Про внесення змін до наказу Міністерства охорони здоров'я України від 28 вересня 2012 року № 751» рекомендована для використання як провідного джерела клінічних рекомендацій.: Neonatal necrotizing enterocolitis: Clinical features and Diagnosis [218]; Overview of neonatal respiratory distress and disorders of transition [48]; Clinical features, diagnosis and treatment of neonatal encephalopathy [265]; Germinal matrix hemorrhage and intraventricular hemorrhage (GMH-IV) in the newborn: pathogenesis, clinical presentation and diagnosis [266]; Retinopathy of prematurity: pathogenesis, epidemiology, classification and screening [58]. Також використовували наступні протоколи МОЗ: уніфікований клінічний протокол вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Некротизуючий ентероколіт у передчасно народжених дітей» №182 від 28 січня 2022 року [7]; уніфікований клінічний протокол вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Респіраторний дистрес-синдром у передчасно народжених дітей» № 873 від 05.05.2021 року [6]; уніфікований клінічний протокол «Початкова, реанімаційна і післяреанімаційна допомога новонародженим в Україні» № 225 від 28.03.2014 [267]; уніфікований клінічний протокол вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Ентеральне харчування недоношених немовлят», затверджений наказом МОЗ України №870 від 05.05.2021 р [268]; наказ МОЗ України «Про затвердження Протоколу з лікування дітей з ретинопатією недоношених» №683 від 21.09.2009 року [59].

*Клініко-анамнестичні методи.* Обстеження пацієнтів в умовах цього дослідження передбачало деталізацію скарг медичного персоналу і матері; клінічний фізикальний огляд щодо наявності порушення толерантності до їжі, диспептичного, больового синдрому, ознак загальної інтоксикації, респіраторної недостатності, гемодинамічних порушень; наявності неврологічної симптоматики. Поглиблено

вивчались анамнестичні дані (перебіг вагітності та пологів, наявність гінекологічної та екстрагінетальної патології з боку матері, наявність асфіксії, необхідність респіраторної підтримки після народження, початок харчування та визначення інших чинників, що могли сприяти розвитку захворювання).

*Загальноклінічні та біохімічні методи.* Загальноклінічний комплекс лабораторних методів дослідження включав клінічний аналіз периферичної крові, визначення С-реактивного білка, глюкози крові які проводились за загальноприйнятими методиками [269-272].

*Рентгенологічне дослідження ОБП та ОГК.* Рентгенологічне дослідження ОБП проводилось дітям з клінічними ознаками НЕК та порушення харчової толерантності; рентгенологічне дослідження ОГК проводилось дітям з ознаками респіраторних порушень при стійких або прогресуючих дихальних розладах. Проведення дослідження та інтерпретація результатів виконувались за встановленим стандартом та критеріями [273-275].

***Молекулярно–генетичне дослідження експресії мікро-РНК-148а, мікро-РНК-155 в материнському грудному молоці та факторів транскрипції FOXP3 та T-bet в клітинах зішкребу букальної слизової оболонки новонароджених***

Молекулярно-генетичне дослідження з визначенням рівня експресії мікро-РНК-148а та мікро-РНК-155 в грудному молоці та факторів транскрипції FOXP3 та T-bet в клітинах зішкребу букальної слизової оболонки проводилось методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу. Для визначення мікроРНК використовували сертифікований набір Applied Biosystems™ TaqMan™ Small RNA Assays. Дослідження проводилось в сертифікованій лабораторії «PCR lab Interdepartmental Training and Research Laboratory (ITRL)» Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (завідувач лабораторії – д.мед.н., професор О.М. Камишний. Дослідження включало такі етапи:

*Забір зразків грудного молока*

Забір зразків грудного молока проводився методом мануального зціджування (попередньо проводилась гігієнічна обробка рук з милом та стерилізація

антисептиком) в стерильні пробірки без реагенту. Попередньо випускали 0,5-2 мл молока. Об'єм зразків складав 5 мл. Зразки відразу поміщалися в холодильник з температурою  $+3^{\circ}\text{C}$  з наступним заморожуванням та зберіганням при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Забір зразків зішкребу епітелію букальної слизової оболонки*

Забір епітелію проводився зішкребом клітин букальної слизової оболонки. Процедура проводилася за допомогою одноразового зонда з синтетичним ворсом для забору проб (виробник: Jiangsu Suyun Medical Materials Co., LTD, Китай). Забір матеріалу проводився через 2-3 години після останнього годування. Зішкріб проводився зі слизової оболонки щік обертальними рухами з невеликим натисканням протягом 6 секунд з кожної сторони. Частина зонду з щіточкою відразу поміщали в стерильну суху одноразову пробірку. Пробірку відразу ставили в холодильник (температура  $+3^{\circ}\text{C}$ ) та протягом 4 годин заморожували та зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Виділення тотальної РНК із грудного молока та клітин епітелію букального зішкребу*

На початку лабораторного дослідження виділяли тотальну РНК зі зразків грудного молока та з імуніцитів зішкребу букальної слизової оболонки. Метод призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, денатурації клітинних нуклеаз, а також для видалення білків і ДНК. Виділення тотальної РНК проводилося відповідно до рекомендацій протоколу, наведених у наборі „Trizol RNA Prep 100” (Ізоген Lab., LTD, РФ). Набор містить *Trizol reagent* (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол з  $\text{pH} = 4.0$ ) та *ExtraGeneE* (суспензія суміші іонообмінників) [276].

РНК виділяли відповідно протоколу до набору для виділення з виконанням наступних етапів:

1. Вносили в пробірки "Ахуген" (США) загальним об'ємом 1,5 мл по 100 мкл проби грудного молока, що досліджувалася; добавляли 1 мл *Trizol reagent* та інтенсивно перемішували вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубували пробірки при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв.



2. Додавали в пробірки 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішували вміст пробірок. Пробірки інкубували при 4°C протягом 5 хв.

3. Центрифугували (центрифуга „СМ-50”, Латвія) пробірки з сумішшю 5 хвилин при 14000 об/хв. для розділення фаз. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносили в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл, намагаючись не зачепити пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

4. Додавали в пробірки рівний об'єм ізопропанолу, приблизно 600 мкл.

5. Інтенсивно перемішували вміст пробірок та переносили пробірки в морозильну камеру («LG», Корея) при -20°C на 30 хв.

6. Центрифугували пробірки з сумішшю 15 хвилин при 14000 об/хв. Повністю видалити супернатант перевертанням пробірки. Видалення супернатанту відсмоктуванням пов'язано з ризиком втрати осаду РНК.

7. Додавали в пробірку 1 мл холодного 75% етилового спирту, перемішували вміст пробірки перевертанням 4-5 разів, центрифугували пробірки з сумішшю 5 хв. при 14000 об/хв. та обережно видаляли супернатант перевертанням пробірки.

8. Просушували осад при температурі 65°C протягом 3 хв.

9. Додавали в пробірки 50-100 мкл реагенту *ExtraGeneE*. Реагент *ExtraGeneE* відбирали від загального об'єму при постійному перемішуванні.

10. Суспендували вміст на вортексі 15-20с та залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв. Потім ще раз суспендували вміст пробірок на вортексі.

Виділену РНК зберігали при температурі -70°C або негайно використовували для роботи. Перед використанням центрифугували вміст пробірок протягом 1 хв. при 14000 об/хв.

Концентрацію та якість виділеної тотальної РНК визначали на спектрофотометрі LibraS32PC (Biochromltd., Англія). Для подальшої процедури зворотної транскрипції відбирали зразки РНК з наступними показниками (за співвідношенням оптичної щільності A260/A280): 260 нм/280 нм=1,8-2,2.

*Проведення зворотної транскрипція та полімеразної ланцюгової реакція в реальному часі для виділення мікроРНК-148а та мікро-РНК-155.*

Кількісне визначення мікроРНК в зразках грудного молока виконували з використанням специфічних праймерів «stem-loop» («стержень-петля») для зворотної транскрипції (ЗТ-праймери) з подальшим ПЛР-аналізом TaqMan (ЗТ-ПЛР).

Довжина молекул мікроРНК складає всього 17-24 нуклетиди. Стандартні якісні та кількісні методи ПЛР (кПЛР) вимагають матриці, яка принаймні вдвічі перевищує довжину будь-якого зі специфічних прямого або зворотного праймерів, кожен з яких зазвичай має довжину - 20 нт. Таким чином, цільова мінімальна довжина становить  $\geq 40$  нт, що робить мікроРНК занадто короткими для стандартних методів ЗТ-ПЛР [277]. Для виділення мікроРНК Chen С та співавт. запропонували використання праймерів «stem-loop» для зворотної транскрипції.

На першому етапі виділення ЗТ-праймери «stem-loop» зв'язуються з 3'-частиною молекул мікроРНК. і піддаються зворотній транскрипції за допомогою зворотної транскриптази (рис. 2.1). У результаті зворотної транскрипції отримують комплементарну ДНК (кДНК).

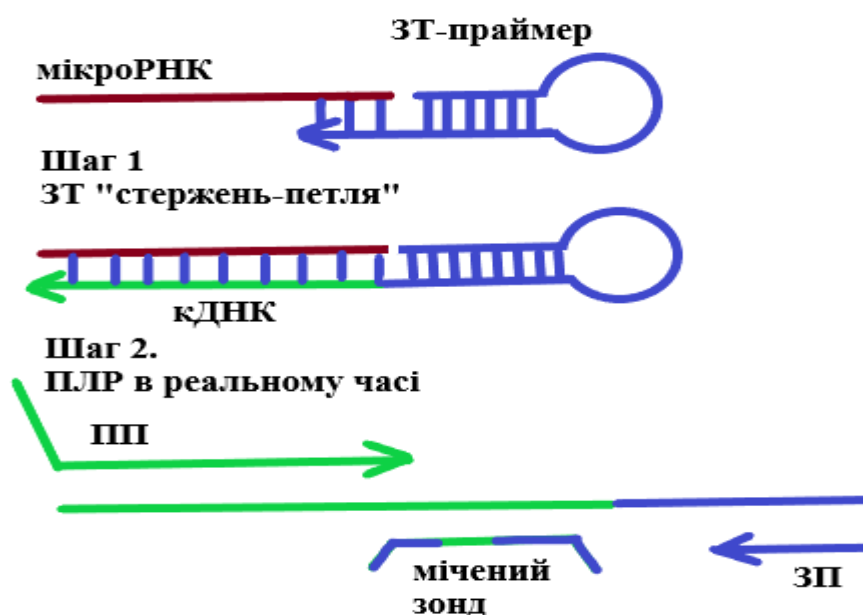


Рис. 2.1.Послідовність виділення мікроРНК.

Примітка. ЗТ-зворотна транскрипція, ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція, ПП – прямий праймер, ЗП – зворотний праймер.

Синтез першого ланцюга кДНК із високостабільним праймером стовбурової петлі подовжує мішень від початкових  $\sim 22$  нт до  $>60$  нт. Потім продукт ЗТ кількісно

визначають за допомогою звичайної ПЛР TaqMan, яка включає мікроРНК-специфічний прямий праймер, зворотний праймер і зонди TaqMan, мічені барвником [277-278].

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі застосовували продукт зворотної транскрипції та реагенти TaqMan. Праймери були затравкою для початку роботи Taq-полімерази, яка володіє 5'-екзонуклеазною активністю. Під час ПЛР прямий і зворотний праймери з'єднувалися з комплементарними послідовностями уздовж ланцюгів денатурованої кДНК-матриці. Праймери містили флуоресцентну мітку в одному кінці та її гасник в іншому.

Під час полімеризації ДНК-полімераза розщеплювала лише ті зонди, які гібридизувала цільова послідовність. Розщеплення відокремлювало флуоресцентну мітку від зонда. Відокремлення барвника-мітки від барвника-гасника призводило до посилення флуоресценції мітки. Це збільшення флуоресценції відбувалося лише в тому випадку, якщо зонд був комплементарним до мішені та якщо цільова послідовність була ампліфікована під час ПЛР. Неспецифічної ампліфікації не виявлялося.

#### *Зворотна транскрипція (виділення кДНК)*

Для зворотної транскрипції (синтез кДНК) використовували „Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ-1)” („СИНТОЛ”, РФ). Підготовку та проведення реакції проводили відповідно до протоколу набору.

При проведенні реакції використовували праймер Random-6, який є більш універсальним і придатним для дослідження РНК по всій довжині. Послідовність Random-6 неспецифічно зв'язується з РНК, дозволяючи напрацьовувати велику кількість коротких к-ДНК, що перекриваються.

На першому етапі готували реакційну суміш в пробірці на льоду. Для цього змішували тотальну РНК (2 мкл); Random-6 праймер (1 мкл); деіонізовану воду, очищену від нуклеаз (11 мкл). Загальний об'єм суміші становив 14 мкл. Суміш обережно перемішували. На наступному етапі в пробірку додавали наступні компоненти в зазначеному порядку: реакційну суміш 2,5x (10 мкл); зворотною транскриптазу MMLV-RT (1 мкл). Отримували загальний об'єм — 25 мкл. Обережно

перемішували та центрифугували. Потім суміш інкубували при  $t = + 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 45 хвилин в термостаті. Для подальшої інактивації MMLV-RT пробірки нагрівали до  $+ 92^{\circ}\text{C}$  та інкубували 5 хвилин. Для швидкого охолодження пробірки переносились на лід.

Послідовність «stem-loop» праймерів для мікроРНК: мікроРНК-148а: GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAGUAUGAUAGAAGUCAGUGCA CUACAGAACUUUGUCUC; мікроРНК-155: CUGUUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGUUUUGGCCUCUGACUGACUCCUACCU GUUAGCAUUAACAG.

*Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу.*

Виділення факторів транскрипції FOXP3, T-bet з клітин зішкребу слизової букальної оболонки та мікроРНК проводилось методом ЗТ-ПЛР в режимі реального часу з використанням набору Maxima SYBR Green / ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США) за таких умов: ініціююча денатурація  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  — 10 хв; далі 45 циклів: денатурація —  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15сек., віджиг праймерів —  $59\text{-}62 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 сек., елонгація —  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 сек. Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично наприкінці стадії елонгації кожного циклу по каналу SybrGreen.

Приготування реакційної суміші проводили відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

1. Додавали на одну пробірку при кімнатній температурі: 2-кратний Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2x) — 12,5 мкл; суміш праймерів (прямий і зворотній) по 0,3 мкМ кожного.
2. Ретельно перемішували суміш і розподіляли відповідні обсяги в пробірки для ПЛР.
3. Додавали кДНК ( $\leq 500$  нг / реакція). Об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою.
4. Ретельно перемішували реакційну суміш без утворення бульбашок без використання вортексу. Центрифугували короткочасно за необхідності.
5. Розміщували зразки в ампліфікаторі й запускали програму.

Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) та виготовлені фірмою Thermo Scientific (США). Послідовності праймерів, використаних для аналізу кПЛР, були такими:

miR-148a-прямий (F): 5'-TCAGTGCACCTACAGAACTTTGT-3';

miR-148a-зворотний (R): 5'-GCTGTACACGATACGCTACGT-3';

miR-155- прямий (F): 5'-TGCTAATCGTGATAGGGG-3',

miR-155- зворотний (R): 5'- GAACATGTCTGCGTATCTC -3';

FOXP3- прямий (F): 5'- TCTGCACCTTCCCAAATCCC-3';

FOXP3- зворотний (R): 5'-AAAGGGTGCTGTCCTTCCTG-3';

T-box 21 (T-bet)- прямий (F): 5'- CCGTGACTGCCTACCAGAAT -3';

T-box 21 (T-bet)- зворотний (R): 5'- TTCAGCTGAGTAATCTCGGCA-3'.

В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген глицеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (*GAPDH*): F = CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC, R= CGATGTGGCTCGGCTGG. Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний Ct метод ( $\Delta\Delta$ Ct метод). Розрахунки проводили за формулами:  $\Delta$ Ct (гена-мішені) = Ct (гена-мішені) – Ct (гена-калібратора / ACT1);  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct (гена-мішені) –  $\Delta$ Ct (базисного гена); Відносний рівень експресії виражали в  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Проводили розрахунок кількості молекул ампліфікату та побудову калібрувальної кривої рівня експресії мікро-РНК відносно контрольного U6 РНК. Підібрано оптимальні умови ЗТ-ПЛР для досягнення лінійної залежності між числом циклів і кількістю продуктів ПЛР. В експеримент були включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторях.

Подальший аналіз рівня експресії нормалізованих показників мікроРНК-148а, мікроРНК-155, факторів транскрипції FOXP3, T-bet в першій і другій групах

порівняння проводився відносно рівня експресії цих показників в групі контролю, де їх значення приймалось за усереднену умовну одиницю – 1,0 ум.од.

#### **2.4. Методи статистичного аналізу отриманих результатів**

Статистичний аналіз проводився з використанням пакету прикладних програм STATISTICA v.6.1 (Statsoft Inc., США) (ліцензійний №AGAR909E415822FpA), LibreOffice та R (версія 4.1.2), MedCalc Statistical Software trial version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023) [279-281].

З метою статистичного аналізу проводили оцінку кількісних та якісних показників, використовуючи параметричні та непараметричні методи статистики. Нормальність розподілу даних перевірялась за критеріями Колмогорова-Смирнова, Лілієфорса, Шапіро-Уїлка. При нормальному розподілі ознак використовували середню арифметичну (M), її стандартне відхилення (SD). При аномальному розподілі розраховували медіану (Me) з міжквартильним розмахом (25 %; 75 %). Міжгрупові порівняння статистичних характеристик були виконані з урахуванням закону розподілу та рівності дисперсій з використанням параметричних і непараметричних критеріїв: оцінка вірогідності відмінностей середніх проводилась за критеріями Стюдента (t) і Манна-Уїтні (U), перевірка рівності дисперсій – за критеріями Фішера та Левена. Встановлення достовірності розходжень якісних параметрів проводилось за критерієм згоди Пірсона ( $\chi^2$ ) та двостороннім точним критерієм Фішера (ТКФ) при значеннях близьких до 0 або 100. Для множинного порівняння усіх трьох груп за критеріями з нормальним розподілом використовували дисперсійний аналіз ANOVA з апостеріорним порівнянням за критерієм Тьюкі, з аномальним розподілом - непараметричний аналіз Краскела-Уолліса (H) з попарним порівнянням за критерієм Данна.

Для оцінювання взаємозв'язку проводився кореляційний аналіз. Оскільки розподіл більшості кількісних ознак був аномальним, для оцінки зв'язків між параметрами ми використовували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r). Коефіцієнт кореляції в діапазоні  $0 < | r | < 0,3$  вказував на слабкий кореляційний

зв'язок;  $0,3 \leq |r| < 0,7$  – на зв'язок середньої сили;  $0,7 \leq |r| < 1$  – на сильний кореляційний зв'язок [279-280, 285].

Для виявлення оптимальних порогових значень факторів ризику з найкращим співвідношенням чутливості і специфічності використовували ROC-аналіз (Receiver Operator Characteristic — операційна характеристика приймача). Кількісну інтерпретацію ROC-аналізу відображали за допомогою показника AUC (Area Under Curve, площі під кривою) з 95% довірчим інтервалом (ДІ). Гранично допустимим вважали значення AUC більше 0,5, що відповідало допустимій якості моделі. Точки відсікання знаходили за допомогою індексу Юдена (J). Також були розраховані статистичні показники діагностичної цінності запропонованих тестів: чутливість (Se) та специфічність (Sp) [303-304]. Для оцінки ризику розвитку ХІ/НЕК, РДС, ретинопатії та БЛД при наявному факторі розраховували показник відносного ризику (BP – relative risk).

Розробка багатфакторних математичних моделей проводилась за допомогою алгоритму Вальда з розрахунком діагностичних коефіцієнтів (ДК). Інформативність критичних значень фактору ризику оцінювали за коефіцієнтом Кульбака (I) [279-284].

Відмінності між ознаками, що порівнювались, для всіх видів аналізу вважались статистично значущими при  $p < 0,05$ . Тенденція до того чи іншого явища визначалась при  $p < 0,1$  [282-284].

Таким чином, методи статистичної обробки отриманих результатів дослідження дають можливість визначити особливості стану здоров'я недоношених новонароджених дітей, виявити схильність до деяких патологічних станів і захворювань та відокремити фактори ризику, що сприятимуть їх розвитку; визначити критерії діагностики та розробити прогностичні математичні моделі розвитку НЕК; з'ясувати вплив мікроРНК материнського грудного молока на розвиток НЕК на підставі аналізу рівня експресії мікроРНК в грудному молоці та клінічних і лабораторних особливостей перебігу хвороби.

## РОЗДІЛ 3

### КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСТЕЖЕНИХ ДІТЕЙ

#### **3.1. Клініко-анамнестичні особливості новонароджених дітей, що народились передчасно**

У дослідженні прийняли участь 74 дитини. Також було відібрано і досліджено 44 зразка грудного молока матерів, чиї діти були в групах спостереження і перебували на грудному вигодовуванні. Було виділено дві основних групи спостереження: перша група - діти на грудному вигодовуванні з гестаційним віком до 37 тижнів (32 дитини); друга група - діти на штучному вигодовуванні з гестаційним віком до 37 тижнів (30 дітей). В контрольну групу увійшли новонароджені діти на грудному вигодовуванні зі строком гестації більше 37 тижнів. Діти контрольної групи перебували у відносно задовільному стані та не мали клінічних ознак захворювання. Вік на момент забору матеріалу в усіх дітей становив менше 28 днів.

##### ***3.1.1. Особливості материнського анамнезу в дітей груп спостереження***

Середній вік матерів в першій групі спостереження склав  $29,2 \pm 6,9$  років; другій групі –  $33,9 \pm 4,1$  рік; в групі контролю –  $28,6 \pm 5,6$  років. Таким чином, матері передчасно народжених дітей не відрізнялись за віком ( $p > 0,05$ ), в той час коли матері, що народили відповідно до віку, були дещо молодші ( $p < 0,05$ ). Серед матерів обстежених дітей відмічався високий відсоток таких, які спостерігались під час вагітності: пізній облік після 20 тижня вагітності або відсутність спостереження відмічалась в 1 (3,1 %) матері з першої групи та 2 (6,7 %) матерів другої групи. Особливості перебігу вагітності в групах спостереження показані в таблиці 3.1.



Таблиця 3.1

## Особливості перебігу вагітності в групах спостереження

Показник	Діти до 37 тижнів гестації на грудному вигодовуванні (n=32)	Діти до 37 тижнів гестації на штучному вигодовуванні (n=30)	Контрольна група (n=12)	Значимість різниці між групами
Вік матері, роки (M (SD))	29,6 (6,9)	33,9 (4,1)	28,6 (5,6)	* $p_{1-2}=0,015$ ; $p_{1-к}=0,915$ ; $p_{2-к}=0,085$
Анемія, n (%)	11 (34,3)	10 (33,3)	3 (25)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,722$ ; $p_{2-к}=0,723$
Інфекція сечовивідних шляхів/бактеріурія, n (%)	7 (21,9)	8 (26,7)	1 (8,3)	$p_{1-2}=0,770$ ; $p_{1-к}=0,413$ ; $p_{2-к}=0,278$
Артеріальна гіпертензія, n (%)	3 (9,4)	4 (13,3)	4 (33,3)	$p_{1-2}=0,703$ ; $p_{1-к}=0,075$ ; $p_{2-к}=0,195$
Міопія, n (%)	6 (18,8)	3 (10)	0	$p_{1-2}=0,475$ ; $p_{1-к}=0,167$ ; $p_{2-к}=0,545$
Захворювання щитоподібної залози, n (%)	1 (3,1)	2 (6,7)	0	$p_{1-2}=0,607$ ; $p_{1-к}=1,0$ ; $p_{2-к}=1,0$
Ожиріння, n (%)	1 (3,1)	1 (3,3)	2 (16,7)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,176$ ; $p_{2-к}=0,192$
Тромбофілія, n (%)	2 (6,3)	3 (10)	0	$p_{1-2}=0,667$ ; $p_{1-к}=1,0$ ; $p_{2-к}=0,545$
ГРВІ, n (%)	5 (16)	2 (6,7)	5 (41,7)	$p_{1-2}=0,427$ ; $p_{1-к}=0,105$ ; $p_{2-к}=0,013$
Вульвовагініт/ерозія шийки, n (%)	8 (26,7)	6 (20,0)	1 (8,33)	$p_{1-2}=0,771$ ; $p_{1-к}=0,405$ ; $p_{2-к}=0,651$

Примітки: <sup>†</sup> – за критерієм Тьюкі; в інших випадках – за двостороннім точним критерієм Фішера;  $p_{1-2}$ ,  $p_{1-к}$ ,  $p_{2-к}$  – рівень статистичної значимості відмінностей показників між відповідними

групами 1-а, 2-а, контрольна; ГРВІ – гостра респіраторна вірусна інфекція; % - відносна частка від дітей спостереження в %.

Найбільш часто діагностованими екстрогенітальними патологіями в матерів були: анемія, інфекція сечовивідних шляхів, артеріальна гіпертензія, тромбофілія. Досить часто визначався вульвовагініт на пізніх строках вагітності. Серед матерів груп порівняння практично не було значимої різниці у відсотках частки патологій як при окремому порівнянні трьох груп між собою, так і при підрахунках між групами недоношених дітей (перша і друга) та групи контролю ( $p > 0,05$ ). В групі контролю дещо частіше зустрічались випадки ГРВІ на пізніх строках вагітності в анамнезі порівняно з другою групою ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. Особливості перебігу пологів

Серед загальної групи недоношених дітей випадки оперативного розродження склали 46,8% - 29 випадків відповідно. В групі контролю цей відсоток склав 33,3% - 4 випадки, що не мало суттєвої різниці з недоношеними дітьми та з першою, другою групами окремо, але відображало загальну тенденцію до підвищення частоти передчасних оперативних пологів. Особливості інтранатального та раннього неонатального періодів показані в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

### Особливості перебігу інтранатального та раннього адаптаційного періодів у групах порівняння

Показник	Групи дослідження			Значимість різниці між групами
	Діти до 37 тижнів гестації на грудному вигодовуванні (n=32)	Діти до 37 тижнів гестації на штучному вигодовуванні (n=30)	Контроль-на група (n=12)	

Гестаційний вік, тижні, Ме (25 %; 75 %)	33 (31; 34)	32,5 (32; 35)	40 (39; 41)	$\dagger p_{1-2}=1,00$ ; $p_{1-к}<0,001$ ; $p_{2-к}<0,001$
Маса тіла при народженні, г, Ме (25 %; 75 %)	1925 (1490; 2200)	1890 (1450; 2250)	3600 (3050; 4100)	$\dagger p_{1-2}=1,00$ ; $p_{1-к}<0,001$ ; $p_{2-к}<0,001$
ОША 1 хв., бал, Ме (25 %; 75 %)	6 (4; 7)	6 (5; 7)	6 (5; 7)	$\dagger p_{1-2}=0,818$ ; $p_{1-к}=1,00$ ; $p_{2-к}=1,00$
ОША 5 хв., бал, Ме (25 %; 75 %)	6 (5,5; 7)	7 (6; 7)	7 (6; 7)	$\dagger p_{1-2}=0,132$ ; $p_{1-к}=0,201$ ; $p_{2-к}=1,00$
Оперативне розродження (КР), n (%)	12 (37,5)	17 (56,7)	4 (33,3)	$p_{1-2}=0,203$ ; $p_{1-к}=1,0$ ; $p_{2-к}=0,306$
ПРПО, n (%)	9 (28,1)	3 (10)	0	$p_{1-2}=0,108$ ; $p_{1-к}=0,05$ ; $p_{2-к}=0,543$
Двійня, n (%)	10 (31,3)	6 (20)	0	$p_{1-2}=0,390$ ; $p_{1-к}=0,04$ ; $p_{2-к}=0,159$
Відшарування плаценти, n (%)	4 (12,5)	4 (13,3)	0	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,562$ ; $p_{2-к}=0,308$
Асфіксія, n (%)	11(34,4)	15(50)	4 (33,3)	$p_{1-2}=0,303$ ; $p_{1-к}=1,0$ ; $p_{2-к}=0,507$
Неінвазивна ШВЛ, n (%)	17 (53,1)	16 (53,3)	2 (16,7)	$p_{1-2}=0,341$ ; $p_{1-к}=0,042$ ; $p_{2-к}=0,042$
Інвазивна ШВЛ, n (%)	4 (12,5)	1 (3,3)	4 (33,3)	$p_{1-2}=0,355$ ; $p_{1-к}=0,185$ ; $p_{2-к}=0,018$
ДН 1 n (%)	4 (12,5)	7 (23,3)	6 (50,0)	$p_{1-2}=0,509$ ; $p_{1-к}=0,015$ ; $p_{2-к}=0,141$
ДН 2 n (%)	15 (46,9)	11 (36,7)	2 (16,7)	$p_{1-2}=0,451$ ; $p_{1-к}=0,087$ ; $p_{2-к}=0,282$
ДН 3 n (%)	4 (12,5)	4 (13,3)	2 (16,7)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,658$ ;

				$p_{2-k}=1,0$
Початок ентерального годування, дні, Ме (25 %; 75 %)	1 (1; 1)	1 (1; 3)	1 (1; 1)	$p_{1-2}=0,008$ ; $p_{1-k}=1,00$ ; $p_{2-k}=0,081$

Примітки: <sup>†</sup> – за критерієм Данна; в інших випадках – за двостороннім точним критерієм Фішера;  $p_{1-2}$ ,  $p_{1-k}$ ,  $p_{2-k}$  – рівень статистичної значимості відмінностей показників між відповідними групами 1-а, 2-а, контрольна; ОША - оцінювання за шкалою Апгар; ПРПО – передчасний розрив плодових оболонок (більше 12 годин); КР - кесарів розтин; ШВЛ-штучна вентиляція легень; ДН- дихальна недостатність; % - відносна частка від дітей спостереження в %.

Середня оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині не мала суттєвої різниці серед новонароджених і відповідала «помірно аномальній» [286]. Серед недоношених дітей була тенденція до збільшення випадків передчасного розриву плодових оболонок, відшарування плаценти та двійні. Початок ентерального годування був однаковим в усіх групах порівняння.

Діти першої та другої групи не відрізнялись за особливостями перебігу пологів та раннього адаптаційного періоду. У контрольній групі дещо вищий був відсоток дітей, що потребували інвазивної вентиляції легень відразу після народження в порівнянні з другою групою, хоча відмінностей між цими групами за частотою розвитку дихальної недостатності III ступеня не було. Порівняно з групою контролю, в першій групі спостерігався нижчий відсоток випадків дихальної недостатності I ступеня, хоча в той же час мала місце тенденція до збільшення відсотку випадків з дихальною недостатністю II ступеня. Ці особливості пов'язані з випадковістю набору пацієнтів, клінічними проявами переважаючої гіпоксично-ішемічної енцефалопатії серед доношених немовлят відділень патології новонароджених.

### ***3.1.3. Клініко-анамнестичні дані періоду новонародженості.***

Основними патологічними станами, що супроводжували ранній неонатальний період, в групах спостереження були: РДС, ХІ/НЕК та гіпоксично-ішемічна енцефалопатія новонароджених (ГІЕ). Частота цих станів у групах спостереження показана на рисунку 3.3.

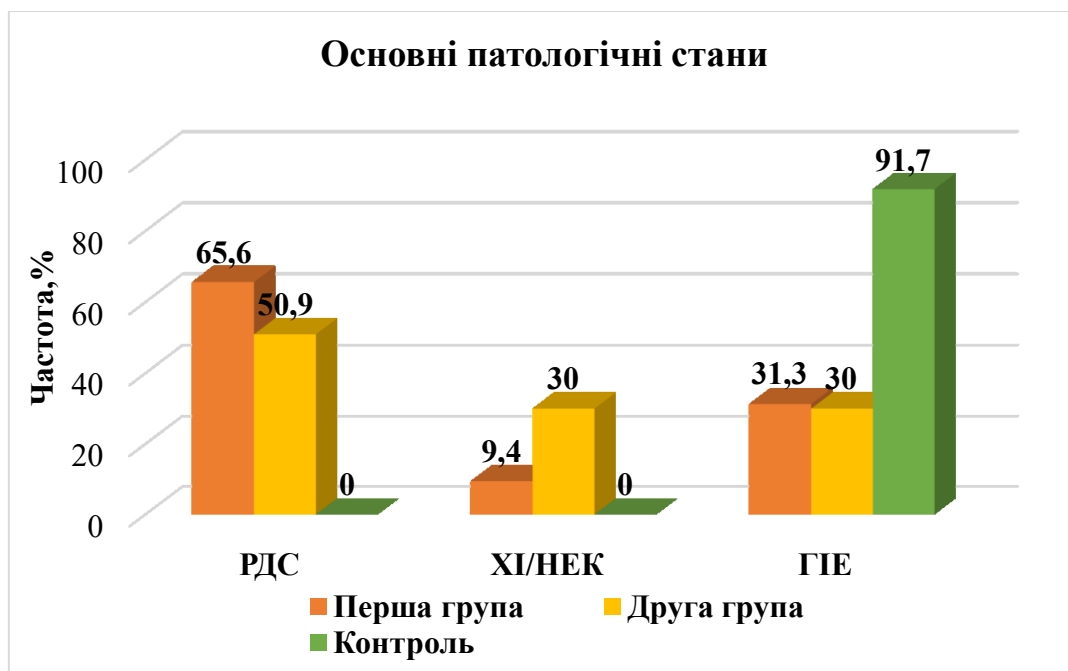


Рис. 3.3. Патологічні стани, що найчастіше спостерігались в групах порівняння

Примітки: РДС- респіраторний дистрес-синдром; XI/НЕК- харчова інтолерантність/некротизуючий ентероколіт; ГІЕ гіпоксично-ішемічна енцефалопатія

РДС виставлявся на основі клінічних ознак: тахіпноє, роздування крил носа, експіраторний стогін, наявність ретракцій грудної клітини, цианоз, зниження сатурації. Діагноз підтверджувався рентгенологічно [48]. РДС достовірно частіше зустрічався серед недоношених дітей ( $p < 0,005$ ). Значимої різниці між частотою випадків РДС у першій і другій групах не виявлено ( $p = 0,303$ ).

Середня тривалість респіраторної підтримки (інвазивної та неінвазивної) в першій, другій, контрольній групах складала відповідно: 3 (1; 11); 2 (1; 6) та 2 (1; 6) (табл. 3.3). Різниця в групах порівняння за показником тривалості загальної кисневої підтримки не було. Проте, в першій групі, в порівнянні з групою контролю, діти довше отримували терапію постійним позитивним тиском кисню – СРАР: 3 (1,0; 7,0) проти 1,0 (1,0; 1,0) ( $p = 0,023$ ). Суттєвої статистичної різниці за цим показником між групою недоношених дітей на штучному вигодовуванні та групою контролю не було, проте відстежувалась тенденція до збільшення цього показника в другій групі. Отримані дані рефлектують зі значеннями частоти випадків РДС у групах порівняння.

Таблиця 3.3

## Особливості раннього неонатального періоду новонароджених

Показник	Групи дослідження			Значимість різниці між групами
	Діти до 37 тижнів гестації на грудному вигодовуванні (n=32)	Діти до 37 тижнів гестації на штучному вигодовуванні (n=30)	Контрольна група (n=12)	
РДС, n (%)	21 (65,6)	15 (50,0)	-	$p_{1-2}=0,303$ ; $p_{1-к}<0,001$ ; $p_{2-к}=0,003$
Загальна тривалість респіраторної підтримки, дні, Me (25 %; 75 %)	3 (1; 11)	2 (1; 6)	2 (1; 6)	* $p_{1-2}=1,00$ ; $p_{1-к}=0,673$ ; $p_{2-к}=1,00$
СРАР/нШВЛ, Me (25 %; 75 %)	3 (1,0; 7,0)	1,5 (1,0; 7,0)	1 (1,0; 1,0)	* $p_{1-2}=0,328$ ; $p_{1-к}=0,023$ ; $p_{2-к}=0,085$
іШВЛ, Me (25 %; 75 %)	5 (2,0; 7,0)	3,0 (1,0; 5,0)	3,0 (2,0; 9,0)	* $p_{1-2}=0,241$ ; $p_{1-к}=0,742$ ; $p_{2-к}=0,408$
XI/НЕК, n (%)	3 (9,4)	9 (30,0)	-	$p_{1-2}=0,041$ ; $p_{1-к}=0,551$ ; $p_{2-к}=0,041$
Тривалість часткового ентерального годування, дні, Me (25 %; 75 %)	5 (4,0; 9,0)	7,5 (5,0; 12,0)	3,0 (3,0; 5,5)	* $p_{1-2}=0,09$ ; $p_{1-к}=0,082$ ; $p_{2-к}=0,002$
Неонатальна енцефалопатія, n (%)	10 (31,3)	9 (30,0)	11 (91,7)	$p_{1-2}=1,00$ ; $p_{1-к}<0,001$ ; $p_{2-к}<0,001$
ВШК, роширення лікворних проторів, кісти епендимального сплетіння, n (%)	16 (50,0)	10 (30,0)	4 (30,0)	$p_{1-2}=0,208$ ; $p_{1-к}=0,498$ ; $p_{2-к}=1$

Жовтяниця, n (%)	28 (87,5)	21 (70,0)	2 (16,7)	$^{\circ}p_{1-2}=0,091$ ; $p_{1-k}<0,001$ ; $p_{2-k}=0,002$
ВАП, n (%)	0	3 (10,0)	2 (16,7)	$p_{1-2}=0,107$ ; $p_{1-k}=0,070$ ; $p_{2-k}=0,613$

Примітки: \* – за критерієм Данна;  $^{\circ}$ - за критерієм  $\chi^2$  Пірсона; в інших випадках - за двостороннім точним критерієм Фішера;  $p_{1-2}$ ,  $p_{1-k}$ ,  $p_{2-k}$  – рівень статистичної значимості відмінностей показників між відповідними групами 1-а, 2-а, контрольна; % - відносна частка від дітей спостереження в %; іШВЛ - інвазивна штучна вентиляція легень; нШВЛ – неінвазивна штучна вентиляція легень, СРАР - терапія постійним позитивним тиском кисню; ХІ/НЕК – харчова інтолерантність/некротизуючий ентероколіт; ВШК – внутрішньоплуночковий крововилив; ВАП – відкрита артеріальна протока.

Клінічними симптомами ХІ/НЕК були: порушення толерантності до їжі, здуття живота та підвищення його чутливості при пальпації, гастро-інтестинальна кровотеча, закид жовчі по назогастральному зонду. Діагноз підтверджувався рентгенологічно відповідав стадії ІБ-ІІА [218]. ГІЕ виставлялась на основі наявних синдромів: зниженої або підвищеної нервово-рефлекторної збудливості; порушення м'язового тону; рухових порушень; оцінки за шкалою Апгар; особливостей неврологічної симптоматики в перші дні після народження (пригнічення або гіперзбудливість; асиметричність рефлексів, м'язового тону; гіпорексія; м'язова гіпо-/гіпертонія; вегето-вісцеральні порушення); даних нейросонограми та висновку невролога [265].

ХІ/НЕК достовірно частіше спостерігався в недоношених дітей другої групи, які перебували на виключно штучному годуванні в порівнянні з недоношеними дітьми першої групи, які годувались виключно материнським молоком: 30,0 % проти 9,4 % ( $p=0,041$ ). Нами встановлено прямий зв'язок між штучним вигодовуванням та розвитком ХІ/НЕК:  $r=0,252$ ;  $p=0,040$ .

Серед дітей, які мали ознаки ХІ/НЕК, тривалість ентеральної паузи склала  $2,9 \pm 1,96$  дні. 34,4 % ( $n=11$ ) новонароджених першої групи переважно через недостатні об'єми ентерального харчування вимагали інфузійної підтримки та часткового парентерального харчування більше ніж 7 днів. Серед дітей другої групи цей

показник склав 56,7 % (n=17). Суттєвої статистичної різниці між цими показниками не було (p=0,279). Хоча тривалість додаткової інфузійної підтримки статистично достовірно не відрізнялась в першій та другій групі (p=0,09), нами виявлено тенденцію до подовження інфузійної терапії серед дітей на штучному вигодовуванні: 5,0 (4,0; 9,0) в першій групі проти 7,5 (5,0; 12,0) в другій групі порівняння. У групі контролю 25 % (n=3) потребували дотаційної інфузії. Тривалість інфузійної терапії в цій групі склала 3,0 (3,0; 5,5) днів, що було значно нижче, ніж в групі дітей, що отримували суміш (p=0,002). Цей показник в групі контролю статистично достовірно не відрізнявся від показника в першій групі (p=0,082).

ГПЕ легкого ступеня тяжкості як основний діагноз переважала в групі контролю і складала  $91,7 \pm 8,0$  %. У групах недоношених дітей ознаки ГПЕ виходили на перший план значно рідше (p<0,05): 31,3 % в першій групі та 30,0 % в групі контролю. На рівні 95% достовірності не було статистичної різниці між частотою випадків ВШК, розширення лікворних просторів або формування субependимальних кіст серед груп обстеження (p>0,05).

Неонатальна жовтяниця спостерігалась у 87,5 % недоношених на грудному вигодовуванні, у 70,0 % недоношених, які мали штучне харчування та в 16,7 % в групі контролю, що було достовірно нижче ніж в групах недоношених новонароджених (p<0,01). Відмінностей за цим показником між першою та другою групами виявлено не було.

Діти груп обстеження не мали вроджених вад серця, які б вимагали медикаментозної корекції серцевої недостатності. Проте, відмічалась тенденція до збільшення випадків відкритої артеріальної протоки (ВАП) серед недоношених дітей на штучному вигодовуванні порівняно з немовлятами, яких годували грудним молоком (p=0,107). В групі контролю відносно першої групи також спостерігалось тенденція до відносного збільшення випадків ВАП, що можна пов'язати з особливостями спостереження доношених новонароджених немовлят. Статистично значимих відмінностей за цим показником виявлено не було.

У першій групі новонароджених анемія першого ступеня зустрічалась у 12 дітей (37,5 %); другого ступеня – 2 дітей (6,3 %). У другій групі спостереження 8 дітей



(26,7 %) мали анемію першого ступеня. Анемії другого ступеня серед дітей на штучному вигодовуванні не було. Достовірної різниці між групами недоношених дітей за частотою випадків анемії виявлено не було ( $p > 0.05$ ). В групі контролю ця патологія взагалі не зустрічалась.

У 6 дітей (18,8 %) на грудному вигодовуванні встановлено ретинопатію першого ступеня проти 5 дітей (16,7 %) на штучному вигодовуванні. Більш важкі форми ретинопатії зустрічались лише в першій групі спостереження: 1 випадок другого ступеня (3,1 %) і 2 випадки третього ступеня (6,3 %). Різниці між частотою цих випадків не було ( $p > 0,05$ ).

Найчастішим неврологічним синдромом серед недоношених новонароджених був синдром зниженої нервово-рефлекторної збудливості: спостерігався в 27 дітей (84,4 %) першої групи; 29 дітей (96,7 %) другої групи, що не мало суттєвої різниці ( $p = 0,197$ ). В групі контролю частота випадків цього синдрому становила 58,3 % (7 дітей), що мало суттєву різницю з групою на штучному вигодовуванні ( $p = 0,005$ ) та тенденцію до збільшення порівняно з групою на грудному вигодовуванні ( $p = 0,105$ ). Наявність синдрому зниженої нервово-рефлекторної збудливості є характерним для передчасно народжених немовлят [287].

Антибіотикотерапії потребували після народження 30 дітей (93,8 %) першої групи, 27 дітей другої групи (90,0 %) та 10 дітей (83,3 %) групи контролю, що не супроводжувалось статистичною різницею ( $p > 0,05$ ).

Середній вік дітей на момент обстеження становив 8 (6; 11) днів. Загальний стан дітей на момент забору матеріалу був середнього ступеня важкості, стабільний або відносно задовільний. Всі діти харчувались ентерально, не мали виражених ознак токсикозу та грубої неврологічної симптоматики; були гемодинамічно стабільні та не потребували кисневої підтримки.

#### *Загальноклінічні лабораторні показники*

У всіх немовлят груп спостереження показник С-реактивного білку був негативний.

Значення клінічних лабораторних показників на момент забору матеріалу відображено в таблиці 3.4.

## Показники клінічного аналізу крові

Показник	Групи дослідження			Значимість різниці між групами
	Діти до 37 тижнів гестації на грудному вигодовуванні (n=32)	Діти до 37 тижнів гестації на штучному вигодовуванні (n=30)	Контрольна група (n=12)	
Лейкоцити, $10^9$ , Ме (25 %; 75 %)	11 (9,9; 14,5)	12,5 (9,7; 14,8)	9,9 (8,9; 13,0)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,639$ ; $p_{2-к}=0,415$
Сегментоядерні нейтрофіли, %, Ме (25 %; 75 %)	38,0 (32,0; 51,0)	41,5 (35,0; 45,0)	51,5 (44,5; 58,0)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,035$ ; $p_{2-к}=0,026$
Паличкоядерні нейтрофіли, %, Ме (25 %; 75 %)	3 (2; 5)	4 (2; 6)	3,5 (2; 5)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=1,0$ ; $p_{2-к}=1,0$
Лімфоцити, %, Ме (25 %; 75 %)	40,0 (34,0; 56,0)	42,5 (36,0; 49,0)	36,5 (28,5; 46,5)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,558$ ; $p_{2-к}=0,569$
Гемоглобін, г/л, М (SD)	167,5 (6,5)	158,2 (5,7)	165,7 (6,7)	* $p_{1-2}=0,513$ ; $p_{1-к}=0,989$ ; $p_{2-к}=0,842$
Тромбоцити, $10^9$ , Ме (25 %; 75 %)	241,0 (185,5; 350,5)	283,0 (177,0; 341,0)	239,0 (177,5; 271,5)	$p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-к}=0,668$ ; $p_{2-к}=0,415$

Примітки: \* - за критерієм Тьюкі; в інших випадках – за критерієм Данна;  $p_{1-2}$ ,  $p_{1-к}$ ,  $p_{2-к}$  – рівень статистичної значимості відмінностей показників між відповідними групами 1-а, 2-а, контрольна.

Діти з груп недоношених дітей мали статистично значно вищі відносні рівні сегментоядерних нейтрофілів ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з групою контролю. Між першою та другою групами не було відмінностей за цим показником ( $p > 0,05$ ). Інших достовірних відмінностей за лабораторними показниками виявлено не було.

Таким чином, групи недоношених новонароджених були відносно однорідні за основними показниками і могли бути порівняними.

### **3.2. Експресія факторів транскрипції в дітей груп обстеження**

Було проведено дослідження рівня експресії факторів транскрипції Tbet та Foxp3 в клітинах зішкребу букальної слизової оболонки. Середній вік немовлят на момент забору матеріалу становив 8 (6; 11) днів. Порівняння показників в групах дослідження проводили відносно усередненого рівня експресії факторів транскрипції в групі контролю (доношені новонароджені на грудному вигодовуванні), який приймали за 1,0 умовну одиницю (ум. од.).

#### **3.2.1. Експресія фактору транскрипції FOXP3**

Аналіз рівня фактору транскрипції FOXP3 показав, що у всіх недоношених дітей відносний рівень експресії FOXP3 був суттєво нижчим, ніж в доношених (0,14 (0,06; 0,31) ум. од.,  $p < 0,001$  за критерієм Манна-Уїтні). Проте найнижчий рівень спостерігався в групі недоношених дітей, які отримували суміш – 0,08 (0,04; 0,16) ум. од. проти 0,21 (0,14; 0,38) ум. од. у недоношених дітей на грудному вигодовуванні ( $p < 0,05$  за критерієм Данна) та порівняно з 1,0 (1,0; 1,0) ум. од. в групі контролю ( $p < 0,001$ ) (рис. 3.4).

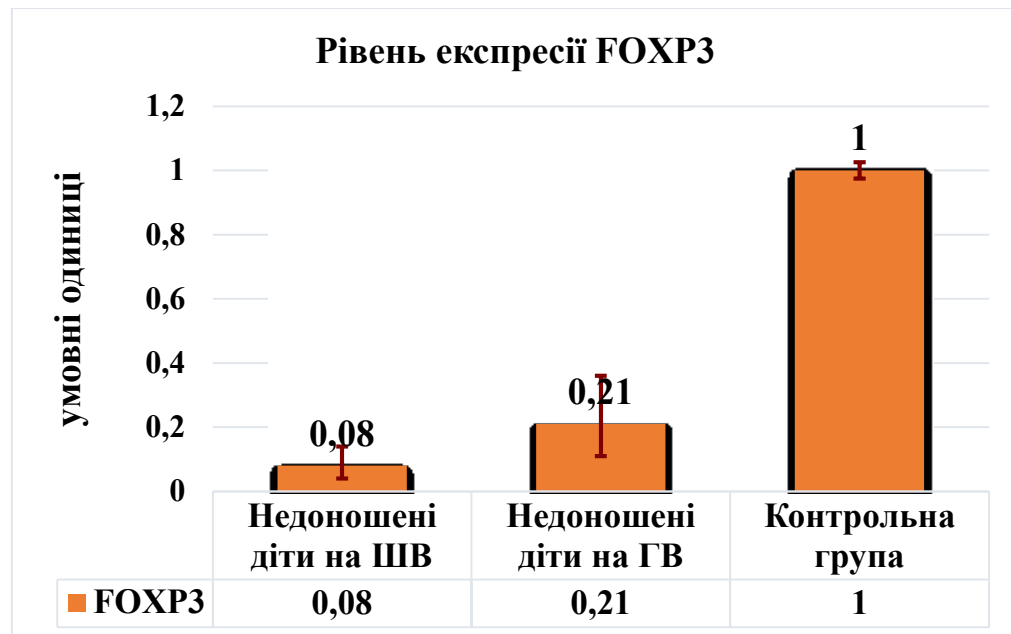


Рис. 3.4. Середні рівні (Me (25 %; 75 %)) нормалізованих показників експресії фактору транскрипції FOXP3 в клітинах букального епітелію передчасно народжених дітей та групи контролю.

Примітка: ГВ – грудне вигодовування, ШВ – штучне вигодовування.

Оцінка зв'язку зміни рівня експресії FOXP3 в клітинах зішкребу букальної слизової оболонки та клінічного стану немовлят виявила наявність зворотної кореляції між рівнем експресії FOXP3 та наявною клінікою ХІ/НЕК: –  $r = -0,246$ ,  $p = 0,037$ . Встановлено достовірне зниження експресії FOXP3 у дітей з появами ХІ/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 (рис. 3.5).

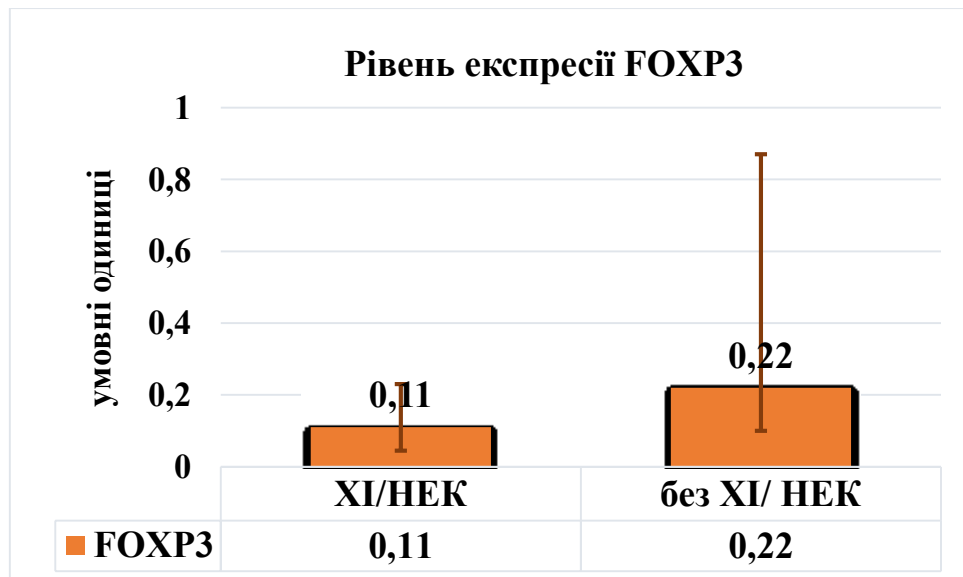


Рис. 3.5. Середні рівні (Me (25 %; 75 %)) нормалізованих показників експресії фактору транскрипції FOXP3 в клітинах букального епітелію новонароджених з XI/НЕК та без НЕК.

Примітка: XI/ НЕК – харчова інтолерантність/некротизуючий ентероколіт.

Результати проведеного дослідження свідчать про зниження рівня експресії FOXP3 в недоношених новонароджених на штучному вигодовуванні з плином часу. Нами був встановлений зворотній кореляційний зв'язок між рівнем експресії FOXP3 та віком на момент забору матеріалу ( $r=-0,374$ ;  $p=0,041$ ).

### 3.2.2. Експресія фактору транскрипції *T-bet*

Експресія *T-bet* у клітинах зішкребу букальної слизової оболонки була вищою в недоношених дітей, та найвищий рівень був в групі передчасно народжених дітей на штучному вигодовуванні ( $p<0,001$ ): 2,4 (1,98; 3,84) ум. од. в недоношених дітей, що отримували суміш, проти 1,48 (1,13; 2,22) ум. од. в недоношених дітей на грудному вигодовуванні порівняно з контрольною групою 1,0 (1,0; 1,0) ум. од. (рис. 3.6). Нами доведено прямий зв'язок між ШВ і рівнем *T-bet* ( $r=0,370$ ;  $p<0,004$ ).

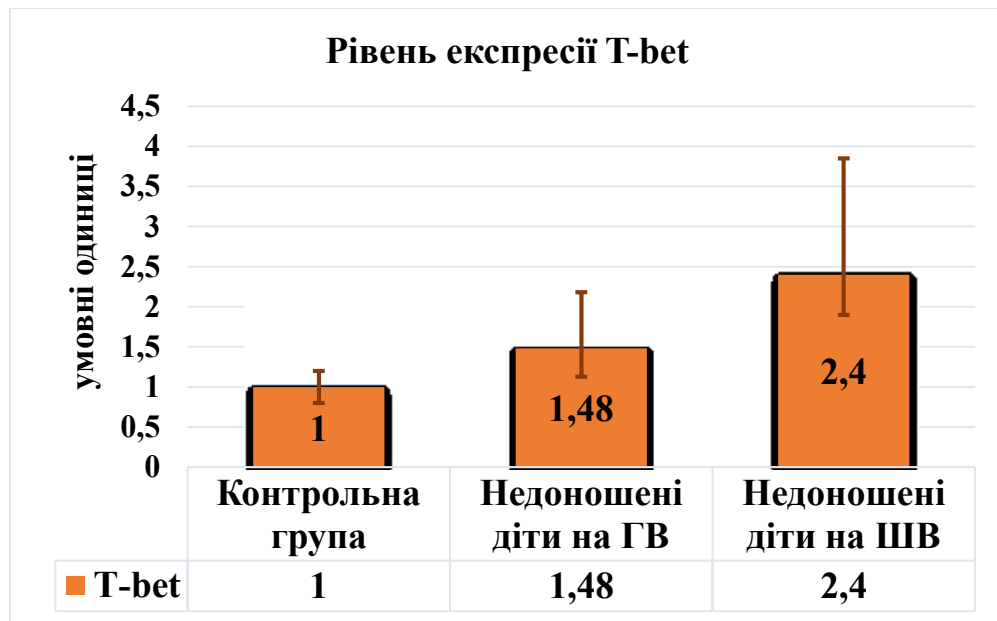


Рис. 3.6. Середні рівні (Me (25 %; 75 %)) нормалізованих показників експресії фактору транскрипції T-bet в клітинах букального епітелію передчасно народжених дітей та групи контролю.

Примітка: ГВ – грудне вигодовування, ШВ – штучне вигодовування.

Попарне порівняння виявило вищий рівень експресії T-bet у дітей з клінікою XI/ НЕК (2,36 (1,94; 3,17) ум. од.) порівняно з новонародженими без такої патології (1,74 (1,01; 3,27) ум. од.) при  $p=0,002$  за критерієм Манна-Уїтні (рис.3.7). Було встановлено прямий зв'язок між рівнем T-bet та розвитком XI/НЕК ( $r=0,271$ ;  $p=0,021$ ).

Отже, штучне вигодовування сприяє зниженню рівня експресії FOXP3 та підвищенню рівня експресії T-bet. Експресія FOXP3 протягом першого місяця життя слабшає при відсутності грудного молока в харчуванні немовляти. Зниження FOXP3 та підвищення T-bet також супроводжує розвиток XI/НЕК.

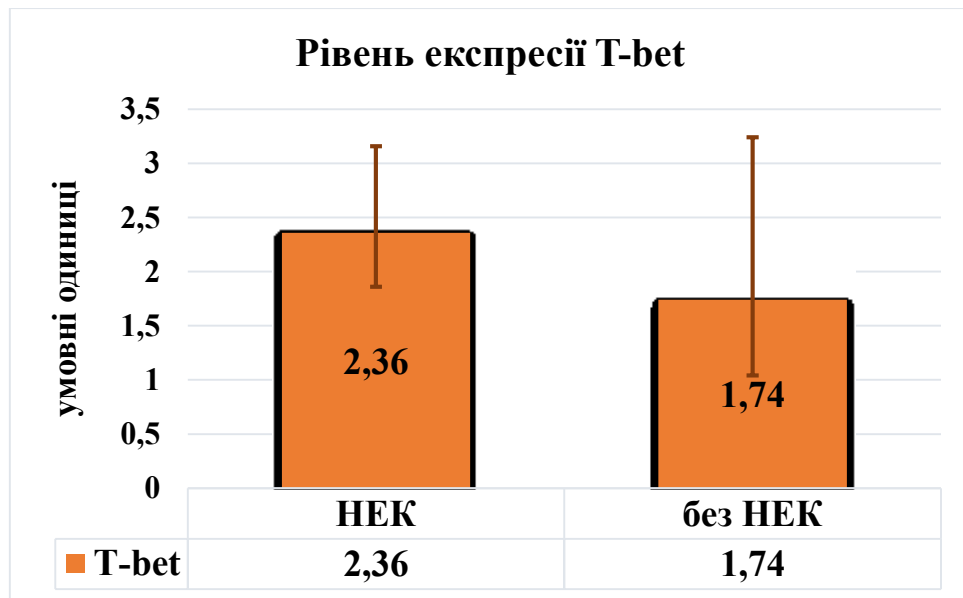


Рис. 3.7. Середні рівні (Me (25%; 75%)) нормалізованих показників експресії фактору транскрипції T-bet в клітинах букального епітелію новонароджених з XI/НЕК та без XI/НЕК.

Примітка: XI/НЕК – харчова інтолерантність/некротизуючий ентероколіт.

### **3.3. Експресія мікроРНК у грудному молоці матерів новонароджених груп порівняння**

Було проведено порівняння рівня експресії miR-155 та miR-148a в грудному молоці матерів передчасно народжених дітей на грудному вигодовуванні та матерів дітей контрольної групи (доношені діти на грудному вигодовуванні). Статистичний аналіз проводили відносно визначеного усередненого рівня експресії відповідних мікроРНК в групі контролю, який умовно приймали за 1,0 ум.од. Середній вік дітей на момент забору матеріалу становив 8 (6; 11) днів.

#### **3.3.1. Експресія miR-155 у грудному молоці матерів новонароджених груп порівняння**

Оцінка рівня експресії miR-155 в грудному молоці матерів недоношених новонароджених на грудному вигодовуванні показала перевищення відповідного показника в групі контролю від 0,5 до 15,3 разів, що в середньому склало 6,2 (4,1; 9,2) ум.од. ( $p < 0,001$ ). Більше того, був визначений зворотній зв'язок помірної сили рівня

експресії miR-155 в передчасно народжених новонароджених зі строком гестації:  $r=-0,421$ ;  $p=0,020$ . Експресія miR-155 в грудному молоці матерів асоціювалась з довшим безводним проміжком при передчасному розриві плодових оболонок:  $r=0,917$ ,  $p=0,001$ .

Аналіз впливу miR-155 грудного молока виявив прямий помірний кореляційний зв'язок рівня цієї мікроРНК в грудному молоці матері з рівнем експресії фактору транскрипції FOXP3 в дитини:  $r=0,442$ ,  $p=0,014$  (рис. 3.8).

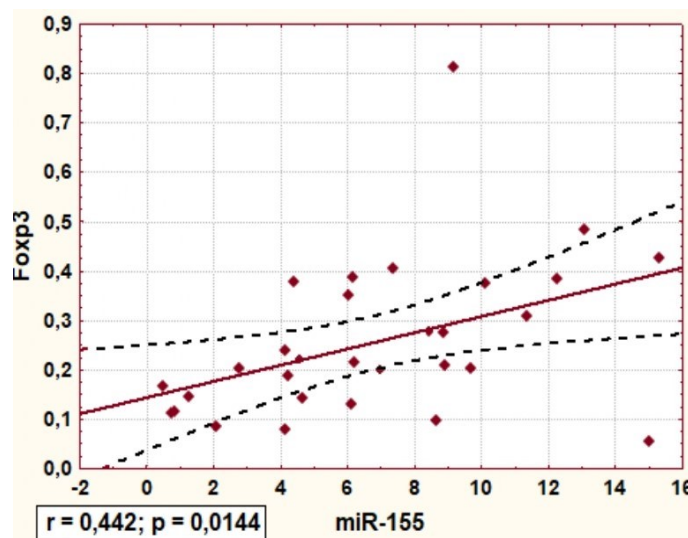


Рис. 3.8. Взаємозв'язок між відносними рівнями експресії miR-155 грудного молока матері та рівня експресії FOXP3 у клітинах слизової оболонки недоношених новонароджених, які знаходились на ГВ.

### ***3.3.2. Експресія miR-148a в грудному молоці матерів новонароджених груп порівняння***

Отримані результати дослідження рівня експресії miR-148a в грудному молоці матерів передчасно народжених дітей на грудному вигодовуванні свідчать про достовірне нижчий рівень цієї мікроРНК в цій групі порівняно з групою контролю ( $p<0,001$ ): 0,089 (0,048; 0,142) ум. од. проти 1,0 (1,0; 1,0) ум.од. Підвищення рівня miR-148a в материнському грудному молоці асоціювалось з ознаками респіраторного дистрес-синдрому в новонароджених ( $r=0,404$ ,  $p=0,027$ ). Дана кореляція опосередковано підтверджується посиленням експресії miR-148a в грудному молоці



матерів при наявних рентгенологічних змінах, що характерні для хвороби гіалінових мембран ( $r=0,385$ ,  $p=0,036$ ) та при необхідності тривалої СРАР - терапії (більше 1 доби) ( $r=0,542$ ,  $p=0,002$ ). Експресія miR-148a в материнському грудному молоці була сильніша при діагностованому внутрішньошлунковому крововиливі у дитини:  $r=0,408$ ,  $p=0,025$ .

Подальший статистичний аналіз показав наявність зворотного зв'язку між рівнем експресії miR-148a та рівнем фактору транскрипції T-bet:  $r=-0,371$ ;  $p=0,043$  (рис. 3.9).

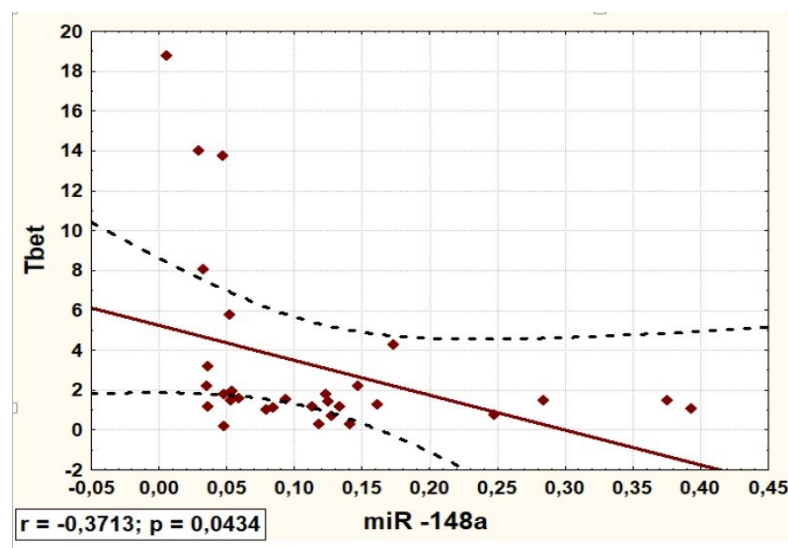


Рис. 3.9. Взаємозв'язок між відносними рівнями експресії miR-148a грудного молока матері та рівня експресії T-bet у клітинах зішкребу букальної слизової оболонки недоношених новонароджених, які знаходились на грудному вигодовуванні.

Отже, в грудному молоці матерів передчасно народжених дітей, які мали проблеми з адаптацією після народження та перебували на грудному вигодовуванні, спостерігався вищий рівень miR-155 та відносно нижчий рівень miR-148a. Експресія miR-148a виявилась сильнішою в материнському молоці при наявному респіраторному дистрес-синдромі новонародженого.

Аналізуючи представлені дані, можна зробити висновок, що мікроРНК грудного молока матері асоціюється зі зміною рівня експресії сигнальних білків, що

контролюють запальний процес в дитини. МікроРНК-155, концентрація якої суттєво підвищується в материнському молоці при передчасних пологах, пов'язана з підвищенням рівня експресії FOXP3, що знижується при ознаках ХІ/НЕК. МікроРНК-148а, яка в меншій кількості представлена в грудному молоці матерів при передчасному народженні немовляти та патологічному перебігу його адаптаційного періоду, асоціюється зі зниженням рівня експресії T-bet. Підвищення рівня експресії T-bet супроводжує розвиток ХІ/НЕК в новонародженого. Таким чином, мікроРНК грудного молока матері вірогідно модифікує запальну відповідь новонародженого і перешкоджає розвитку ХІ/НЕК.

**Матеріали даного розділу дослідження відображені в наступних публікаціях:**

1. Abaturov OE, Tovarnytska AO. Anti-inflammatory effect of breast milk miR-148a on the state of mucous membranes in premature newborns. *Child`s Health (Ukraine)*, 2023, 18 (1). С. 59-66. ISSN 2224-0551 (print), 2307-1168 (online). <https://doi.org/10.22141/2224-0551.18.1.2023.1556>.

2. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Вплив miR-155 грудного молока на стан здоров'я недоношених новонароджених. *Child`s Health (Ukraine)*, 2022,17(7), 347–353. ISSN 2224-0551 (print), ISSN 2307-1168 (online). <https://doi.org/10.22141/2224-0551.17.7.2022.1539>.

3. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Фактор транскрипції T-bet — діагностичний маркер розвитку некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених. *Сучасна педіатрія (Україна)*. 2022, 8 (128). С. 6-11. ISSN 2663-7553 (print); 2706-6134 (online). doi 10.15574/SP.2022.128.6.

4. Tovarnytska A. MiR-155 in maternal breast milk is a natural modulator of inflammatory response for preterm neonates. XXI International Scientific and Practical Conference “Information, modern and recent theories of development”, Madrid, Spain, 29-31 May, 2023. <https://eu-conf.com/events/informational-modern-and-recent-theories-of-development/>.

5. Абатуров ОЄ. Товарницька АО. Усна доповідь, тези. Епігенетичний вплив грудного молока на імунну толерантність в передчасно народжених дітей. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «ХІ наукова сесія інституту гастроентерології НАМН України. Новітні технології в теоретичній та клінічній гастроентерології» м. Дніпро, 14-15 червня 2023.

## РОЗДІЛ 4

### РЕТРОСПЕКТИВНИЙ АНАЛІЗ ПЕРЕБІГУ НЕОНАТАЛЬНОГО ПЕРІОДУ В ДІТЕЙ, ЩО НАРОДИЛИСЬ ПЕРЕДЧАСНО

З метою оцінки особливостей перебігу неонатального періоду в дітей, що народились передчасно, нами проведено ретроспективний аналіз історій хвороби дітей зі строком гестації до 37 тижнів, які отримували лікування в неонатальних відділеннях. Було проаналізовано 300 історій хвороби.

Критеріями включення були: гестаційний вік немовлят до 37 тижнів, перебування на стаціонарному лікуванні в неонатальному відділенні.

Критеріями виключення були: гестаційний вік новонароджених старше 37 тижнів, дуже важкий клінічний стан новонароджених.

Було виділено дві групи порівняння:

- перша група - недоношені новонароджені, які годувались грудним молоком відразу після народження (102 дитини);
- друга група, контрольна - недоношені новонароджені, які в якості першого ентерального годування отримали суміш (198 дитини).

#### *4.1. Клініко-анамнестичні особливості недоношених дітей з груп ретроспективного аналізу*

##### *4.1.1. Клініко-анамнестичні особливості загальної групи недоношених новонароджених*

Середній гестаційний вік дітей, що потрапили в дослідження, становив 33,0 (31,0; 34,0) тижні. Не було різниці між розподілом дітей за гендерною ознакою ( $p > 0,05$ ): загальна кількість хлопчиків склала 160 дітей (53,3 %); дівчат – 140 дітей (46,7 %).

Серед екстрагенітальних хвороб матері найбільш розповсюдженою була анемія – 109 випадків (36,3 %). Інфекцію сечовивідних шляхів, в тому числі гострий та хронічний пієлонефрит, бактеріурію, було діагностовано в 58 випадках (19,3 %). Розподіл за частотою виявлення екстрагенітальних захворювань матері, які виявляли найчастіше, представлений на рисунку 4.1.



Рис. 4.1. Частота екстрагенітальної патології серед матерів (%).

Примітка: ІСВШ – інфекція сечовивідних шляхів; АГ-артеріальна гіпертензія; ЦД – цукровий діабет; ВІЛ – вірус імунодефіциту людини; ЩЗ-щитоподібна залоза.

Найчастішою можливою причиною передчасних пологів була наявність інфекційного захворювання в матері під час вагітності (екстрагенітального та/або генітального): 93 випадки (31,0 %). Передчасний розрив плодових оболонок (ПРПО) зустрічався у 76 вагітних (25,3 %). Загроза викидня та/або передчасних пологів спостерігалась у 87 жінок, що склало 29,0 % всієї когорти. В 148 випадках (49,3 %) жінкам проводився кесарів розтин. Розподіл за частотою станів, що могли призвести до передчасних пологів, показаний на рисунку 4.2.

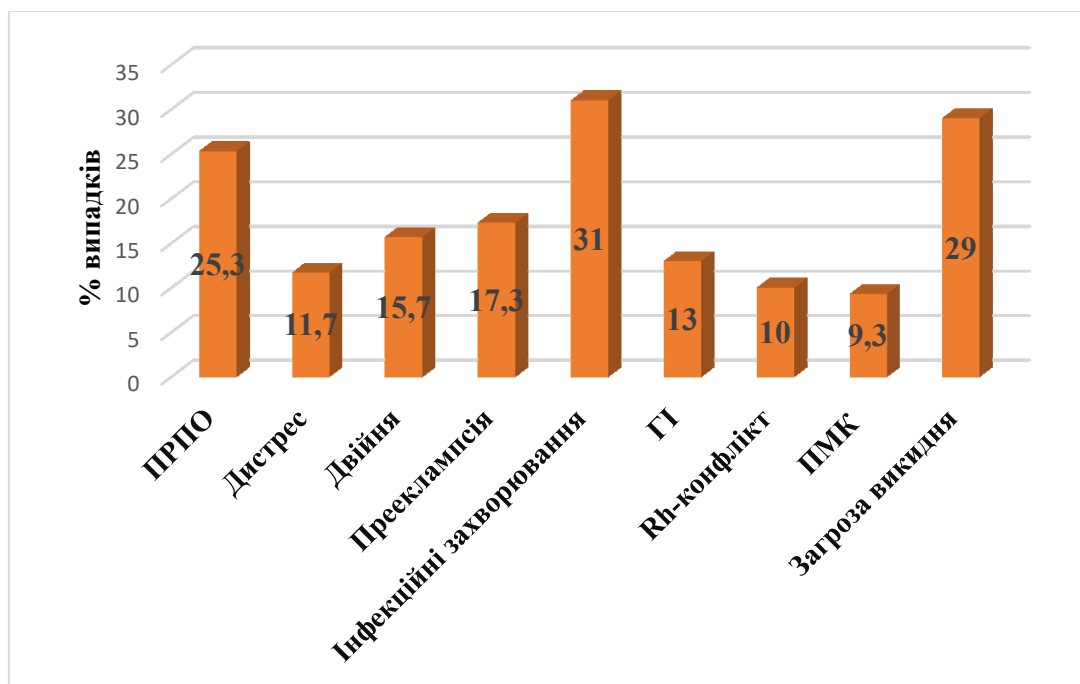


Рис. 4.2. Частота діагностованих станів, що потенційно могли призвести до передчасних пологів (%)

Примітка: ПРПО- передчасний розрив плодових оболонок; інфекційні захворювання – гострі генітальні та екстранітальні інфекційні хвороби під час вагітності; ГІ-генітальна інфекція (вагіноз, кольпіт), Rh-конфлікт-резус-конфлікт; ПМК – порушення маткового кровотоку.

Серед основних причин початку штучного вигодовування після народження лідувала гіпогалактія – 98/49,5 %; потенційне порушення толерантності до їжі в немовляти– 34/17,2 %; прийом матір'ю медикаментів, при якому грудне вигодовування протипоказане (переважно антигіпертензивні препарати) – 31/15,6 %. Резус-конфлікт з високим титром резус-антитіл як причина введення суміші становив 9/4,5 % Відмова матері від годування груддю або її психічні розлади траплялись в 3/1,4 % випадків. Розподіл за причинами початку штучного вигодовування недоношених новонароджених показано на рисунку 4.3.

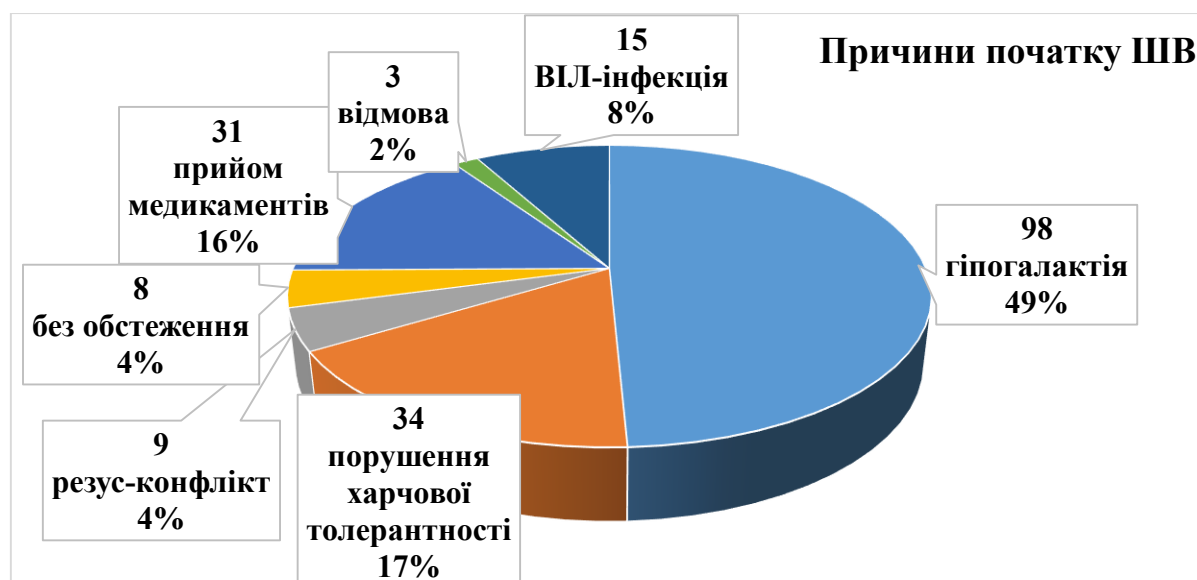


Рис. 4.3. Причини початку штучного вигодовування в усіх недоношених немовлят

Примітка: ШВ - штучне вигодовування, ВІЛ-інфекція – вірус імунодефіциту людини

Після пологів шляхом кесаревого розтину (n=146) лише 40 (27,4 %) матерів починали годувати новонароджених грудним молоком. Дуже часто введення суміші спостерігалось після закінчення ентеральної паузи – у 80 з 90 випадків (88,9 %). 40 немовлят (20,2 %) з групи штучного вигодовування згодом були переведені на повне або змішане грудне вигодовування.

#### ***4.1.2. Порівняння клініко-анамнестичних особливостей групи недоношених дітей на грудному вигодовуванні та недоношених дітей на штучному вигодовуванні***

##### *Особливості антенального періоду*

Новонароджені немовлята, які з народження харчувались грудним молоком, мали пізніший строк гестації порівняно з групою на штучному вигодовуванні ( $p < 0,001$ ): 34,0 (32,0; 35,0) проти 32,0 (30,0; 34,0). Маса при народженні також була достовірно вища в першій групі ( $p < 0,001$ ): 2065 (1800; 2400) г проти 1765 (1360; 2100) г. Диспропорція тіла з тенденцією до переважання обводу голови над обводом грудної клітини, що є однією з ознак затримки внутрішньоутробного розвитку [288], частіше зустрічалась в другій групі немовлят ( $p = 0,009$ ). Частіше немовлята, які отримували з

народження суміш, були від 2-4-х пологів ( $p=0,002$ ). Також в другій групі, порівняно з першою, було менше хлопчиків ( $p=0,02$ ): 64 дитини (62,7 %) в першій групі проти 96 дітей (48,5 %).

ВІЛ – інфекція спостерігалась достовірно частіше в матерів дітей групи на штучному годуванні ( $p=0,014$ ): 1 випадок (1,0 %) в першій групі проти 15 випадків (7,5 %) в другій групі. Вибір штучного харчування для дітей від матерів з ВІЛ є обгрунтованим і рекомендованим чинними протоколами лікування ВІЛ-інфекції [289]. Не було різниці між частотою іншої екстрагенітальної патології матері в групах порівняння ( $p>0,05$ ).

Розподіл за екстрагенітальною патологією серед матерів груп порівняння представлений в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

**Порівняння першої та другої груп за екстрагенітальною патологією матерів**

Показник	Матері новонароджених на грудному вигодовуванні (n=102)	Матері новонароджених на штучному вигодовуванні (n=198)	Значимість різниці між групами (p)
ІСВШ, n (%)	19(18,6)	39(19,7)	$p=0,825$
Анемія, n(%)	38(37,2)	71(35,9)	$p=0,812$
Фіброміома, n (%)	5(4,9)	11(5,5)	$p=0,812$
АГ, n (%)	5(4,9)	21(10,6)	$p=0,097$
ЦД, n (%)	7(6,9)	12(6,0)	$p=0,787$
Міопія, n (%)	6(5,9)	22(11,1)	$p=0,141$
ВІЛ, n (%)	1(1,0)	15(7,5)	* $p=0,017$
Хвороби ЩЗ, n (%)	11(10,8)	10(5)	$p=0,066$
Тромбофілія, n (%)	5(4,9)	9(4,5)	$p=0,890$
Ожиріння, n (%)	7(6,9)	13(6,6)	$p=0,923$

Примітка: ІСВШ – інфекція сечовивідних шляхів; АГ-артеріальна гіпертензія; ЦД – цукровий діабет; ВІЛ – вірус імунодефіциту людини; ЩЗ-щитоподібна залоза; p – значимість відмінностей: \*- за точним критерієм Фішера, в інших випадках – за критерієм  $\chi^2$  Пірсона



Порівняння частоти чинників, які потенційно могли призвести до передчасних пологів, показав, що хоча різниці між частотою ПРПО в групах порівняння не було ( $p=0,045$ ), тривалість безводного проміжку значно довше була в групі на штучному годуванні ( $p=0,002$ ): 20,0 (2,5; 79,0) годин проти 148,0 (29,0; 291,0) годин. Вірогідно, початок штучного годування можливо пояснити очікуванням швидкої реалізації інфекції, отриманої анте- та інтранатально. Преекламсія частіше спостерігалась серед матерів другої групи ( $p=0,002$ ) і становила 8 випадків (7,8 %) в першій групі та 44 випадки (22,2 %) в другій групі. Початок годування сумішшю в другій групі дітей був певною мірою пов'язаний з призначенням матері антигіпертензивних препаратів, що протипоказані при грудному вигодовуванні, та її важким післяпологовим станом.

Дистрес плода під час пологів спостерігався статистично достовірно частіше в дітей другої групи ( $p=0,026$ ): 6 випадків (5.9 %) проти 29 випадків (14,6 %). Нами не виявлено відмінностей між частотою випадків резус-конфлікту, двійні, інфекційні захворювань матері під час вагітності в групах порівняння ( $p>0,05$ ). Більш детально відмінності між частотою станів, що могли призвести до передчасних пологів, висвітлені в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

**Порівняння першої та другої груп за станами, що могли призвести до передчасних пологів**

Показник	Матері новонароджених на грудному вигодовуванні (n=102)	Матері новонароджених на штучному вигодовуванні (n=198)	Значимість різниці між групами (p)
ПРПО, n (%)	33 (32,4)	43 (21,7)	p=0,045
Тривалість безводного проміжку, години, Me (25 %; 75 %)	20,0 (2,5; 79,0)	148,0 (29,0; 291,0)	*p=0,002
Дистрес плода, n (%)	6 (5,9)	29 (14,6)	p=0,026
Двійня, n (%)	19 (18,6)	28 (14,1)	p=0,312
Преeklampсія, n (%)	8 (7,8)	44 (22,2)	p=0,002
Інфекційні хвороби під час вагітності, n (%)	28 (27,5)	65 (32,8)	p=0,341
Генітальні інфекції, n (%)	14 (13,7)	25 (12,6)	p=0,789
Резус-конфлікт, n (%)	11 (10,8)	19 (9,6)	p=0,746
ПМК, n (%)	10 (9,8)	22 (11,1)	p=0,729
Загроза викидня, n (%)	34 (33,3)	53 (26,8)	p=0,236

**Примітка:** ПРПО- передчасний розрив плодових оболонок; генітальна інфекція: вагіноз, кольпіт; інфекції – екстрагенітальні та генітальні; ПМК – порушення маткового кровотоку; p - значимість відмінностей: \*- за критерієм Манна-Уїтні, в інших випадках - за критерієм  $\chi^2$  Пірсона.

*Особливості інтранатального, раннього неонатального періодів*

Дітей, що народились шляхом кесаревого розтину, частіше починали ентерально годувати сумішшю ( $p=0,043$ ): 106 новонароджених (53,5 %) проти 42 новонароджених (41,2 %). Між групами порівняння не було відмінностей в показниках ОША на першій і п'ятій хвилині ( $p>0,05$ ). Проте достовірно частіше немовлятам, які потребували інвазивної респіраторної підтримки відразу після народження, розпочинали штучне вигодовування ( $p<0,001$ ). Переважання штучного вигодовування серед дітей на інвазивній ШВЛ зберігалось до кінця лікування ( $p<0,001$ ). Новонароджені груп обстеження не відрізнялись за частотою проведення СРАР відразу після народження ( $p>0,05$ ). Відмінностей в тривалості інвазивної та неінвазивної підтримки в групах порівняння також не знайдено ( $p>0,05$ ).

Початок ентерального годування в другій групі дітей був більш відстрочений ( $p<0,001$ ): на 2,0 (1,0; 6,0) день життя проти 1,0 (1,0; 1,0). Проте, не виявлено різниці в тривалості періоду трофічного ентерального харчування в обох групах ( $p=0,185$ ). В той же час, тривалість необхідності інфузійної підтримки була довше при штучному вигодовуванні ( $p=0,001$ ): 6,0 (3,0; 13,0) днів проти 10,0 (6,0; 17,0). В дітей на штучному вигодовуванні визначався швидший щоденний приріст маси тіла ( $p<0,001$ ). Особливості перебігу інтранатального та раннього неонатального періодів показано в таблиці 4.3.

*Таблиця 4.3*

**Порівняння груп за особливостями перебігу інтранатального та раннього неонатального періодів**

Показник	Новонароджені на грудному вигодовуванні (n=102)	Новонароджені на штучному вигодовуванні (n=198)	Значимість різниці між групами (p)
КР, n (%)	42 (41,2)	106 (53,5)	p=0,043

ОША 1 хв., бал, Ме (25 %; 75 %)	6,0 (5,0; 7,0)	6,0 (5,0; 7,0)	p=0,404
ОША 5 хв., бал, Ме (25 %; 75 %)	7,0 (6,0;7,0)	7,0 (6,0;7,0)	p=0,889
Необхідність в СРАР відразу після народження, n (%)	43(42,2)	75(37,9)	p=0,473
Необхідність в тривалій СРАР, n (%)	25(24,5)	70(36,4)	p=0,056
Тривалість СРАР, дні, Ме (25 %; 75 %)	2,0 (1,0; 7,0)	3,0 (1,5; 6,5)	p=0,657
Необхідність в іШВЛ відразу після народження, n (%)	7(6,9)	51(25,8)	p<0,001
Необхідність в тривалій іШВЛ, n (%)	21(20,6)	80(40,4)	p<0,001
Тривалість іШВЛ, дні, Ме (25 %; 75 %)	6,8 (5,0;7,0)	5,0 (2,0; 8,0)	p=0,368
Початок ентерального харчування, дні, Ме (25 %; 75 %)	1,0 (1,0; 1,0)	2,0 (1,0; 6,0)	p<0,001
Тривалість трофічного харчування, дні, Ме (25 %; 75 %)	2,0 (2,0; 2,0)	4,5 (2,0; 8,0)	p=0,185
Тривалість інфузійної підтримки, дні, Ме (25 %; 75 %)	6,0 (3,0; 13,0)	10,0 (6,0; 17,0)	p=0,001
Щоденний приріст ваги, г, Ме (25 %; 75 %)	14,5 (5,0; 22,6)	21,4 (16,7; 27,6)	p<0,001

Примітки: ОША - оцінювання за шкалою Апгар; КР - кесарів розтин; іШВЛ - інвазивна штучна вентиляція легень; СРАР - терапія постійним позитивним тиском кисню; р– рівень статистичної значимості відмінностей показників: \* – за критерієм Манна-Уїтні; в інших випадках - за критерієм  $\chi^2$  Пірсона.

#### *Клініко-лабораторні особливості дітей груп порівняння*

Було порівняно показники загального аналізу крові в новонароджених перед випискою зі стаціонару. Показник гемоглобіну був достовірно вищий в першій групі дітей ( $p < 0,001$ ): 165 (127; 185) г/л проти 130 (113; 153) г/л. Не дивлячись на те, що в групах не було відмінностей між середніми абсолютними значеннями лейкоцитів, у дітей на грудному вигодовуванні спостерігався вищий відсоток сегментоядерних нейтрофілів ( $p = 0,006$ ): 52 (47; 60) % проти 29 (23; 36) %. В той же час, відносний рівень моноцитів переважав в другій групі немовлят ( $p = 0,002$ ): 9,0 (6,0; 12,0) % проти 7,0 (5,0; 10,0) %. Діти на штучному вигодовуванні мали вищі показники тромбоцитів (342,5 (262,0; 396,0) Г/л проти 289,0 (222,0; 370,0) Г/л. За рівнем С-реактивного білку на піку активності патологічних процесів різниці між групами не виявлено.

#### ***4.1.3. Клінічні ускладнення недоношеності в неонатальному періоді***

Найчастішим ускладненням недоношеності був розвиток РДС-синдрому (Рис.4.5): 173 випадки (57,7 % всіх дітей). Діти, що з народження отримували суміш, достовірно частіше мали розвиток синдрому дихальних порушень ( $p < 0,001$ ): 129 дітей другої групи (65,2 %) проти 44 дітей першої групи (43,1 %). Різниці між частотою випадків розвитку дихальної недостатності II ступеня в групах виявлено не було (24,5 % ( $n=25$ ) в першій групі проти 26,3 % ( $n=52$ ) в другій групі при  $p=0,742$ ), проте суттєво частіше діагностували дихальну недостатність I та III ступенів у новонароджених другої групи. В 2,3 рази частіше траплялись випадки дихальної недостатності I ступеня в другій групі ( $p=0,012$ ): 8,8 % ( $n=9$ ) першої групи проти 20,2 % ( $n=40$ ) другої групи ( $p=0,012$ ). Різниця між частотою випадків дихальної недостатності III ступеня була також висока: 12,7 % ( $n=13$ ) новонароджених першої групи проти 25,8 % ( $n=51$ ) другої групи ( $p=0,009$ ).

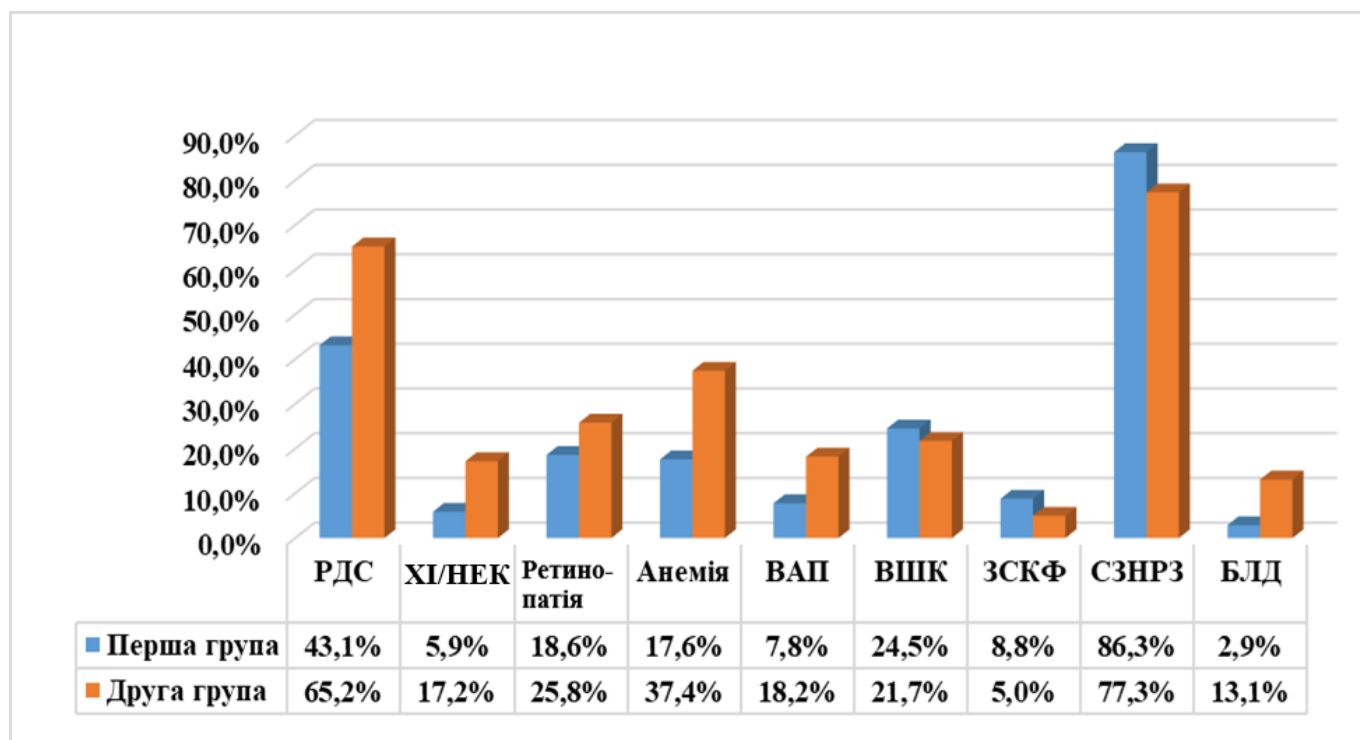


Рис. 4.5. Порівняння новонароджених на грудному та штучному вигодовуванні за частотою виявлення деяких патологічних станів.

Примітка: перша група – діти на грудному вигодовуванні; друга група – діти на штучному вигодовуванні; РДС - респіраторний дистрес-синдром; ХІ – харчова інтолерантність; НЕК-некротизуючий ентероколіт; ВАП – відкрита артеріальна протока; ВШК – внутрішньошлунковий крововилив; ЗСКФ – затримка стато-кінетичного розвитку; СЗНРЗ – синдром зниженої нервово-рефлекторної збудливості; БЛД – бронхолегенева дисплазія.

Подібна тенденція спостерігалась і серед дітей, що мали ХІ/НЕК. Новонароджені з клінічними ознаками розвитку ХІ та НЕК (2А ступеня і вище), що був підтверджений рентгенологічно, частіше перебували на штучному вигодовуванні ( $p=0,007$ ): 34 випадки ХІ/НЕК на штучному вигодовуванні (17,2 %) проти 6 дітей з ХІ/НЕК на грудному вигодовуванні (5,9 %).

Ретинопатія була однією з ускладнень недоношеності, що виявлялась найчастіше – 70 випадків (23,3 % всіх дітей). Між групами порівняння достовірної різниці між частотою випадків ретинопатії не виявлено ( $p>0,05$ ).

Розповсюдженість анемії того чи іншого ступеня склала 30,7 %, що відповідає 92 випадкам. Виявлено статистично значуще переважання частоти випадків анемії серед дітей на штучному вигодовуванні ( $p<0,001$ ): 74 дитини (37,4 %), що отримували суміш, проти 18 дітей (17,6 %), які годувались грудним молоком. Було також

визначено зворотній кореляційний зв'язок між випадками грудного вигодовування та розвитком анемії:  $r = -0,203$ ;  $p < 0,001$ .

23,5 % всіх новонароджених мали при виписці зі стаціонару встановлену ваду серця (відкриту артеріальну протоку (ВАП), дефект міжпередсердної перетинки (ДМПП), дефект міжшлуночкової перетинки (ДМЖП) – 76 випадків. Різниця між частотою випадків ДМПП, ДМЖП в групах порівняння не було ( $p > 0,05$ ). Проте значно частіше діти, яких годували сумішшю, мали ВАП ( $p < 0,017$ ): 8 дітей на грудному вигодовуванні (7,8 %) проти 36 дітей на штучному вигодовуванні (18,2 %).

Збільшення випадків неонатальної жовтяниці спостерігалось у дітей на грудному вигодовуванні: 60,8 % ( $n=62$ ) в першій групі проти 49,0 % ( $n=97$ ) у немовлят другої групи при  $p=0,05$ .

Частота випадків важкої асфіксії не відрізнялась в обох групах, що досліджувались ( $p > 0,05$ ). Важку асфіксію при народженні мали 3,8 % всіх немовлят – 11 дітей. Внутрішньошлуночковий крововилив (ВШК) визначили у 68 дітей (22,7 % всіх дітей). Різниця між частотою випадків або важкістю ВШК в групах порівняння не виявлено ( $p > 0,05$ ). Серед неврологічної симптоматики превалював синдром зниженої нервово-рефлекторної збудливості (241 випадок – 80,3 % всіх дітей). Достовірної статистичної різниці між рівнем захворюваності на цю патологію в групах порівняння не виявлено ( $p > 0,05$ ). Синдром затримки стато-кінетичних функцій (СЗСКФ) був встановлений 19 дітям, що склало 6,3 % від усіх немовлят. Відмінностей між частотою випадків в першій і другій групах порівняння не було ( $p > 0,05$ ).

Бронхолегенева дисплазія (БЛД) як ускладнення РДС значно частіше розвивався в дітей, що отримували суміш ( $p=0,004$ ): 3 випадки першої групи (2,9 %) проти 26 випадків другої групи (13,1 %). Серед трьох випадків БЛД першої групи 2 були легкого ступеня важкості, 1 – середнього ступеня важкості. В групі ж на штучному вигодовуванні більше було дітей з середнім ступенем важкості БЛД (15 дітей – 57,7 % випадків БЛД в другій групі).

Таким чином, екстрагенітальною патологією, що зустрічалась в матерів найчастіше, були анемія та інфекція сечовивідних шляхів. Достовірно частіше новонароджених від ВІЛ-інфікованих матерів починали годувати сумішшю. В групах

новонароджених на грудному та штучному вигодовуванні не було різниці за частотою іншої екстрагенітальної патології матерів. Серед причин, що потенційно могли призвести до передчасного народження, лідували гострі інфекційні хвороби матері під час вагітності, загроза передчасних пологів, передчасний розрив плодових оболонок. Діти, народжені шляхом кесарева розтину або чиї матері мали преєклампсію, дещо частіше отримували суміш. Діти, які мали в анамнезі дистрес, частіше отримували суміш, проте групи порівняння були ідентичними за оцінкою за шкалою Апгар.

Основними причинами початку штучного вигодовування були гіпогалактія та важкий стан матері після пологів, вірогідне порушення харчової толерантності немовляти.

#### ***4.2. Тривалість стаціонарного лікування в групах порівняння***

Тривале перебування в стаціонарі передчасно народжених немовлят пов'язують з можливим негативним впливом навколишнього середовища (приєднання нозокоміальної інфекції, впливом роботи апаратури та персоналу (шум, яскраві вогні)). У подальшому цей вплив може сприяти затримці розвитку, появі хронічних захворювань, конгнітивних дисфункцій, психо-неврологічних розладів [290-293]. До того ж, тривале стаціонарне лікування призводить до використання значних економічних та людських ресурсів, матеріального та морального навантаження на батьків [294-295].

Середня тривалість перебування в стаціонарі всіх передчасно народжених немовлят склала 27,5 (16,0; 43,0) дні.

Тривалість стаціонарного лікування була довшою при меншій антропометричних параметрах при народженні (маса та довжина тіла, обвід грудної клітини, обвід голови):  $r < -0,3$ ;  $p < 0,001$ . Також з подовженням цього параметру асоціювався менший гестаційний вік немовлят:  $r = -0,606$ ,  $p < 0,001$ . Діти, що мали диспропорційний внутрішньоутробний розвиток, вимагали тривалішого лікування:  $r = 0,263$ ;  $p < 0,001$ . Щоденний приріст маси тіла в дітей на штучному вигодовуванні був швидшим ( $p < 0,001$ ): 14,5 (5,0; 22,0) г в першій групі проти 21,4 (16,7; 27,6) г другої



групи. В немовлят другої групи загальне збільшення маси тіла також було більше ( $p < 0,001$ ): 300,0 (50,0; 630,0) г в першій групі проти 810,0 (460,0; 1245,0) г в другій групі. Маса тіла при виписці зі стаціонару дітей на грудному вигодовуванні склала 2375 (2150; 2580) г проти 2530 (2310; 2860) г у дітей на штучному вигодовуванні ( $p < 0,001$ ).

Проте, діти на штучному вигодовування отримували стаціонарне лікування достовірно довше ( $p < 0,001$ ): 16,0 (10,0; 29,0) днів проти 34,0 (22,0; 52,0) днів. Був виявлений прямий кореляційний зв'язок між штучним вигодовуванням та тривалістю перебування у відділенні:  $r = 0,411$ ;  $p < 0,001$ .

Термін госпіталізації подовжувався при розвитку РДС та БЛД; при клінічних симптомах НЕК; виявленні анемії та ретинопатії ( $r > 0,240$ ;  $p < 0,001$ ).

Отже, тривалість стаціонарного лікування була довше серед дітей, які мали менші антропометричні показники, проте активніший набір маси тіла при штучному вигодовуванні не гарантував швидкого покращення загального стану і не пришвидшував виписку зі стаціонару.

### ***4.3. Оцінка ризиків розвитку ускладнень недоношеності на основі аналізу клініко-анамнестичних даних***

#### *Фактори ризику розвитку РДС в недоношених новонароджених*

Аналіз когорти випадків стаціонарного лікування недоношених новонароджених виявив найвищий ризик розвитку РДС у дітей з екстремально низьким гестаційним віком 24-28 тижнів (відносний ризик -  $OR = 13,64$ , рівень значущості  $p = 0,001$ ) та масою тіла при народженні до 1500 г ( $OR = 4,26$ ,  $p < 0,001$ ). Висока вірогідність цієї патології була також при терміні гестації 29-32 тижні ( $OR = 8,02$ ,  $p < 0,001$ ). Підвищення гестаційного строку вище 32 тижнів перешкоджало розвитку РДС і виступало профілактичним фактором ( $OR = 0,50$ ;  $p < 0,001$ ). Наявність гострого інфекційного захворювання під час вагітності, гострого вагінозу ніяк не впливали на ризик РДС в немовляти ( $p > 0,05$ ). Хронічні вогнища інфекції матері в стадії ремісії та при вчасному лікуванні загострень також не сприяли розвитку дихальних порушень у новонароджених ( $OR \approx 1,0$ ,  $p > 0,05$ ). Загроза викидня та/або

передчасних пологів підвищувала ризик розвитку РДС (ВР = 1,73,  $p=0,006$ ). Істміко-цервікальна недостатність, що супроводжувалась встановленням акушерського песарію, була пов'язана з п'ятикратним підвищенням частоти випадків РДС серед немовлят (ВР = 5,02,  $p=0,014$ ). Діти від п'ятої та більше вагітності частіше мали дихальні порушення (ВР = 3,41,  $p=0,013$ ). Антенатальна профілактика РДС проводилась 104 дітям (34,6 %). В 11,5 % цих випадків ( $n=12$ ) було проведено лише часткову профілактику. Матері 68 дітей (22,7 %) отримала стероїдну профілактику до 32 тижнів вагітності, решта 36 (12,0 %) – до 35 тижнів вагітності. Серед немовлят, що проходили лікування у відділеннях патології новонароджених, ризик при проведеній антенальній профілактиці зберігався (ВР = 8,5;  $p<0,001$ ). Проте, такі новонароджені після народження переважно мали дихальні розлади 2 ступеня важкості ( $p<0,001$ ) і вимагали проведення більш щадних режимів вентиляційної підтримки.

Суттєвий вплив на розвиток РДС мала низька оцінка за шкалою Апгар на першій та п'ятій хвилині. Найчастіше дихальні порушення спостерігались у дітей, що мали важку та помірну асфіксію при народженні. Оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині після народження 1-3 була пов'язана з десятикратним (ВР = 10,11;  $p<0,001$ ), а 4-6 з дев'ятикратним (ВР = 9,10;  $p<0,001$ ) підвищенням ризику розвитку РДС в немовлят. Та найвищий ризик розвитку дихальної недостатності був серед новонароджених, стан яких на п'ятій хвилині життя був оцінений в проміжку 4-6 балів за шкалою Апгар (ВР = 19,14,  $p<0,001$ ). Достатня адаптація як на першій (ВР=0,47;  $p<0,001$ ), так і на п'ятій (ВР = 0,63;  $p<0,001$ ) хвилині життя знижувала вірогідність дихальних порушень в передчасно народжених немовлят.

Новонароджені, що мали функціонуюче відкрите овальне вікно, навіть рідше страждали на РДС (ВР = 0,53,  $p=0,002$ ). Ті ж, в яких функціонування овального вікна не визначалось або його діаметр не перевищував 3.0 мм, мали підвищений ризик розвитку дихальних порушень (ВР = 1,53,  $p=0,002$ ). Діти з РДС набагато частіше страждали на анемію різного ступеня важкості (ВР = 8,31,  $p<0,001$ ).

#### *Фактори ризику розвитку ХІ/НЕК в недоношених новонароджених*

Результати проведеного дослідження не виявили підвищення ризику ХІ/НЕК зі зменшенням гестаційного віку або ваги при народженні в недоношених

новонароджених ( $OR \approx 1,0$ ;  $p > 0,05$ ). Проте, був відмічений прямий кореляційний зв'язок між значенням різниці обводу голови та обводу грудної клітини. Частота ХІ/НЕК збільшувалась при різниці більшій за 3 см ( $r = 0,219$ ;  $p < 0,001$ ), що є однією з ознак затримки фізичного розвитку [288].

Екстрагенітальна патологія матері, спосіб розродження, наявність асфіксії при народженні практично не впливали на ризик розвитку ХІ/НЕК в недоношених ( $OR \approx 1,0$ ,  $p > 0,05$ ). Хоча короткочасна СРАР-терапія не підвищувала вірогідність ХІ/НЕК ( $OR = 0,67$ ,  $p > 0,05$ ), а проведення короткотривалої інвазивної ШВЛ після народження навіть знижувало ризик цієї патології ( $OR = 0,56$ ;  $p = 0,004$ ), тривала інвазивна вентиляція легень протягом 24-35 днів значно сприяла патології кишечника в немовлят ( $OR = 8,14$ ,  $p = 0,01$ ).

Грудне вигодовування мало протекторний, профілактичний вплив на стінки кишечника ( $OR = 0,36$ ,  $p = 0,002$ ), в той час коли введення суміші виступало фактором ризику ( $OR = 1,43$ ,  $p = 0,002$ ). Частота випадків ХІ/НЕК зменшувалась при годування грудним молоком в якості першого ентєрального харчування ( $r = -0,183$ ;  $p = 0,001$ ).

Значно підвищувалась вірогідність ХІ/НЕК при діагностованому дефекті міжшлуночкової перетинки ( $OR = 11,66$ ,  $p = 0,010$ ). Крім того, був виявлений прямий кореляційний зв'язок наявності дефекту міжшлуночкової перетинки та розвитку ХІ/НЕК зі значним ступенем достовірності ( $r = 0,155$ ,  $p = 0,007$ ). В той же час, наявність дефекту міжпередсердної перетинки зовсім не впливала на стан кишечника ( $OR \approx 1,0$ ,  $p > 0,05$ ). Функціонування відритої артеріальної протоки підвищувало ризик розвитку ХІ/НЕК в 2,1 рази ( $OR = 2,08$ ,  $p = 0,029$ ). Наявність поліцитемії також сприяла розвитку патології кишечника. Був виявлений прямий кореляційний зв'язок поліцитемії в новонароджених та розвитку ХІ/НЕК ( $r = 0,145$ ;  $p = 0,012$ ).

*Фактори ризику персистенції відкритої артеріальної протоки в недоношених новонароджених*

Ступінь недоношеності при народженні не впливав на вірогідність персистенції ВАП в майбутньому ( $OR \approx 1,0$ ,  $p > 0,05$ ). Хоча збільшення ваги при народженні більше 2500 г зменшувала вірогідність ВАП ( $OR = 0,0$ ;  $p = 0,032$ )

Серед хвороб матері, що могли негативно вплинути на закриття ВАП, найбільш значущими виявились міома матки та мастопатія: підвищували ризик не закриття ВАП в 4,25 рази ( $BP = 4,25, p=0,002$ ).

Важка та помірна асфіксія при народженні з оцінкою за шкалою Апгар 3-5 балів сприяла персистенції ВАП ( $BP = 1,89, p=0,019$ ). Подібні результати на п'ятій хвилині вже не впливали на ВАП ( $BP \approx 1,0, p > 0,05$ ).

Аналіз історій хвороби не виявив впливу кисневої терапії (незалежно від її способу, інвазивної та неінвазивної, та її тривалості) на закриття ВАП ( $BP \approx 1,0, p > 0,05$ ). Наявність супутніх інших вад серця також не підвищувало ризик ВАП ( $BP \approx 1,0, p > 0,05$ ).

Штучне вигодовування з народження асоціювалось з персистенцією ВАП ( $BP = 1,29, p=0,034$ ), в той час коли грудне вигодовування виступало профілактичним фактором ( $BP = 0,54, p=0,034$ ). Випадки некротизуючого ентероколіту 2А ( $BP = 2,87, p=0,004$ ) ступенів супроводжувались підвищеною частотою випадків ВАП.

Достовірно частіше ВАП спостерігалась в дітей, що мали ДМПП ( $BP = 4,39, p < 0,001$ ). Нами не виявлено зв'язку функціонуючого овального вікна та ДМПП з персистенцією ВАП ( $BP \approx 1,0, p > 0,05$ ). ВАП в 3,75 рази частіше супроводжував розвиток БЛД ( $BP = 3,75, p < 0,001$ ).

#### *Фактори ризику розвитку ретинопатії*

Малий термін гестації суттєво підвищував ризик розвитку ретинопатії. В дітей з терміном гестації 28-32 тижні ризик підвищувався в 4,2 рази ( $BP = 4,24, p < 0,001$ , в той час коли в дітей з гестаційним терміном 24-28 тижнів – в 16,3 рази ( $BP = 16,31, p < 0,001$ ). Маса тіла при народженні менше 1500 г підвищувала вірогідність ретинопатії майже в 5,0 разів ( $BP = 4,96, p < 0,001$ ). Був встановлений прямий кореляційний зв'язок між розвитком ретинопатії та наявною різницею обводу голови та обводу грудної клітини дітей після народження:  $r=0,152; p=0,008$ . Ступінь тяжкості ретинопатії збільшувалась при збільшенні різниці обводу голови та обводу грудної клітини:  $r=0,123; p=0,033$ . Таким чином, можливо припустити більшу схильність до ретинопатії немовлят із затримкою внутрішньоутробного розвитку [288].

Помірний негативний ефект мала наявність в матері гострого вагінозу (ВР = 2,22,  $p=0,007$ ), інфекції сечовивідних шляхів (ВР = 1,98,  $p=0,004$ ) під час вагітності. Істміко-цервікальна недостатність підвищувала вірогідність розвитку ретинопатії майже в 3 рази (ВР = 3,06,  $p=0,015$ ).

Суттєво сприяла появі патологічних змін сітківки важка асфіксія при народженні. Оцінка 1-3 балів за шкалою Апгар на першій хвилині життя підвищувала ризик в 7,1 рази (ВР = 7,14,  $p<0,001$ ). Ризик зростав в 30,6 рази при подібній оцінці на п'ятій хвилині після народження (ВР = 30,56,  $p<0,001$ ). Оцінка 3-5 балів за шкалою Апгар на першій хвилині відповідала підвищенню ризику в 2,9 рази (ВР = 2,88,  $p<0,001$ ); такі ж показники на п'ятій хвилині призводили до зростання вірогідності розвитку ретинопатії в 4,9 рази (ВР = 4,95,  $p<0,001$ ). Проведення СРАР-терапії підвищувало ризик в майже в 2 рази (ВР = 1,96,  $p<0,001$ ). Необхідність інвазивної респіраторної підтримки після народження сприяла розвитку ретинопатії (ВР = 2,2,  $p<0,001$ ), але відносний ризик значно підвищувався з подовженням строку інвазивної вентиляції легень і максимально відповідав значенню 8,2 при тривалості іШВЛ 12-24 дні (ВР = 8,22,  $p=0,039$ ). Проведення неінвазивної вентиляції легень протягом 18-35 днів підвищувало ризик розвитку ретинопатії в 3,2 рази (ВР = 3,18,  $p=0,031$ ). Необхідність введення сурфактанта після народження виступала додатковим суттєвим фактором ризику (ВР = 3,55,  $p<0,001$ ).

Частіше ретинопатія супроводжувала РДС (ВР = 1,88,  $p<0,001$ ). Анемія новонародженого в 4 рази підвищувала ризик патології сітківки в передчасно народжених дітей (ВР = 4,02,  $p<0,001$ ). Прямий кореляційний зв'язок анемії та розвитку ретинопатії відрізнявся високим ступенем достовірності: ( $r=0,290$ ;  $p<0,001$ ).

Хоча нами не було виявлено достовірної значущості впливу способу вигодовування на розвиток ретинопатії ( $p=0,08$ ), простежувалась тенденція до зменшення випадків захворювання сітківки в дітей на грудному вигодовуванні (ВР=0,7) і незначного збільшення на штучному (ВР=1,17).

Значний вплив мала наявність бронхолегеневої дисплазії. При цьому відносний ризик зростав з погіршенням важкості захворювання: при першому ступені він склав 9,17 ( $p<0,001$ ); вже при другому ступені відповідав 42,81 ( $p<0,001$ ).

### *Фактори ризику розвитку бронхолегеневої дисплазії*

Діти з екстремально низьким гестаційним віком при народженні (<28 тижнів) мали значну загрозу розвитку бронхолегеневої дисплазії (БЛД), адже ризик цього ускладнення в таких немовлят зростав в 20,3 рази (ВР = 20,30,  $p < 0,001$ ). При подовженні терміну гестації до 32 тижнів вірогідність БЛД була значно нижчою (ВР=1,81,  $p < 0,026$ ). Маса тіла <1500 г при народженні менше впливала на формування хронічної легеневої патології в недоношених новонароджених, проте підвищувала ризик в 3,1 рази (ВР = 3,08,  $p < 0,001$ ).

Наявність інфекції сечовивідних шляхів (ВР = 2,29,  $p = 0,005$ ). Підтверджена COVID-19 - інфекція в матері протягом місяця до пологів прямо корелювала з виникненням БЛД в немовляти:  $r = 0,166$ ;  $p = 0,001$ . Хоча випадків зафіксованої інфекції COVID-19 серед новонароджених не було.

Гострий вагіноз під час вагітності посилював відносний ризик БЛД в 2,5 рази (ВР = 2,50,  $p = 0,010$ ). Вибір способу розродження несуттєво впливав на розвиток БЛД (ВР  $\approx 1,0$ ,  $p > 0,05$ ).

Значним фактором ризику розвитку БЛД була важка та помірна асфіксія при народженні. Відносний ризик при оцінці за шкалою Апгар на першій хвилині 1-3 балів відповідав показнику 4,69 ( $p < 0,001$ ), при оцінці 3-6 балів – 2,21 ( $p = 0,002$ ). Низька оцінка за шкалою Апгар на п'ятій хвилині також сприяла розвитку БЛД: при оцінці 2-4 бала, ризик підвищувався в 3,5 рази (ВР = 3,51,  $p = 0,043$ ); при оцінці 4-6 балів – в 4,2 рази (ВР = 4,19,  $p < 0,001$ ). Відсутність асфіксії та гарна адаптація в продовж перших п'яти хвилин життя мали навпаки профілактичний вплив (ВР = 0,32,  $p < 0,001$ ).

Загроза розвитку БЛД підвищувалась з подовженням тривалості кисневої підтримки. При СРАР – терапії впродовж 17-36 днів відносний ризик склав 6,32 ( $p < 0,001$ ). Високий ризик спостерігався при проведенні тривалої інвазивної ШВЛ: тривалість 12-23 дні підвищувала вірогідність розвитку БЛД в 5 разів (ВР = 5,12,  $p = 0,021$ ). Чередування неінвазивних методів штучної вентиляції легень протягом тривалого часу (36-54 дні) підвищувало вірогідність розвитку хронічної патології

легень в 20,4 рази (ВР = 20,4,  $p < 0,001$ ). Наявність РДС була пов'язана з відносно помірним ризиком БЛД (ВР = 1,87;  $p < 0,001$ ).

Одним з факторів ризику виступало штучне харчування, підвищуючи загрозу виникнення БЛД в 1,46 рази (ВР = 1,46,  $p = 0,004$ ). Вигодовування грудним молоком попереджало розвиток хвороби (ВР = 0,29,  $p = 0,004$ )

Функціонуюча ВАП асоціювалась з розвитком хронічної патології легень (ВР = 3,35,  $p < 0,001$ ). Було виявлено прямий кореляційний зв'язок між наявністю ВАП та розвитком БЛД:  $r = 0,189$ ;  $p = 0,001$ . Анемія новонародженого підвищувала ризик БЛД в 3 рази (ВР = 3,12,  $p < 0,001$ ).

Отже, екстрагенітальна патологія матері та особливості акушерського анамнезу: порушення артеріального тиску в матері під час вагітності, преєклампсія, загроза викидня та/або передчасних пологів в анамнезі, резус-негативна група крові матері, дистрес плода практично не підвищували ризик розвитку ускладнень недоношеності. Істміко-цервікальна недостатність підвищувала ризик РДС та ретинопатії. Патологія матері, вірогідно пов'язана з вірогідною гормональною дисфункцією (міома, мастопатія) [296-299] суттєво сприяла персистенції ВАП.

Менший гестаційний термін при народженні суттєво збільшував ризик РДС, ретинопатії та БЛД. При затримці внутрішньоутробного розвитку частіше спостерігались випадки НЕК та ретинопатії.

Спосіб розродження не впливав на ризик ускладнень. В той же час, важка та помірна асфіксія значно підвищувала ризик розвитку всіх нозологій, що досліджувались. Хоча необхідність в допоміжній вентиляції легень відразу після народження помірно підвищувала вірогідність розвитку ускладнень, ризик зростав з подовженням тривалості респіраторної підтримки.

Функціонуюче овальне вікно виступало профілактичним фактором РДС, в той час коли ВАП сприяв розвитку НЕК і БЛД. Суттєвим фактором ризику розвитку всіх ускладнень була анемія, яка достовірно частіше спостерігалась в групі на штучному вигодовуванні ( $p < 0,001$ ).

Штучне вигодовування підвищувало в середньому в 1,4 рази вірогідність НЕК, ВАП, дихальних порушень з майбутнім розвитком БЛД.

### **Висновки за розділом:**

Основними причинами початку штучного вигодовування були гіпогалактія та важкий стан матері після пологів, вірогідне порушення харчової толерантності немовляти. Діти, які мали в анамнезі дистрес, були народжені шляхом кесаревого розтину, чиї матері страждали на прееклампсію частіше отримували суміш. Проте, не було різниці між показниками за шкалою Апгар у дітей на грудному та штучному вигодовуванні.

За результатами проведеного дослідження штучне вигодовування було пов'язане з підвищенням ризику розвитку патологічних станів, асоційованих з передчасним народженням: сприяло розвитку ХІ/НЕК, персистенції ВАП, погіршувало прогноз щодо розвитку БЛД. Хоча в дітей на штучному вигодовуванні спостерігався значно швидший приріст маси тіла ( $p < 0,001$ ), вони мали в середньому в 1,4 рази вищий ризик ускладнень недоношеності та довшу тривалість перебування в стаціонарі ( $p < 0,001$ ).

Таким чином, грудне молоко в харчуванні недоношених немовлят асоціювалось з протекторним та профілактичним ефектом: перешкоджало розвитку ХІ/НЕК, БЛД; сприяло зменшенню запалення легеневої тканини, закриттю відкритої артеріальної протоки та зменшувало вірогідність анемії.

### **Матеріали даного розділу дослідження відображені в наступних публікаціях:**

1. Товарницька А.О. Вплив грудного вигодовування на закриття відкритої артеріальної протоки в недоношених новонароджених. Здоров'я дитини (Україна). 2022, 17(4), 184–191. SSN 2224-0551 (print), ISSN 2307-1168 (online). doi: 10.22141/2224-0551.17.4.2022.1515.

2. Товарницька А.О. Прогнозування ризику розвитку бронхолегеневої дисплазії в передчасно народжених дітей. – Подано до друку в журнал Педіатрія і перинаталогія (Україна).



## РОЗДІЛ 5

### **МАТЕМАТИЧНІ МОДЕЛІ ДІАГНОСТИКИ ТА ЙМОВІРНОСТІ РОЗВИТКУ РЕСПІРАТОРНОГО ДИСТРЕС-СИНДРОМУ, РЕТИНОПАТІЇ, БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ ДИСПЛАЗІЇ НА ОСНОВІ РЕТРОСПЕКТИВНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ**

Літературні дані свідчать про стійкий негативний вплив малого гестаційного віку, малої маси тіла при народженні на розвиток РДС, ретинопатії та БЛД. Проте розвиток цих ускладнень недоношеності залежить від поєданого негативного впливу різних факторів ризику [7, 53, 207, 218, 300-302]. Визначення основних діагностичних факторів та факторів ризику розвитку РДС, ретинопатії та БЛД в дітей забезпечує своєчасне та найбільш ефективне проведення лікувальних та профілактичних заходів.

На підставі аналізу 280 історій хвороби передчасно народжених новонароджених, що отримували стаціонарне лікування в неонатальних відділеннях в 2020 - 2021 роках визначено високоінформативні анамнестичні та клінічні фактори ризику, що підвищують вірогідність ускладнень серед недоношених новонароджених. Розрахунок проводився на основі показника відносного ризику (ВР), діагностичного коефіцієнту (ДК), показника достовірності результатів на рівні 95 % зі значенням  $p < 0,05$ . Інформативність факторів визначалась за коефіцієнтом Кульбака. Фактори ризику в таблицях моделей розміщувались в порядку від найбільшої інформативності.

**5.1. Математична модель ймовірності розвитку та діагностики респіраторного дистрес-синдрому в передчасно народжених новонароджених**

Одним з найбільш сильних факторів ризику розвитку РДС виявилась низька оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині (табл. 5.1). Асфіксія при народженні підвищувала ризик РДС в 9-10 разів: при 1-3 балах за шкалою Апгар ВР = 10,11,  $p < 0,001$ , ДК = 10,1; при 4-6 балах – ВР = 9,10,  $p < 0,001$ , ДК = 9,6. Необхідність в інвазивній вентиляційній підтримці протягом 2 годин після народження часто було характерною для дітей з РДС (ВР = 4,53,  $p < 0,001$ , ДК = 6,6.). СРАР-терапія відразу після народження була менш специфічним фактором, хоча також відображала наявність дихальних порушень (ВР = 4,96,  $p < 0,001$ , ДК = 7,0).

При проведенному аналізі стійким фактором ризику був гестаційний вік. Максимальний ризик спостерігався при екстремально низькому гестаційному віці в 24-28 тижнів (ВР = 13,64,  $p = 0,001$ , ДК = 11,3) та зберігався при 29-32 тижнях гестації (ВР = 8,0,  $p < 0,001$ , ДК = 9,0). Профілактичний вплив мав старший гестаційний вік (ВР = 0,50,  $p < 0,001$ , ДК = -3,0). Ризик суттєво зменшувався при підвищенні маси тіла при народженні.

Помірний вплив мала істміко-цервікальна недостатність протягом вагітності, що пов'язано з вищим ризиком передчасних пологів (ВР = 5,02,  $p = 0,014$ , ДК = 7,0).

При 95 % вірогідності розвитку РДС сума ДК буде становити 13 балів і більше. При цьому чутливість методу складе 75,3 %, специфічність – 83,1 %. Хибно позитивний результат можна очікувати в 24,7 %, хибно негативний – 16,9 %. Точність прогнозу РДС складає 78,6 %.

Розрахунок ймовірності розвитку РДС в новонародженого, що народився передчасно, наводимо в Прикладі 1 (табл. 5.2).

Таблиця 5.1

**Модель ймовірності розвитку та діагностики респіраторного дистрес-синдрому в передчасно народжених дітей за клініко-анамнестичними даними**

<b>Ознака</b>	<b>Значення або інтервал</b>	<b>Діагностичний коефіцієнт</b>	<b>Коефіцієнт Кульбака</b>
Інвазивна ШВЛ після народження	так	6.6	3,31
	ні	-2.3	
ОША, 1 хвилина (бали)	1 – 3	10.1	3,27
	4 – 5	9.6	
	6 – 8	-3.3	
ОША, 5 хвилина (бали)	2 – 4	8.6	2,58
	5 – 6	12.8	
	7 – 8	-2.0	
Гестаційний термін (тижні)	24 – 28	11.3	2,17
	29- 32	9.0	
	33 – 36	-3.0	
Маса тіла дитини при народженні (г)	600 - 1500	6.3	1,83
	1501 – 2500	-2.1	
	2501 – 3400	-5.5	
Проведення СРАР після народження	так	7.0	1,72
	ні	-2.3	
Істміко-цервікальна недостатність	так	7.0	0,25
	ні	-0.3	
Загроза викидня	так	2.4	0,25
	ні	-0.9	
Вагітність за рахунком	1 – 4	-0.4	0,24
	5 – 9	5.3	

Примітка. ОША - оцінювання за шкалою Апгар; іШВЛ - інвазивна штучна вентиляція легень; СРАР - терапія постійним позитивним тиском кисню

*Приклад 1*

Новонароджений хлопчик Микита Д. народився 7.04.2021. В анамнезі загроза передчасних пологів без ознак істміко-цервікальної недостатності. Дитина від першої вагітності, самостійних пологів в гестаційному віці 31 тиждень. Маса тіла при народженні 1970 г. Стан після народження важкий. Важкість обумовлена дихальними порушеннями, синдромом зниженої нервово-рефлекторної збудливості на фоні морфо-функціональної незрілості.

Оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині – 5 балів, на п'ятій хвилині – 5 балів. В пологовій залі виконана санація верхніх дихальних шляхів, СРАР через мононазальну канюлю. СРАР дитина отримувала протягом 1 доби до 8.04.2021, потім пасивну оксигенацію вільним потоком кисню ще протягом 2-х діб.

*Таблиця 5.2*

**Розрахунок ймовірності розвитку респіраторного дистрес-синдрому в новонародженого Микити Д., 7.04.2021. р.н.**

<b>Ознака</b>	<b>Значення або інтервал</b>	<b>Діагностичний коефіцієнт</b>
Інвазивна ШВЛ після народження	ні	-2.3
ОША, 1 хвилинка (бали)	5	9.6
ОША, 5 хвилинка (бали)	5	12.8
Гестаційний термін (тижні)	31	9.0
Маса тіла дитини при народженні (г)	1970	-2.1
Проведення СРАР після народження	так	7.0
Істміко-цервікальна недостатність	ні	-0.3
Загроза викидня	так	2.4
Вагітність за рахунком	1	-0.4
<b>Всього</b>		<b>35.7</b>

За наведеною моделлю Микита Д. має 35,7 балів, що більше 13, а отже з вірогідністю 95 % він має РДС.

Таким чином, можна зробити висновок, що найбільше значення в оцінці РДС має необхідність в інвазивній кисневій підтримці та наявність асфіксії при народженні на тлі малого гестаційний терміну та низької маси при народженні.

## **5.2. Математична модель ймовірності розвитку та діагностики ретинопатії в передчасно народжених новонароджених.**

Найбільш значимим чинником, що впливав на розвиток ретинопатії в немовлят був ранній гестаційний вік (табл. 5.3). При гестаційному терміні 28 тижнів і менше ризик підвищувався в 16,3 рази (ВР = 16,31,  $p < 0,001$ , ДК = 12,1), в проміжку 32-29 тижнів гестації – майже в 5 разів (ВР = 4,96,  $p < 0,001$ , ДК = 6,3). В той же час пізніший гестаційний термін виступав профілактичним фактором (ВР = 0,17,  $p < 0,001$ , ДК = -7,6).

Суттєвий вплив на розвиток патології сітківки в немовлят мала екстремально низька вага при народженні (ВР = 4,96,  $p < 0,001$ , ДК=7,0). При масі вище 1500 г при народженні ретинопатія спостерігалась значно рідше (ВР = 0,18,  $p < 0,001$ , ДК = -7,3).

Важка асфіксія при народженні значно сприяла розвитку ретинопатії. Виражений негативний ефект спостерігався при низькій оцінці за шкалою Апгар на першій хвилині життя (ВР = 7,10,  $p < 0,001$ , ДК = 8,5). Та дезадаптація на п'ятій хвилині підвищувала ризик захворювання сітківки в 30,4 рази (ВР = 30,43,  $p < 0,001$ , ДК = 14,8).

Розвиток ретинопатії потенціювала тривала штучна вентиляція легень: проведення іШВЛ протягом 12-24 днів (ВР = 8,22,  $p = 0,039$ , ДК = 9,2), нШВЛ протягом 19-35 днів (ВР = 3,18,  $p = 0,03$ , ДК = 5,0), комбінованої СРАР з нШВЛ протягом 19-35 днів (ВР = 6,7,  $p < 0,001$ , ДК = 8,3). При цьому СРАР до 18 днів

Таблиця 5.3

**Модель ймовірності розвитку та діагностики ретинопатії в передчасно народжених дітей за клініко-анамнестичними даними**

<b>Ознака</b>	<b>Значення або інтервал</b>	<b>Діагностичний коефіцієнт</b>	<b>Коефіцієнт Кульбака</b>
Гестаційний термін (тижні)	24-28	12.1	5,46
	29-32	6.3	
	33-36	-7.6	
Маса тіла дитини при народженні (г)	600 - 1500	7.0	4,53
	1501 – 2500	-7.3	
	2501 – 3400	0	
ОША, 5 хвилина (бали)	2 – 4	14.8	3,45
	5 – 6	6.9	
	7 – 8	-3.9	
ОША, 1 хвилина (бали)	1 – 3	8.5	3,43
	4 – 5	4.6	
	6 – 8	-5.6	
Анемія новонародженого	так	6.0	2,94
	ні	-4.7	
Проведення іШВЛ після народження	так	3.4	2,55
	ні	-7.2	
РДС	так	2.7	2,07
	ні	-7.2	
Тривалість СРАР + нШВЛ	1-18	-2.7	2,00
	19-35	5.0	
	36-52	0	

Введення сурфактанту	так	5.5	1,45
	ні	-2.5	
Тривалість нШВЛ (дні)	1-18	-2.5	1,11
	19-35	5.0	
	36-52	0	
Тривалість іШВЛ (дні)	1-12	-1.2	1,03
	13-24	9.2	
	25-35	1.4	
Проведення СРАР після народження	так	2.9	0,56
	ні	-1.7	
ІСВШ в матері	так	3.0	0,31
	ні	-0.9	
Тривалість СРАР (дні)	1-18	-1.6	0,26
	більше 18	0	
Гострий вагіноз в матері	так	3.5	0,26
	ні	-0.7	
Істміко-цервікальна недостатність	так	4.9	0,20
	ні	-0.4	
Грудне вигодовування	так	-1.5	0.13
	ні	0.8	

Примітка: ОША - оцінювання за шкалою Апгар; іШВЛ - інвазивна штучна вентиляція легень; нШВЛ – неінвазивна штучна вентиляція легень, СРАР - терапія постійним позитивним тиском кисню, ІСВШ – інфекція сечовивідних шляхів.

мала профілактичний вплив ( $OR = 0,69$ ,  $p < 0,001$ ,  $OR = -1,64$ ). Сильним фактором ризику, пов'язаним з гіпоксією, виступила анемія новонародженого ( $OR = 4,02$ ,  $p < 0,001$ ,  $OR = 6,0$ ).

Хвороби матері, що могли сприяти інфікуванню плоду під час вагітності, мали помірний негативний вплив. Так, гострому вагінозу відповідали  $OR = 2,22$ ,  $p = 0,007$ ,  $OR = 3,5$ ; істміко-цервікальній недостатності з встановленням акушерського песарію –  $OR = 3,06$ ,  $p = 0,015$ ,  $OR = 4,9$ ; інфекції сечовивідних шляхів з бактеріурією –  $OR = 1,98$ ,  $p = 0,004$ ,  $OR = 3,0$ .

При 95 % вірогідності розвитку ретинопатії сума  $OR$  буде становити 13 балів і більше. При цьому чутливість методу складе 71,8 %, специфічність – 90,3 %. Хибно позитивний результат можна очікувати в 9,7 %, хибно негативний – 28,2 %. Точність прогнозу ретинопатії складає 80,0 %.

Розрахунок ймовірності розвитку ретинопатії в новонародженого, що народився передчасно, наводимо в Прикладі 2 (табл.5.4).

#### *Приклад 2.*

Дівчинка Софія М. народилась 2.12.2020 року. Вагітність перебігала на тлі загрози викидня без явищ істміко-цервікальної недостатності, інфекції сечовивідних шляхів, прееклампсії важкого ступеня. Перші передчасні оперативні пологи шляхом касаревого розтину (передчасне відшарування плаценти) у терміні вагітності 30 тижнів. Маса тіла при народженні 1230 г.

Стан після народження важкий за рахунок дихальних розладів, неврологічної симптоматики на тлі морфо-функціональної незрілості. Оцінка за шкалою Апгар: перша хвилина - 5 балів, п'ята хвилина - 6 балів. В пологовій залі дитині проведено санацію верхніх дихальних шляхів, СРАР через мононазальну канюлю. Дівчинка отримувала неінвазивну СРАР-терапію протягом 22 днів. В першу годину життя дитині введено «Курсорф».



## Розрахунок ймовірності розвитку ретинопатії в новонародженій Софії М.

2.12.2020. р.н

Ознака	Значення або інтервал	Діагностичний коефіцієнт
Гестаційний термін (тижні)	30	6.3
Маса тіла дитини при народженні (г)	1230	7.0
ОША, 5 хвилина (бали)	5	6.9
ОША, 1 хвилина (бали)	6	-5.6
Анемія новонародженого	так	6.0
Проведення іШВЛ після народження	ні	-7.2
РДС	так	2.7
Тривалість СРАР + нШВЛ (дні)	22	5.0
Введення сурфактанту	так	5.5
Тривалість нШВЛ (дні)	не було	0
Тривалість іШВЛ (дні)	не було	0
Проведення СРАР після народження	так	2.9
ІСВШ в матері	так	3.0
Тривалість СРАР (дні)	більше 18	0
Гострий вагіноз в матері	ні	-0.7
Істміко-цервікальна недостатність	ні	-0.4
Грудне вигодовування	ні	0.8
<b>Всього</b>		<b>32.2</b>

Ентеральне годування розпочато в першу добу адаптованою сумішшю «Мальабсорбція». Причиною початку штучного вигодовування стала комбінована антигіпертензивна терапія матері та її важкий стан. У дівчинки відмічалась анемія легкого ступеня тяжкості на другому тижні життя.

За запропонованою моделлю дівчинка отримала 32,2 бали, що більше 13. Таким чином, з 95 % вірогідністю в Софії М. може бути виявлена ретинопатія.

Отже, розвитку ретинопатії в немовлят найбільш сприяє малий гестаційний вік, мала маса тіла при народженні та тривалий період оксигенотерапії.

### **5.3. Математична модель ймовірності розвитку та діагностики бронхолегеневої дисплазії в передчасно народжених новонароджених**

Найсуттєвішим фактором, що впливав на розвиток БЛД був малий гестаційний вік. Ризик підвищувався в 20,3 рази при екстремальному ступеню недоношеності (ВР = 20,30,  $p < 0,001$ , ДК = 13,1) (табл.5.5).

Тривалість загальної неінвазивної підтримки більше 36 днів відображала наявний розвиток БЛД (ВР = 20,4,  $p < 0,001$ , ДК = 13,1). Низька маса тіла при народженні менше 1500 г виступала важливою передумовою БЛД (ВР = 3,08,  $p < 0,001$ , ДК = 4,9). При цьому підвищення маси тіла більше 1500 г при народженні перешкоджало розвитку хронічної патології легень (ВР = 0,18,  $p < 0,001$ , ДК = -7,4).

Значно сприяла розвитку БЛД гіпоксія. Так, важка асфіксія при народженні (ОША менше 3) підвищувала ризик в 4,7 разів (ВР = 4,69,  $p < 0,001$ , ДК = 6,7). Деадаптація на п'ятій хвилині життя також чинила суттєвий негативний вплив (ВР = 3,51,  $p = 0,043$ , ДК = 5,4). Серед найбільш значущих факторів ризику була анемія новонародженого (ВР = 3,12,  $p < 0,001$ , ДК = 5,0). Відсутність анемії недоношених перешкоджало продовженню запального процесу легень немовляти (ВР = 0,12,  $p < 0,001$ , ДК = -6,0).

Одним з важливих чинників БЛД було штучне вигодовування, що підвищувало вірогідність розвитку цієї патології (ВР = 1,46,  $p = 0,004$ , ДК = 1,6) і навпаки годування грудним молоком мало сильний профілактичний ефект (ВР = 0,29,  $p = 0,004$ , ДК = -5,4).

Суттєво сприяла підтриманню запалення в легенях наявність функціонуючої ВАП (ВР=3,35,  $p < 0,001$ , ДК = 5,2).

Таблиця 5.5

**Модель ймовірності розвитку та діагностики бронхолегеневої дисплазії в передчасно народжених дітей за клініко-анамнестичними даними**

<b>Ознака</b>	<b>Значення або інтервал</b>	<b>Діагностичний коефіцієнт</b>	<b>Коефіцієнт Кульбака</b>
Гестаційний термін (тижні)	24-28	13.1	6,52
	29-32	2.6	
	33-36	-9.9	
Тривалість СРАР + нШВЛ	1-18	-5.3	3,97
	19-35	5.7	
	36-52	13.1	
Маса тіла дитини при народженні (г)	600 - 1500	4.9	3,33
	1501 – 2500	-7.4	
	2501 – 3400	0	
ОША, 1 хвилина (бали)	1 – 3	6.7	3,30
	4 – 5	3.4	
	6 – 8	-6.8	
ОША, 5 хвилина (бали)	2 – 4	5.4	3,10
	5 – 6	6.2	
	7 – 8	-5.0	
Анемія новонародженого	так	5.0	3,04
	ні	-6.0	
Тривалість СРАР-терапії	1-18	-2.7	2,31
	19-36	8.0	
	37-54	9.0	
Введення сурфактанту	так	5.3	2,25

	ні	-4.1	
Наявність ретинопатії за ступенем важкості	1 ступінь	0	1,99
	2 ступінь	12.1	
	3 ступінь	10.4	
	немає	0	
Проведення іШВЛ після народження	так	2.5	1,88
	ні	-6.7	
Тривалість іШВЛ (дні)	1-12	-1.8	1,43
	13-24	7.1	
	25-35	7.9	
Грудне вигодовування	так	-5.4	0,98
	ні	1.6	
ВАП	так	5.2	0,88
	ні	-1.5	
Тривалість нШВЛ (дні)	1-18	-2.9	0,66
	19-35	1.8	
	36-52	0	
РДС	так	2.7	0,62
	ні	0	
ІСВШ в матері	так	3.6	0,58
	ні	-1.4	
Гострий вагіноз в матері	так	4.0	0,44
	ні	-1.0	

Примітка. ОША - оцінювання за шкалою Апгар; іШВЛ - інвазивна штучна вентиляція легень; нШВЛ – неінвазивна штучна вентиляція легень, СРАР - терапія постійним позитивним тиском кисню, ВАП – відкрита артеріальна протока, ІСВШ – інфекція сечовивідних шляхів

Генітальні та парагенітальні інфекції матері під час вагітності помірно підвищували вірогідність БЛД в немовляти: інфекція сечовивідних шляхів з бактеріурією (ВР = 2,29, р=0,005, ДК=3,6), гострий вагіноз (ВР = 2,50, р = 0,010, ДК = 0,44).

При 95 % вірогідності розвитку БЛД сума ДК буде становити 13 балів і більше. При цьому чутливість методу складе 88,5 %, специфічність – 86,7 %. Хибно позитивний результат можна очікувати в 13,3 %, хибно негативний – 11,5 %. Точність прогнозу БЛД складає 87,5 %.

Розрахунок ймовірності розвитку бронхолегеневої дисплазії в новонародженого, що народився передчасно, наводимо в Прикладі 3 (табл.5.6).

### *Приклад 3.*

Хлопчик Іван Л. народився 19.04.2021 року. Дитина від другої вагітності, що перебігала на тлі анемії легкого ступеня, крайового передлежання плаценти. Мати госпіталізована із загрозою передчасних пологів 07.04.2021 року. Другі самостійні стрімкі пологи в терміні 27 тижнів. Вага при народженні 970 грамів. Оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині – 3 бали, на п'ятій хвилині 4 бали. Стан після народження важкий за рахунок дихальних розладів, неврологічної симптоматики на тлі морфо-функціональної незрілості.

*Таблиця 5.6*

### **Розрахунок ймовірності розвитку бронхолегеневої дисплазії в новонародженого Івана Л., 19.04.2021. р.н**

<b>Ознака</b>	<b>Значення або інтервал</b>	<b>Діагностичний коефіцієнт</b>
Гестаційний термін (тижні)	27	13.1
Тривалість СРАР + нШВЛ	6	-5.3
Маса тіла дитини при народженні (г)	970	4.9
ОША, 1 хвилинка (бали)	3	6.7

ОША, 5 хвилина (бали)	4	5.4
Анемія новонародженого	так	5.0
Тривалість СРАР-терапії (дні)	2	-2.7
Введення сурфактанту	так	5.3
Наявність ретинопатії за ступенем важкості	3 ступінь	10.4
Проведення іШВЛ після народження	так	2.5
Тривалість іШВЛ (дні)	3	-1.8
Грудне вигодовування	так	-5.4
ВАП	ні	-1.5
Тривалість нШВЛ (дні)	3	-2.9
РДС	так	2.7
ІСВШ в матері	ні	-1.4
Гострий вагіноз в матері	ні	-1.0
<b>Всього</b>		<b>34</b>

Після народження проведено санацію верхніх дихальних шляхів, інтубацію трахеї, розпочато інвазивну ШВЛ. Протягом першої години життя дитині введено «Курсорф». Дитина отримувала іШВЛ з 19.04 по 22.04.2021 р, потім переведена на неінвазивну ШВЛ (22-25.04.2021 р.) та СРАР-терапію (25-27.04.2021 р.). Ентеральне харчування розпочате грудним молоком в 1-шу добу життя. Зривів ентерального годування не спостерігалось. У зв'язком з розвитком важкої анемії хлопчику були перелиті однокрупні еритроцити 31.05.2021. Офтальмологом діагностовано ретинопатію III ступеня обох очей.

За запропонованою моделлю Іван Л. отримав 34 бали. Таким чином, із 95% вірогідністю хлопчик має бронхолегеневу дисплазію і потребує призначення базисної терапії для попередження рецидивів в майбутньому.

Отже, на розвиток бронхолегеневої дисплазії найбільший вплив чинить малий гестаційний вік та низька маса тіла, важка та помірна асфіксія при народженні з подальшою тривалою кисневою залежністю. Значущими діагностичними критеріями виступають наявність анемії та ретинопатії, функціонування ВАП в новонародженого.

Беручи до уваги запропоновані моделі, можна зробити висновок, що розвиток РДС, ретинопатії та БЛД найбільш ймовірний при низьких показниках гестаційного віку та маси тіла при народженні, але суттєвий вплив чинять також наявність перинатальної гіпоксії та індивідуальні особливості раннього адаптаційного періоду. Значущим негативним фактором є анемія новонародженого, що потенціює гіпоксію немовляти. Наявність інфекції сечовивідних шляхів з бактеріурією, гострого вагінозу в матері під час вагітності виступають загрозливими факторами ризику ускладнень в новонароджених. Рання діагностика та лікування цих патологічних станів в матері є важливими засобами профілактики ускладнень в новонародженого.

Спосіб вигодовування має суттєвий вплив на стан дитини після народження. Грудне вигодовування є потужним протекторним фактором розвитку персистуючого запалення в легенях, а отже потенційно може сприяти скороченню необхідності кисневої підтримки, що, в свою чергу, чинить профілактичний вплив на стан сітківки немовляти, перешкоджаючи розвитку ретинопатії.

## РОЗДІЛ 6

### **МАТЕМАТИЧНЕ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ХАРЧОВОЇ ІНТОЛЕРАНТНОСТІ/НЕКРОТИЗУЮЧОГО ЕНТЕРОКОЛІТУ В ПЕРЕДЧАСНО НАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ НА ОСНОВІ КЛІНІКО-АНАМНЕСТИЧНИХ ДАНИХ ТА РІВНІВ ФАКТОРІВ ТРАНСКРИПЦІЇ**

З огляду на виявлені статистично значущі відмінності клініко-анамнестичних даних та лабораторних показників факторів транскрипції T-bet та FOXP3 в недоношених новонароджених з ХІ/НЕК було проведено математичне моделювання ймовірності розвитку цієї патології кишечника. Метою даного дослідження була розробка простої шкали прогнозу ХІ/НЕК, що могла б застосовуватись в практичній медицині для покращення ефективності лікувально –профілактичних заходів.

Для побудови математичної моделі використовували наступний алгоритм:

- 1) визначення статистично значущих відмінностей показників, кореляційних зв'язків в групах дітей з ХІ/НЕК та без ХІ/НЕК;
- 2) проведення ROC-аналізу для виявлення оптимальних порогових значень факторів ризику з найкращим співвідношенням чутливості і специфічності (точка відсікання); оцінка значущості впливу цих факторів на розвиток захворювання та їх діагностичної цінності, перевірка гіпотези за допомогою статистичного порівняння та виявлення кореляційних зв'язків;
- 3) розробка багатофакторної математичної моделі на основі алгоритму Вальда;
- 4) оцінка валідності представленої моделі та інтерпретація результатів.

Для прогнозування було обстежено 62 дитини у віці до 28 днів, що народились передчасно: 32 немовляти на грудному вигодовуванні та 30 немовлят на штучному вигодовуванні. 12 з новонароджених груп обстеження мали клінічну картину ХІ/НЕК. За обов'язковою інформованою згодою матері (опікуна) дітям проводили дослідження рівня експресії T-bet та FOXP3 в клітинах зішкребу букальної слизової



оболонки (відносно нормалізованого рівня експресії цих факторів у доношених новонароджених, який умовно прийняли за 1 ум. од.); збирали клініко-анамнестичні дані.

### **6.1. Визначення валідних факторів ризику розвитку ХІ/НЕК**

Серед факторів ризику, що могли статистично достовірно сприяти ХІ/НЕК, виділені наступні: рівень експресії T-bet, FOXP3 в новонароджених, тип вигодовування (штучне чи грудне), вага при народженні, необхідність проведення неінвазивної штучної вентиляції легень, в т.ч. і СРАР-терапії протягом перших 2 годин після народження, тривалість часткового парентерального харчування та інфузійної підтримки, оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині, початок ентерального годування.

Далі за допомогою ROC-аналізу (Receiver Operator Characteristic — операційна характеристика приймача) знаходили значення розділяючого порогу (точку відсікання) значень перелічених факторів ризику при найкращій діагностичній цінності тесту. Кількісну інтерпретацію ROC-аналізу відображали за допомогою показника AUC (Area Under Curve, площі під кривою) з 95 % довірчим інтервалом (ДІ). Гранично допустимим вважали значення AUC більше 0,5, що відповідало допустимій якості моделі. Точки відсікання знаходили за допомогою індексу Юдена (J). За побудованими кривими проведена оцінка критичних порогів прогнозу щодо розвитку ХІ/НЕК у передчасно народжених немовлят. Також були розраховані статистичні показники діагностичної цінності запропонованих тестів: чутливість (Se) та специфічність (Sp) [303-304].

Наявність впливу критичних значень факторів перевірялась за допомогою статистичного порівняння частот (критерію згоди Пірсона ( $\chi^2$ ) та точного критерію Фішера при значеннях, близьких до 0 або 100), визначення кореляційних зв'язків (коефіцієнт кореляції Спірмена (r)) та оцінки відносного ризику розвитку ХІ/НЕК при наявному факторі ризику (ВР). Розрахунок діагностичних коефіцієнтів (ДК) для побудови моделі проводили за допомогою послідовного (секвенційного) аналізу Вальда; інформативність критичних значень фактору оцінювали за коефіцієнтом

Кульбака (I). Рівень статистичної значущості при перевірці усіх гіпотез приймався за  $p < 0,05$ .

*Зв'язок рівня експресії фактору T-bet з розвитком XI/НЕК*

За результатами ROC-аналізу показників експресії T-bet побудовано криву, що не перетинала контрольну діагональ (рис. 6.1). Показник AUC відповідав 0,641 (0,506-0,760) при  $p = 0,047$ . Точкою відсікання визначено експресію T-bet на рівні вищому за 1,76 ум. од. Монофакторіальне визначення рівня T-bet для оцінки ризику розвитку XI/НЕК має високу чутливість ( $Se = 91,7\%$ ), проте відносно помірну специфічність ( $Sp = 52,1\%$ ).

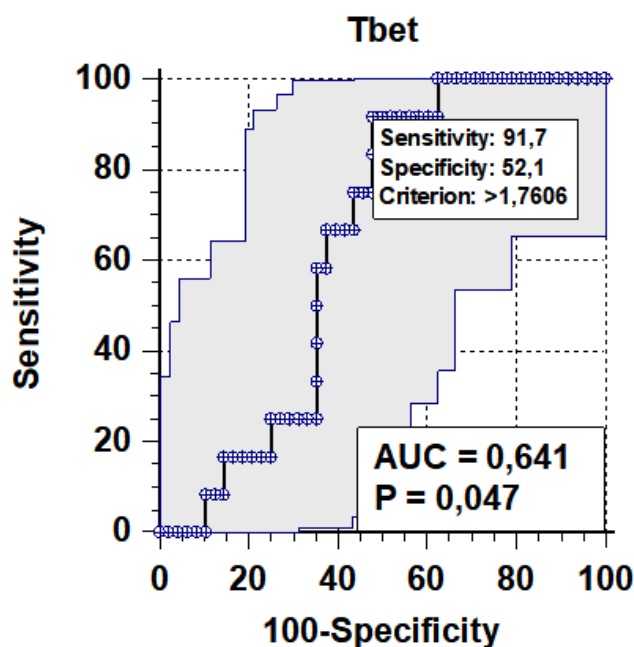


Рис.6.1. Дані ROC-аналізу щодо визначення прогностичної цінності рівня експресії T-bet для розвитку харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених.

Подальша перевірка гіпотези показала, що зростання рівня T-bet вище 1,76 ум.од. напряму корелювало з підвищенням числа пацієнтів з XI/НЕК:  $r = 0,353$ ;  $p = 0,006$ . При рівні T-bet, вищому за 1,76 ум.од., відносний ризик розвитку XI/НЕК підвищувався майже в 2 рази ( $BP = 1,91$ ,  $ДК = 2,8$ ,  $p = 0,006$ ).

### Зв'язок рівня експресії фактору FOXP3 з розвитком XI/НЕК

ROC-аналіз впливу рівня фактору транскрипції FOXP3 на розвиток XI/НЕК показав збільшення вірогідності захворювання при значенні показника  $\leq 0,07$  ум.од. (рис.6.2). При цьому значення AUC дорівнювало 0,686 (0,553-0,799)

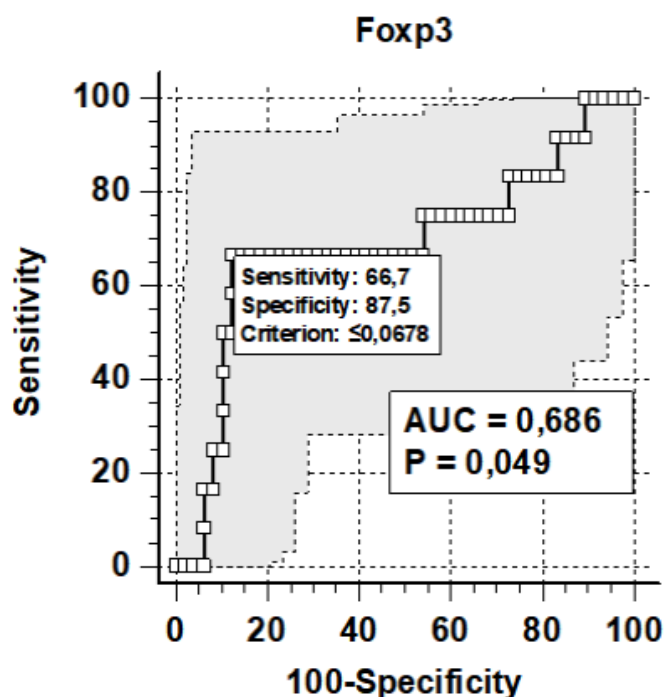


Рис.6.2. Дані ROC-аналізу щодо визначення прогностичної цінності рівня експресії FOXP3 для розвитку харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених.

при  $p = 0,049$ . Даному критерію була притаманна висока специфічність ( $Sp = 87,5\%$ ) при помірній чутливості ( $Se = 66,7\%$ ). Зниження відносного рівня FOXP3 нижче за  $0,07$  ум.од. достовірно асоціювалося з підвищенням чисельності дітей, хворих на XI/НЕК:  $r = 0,512$ ,  $p < 0,001$ , а відносний ризик розвитку НЕК підвищувався в 5,3 рази:  $VP = 5,33$ ;  $ДК = 7,3$ ;  $p < 0,001$ .

### Зв'язок ваги при народженні з розвитком XI/НЕК

При проведенні ROC-аналізу було визначено підвищення вірогідності розвитку XI/НЕК при пороговому значенні ваги тіла при народженні  $\leq 1490$  г (рис.6.3). Це відповідає раніше опублікованим даним, які підтверджують підвищення частоти випадків НЕК при масі при народженні  $< 1500$  г [292-295].

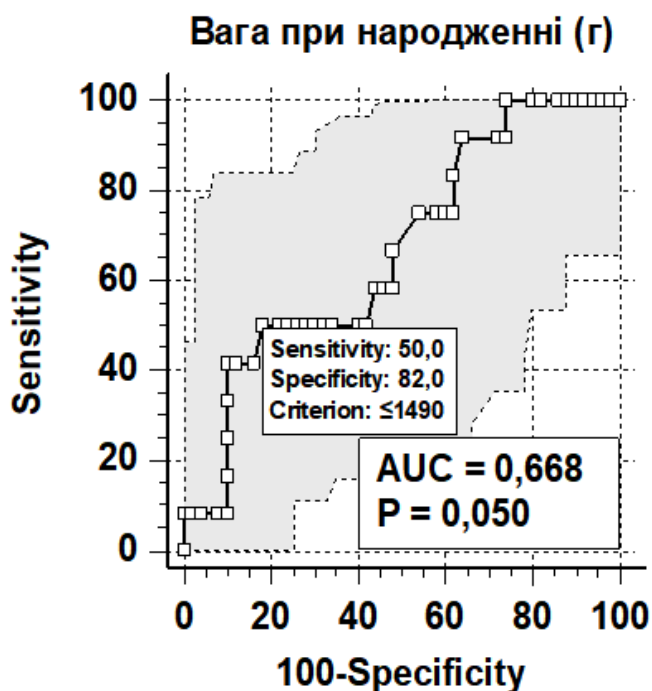


Рис. 6.3. Дані ROC-аналізу щодо визначення прогностичної цінності ваги при народженні для розвитку харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених.

Даній кривій відповідала  $AUC=0,668$  (0,537-0,783);  $p = 0,050$ . Хоча цьому критерію була притаманна доволі низька чутливість ( $Se = 50,0\%$ ), специфічність була високою ( $Sp = 82,0\%$ ). Подальша перевірка гіпотези виявила прямий кореляційний зв'язок між масою тіла при народженні нижче 1500 г та розвитком клініки ХІ/НЕК:  $r = 0,295$ ,  $p = 0,02$ . Визначено підвищення відносного ризику розвитку ХІ/НЕК в 2,8 рази при наявності цього фактору ризику ( $BP = 2,78$ ;  $ДК = 4,4$ ;  $p = 0,02$ ).

*Зв'язок оцінки за шкалою Апгар на першій хвилині життя з розвитком ХІ/НЕК*

Результати наших досліджень вказують на суттєвий негативний вплив помірної та важкої асфіксії на розвиток ХІ/НЕК. При значенні оцінки за шкалою Апгар (ОША)  $\leq 6$  балів,  $AUC=0,679$  (0,548-0,792) при  $p = 0,016$  (рис.6.4). Даний критерій характеризується високою чутливістю ( $Se = 91,7\%$ ), проте низькою специфічністю ( $Sp = 40,0\%$ ). Подальша статистична обробка виявила прямий кореляційний зв'язок між зниженням показника ОША менше 6 балів на першій хвилині життя і розвитком

XI/НЕК:  $r = 0,264$ ,  $p = 0,037$ . Розрахунок показника ВР підтвердив підвищення ризику XI/НЕК в 1,5 рази під впливом даного фактору (ВР = 1,53; ДК = 1,84;  $p = 0,037$ ).

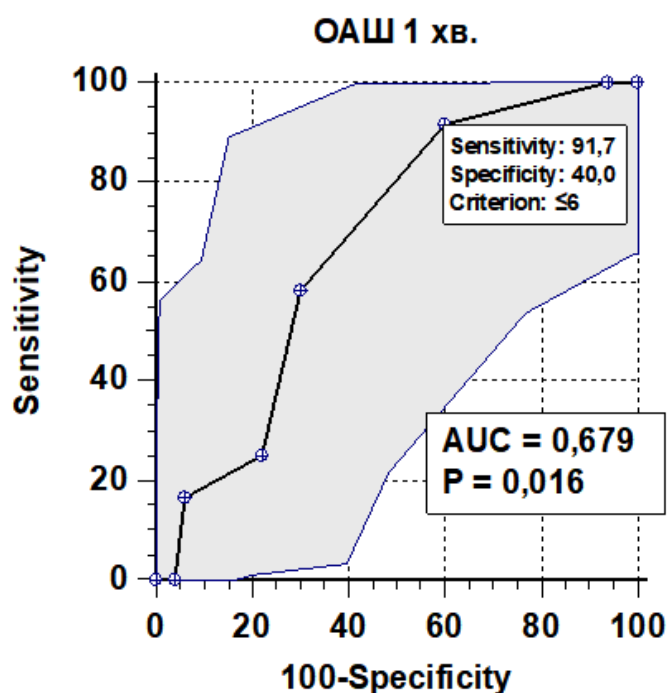


Рис. 6.4. Дані ROC-аналізу щодо визначення прогностичної цінності значення ОАШ на першій хвилині життя для розвитку харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених.

Примітка: ОАШ – оцінка за шкалою Апгар.

*Зв'язок проведення неінвазивної ШВЛ, в тому числі СРАР-терапії, після народження з розвитком XI/НЕК*

Дослідження впливу проведення неінвазивної ШВЛ (в тому числі СРАР-терапії) протягом перших 2 годин життя за допомогою ROC-аналізу показало достовірне підвищення ризику розвитку XI/НЕК у новонароджених при наявності цього фактору ризику:  $AUC = 0,687$  (0,556-0,799),  $p = 0,005$  (рис.6.5). Чутливість методу монофакторіального прогнозу розвитку XI/НЕК за цим критерієм була високою ( $Se = 83,3\%$ ), проте їй відповідала низька специфічність ( $Sp = 54,0\%$ ).

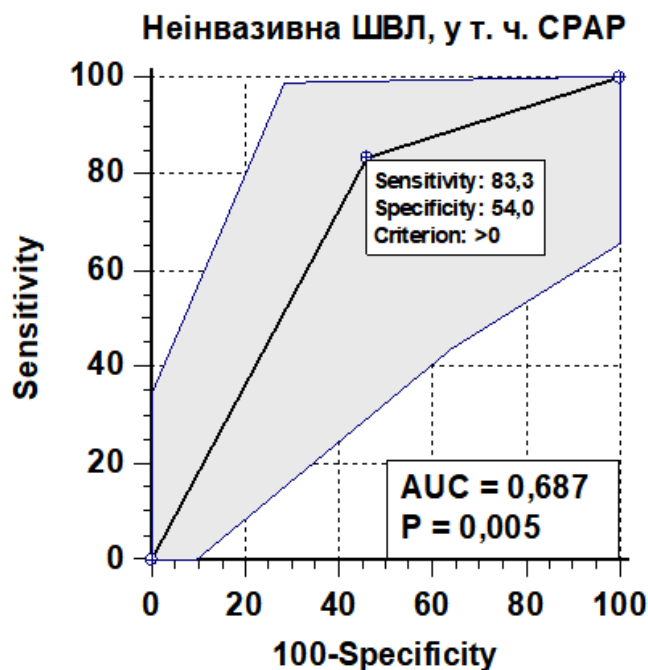


Рис. 6.5. Вплив неінвазивної штучної вентиляції легень (в тому числі СРАР-терапії) на розвиток харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених (за даними ROC-аналізу).

Примітка: СРАР – терапія постійним позитивним тиском кисню

Порівняння вибірок дітей з ХІ/НЕК і без ХІ/НЕК, що мали неінвазивну (нШВЛ) після народження, показало наявність статистично достовірної різниці в групах ( $p = 0,020$ ). Було виявлено прямий кореляційний зв'язок між проведенням нШВЛ після народження та розвитком клініки ХІ/НЕК:  $r = 0,296$ ,  $p = 0,02$ . Таким чином, наявність описаного фактору збільшує відносний ризик розвитку ХІ/НЕК в 1,8 рази ( $BP = 1,81$ ;  $ДК = 2,6$ ;  $p = 0,02$ ).

#### *Зв'язок способу вигодовування з розвитком ХІ/НЕК*

Оцінка впливу способу вигодовування за допомогою ROC-аналізу показала достовірне підвищення частоти випадків ХІ/НЕК при штучному вигодовуванні:  $AUC = 0,665$  ( $0,534-0,780$ ) при  $p = 0,026$ ,  $Se = 75,0\%$ ,  $Sp = 58,0\%$  (рис.6.6). Було доведено прямий кореляційний зв'язок розвитку ХІ/НЕК із виключним вигодуванням сумішшю ( $r = 0,261$ ,  $p = 0,041$ ). Аналіз виявив підвищення ризику розвитку ХІ/НЕК в 1,8 рази при штучному вигодуванні ( $BP = 1,79$ ;  $ДК = 2,5$ ;  $p = 0,04$ ).

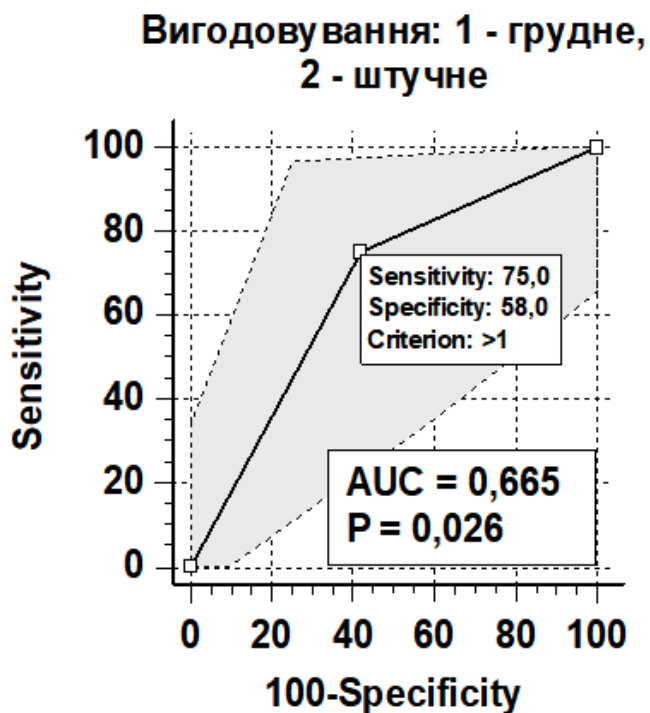


Рис. 6.6. Вплив способу вигодовування на розвиток харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених (за даними ROC-аналізу).

#### *Зв'язок початку ентерального годування з розвитком XI/НЕК*

Результати досліджень доводять значущий достовірний зв'язок ранньої ентеральної паузи з розвитком XI/НЕК. Проведений ROC-аналіз визначив суттєве підвищення вірогідності XI/НЕК при початку ентерального годування (в тому числі і трофічного годування) пізніше за 2 добу життя: AUC = 0,853 (0,711-0,996);  $p < 0,001$  (рис.6.7).

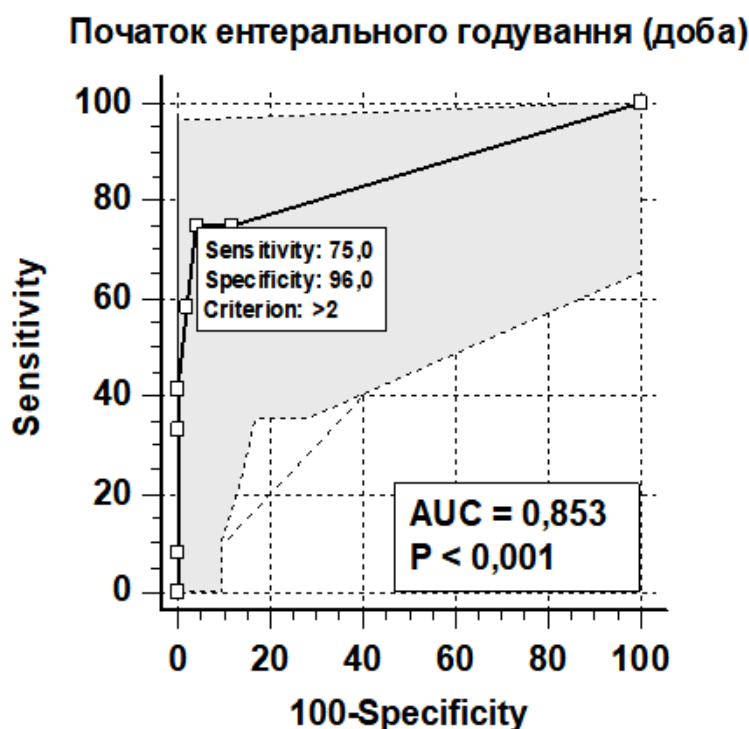


Рис. 6.7. Дані ROC-аналізу щодо визначення прогностичної цінності показника початку ентерального вигодовування (дні) для розвитку харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених.

Аналіз впливу фактору тривалості ранньої ентеральної паузи більше 2 діб на розвиток ХІ/НЕК показав сильний прямий кореляційний зв'язок між ними ( $r = 0,736$ ;  $p < 0,001$ ) та високі показники прогностичної цінності критерію:  $Se = 75,0\%$ ,  $Sp = 96,0\%$ . За нашими даними, ймовірність ХІ/НЕК підвищувалась більш ніж у 18 разів при відтермінуванні початку ентерального вигодовування ( $VP = 18,75$ ;  $ДК = 12,7$ ;  $p < 0,001$ ).

*Зв'язок тривалості парентерального харчування та інфузійної підтримки з розвитком ХІ/НЕК*

Отримані нами результати доводять підвищення ймовірності ХІ/НЕК за потреби часткового парентерального харчування та інфузійної підтримки понад 8 днів. Даній ROC-кривій відповідала  $AUC = 0,725$  ( $0,575-0,845$ ) при значенні  $p = 0,013$  (рис. 6.8). Цей однофакторіальний метод прогнозування ХІ/НЕК характеризувався відносно високими рівнями чутливості ( $Se = 72,7\%$ ) та специфічності ( $Sp = 72,2\%$ ).



Подальші дослідження виявили прямий помірний зв'язок необхідності подовження часткового парентерального харчування та інфузійної терапії з розвитком ХІ/НЕК:  $r = 0,392$ ;  $p = 0,007$ . В 2,6 разів частіше клініка ХІ/НЕК супроводжувалась необхідністю інфузійної підтримки понад 8 днів ( $BP = 2,62$ ;  $DK = 4,2$ ;  $p = 0,007$ ).

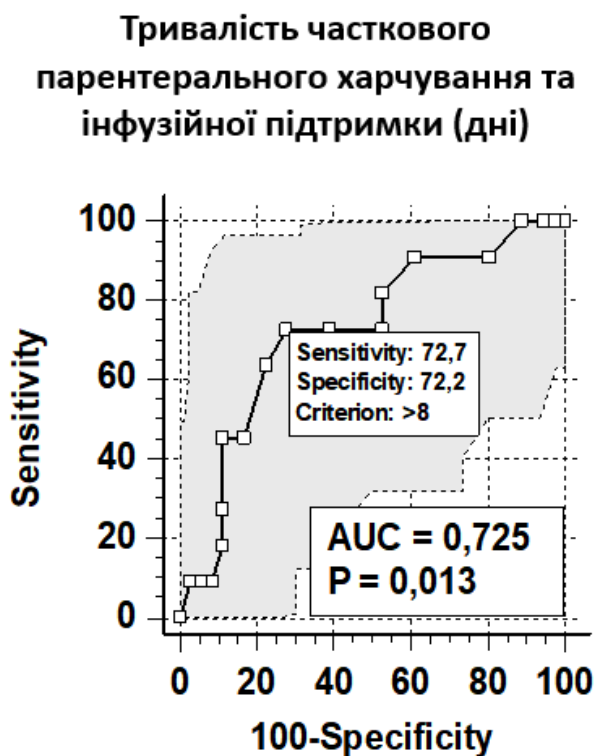


Рис. 6.8. Дані ROC-аналізу щодо визначення прогностичної цінності тривалості часткового парентерального харчування та інфузійної підтримки (дні) для розвитку харчової інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених.

## **6.2. Побудова математичної моделі оцінки ймовірності розвитку ХІ/НЕК у недоношених новонароджених**

На основі виявлених клініко-анамнестичних та лабораторних критеріїв діагностики була розроблена математична шкала оцінки ймовірності розвитку ХІ/НЕК у передчасно народжених немовлят (табл.6.1).

Таблиця 6.1

**Модель оцінки ймовірності розвитку та діагностики ХІ/НЕК у передчасно народжених немовлят**

Ознака	Критичне значення	Діагностичний коефіцієнт (ДК)	Коефіцієнт Кульбака (I)*
Початок ентерального харчування (дні)	>2	12,7	<b>6,59</b>
	≤2	-5,8	
Рівень експресії FOXP3 (ум.од.)	<0,07	7,3	<b>3,10</b>
	≥0,07	-4,2	
Рівень експресії T-bet (ум.од.)	>1,76	2,8	<b>2,36</b>
	≤1,76	-7,9	
Тривалість часткового парентерального харчування та інфузійної терапії (дні)	>8	4,2	<b>1,89</b>
	≤8	-4,2	
Проведення нШВЛ ( в т.ч. СРАР) після народження	так	2,6	<b>1,44</b>
	ні	-5,1	
Оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині життя	≤6	1,8	<b>1,37</b>
	>6	-6,8	
Вага при народженні (г)	≤1490	4,4	<b>1,05</b>
	>1490	-2,1	
Штучне вигодовування	так	2,5	<b>1,02</b>
	ні	-3,7	

Примітка: нШВЛ - неінвазивної штучної вентиляції легень, СРАР - терапія постійним позитивним тиском кисню; \* – показники упорядковані (ранжовані) за значенням коефіцієнта Кульбака для позитивного ДК.

Принцип роботи з даною математичною моделлю оцінки ймовірності розвитку та діагностики ХІ/НЕК у недоношених новонароджених полягає в складанні діагностичних коефіцієнтів (ДК). При досягненні сумарного значення ДК в 6 балів ймовірність розвитку ХІ/НЕК у передчасно народженої дитини становить 80 %, 9,5 балів – 90 %, 13 балів – 95 %. В усіх випадках зберігається висока специфічність (96,0

– 98,0 %) та чутливість (83,3 %) прогнозу. В залежності від ступеня значущості прогнозу ймовірність хибно позитивного результату буде становити 2-4 %. Ймовірність хибно позитивного результату залишається сталою і становить 16,7 %.

Інтерпретація сумарних значень ДК за представленою математичною моделлю оцінки ймовірності розвитку ХІ/НЕК показана в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2

**Інтерпретація результатів підрахунку за математичною моделлю оцінки ймовірності розвитку та діагностики ХІ/НЕК у передчасно народжених новонароджених**

Показники моделі	Вірогідність розвитку ХІ/НЕК		
	80%	90%	95%
Кількість балів ДК	6	9,5	13
Чутливість, %	83,3	83,3	83,3
Специфічність, %	96,0	96,0	98,0
Хибно негативний результат, %	16,7	16,7	16,7
Хибно позитивний результат, %	4,0	4,0	2,0
Точність прогнозу, %	93,5	93,5	95,2
Прогностична цінність позитивного результату, %	83,3	83,3	90,9
Прогностична цінність негативного результату, %	96,0	96,0	96,1

Розрахунок ймовірності розвитку ХІ/НЕК в передчасно народженої дитини на основі представленої математичної моделі наводимо в прикладах.

*Приклад 1.*

Хлопчик Павло М., 22.06.2021 р.н. був госпіталізований до відділення анестезіології та інтенсивної терапії в 1-шу добу життя. Хлопчик народився в гестаційному терміні 32 тижнів з масою тіла 1390 г. Стан після народження важкий

за рахунок дихальних розладів, неврологічної симптоматики на тлі морфофункціональної незрілості. Оцінка за шкалою Апгар на 1-й хвилині життя – 5 балів, на 5-й – 6 балів. В пологовому залі розпочаті реанімаційні заходи: інтубація трахеї з ШВЛ. Отримував інвазивну ШВЛ протягом 3 діб, потім переведений на СРАР-терапію протягом 5 діб. Ентеральне харчування розпочато з 6 доби життя адаптованою молочною сумішшю. На 9-ту добу життя для подальшого лікування дитина переведена до відділення для недоношених дітей. Тривалість часткового парентерального харчування та інфузійної підтримки склала 12 діб. Павло М. має 30,6 балів за наведеною шкалою (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

**Розрахунок ймовірності розвитку харчової  
інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в новонародженого Павла М.,  
22.06.2021 р.н.**

<b>Ознака</b>	<b>Критичне значення</b>	<b>Діагностичний коефіцієнт</b>
Початок ентерального харчування (дні)	>2	12,7
Рівень експресії FOXP3 (ум.од.)	0,039 ( $\leq 0,068$ )	7,3
Тривалість часткового парентерального харчування та інфузійної терапії (дні)	12 (>8)	4,2
Маса тіла при народженні (г)	1390 ( $\leq 1490$ )	4,4
Рівень експресії T-bet (ум.од.)	6,62 (>1,760)	2,8
Проведення нШВЛ ( в т.ч. СРАР) після народження	ні	-5,1
Штучне вигодовування	так	2,5
Оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині життя	5 ( $\leq 6$ )	1,8
<b>Всього</b>		<b>30,6</b>

Загальний результат більше 13 балів. Отже, з 95 % вірогідністю Павло М. на момент переведення до відділення для недоношених дітей мав XI/НЕК. При даній кількості балів вірогідність хибно позитивного результату складає 2,0 %.

*Приклад 2.*

Хлопчик Мирослав П., 20.03.2021 р.н. переведений у відділення анестезіології та інтенсивної терапії в першу добу життя. Дитина від другої вагітності, перших самостійних пологів у терміні 32 тижні. Маса тіла при народженні 1200 г. Оцінка за шкалою Апгар на 1-й хвилині – 4 бали, на 5-й хвилині – 5 балів. Стан після народження важкий за рахунок дихальних розладів, неврологічної симптоматики на тлі морфо-функціональної незрілості. Реанімаційні заходи в пологовій залі: санація верхніх дихальних шляхів, СРАР-терапія. Ентеральне годування розпочате грудним молоком з першої доби життя. Хлопчик потребував часткового парентерального харчування та інфузійної підтримки протягом 11 діб. Дитина переведена у відділення виходжування новонароджених на 14-й день життя. Розрахунок вірогідності XI/НЕК в Мирослава П. представлений в таблиці 6.4.

*Таблиця 6.4*

**Розрахунок ймовірності розвитку харчової  
інтолерантності/некротизуючого ентероколіту в новонародженого Мирослав  
П., 20.03.2021 р.н.**

<b>Ознака</b>	<b>Критичне значення</b>	<b>Діагностичний коефіцієнт</b>
Початок ентерального харчування (дні)	1 (<2)	-5,8
Рівень експресії FOXP3 (ум.од.)	0,203 (>0,068)	-4,2
Тривалість часткового парентерального харчування та інфузійної терапії (дні)	11 (>8)	4,2

Маса тіла при народженні (г)	1200 ( $\leq 1490$ )	4,4
Рівень експресії T-bet (ум.од.)	1,508 ( $< 1,760$ )	-7,9
Проведення нШВЛ ( в т.ч. СРАР) після народження	так	2,6
Штучне вигодовування	ні	-3,7
Оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині життя	4 ( $\leq 6$ )	1,8
<b>Всього</b>		<b>-8,6</b>

Мирослав П. має - 8,6 балів за даною моделлю. Таким чином, хлопчик із ймовірністю 95 % не має ХІ/НЕК. Вірогідність хибно негативного результату становить 16,7 %, тому дитині рекомендоване динамічне спостереження на предмет розвитку порушень харчової толерантності.

Таким чином, успішний початок раннього ентерального харчування (в тому числі трофічного), характер вигодовування, рівень факторів транскрипції T-bet та FOXP3, оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині життя та проведення ранньої неінвазивної штучної вентиляції легень (в тому числі і СРАР-терапії) є основними предикторами розвитку ХІ/НЕК в немовлят. Простота використання представленої діагностичної моделі ймовірності розвитку ХІ/НЕК у передчасно народжених новонароджених і високий відсоток специфічності цього методу дозволяє рекомендувати його для застосування в практичній діяльності лікарів-неонатологів, дитячих анестезіологів та педіатрів.

**Матеріали даного розділу дослідження відображені в наступних публікаціях:**

1. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Вплив miR-155 грудного молока на стан здоров'я недоношених новонароджених. *Child's Health (Ukraine)*, 2022,17(7), 347–353. ISSN 2224-0551 (print), ISSN 2307-1168 (online). <https://doi.org/10.22141/2224-0551.17.7.2022.1539>.

2. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Фактор транскрипції T-bet — діагностичний маркер розвитку некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених. Сучасна педіатрія (Україна). 2022, 8 (128). С. 6-11. ISSN 2663-7553 (print); 2706-6134 (online). doi 10.15574/SP.2022.128.6.

3. Абатуров ОЄ. Товарницька АО. Усна доповідь, тези. Епігенетичний вплив грудного молока на імунну толерантність в передчасно народжених дітей. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «ХІ наукова сесія інституту гастроентерології НАМН України. Новітні технології в теоретичній та клінічній гастроентерології» м. Дніпро, 14-15 червня 2023.

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Передчасне народження немовлят (до 37 повних тижнів гестації) на сьогодні залишається всесвітньою проблемою. В середньому кожна 10-та дитина в світі народжується раніше встановленого терміну. Недоношеність займає лідируючу позицію серед причин смертності немовлят до 5 років. Щорічно від ускладнень недоношеності помирає близько 1 мільйона дітей [1]. В Україні відсоток передчасно народжених немовлят становить 5,4 %, що відповідає середньоєвропейським показникам. [2, 305].

Респіраторний дистрес-синдром (РДС); бронхолегенева дисплазія (БЛД); некротизуючий ентероколіт (НЕК); порушення харчової толерантності; ретинопатія; персистуюча відкрита артеріальна протока (ВАП) залишаються серед найчастіших наслідків недоношеності [4-5]. Патогенетичною основою для розвитку більшості з цих станів є гострий запальний процес, що в передчасно народжених немовлят характеризується переважанням неспецифічної імунної відповіді, в той час коли Т-клітинна відповідь, зокрема Т-регуляторних клітин, залишається менш активною. Вивільнення ж прозапальних факторів, таких як TNF, IL-1, IL-6, IL-8, в таких дітей менш контрольоване, може супроводжуватись високими титрами цитокінів, що на пряму корелює з важкістю запалення і несприятливим прогнозом [78, 81, 83 -89].

На сьогодні увагу науковців всього світу привертає можливість епігенетичної модуляції запальної відповіді новонародженого, зокрема через дію мікроРНК грудного молока. Грудне молоко – потужне джерело мікроРНК, які завдяки надзвичайній стійкості, всмоктуються в кишечнику немовляти і транспортуються до різних органів і тканин дитини [122, 127 , 139]. Більшість з цих екзогенних мікроРНК впливають на імунну відповідь, процеси метаболізму [135]. Окремо відзначається роль мікроРНК грудного молока в диференціюванні та дозріванні клітин кишечника, впливу на баланс запальних і протизапальних процесів в його стінках, становлення харчової толерантності [33, 124, 134]. Не зважаючи на прогрес у вивченні впливу



мікроРНК грудного молока на стан здоров'я новонароджених, бракує даних які б відображали відмінності складу мікроРНК в материнському молоці передчасно народжених дітей з проблемами адаптації і можливий вплив цих молекул на розвиток ускладнень недоношеності, зокрема НЕК. Досить висока вірогідність появи низки довготривалих наслідків передчасного народження і їх негативного впливу на якість і інколи тривалість життя немовлят [8-11] викликають необхідність у виділенні факторів ризику для прогнозування ускладнень з метою підвищення ефективності лікувально-профілактичних заходів при виходжуванні недоношених немовлят.

Метою нашого дослідження було встановити значущість клініко-біологічних факторів експозома, miR-148a та miR-155 грудного молока матері, факторів транскрипції T-bet та FOXP3 дитини в прогнозуванні індивідуальної ймовірності розвитку патологічних станів у недоношених новонароджених.

Для досягнення мети нами були вирішені наступні завдання:

1. Вивчити частоту патологічних станів, асоційованих з недоношеністю, на основі ретроспективного аналізу особливостей періоду новонародженості в передчасно народжених дітей.
2. Визначити фактори ризику розвитку патологічних станів, асоційованих з недоношеністю.
3. Дослідити рівень концентрації мікроРНК-148a та мікроРНК-155 у грудному молоці матерів недоношених дітей.
4. Встановити залежність перебігу патологічних станів у недоношених новонароджених від рівня концентрації мікроРНК-148a та мікроРНК -155 грудного молока їх матерів.
5. Вивчити вплив грудного молока матері на рівень експресії факторів транскрипції T-bet та FOXP3 недоношених дітей.
6. Розробити прогностичну модель ризику розвитку патологічних станів у недоношених новонароджених.

Для виконання поставлених завдань дисертації на першому етапі роботи був проведений ретроспективний аналіз 300 випадково відібраних історій хвороби новонароджених дітей, що народились до 37 тижнів гестації та знаходились на

стаціонарному лікуванні у відділенні для постінтенсивного догляду та виходжування новонароджених Комунального підприємства «Регіональний медичний центр родинного здоров'я» Дніпропетровської обласної ради (генеральний директор – О.О. Власов, завідувачка відділенням - І.І. Самохіна), та відділенні для недоношених новонароджених Комунального некомерційного підприємства «Міська багатопрофільна клінічна лікарня матері та дитини ім. проф. М.Ф. Руднева» Дніпровської міської ради» (генеральний директор – І.О. Македонський, завідувач відділенням – О.О. Тебердєєв) протягом 2020-2021 років. На другому етапі було проведено комплексне обстеження 62 новонароджених дітей, що народились до 37 тижнів гестації і отримували лікування в тих самих відділеннях протягом 2021 року. До цієї когорти увійшли 32 немовляти, які знаходились виключно на грудному вигодовуванні та 30 дітей - на виключно штучному вигодовуванні. Групу порівняння склали 12 новонароджених дітей, що народились після 37 тижнів гестації, стан яких був відносно задовільний на момент проведення дослідження.

Критеріями включення були виключно грудне або виключно штучне вигодовування з моменту народження, вік на момент обстеження до 28 дня; наявність інформованої згоди з боку їхніх батьків чи опікунів.

Критерії виключення були важкий та клінічно нестабільний стан новонароджених; змішане харчування або зміна харчування в анамнезі; вік немовляти старше 28 дня; наявність запальних захворювань матері, що потребували медикаментозного втручання; наявність запальних ознак запалення слизової оболонки ротової порожнини, носо- і ротоглотки немовлят.

Верифікація діагнозу та клінічне обстеження проводилось згідно з відповідними клінічними настановами інтернет-платформи UpToDate, яка Наказом МОЗ України від 29.12.2016 № 1422 «Про внесення змін до наказу Міністерства охорони здоров'я України від 28 вересня 2012 року № 751» рекомендована для використання як провідного джерела клінічних рекомендацій; чинними протоколами МОЗ: «Некротизуючий ентероколіт у передчасно народжених дітей» №182 від 28 січня 2022 року [7]; «Респіраторний дистрес-синдром у передчасно народжених дітей» № 873 від 05.05.2021 року [6]; уніфікований клінічний протокол «Початкова,

реанімаційна і післяреанімаційна допомога новонародженим в Україні» № 225 від 28.03.2014 [267]; уніфікований клінічний протокол вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Ентеральне харчування недоношених немовлят», затверджений наказом МОЗ України №870 від 05.05.2021 р [268]; наказ МОЗ України «Про затвердження Протоколу з лікування дітей з ретинопатією недоношених» №683 від 21.09.2009 року [59].

Крім ретельного клінічного обстеження та збору анамнестичних даних, було проведено та інтерпретовано результати клінічного аналізу крові, С-реактивного білку, глюкози крові за загальноприйнятими методиками [269-272]. Рентгенологічне дослідження органів черевної порожнини та/або грудної клітини проводилось для підтвердження діагнозу та визначення ступеню важкості захворювання при наявній клініці НЕК, при стійких та прогресуючих проявах дихальної недостатності. Виконання рентгенографії та інтерпретація результатів також відповідали загальноприйнятим методикам і стандартам [273-275].

Всім дітям груп обстеження було проведено визначення рівня експресії факторів транскрипції FOXP3, T-bet в клітинах зішкребу букальної слизової оболонки. Також було досліджено рівень експресії мікроРНК-155 та мікроРНК-148a в грудному молоці дітей, що перебували на грудному вигодовуванні. Середній вік новонароджених на момент забору матеріалу становив 8 (6; 11) днів. Дослідження рівня експресії факторів транскрипції, концентрації мікроРНК виконувались методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (з методом зворотної транскрипції для виділення мікроРНК) за рекомендованими протоколами TaqMan®MicroRNA Assays в сертифікованій лабораторії «PCR lab Interdepartmental Training and Research Laboratory (ITRL)» Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (завідувач лабораторії – д.мед.н., професор О.М. Камишний). Визначення рівнів експресії показників проводилось відносно рівня експресії цих показників у групі контролю, де їх значення приймалось за усереднену умовну одиницю – 1,0 ум. од. Рівень мікроРНК в сумішах не визначався в зв'язку з раніше описаним дефіцитом miR в сумішах [131, 148].

Для вирішення поставлених задач і перевірки вихідних гіпотез використовувались статистичні методи дослідження. Аналіз кількісних і якісних показників проводили за допомогою параметричних і непараметричних методів; кореляційного аналізу. Для виявлення факторів ризику та побудови прогностичних моделей застосовували алгоритм Вальда із розрахунком міри інформативності Кульбака, показника відносного ризику (ВР), діагностичних коефіцієнтів (ДК). Пошук точки відсікання та оцінку діагностичної якості запропонованих прогностичних моделей здійснювали методом ROC-аналізу. Для всіх видів аналізу статистично достовірними вважались відмінності між ознаками, що порівнювались, при  $p < 0,05$ . Статистичні дослідження виконували за допомогою пакету статистичних програм STATISTICA v.6.1 (Statsoft Inc., США) (ліцензійний №AGAR909E415822FpA), LibreOffice та R (версія 4.1.2), MedCalc Statistical Software trial version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023).

Результати ретроспективного дослідження показали, що найчастіше передчасні пологи супроводжувались наявною активною інфекцією матері (генітальної та/або екстрагенітальною) (93 випадки, 31,0 %), загрозою викидня та/або передчасних пологів, що потребували стаціонарного лікування (87 випадків, 29,0 %), передчасним розривом плодових оболонок (76 випадків, 25,3 %). Преєклампсія спостерігалась в 52 випадках – 17,3 %. Найчастіше у передчасно народжених дітей діагностували: РДС (173 пацієнти, 57,7 %), анемію (92 випадки, 30,7 %), ретинопатію (70 пацієнтів, 23,3 %), вроджену ваду серця, в тому числі ВАП, дефект міжпередсердної перетинки, дефект міжшлуночкової перетинки (76 пацієнтів, 23,5 %), ХІ/НЕК (40 пацієнтів, 13,3 %), БЛД (29 пацієнтів, 9,7 %).

Серед факторів ризику розвитку ускладнень лідирував малий гестаційний термін. При екстремальному ступені недоношеності (гестаційний термін до 28 тижнів [306] ризик РДС зростав в 13,6 разів (ВР = 13,64,  $p = 0,001$ ), ретинопатії – в 16,3 рази (ВР = 16,31,  $p < 0,001$ ), БЛД – в 20,3 рази (ВР = 20,30,  $p < 0,001$ ). Ризик розвитку цих ускладнень залишався і при подовженні терміну гестації до 32 тижнів: вірогідність РДС підвищувалась в 8,2 рази (ВР = 8,02,  $p < 0,001$ ), ретинопатії – в 4,2 рази (ВР = 4,24,

$p < 0,001$ ), БЛД – 1,8 рази (ВР = 1,81,  $p < 0,026$ ). Низька маса тіла при народженні ( $< 1500$  г) переважно помірно сприяла розвитку цих самих станів ( $p < 0,001$ ). Хоча статистично значущого впливу низької ваги на розвиток ХІ/НЕК виявлено не було, частота випадків ХІ/НЕК підвищувалась при ознаках затримки внутрішньоутробного розвитку ( $r = 0,219$ ;  $p < 0,001$ ).

Низька оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині була пов'язана з більшою вірогідністю розвитку РДС (ВР = 10,11;  $p < 0,001$ ), персистенцією ВАП (ВР = 1,89,  $p = 0,019$ ), ретинопатією (ВР = 7,14,  $p < 0,001$ ); БЛД (ВР = 4,69;  $p < 0,001$ ). Необхідність в неінвазивній респіраторній підтримці понад 18 днів супроводжувалась достовірно частішим розвитком ретинопатії (ВР = 3,18,  $p = 0,031$ ) та БЛД (ВР = 6,32;  $p < 0,001$ ). Формування БЛД часто було пов'язане з діагностованою ретинопатією: при БЛД першого ступеня відносний ризик ретинопатії складав 9,17 ( $p < 0,001$ ), в той час коли при другому ступені підвищувався до 42,81 ( $p < 0,001$ ). Формування хронічної легеневої патології також сприяло персистенції ВАП (ВР = 3,75,  $p < 0,001$ ). Персистуюча ВАП підвищувала вірогідність розвитку ХІ/НЕК в 2 рази (ВР = 2,08,  $p = 0,029$ ). Такі результати нашого дослідження підтверджують опубліковані світові літературні дані [53, 57, 64, 66, 307].

Грудне вигодовування переважно виступало протекторним фактором та перешкоджало розвитку ускладнень. Так, результати аналізу за методом Вальда свідчать про зменшення відносного ризику розвитку ХІ/НЕК (ВР = 0,36,  $p = 0,002$ ), БЛД (ВР = 0,29,  $p = 0,004$ ), персистенції ВАП (ВР = 0,54,  $p = 0,034$ ) в дітей, що годувались грудним молоком. Хоча не було підтверджено статистично значущої відмінності формування ретинопатії при різних способах вигодовування, протекторний вплив грудного молока простежувався на рівні тенденцій (ВР = 0,71;  $p = 0,77$ ). В протилежність, штучне вигодовування сприяло розвитку ХІ/НЕК (ВР = 1,43,  $p = 0,002$ ), БЛД (ВР = 1,46,  $p = 0,004$ ), персистенції ВАП (ВР = 1,29,  $p = 0,034$ ).

Серед причин початку штучного вигодовування лідирували гіпогалактія (98 пацієнтів, 49,5%), потенційне порушення харчової толерантності через нестабільний клінічний стан дитини (34 пацієнта, 17,2 %), прийом матер'ю медикаментів, при якому грудне вигодовування було протипоказане (31 пацієнт, 15,6 %). Після пологів шляхом

кесаревого розтину лише 27,4 % матерів (40 випадків) починали годувати грудним молоком. Годування грудним молоком частіше починали дітям з пізнішим гестаційним терміном (34,0 (32,0; 35,0) проти 32,0 (30,0; 34,0) при  $p < 0,001$  та більшою масою тіла при народженні (2065 (1800; 2400) г проти 1765 (1360; 2100) г при  $p < 0,001$ ). Діти груп грудного та штучного вигодовування не відрізнялись за показниками шкали Апгар, необхідністю неінвазивної респіраторної підтримки ( $p < 0,05$ ). Хоча немовлят, що потребували інвазивної штучної вентиляції легень (іШВЛ) частіше ентерально починали годувати сумішшю (6,9 % проти 25,8 %;  $p = 0,001$ ), між групами порівняння не було різниці в тривалості іШВЛ: (6,8 (5,0; 7,0) днів у дітей на грудному вигодовуванні проти 5,0 (2,0; 8,0) днів у дітей, що отримували суміш;  $p = 0,368$ ). Немовлята на штучному вигодовуванні мали достовірно швидший щоденний темп набору ваги (14,5 (5,0; 22,0) г проти 21,4 (16,7; 27,6) г при  $p < 0,001$ ), що вірогідно можна пояснити вищим вмістом білку і калоражем в сумішах та швидшим розвитком жирової тканини. Попередні дослідження свідчать про активніший набір пластичної нежирової маси тіла в недоношених лише після 36 тижнів скорегованого віку [308]. У той же час, літературні дані підтверджують кращу утилізацію білку та швидший набір безжирової маси тіла в дітей на грудному вигодовуванні, незважаючи на можливі нижчі темпи набору загальної ваги [309-311].

Діти на штучному вигодовуванні довше вимагали інфузійної підтримки та часткового парентерального харчування: (6,0 (3,0; 13,0) днів проти 10,0 (6,0; 17,0) днів при  $p = 0,001$ ). Хоча маса тіла при виписці була вище в дітей, що отримували суміш (2530 (2310; 2860) г проти 2375 (2150; 2580) г при  $p < 0,001$ ), їх тривалість спостереження та перебування в стаціонарі також була довша: 34,0 (22,0; 52,0) проти 16,0 (10,0; 29,0) днів при  $p < 0,001$ . Подовження перебування в стаціонарі в дітей на штучному вигодовуванні може бути пов'язане з гіршою функціональною толерантністю шлунково-кишкового тракту до макронутрієнтів сумішей, тривалішою необхідністю в парентеральному харчуванні, яке пов'язане з низкою інфекційних та метаболічних ризиків [312-313]. Наші дані співпадають з результатами дослідження Kim E.J. та співавторів, які доводять швидшу адаптацію передчасно народжених немовлят на грудному вигодовуванні до ентерального харчування, швидшу відміну

вентиляційної підтримки та значно нижчу вірогідність ускладнень під час виходжування [314]. Мета-аналіз Pados В.Ф. досліджень 2002-2022 років підтверджує зменшення ймовірності розвитку НЕК, пізнього неонатального сепсису, ретинопатії, БЛД при грудному вигодовуванні [315].

На основі результатів ретроспективного дослідження нами було розроблено три прості математичні моделі ймовірності розвитку і діагностики РДС, ретинопатії та БЛД. Під час розробки прогностичних моделей були відібрані найбільш інформативні предиктори розвитку цих патологічних станів. Представлені моделі засновані на підрахунку суми балів діагностичних коефіцієнтів. Сума балів 13 і вище вказує на 95% ймовірність розвитку захворювання. Показники чутливості для моделей такої значущості становлять: при розрахунку ймовірності РДС - 75,3 %, ретинопатії – 71,8 %, БЛД – 88,5 %. Показники специфічності за таких же умов: для РДС – 83,1 %, ретинопатії – 90,3 %, БЛД – 86,6 %. Простота у використанні і достатні показники валідності дозволяють рекомендувати її в практиці лікарів–неонатологів та педіатрів.

При проведенні проспективного дослідження найчастішими патологічними станами в передчасно народжених дітей були РДС (36 пацієнтів, 56,0 %), ВШК і розширення лікворних просторів (16 пацієнтів, 25,8 %), ХІ/НЕК (12 пацієнтів, 19,3 %), перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія (19 пацієнтів, 30,6 %). Переважаючою патологією в дітей контрольної групи була гіпоксично-ішемічна енцефалопатія (11 пацієнтів, 91,7 %). Діти груп порівняння не відрізнялись за оцінкою за шкалою Апгар, загальною тривалістю респіраторної підтримки ( $p>0,05$ ).

Різниці між частотою РДС, неонатальної енцефалопатії в групах недоношених дітей не було ( $p>0,05$ ). Проте, достовірно частіше в групі передчасно народжених немовлят на штучному вигодовуванні було діагностовано ХІ/НЕК ( $p=0,041$ ): 3 випадки (9,4 %) в групі грудного вигодовування проти 9 випадків (30,0 %) в групі штучного вигодовування. Нами знайдено прямий зв'язок між штучним вигодовуванням та розвитком ХІ/НЕК:  $r=0,252$ ;  $p=0,040$ .

Тривалість ентеральної паузи в дітей з ХІ/НЕК склала в середньому  $2,9\pm 1,96$  днів. Такі результати підтверджуються чисельними світовими джерелами, які вказують на ризик розвитку ХІ/НЕК при штучному вигодовуванні, що зростає від 2

до 9 разів в порівнянні з грудним вигодовуванням [27, 312, 316-319]. Доведено, що висока осмолярність сумішей [320], не до кінця розщеплені тригліцериди [321], порушення мікробіома кишечника [322], недостатній синтез аргініну/оксиду азоту, що сприяє порушенню мікроциркуляції [323], - основні ланки патогенезу розвитку запалення кишечника при штучному вигодовуванні.

Аналіз рівня факторів транскрипції запалення в клітинах букального зішкребу виявив достовірне зниження експресії FOXP3 в дітей з ХІ/НЕК, порівняно з дітьми без такої патології ( $p = 0,038$ ): 0,22 (0,09; 0,91) ум. од. проти 0,11 (0,04; 0,25) ум. од. Було визначено зворотний кореляційний зв'язок рівня цього фактору з розвитком ХІ/НЕК:  $r = -0,246$  ( $p = 0,037$ ). Більше того, порівняно з групами дітей на грудному вигодовуванні, у дітей, що отримували суміш, рівень FOXP3 був найнижчим ( $p < 0,001$ ): 0,08 (0,04; 0,16) ум. од. в групі на штучному вигодовуванні проти 0,21 (0,14; 0,38) ум. од. - недоношених дітей на грудному вигодовуванні, проти 1,0 ум. од. – доношених новонароджених на грудному вигодовуванні. Подальше дослідження материнського грудного молока виявило відносне підвищення експресії miR-155 в молоці матерів, чиї діти народились передчасно ( $p < 0,001$ ): 6,2 (4,1; 9,2) ум. од. при передчасному народженні дитини проти 1,0 ум. од. при пологах у визначений термін. Нами було визначено зворотній кореляційний зв'язок гестаційного віку дитини та рівня експресії miR-155 в молоці його матері:  $r = -0,421$ ,  $p = 0,020$ . Посилення експресії miR-155 грудного молока матері супроводжувалось експресією FOXP3 її дитини:  $r = 0,442$ ,  $p = 0,014$ .

FOXP3 – непрямий блокатор прозапальних цитокінів IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  [225-229]. Через блокування активації IL2 та Ifng цей фактор перешкоджає продукції IL-2 та IFN $\gamma$  [230]. FOXP3 необхідний для активізації T-reg – клітин, які сприяють підтриманню периферичної імунологічної толерантності [231]. Особливо важливою є функція FOXP3<sup>+</sup>Treg в стінках кишечника, де вони стримують запальні імунні реакції на мікробіоту та харчові алергени [249]. FOXP<sup>+</sup>- клітини сприяють супресивній активності Т-клітин CD4<sup>+</sup>. І в протилежність, при генетичній абляції гену FOXP3 Treg втрачають свої супресивні властивості і починають виділяти велику кількість прозапальних цитокінів IL-17 та IFN $\gamma$  [233]. Під дією IL-6, що супроводжує



запалення кишечника [324], посилюється експресія *Stat1* та пригнічується експресія *USP7*, що веде до зниження рівня *FOXP3* і індукує розвиток *Th17 Treg* [225, 238-239].

МікроРНК-155 міститься у високих концентраціях в грудному молоці [140] і одна з найперших мікроРНК, в якій виявили імунорегуляторну активність [158]. З одного боку, вона через блокування фактору *SHIP* та активацію *NFκB* сприяє вивільненню *TNFα*, *IL-6*, *IFNβ* [160-162]; через інгібування *SOCS1* потенціює диференціювання і розвиток *Treg* та *Th17* для підтримання балансу *Th1* та *Th2* – лімфоцитами [166,183,249,]. З іншого боку, блокування сигнальної молекули *SOCS1* пригнічення фосфорювання *STAT5* призводить до посилення експресії *FOXP3* [128, 132, 168], а гіперекспресія *miR-155* призводить до блокування *MyD88*, *TAB2*, *IKKε*, *RIP1* та *C/EBPβ* і знижує рівень *IFNα*, *IFNβ*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12*, *TNFα*, *IL-1* [151, 158, 160, 177-179]. Літературні джерела свідчать, що *miR-155* через інгібування сигнальних молекул *PU.1* та *c-Maf* пригнічує синтез *IgE*, а трансактивація рецептору *FcεRI* перешкоджає *IgE*-опосередковній atopічній сенсibiliзації [128, 182]. Літературні джерела свідчать, що при дефіциті *miR-155* знижується кількість і проліферативний потенціал *FOXP3* T-регуляторних клітин [159, 166].

Таким чином, наші дослідження підтверджують тонкий регуляторний вплив *miR-155* материнського грудного молока на імунну відповідь, контроль запалення в стінках кишечника, становлення харчової толерантності та профілактику atopії в немовляти.

Попарне порівняння рівня експресії фактору транскрипції *T-bet* в клітинах букального зішкребу виявило посилення експресії при діагностованих ХІ/НЕК( $p=0,002$ ): 2,36 (1,94; 3,17) ум. од. проти 1,74 (1,01; 3,27) ум. од. Нами був доведений прямий зв'язок рівня *T-bet* з розвитком ХІ/НЕК:  $r = 0,271$ ;  $p = 0,021$ . Відносне підвищення експресії цього фактору також спостерігалось в обох групах передчасно народжених, але найвищий рівень був в недоношених немовлят на штучному вигодовуванні ( $p<0,001$ ): 2,4 (1,98; 3,84) ум. од. у дітей, що отримували суміш, проти 1,48 (1,13; 2,22) ум. од. в групі недоношених на грудному вигодовуванні проти 1,0 ум. од. у народжених у визначений термін новонароджених. Було визначено

прямий кореляційний зв'язок штучного вигодовування з рівнем експресії T-bet:  $r = 0,370$ ;  $p < 0,004$ .

Аналіз рівня експресії miR-148a виявив відносне зниження цієї мікроРНК в грудному молоці матерів, діти яких народились передчасно ( $p < 0,001$ ):  $0,089$  ( $0,048$ ;  $0,142$ ) ум. од. проти  $1,0$  ( $1,0$ ;  $1,0$ ) ум. од. Нами було визначено підвищення експресії miR-148a в материнському грудному молоці новонароджених з РДС ( $r = 0,404$ ,  $p = 0,027$ ), при наявному ВШК ( $r = 0,408$ ,  $p = 0,025$ ) в новонародженого. Рівень експресії T-bet зменшувався при посиленні експресії miR-148a:  $r = -0,371$ ;  $p = 0,043$ .

T-bet – фактор транскрипції, що сприяє розвитку Th1-клітин, вивільненню IL-1 $\alpha$  та хемокінів дендритними клітинами, потенціює цитотоксичний ефект натуральних кілерів, вивільнення IFN $\gamma$  [254-256]. IFN $\gamma$  – цитокін імунних клітин (Th1, натуральних кілерів, цитотоксичних T-лімфоцитів CD8+, вроджених клітин кишечника), який забезпечує необхідний рівень фагоцитозу, чинить протівірусний та антимікробний ефект, захищає від внутрішньоклітинних та грибкових патогенів [257-258]. Концентрація IFN $\gamma$  впливає на рівень запалення: дефіцит цитокіну сприяє швидкій інвазії патогенів; гіперекспресія супроводжується надмірним запаленням (синдром активації макрофагів, синдром вивільнення цитокінів та інші) [259-260].

При порушенні епітеліальної цілісності стінок кишечника Treg клітини приймають Th1-подібний фенотип з активною експресією фактору T-bet та продукцією IFN $\gamma$ . Літературні дані свідчать про підвищення рівня експресії T-bet навіть на ранніх стадіях запалення кишечника [234]. В експериментальних дослідженнях розвиток НЕК супроводжувався майже п'ятикратним підвищенням кількості прозапальних NKp46<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>ILC3 клітин при зниженні числа протекторних NKp46<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC3 клітин. Збільшення чисельності ILC3 клітин було пов'язане з відповідним наступним підвищенням рівню прозапальних IFN $\gamma$  та TNF [210].

МікроРНК-148a входить до найбільш представлених мікроРНК грудного молока і складає приблизно третину всього транскриптома [125,142], у високих концентрація виділяється в молозиві і ранньому молоці матерів, що народили передчасно [143-144]. Доведено, що miR-148a проявляє виражені протизапальні

властивості. Через інгібуючий вплив на сигнальні молекули CaMKII $\alpha$ , IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , експресію білка p53 ця мікроРНК гальмує NF- $\kappa$ B-шлях в імунних клітинах і пригнічує вивільнення цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  [124, 147, 150, 151]. МікроРНК-148a суттєво знижує експресію рецептору TLR4, пригнічує експресію MyD88, IRAK1 і TRAF6. В результаті блокується TLR/IL-1R-сигнальний шлях і зменшується вивільнення IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  [152]. Результати Li G. та співав. вказують також на блокування p38/MAPK-сигнального шляху через інгібівання білку p-p38, що веде до зниження продукції TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6 [325]. Отже, miR-148a справляє багатофакторний протизапальний ефект.

Літературні джерела свідчать про гастропротекторний вплив miR-148a. Ця мікроРНК блокує фактор DNMT1 і, таким чином, підвищує рівень білку сурвініну, що перешкоджає апоптозу ентероцитів. Крім того, miR-148a підтримує достатні рівні білку щільного з'єднання ZO-1 в кишечнику, що зменшує парацелюлярну проникність його епітелію [148-149].

Отримані нами результати вказують на інгібуючий вплив miR-148a на рівень експресії T-bet, що вірогідно призводить до зменшення частки активних клітин з фенотипом Th1 та зниження рівня IFN $\gamma$  і, таким чином, модулює запальний процес в кишечнику. Більше того, годування молозивом та грудним молоком після народження достовірно впливає на імунну толерантність дитини в майбутньому. Дослідження Ahlberg E., Martí M. та співат. доводять пряму кореляцію експресії miR-148a в молозиві матері та рівня активних Treg в дитини у віці 24 місяців [326].

Наукові роботи зарубіжних вчених демонструють вплив різних факторів на концентрацію і склад мікроРНК грудного молока. Експресія miR-148a знижується при стресі та негативних емоціях матері [149], ожирінні [327]. В той же час прийом деяких медикаментів, зокрема окситоцина, мелатоніна, пролактина, дексаметазона, супроводжуються підвищенням рівня цієї мікроРНК в грудному молоці [124]. Вплив дієти матері на рівень експресію мікроРНК залишається не вивченим [328].

За результатами проспективного дослідження була розроблена багатофакторна математична модель ймовірності розвитку та діагностики ХІ/НЕК в немовлят. Діагностично значущими факторами ризику розвитку ХІ/НЕК виявилися: початок

ентерального годування пізніше 2-ї доби життя, рівень експресії FOXP3 <0,07 ум. од., рівень експресії T-bet >1,76 ум. од., тривалість часткового парентерального харчування та інфузійної підтримки понад 8 днів, проведення неінвазивної ШВЛ (в тому числі СРАР) після народження, оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині життя  $\leq 6$  балів, вага при народженні  $\leq 1490$  г, штучне вигодовування новонародженого. Модель заснована на оцінці суми діагностичних коефіцієнтів (ДК). Ймовірність розвитку ХІ/НЕК при сумі ДК в 6 балів відповідала 80 %, при 9,5 балах – 90 %, при 13 і більше балах – 95 %. Представлена модель має високі показники валідності: чутливість – 83,3 %, специфічність  $\geq 96,0$  %. Вірогідність хибно позитивного результату складає  $\leq 4,0$  %, хибно негативного – 16,7 %. Таким чином, дана математична модель може бути корисною для використання в рутинній практиці неонатальних та педіатричних відділень.

Розроблено та запропоновано в практику «Спосіб персоніфікованого прогнозування розвитку некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених» (нововведення в систему охорони здоров'я України, реєстр № 84/9/23, опубліковане на офіційному сайті [www.testcentr.org.ua](http://www.testcentr.org.ua) 20 березня 2023 року). Одержані результати ефективно впроваджені в практичну діяльність медичних установ України, що надають неонатологічну та педіатричну допомогу.

## ВИСНОВКИ

1. Найчастішими патологічними станами, що діагностують в передчасно народжених дітей є РДС (57,7 %), анемія (30,7 %), вроджена вада серця, в тому числі ВАП, дефект міжпередсердної перетинки, дефект міжшлуночкової перетинки (23,5 %), ретинопатія (23,3 %), ХІ/НЕК (13,3 %), БЛД (9,7 %). Найбільш вагомими факторами ризику ускладнень недоношеності виступають гестаційний вік до 32 тижнів, вага при народженні < 1500 г, низька оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині, тривала необхідність в неінвазивній респіраторній підтримці.

2. Штучне вигодовування виступає значущим фактором ризику ХІ/НЕК (ВР = 1,43,  $p=0,002$ ), персистенції ВАП (ВР = 1,29,  $p=0,034$ ). Грудне вигодовування має протекторний вплив і достовірно асоціюється з меншою вірогідністю розвитку ХІ/НЕК (ВР = 0,36,  $p=0,002$ ), БЛД (ВР = 0,29,  $p=0,004$ ), персистенції ВАП (ВР = 0,54,  $p=0,034$ ) в передчасно народжених дітей, що годуються грудним молоком.

3. Рівень експресії фактору FOXP3 в клітинах букального зішкребу передчасно народжених новонароджених нижче, ніж в доношених ( $p<0,001$ ): 0,21 (0,14; 0,38) ум. од. проти 1,0 ум. од. Найнижча експресія FOXP3 спостерігається в недоношених дітей на штучному вигодовуванні: 0,08 (0,04; 0,16) ум.од. при  $p<0,001$ . Зниження рівня FOXP3 пов'язане з розвитком клініки ХІ/НЕК:  $r = -0,246$  ( $p=0,037$ ).

4. Рівень експресії фактору T-bet в клітинах букального зішкребу передчасно народжених новонароджених вище, ніж в доношених ( $p<0,001$ ): 1,48 (1,13; 2,22) ум. од. проти 1,0 ум. од. Найвища експресія T-bet спостерігається в недоношених дітей на штучному вигодовуванні: 2,4 (1,98; 3,84) ум.од. при  $p<0,001$ . Посилення експресії T-bet напряму корелює з розвитком ХІ/НЕК:  $r = 0,370$ ;  $p<0,004$ .

5. В грудному молоці матерів, що народили передчасно, виявлено вищу концентрацію miR-155 ( $p<0,001$ ): 6,2 (4,1; 9,2) ум. од. при передчасному народженні дитини проти 1,0 ум. од. при пологах у визначений термін. Підвищення рівня miR-155 в материнському грудному молоці сприяє експресії FOXP3 в немовлят на грудному вигодовуванні:  $r=0,442$ ,  $p=0,014$ . В грудному молоці матерів передчасно народжених дітей визначено сильнішу експресію miR-148a ( $p<0,001$ ): 0,089 (0,048;

0,142) ум. од. проти 1,0 ум. од. Підвищення рівня miR-148a в материнському грудному молоці асоціюється зі зниженням експресії T-bet в немовлят на грудному вигодовуванні:  $r=0,370$ ;  $p<0,004$ . Таким чином, грудне молоко опосередковано регулює імунну відповідь новонароджених, модулює рівень запалення в кишечнику та перешкоджає розвитку ХІ/НЕК. Подальші дослідження впливу на рівень експресії мікроРНК в грудному молоці вагомі для прогнозування та природного моделювання запальної відповіді в немовлят на грудному вигодовуванні.

6. Прогнозування розвитку ХІ/НЕК під час стаціонарного лікування має важливе значення для підвищення ефективності лікувально-профілактичних заходів. Розроблена модель діагностики та прогнозування ХІ/НЕК на основі неінвазивних методик дозволяє з високою вірогідністю розрахувати ризик НЕК для персоніфікованої корекції харчування та призначення терапії.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. З метою формування груп ризику щодо розвитку РДС, ретинопатії, БЛД доцільно використовувати математичні моделі ймовірності розвитку немашинного застосування, що побудовані на підставі аналізу анамнестичних, клініко-лабораторних параметрів, мають за основу сумарне визначення балів діагностичних коефіцієнтів та відрізняються високою чутливістю та специфічністю.

2. Для оцінки розвитку вірогідного запалення в кишечнику рекомендується визначати рівні експресії FOXP3 та T-bet в клітинах букального зішкребу, що є неінвазивним, простим у використанні та ефективним методом діагностики (нововведення в систему охорони здоров'я України, реєстр № 84/9/23).

3. Для діагностики та прогнозування ХІ/НЕК у недоношених новонароджених, що знаходяться на стаціонарному лікуванні, рекомендовано використовувати багатофакторну математичну модель, що заснована на оцінці клініко-анамнестичних даних та результатах неінвазивних тестів. При 95 % вірогідності розвитку ХІ/НЕК модель має чутливість – 83,3 %, специфічність – 98 %, що вказує на високу точність моделі.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. World Health Organization. Launch of the WHO recommendations for care of the preterm or low birth weight infant. 17 November 2022. <https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/11/17/default-calendar/launch-of-the-who-recommendations-for-care-of-the-preterm-or-low-birth-weight-infant>.
2. Центр громадського здоров'я МОЗ України. 1 березня 2023. <http://medstat.gov.ua/ukr/main.html>
3. Знаменська ТК, Марушко РВ, Дудіна О.О. та ін. Актуальні питання організації неонатології і перинатальної медицини в Україні. Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. Т. XII, № 2(44), 2022. DOI: 10.24061/2413-4260.XII.2.44.2022.1. ISSN 2226-1230 (PRINT) ISSN 2413-4260 (ONLINE).
4. Jia CH, Feng ZS, Lin XJ et al. Short term outcomes of extremely low birth weight infants from a multicenter cohort study in Guangdong of China. *Sci Rep.* 2022 Jul 1;12(1):11119. doi: 10.1038/s41598-022-14432-2. PMID: 35778441; PMCID: PMC9249781.
5. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB et al. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018 Oct;52:3-12. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29779863.
6. Наказ МОЗ «Про затвердження Уніфікованого клінічного протоколу вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Респіраторний дистрес-синдром у передчасно народжених дітей» №873 05.05.2021.
7. Некротизуючий ентероколіт у передчасно народжених дітей. Клінічна настанова, заснована на доказах. Міністерство охорони здоров'я України. 2022.
8. Pravia CI, Benny M. Long-term consequences of prematurity. *Cleve Clin J Med.* 2020 Nov 23;87(12):759-767. doi: 10.3949/ccjm.87a.19108. PMID: 33229393/
9. Chen X, Zhang X, Li W et al. Iatrogenic vs. Spontaneous Preterm Birth: A Retrospective Study of Neonatal Outcome Among Very Preterm Infants. *Front Neurol.* 2021 Mar 23;12:649749. doi: 10.3389/fneur.2021.649749. PMID: 33833733; PMCID: PMC8021792.



10. Di Filippo P, Dodi G, Ciarelli F et al. Lifelong Lung Sequelae of Prematurity. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Apr 26;19(9):5273. doi: 10.3390/ijerph19095273. PMID: 35564667; PMCID: PMC9104309.
11. D'Agata AL, Kelly M, Green CE, Sullivan MC. Molding influences of prematurity: Interviews with adults born preterm. *Early Hum Dev*. 2022 Mar;166:105542. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2022.105542. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35085882; PMCID: PMC9186092.
12. Quitadamo PA, Comegna L, Cristalli P. Anti-Infective, Anti-Inflammatory, and Immunomodulatory Properties of Breast Milk Factors for the Protection of Infants in the Pandemic From COVID-19. *Front Public Health*. 2021 Mar 2;8:589736. doi: 10.3389/fpubh.2020.589736. PMID: 33738273; PMCID: PMC7960784.
13. Lewis ED, Richard C, Larsen BM, Field CJ. The Importance of Human Milk for Immunity in Preterm Infants. *Clin Perinatol*. 2017 Mar;44(1):23-47. doi: 10.1016/j.clp.2016.11.008. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28159208
14. 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. PMID: 35450064; PMCID: PMC9016618.
15. Lin YH, Hsu YC, Lin MC et al. The association of macronutrients in human milk with the growth of preterm infants. *PLoS One*. 2020 Mar 26;15(3):e0230800. doi: 10.1371/journal.pone.0230800. PMID: 32214387; PMCID: PMC7098608.
16. World Health Organization. Breastfeeding. <https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab 1>.
17. Ottolini KM, Schulz EV, Limperopoulos C, Andescavage N. Using Nature to Nurture: Breast Milk Analysis and Fortification to Improve Growth and Neurodevelopmental Outcomes in Preterm Infants. *Nutrients*. 2021 Nov 29;13(12):4307. doi: 10.3390/nu13124307. PMID: 34959859; PMCID: PMC8704746.
18. Piersigilli F, Van Grambezen B, Hocq C, Danhaive O. Nutrients and Microbiota in Lung Diseases of Prematurity: The Placenta-Gut-Lung Triangle. *Nutrients*.

2020 Feb 13;12(2):469. doi: 10.3390/nu12020469. PMID: 32069822; PMCID: PMC7071142.

19. Ito M, Kato S, Saito M et al. Bronchopulmonary Dysplasia in Extremely Premature Infants: A Scoping Review for Identifying Risk Factors. *Biomedicines*. 2023 Feb 14;11(2):553. doi: 10.3390/biomedicines11020553. PMID: 36831089; PMCID: PMC9953397.

20. Nuzzi G, Trambusti I, DI Cicco ME, Peroni DG. Breast milk: more than just nutrition! *Minerva Pediatr (Torino)*. 2021 Apr;73(2):111-114. doi: 10.23736/S2724-5276.21.06223-X. PMID: 33880902.

21. Kim SJ, Port AD, Swan R et al. Retinopathy of prematurity: a review of risk factors and their clinical significance. *Surv Ophthalmol*. 2018 Sep-Oct;63(5):618-637. doi: 10.1016/j.survophthal.2018.04.002. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29679617; PMCID: PMC6089661.

22. Strobel NA, Adams C, McAullay DR, Edmond KM. Mother's Own Milk Compared With Formula Milk for Feeding Preterm or Low Birth Weight Infants: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatrics*. 2022 Aug 1;150(Suppl 1):e2022057092D. doi: 10.1542/peds.2022-057092D. PMID: 35921674.

23. Cortez J, Makker K, Kraemer DF et al. Maternal milk feedings reduce sepsis, necrotizing enterocolitis and improve outcomes of premature infants. *J Perinatol*. 2018 Jan;38(1):71-74. doi: 10.1038/jp.2017.149. Epub 2017 Sep 28. PMID: 29048409.

24. Brown JVE, Walsh V, McGuire W. Formula versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Aug 12;8(8):CD002972. doi: 10.1002/14651858.CD002972.pub3. PMID: 31452191; PMCID: PMC6710607.

25. Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Jun 20;6(6):CD002971. doi: 10.1002/14651858.CD002971.pub4. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Jul 19;7:CD002971. PMID: 29926476; PMCID: PMC6513381.

26. Tosh K Feeding preterm infants with formula rather than donor breast milk is associated with faster rates of short-term growth, but increased risk of developing necrotising enterocolitis *Evidence-Based Nursing* 2019;**22**:18.
27. Meister AL, Doheny KK, Travagli RA. Necrotizing enterocolitis: It's not all in the gut. *Exp Biol Med* (Maywood). 2020 Jan;245(2):85-95. doi: 10.1177/1535370219891971. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31810384; PMCID: PMC7016421.
28. Melnik BC, Kakulas F, Geddes DT et al. Milk miRNAs: simple nutrients or systemic functional regulators? *Nutr Metab (Lond)*. 2016 Jun 21;13:42. doi: 10.1186/s12986-016-0101-2. PMID: 27330539; PMCID: PMC4915038.
29. Chutipongtanate S, Morrow AL, Newburg DS. Human Milk Extracellular Vesicles: A Biological System with Clinical Implications. *Cells*. 2022 Jul 30;11(15):2345. doi: 10.3390/cells11152345. PMID: 35954189; PMCID: PMC9367292.
30. CarrilloLozano E, SebastianValles F, KnottTorcal C. Circulating microRNAs in Breast Milk and Their Potential Impact on the Infant. *Nutrients*. 2020. 12 (10): 3066. Published 2020 Oct 8. doi: 10.3390/nu12103066.
31. Hatmal MM, Al-Hatamleh MAI, Olaimat AN et al. Immunomodulatory Properties of Human Breast Milk: MicroRNA Contents and Potential Epigenetic Effects. *Biomedicines* 2022, 10, 1219. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061219>.
32. Tingö L, Ahlberg E, Johansson L et al. Non-Coding RNAs in Human Breast Milk: A Systematic Review. *Front. Immunol*. 2021. 12:725323. doi: 10.3389/fimmu.2021.725323
33. Zeng B, Chen T, Luo JY et al. Biological Characteristics and Roles of Noncoding RNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles. *Adv Nutr*. 2021 Jun 1;12(3):1006-1019. doi: 10.1093/advances/nmaa124. PMID: 33080010; PMCID: PMC8166544.
34. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jan;27(1): 21-47. doi: 10.1128/CMR.00031-13. PMID: 24396135; PMCID: PMC3910904.
35. Camargo JF, Caldas JPS, Marba STM. Early neonatal sepsis: prevalence, complications and outcomes in newborns with 35 weeks of gestational age or more. *Rev*

Paul Pediatr. 2021 Oct 4; 40:e2020388. doi: 10.1590/1984-0462/2022/40/2020388. PMID: 34614138; PMCID: PMC8543790.

36. Singh M, Alsaleem M, Gray CP. Neonatal Sepsis. [Updated 2022 May 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531478/>

37. Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal Infectious Diseases. *Pediatric Clinics of North America*. 2013. 60(2): 367–389. doi:10.1016/j.pcl.2012.12.003.

38. Zea-Vera A, Ochoa TJ. Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr*. 2015 Feb;61(1):1-13. doi: 10.1093/tropej/fmu079. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25604489; PMCID: PMC4375388.

39. Wynn JL. Defining neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr*. 2016 Apr;28(2):135-40. doi: 10.1097/MOP.0000000000000315. PMID: 26766602; PMCID: PMC4786443.

40. Мавропуло ТК. *Пізній неонатальний сепсис. З турботою про дитину*. 2018. № 1 (63): С. 31-35.

41. Kumar SK, Bhat BV. Distinct mechanisms of the newborn innate immunity. *Immunol Lett*. 2016 May;173:42-54. doi: 10.1016/j.imlet.2016.03.009. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26994839.

42. Chen X, Zhang X, Li W et al. Spontaneous Preterm Birth: A Retrospective Study of Neonatal Outcome Among Very Preterm Infants. *Front Neurol*. 2021 Mar 23;12:649749. doi: 10.3389/fneur.2021.649749. PMID: 33833733; PMCID: PMC8021792.

43. Murki S, Vardhelli V, Deshabhotla S et al. Predictors of length of hospital stay among preterm infants admitted to neonatal intensive care unit: Data from a multicentre collaborative network from India (INNC: Indian National Neonatal Collaborative). *J Paediatr Child Health*. 2020 Oct;56(10):1584-1589. doi: 10.1111/jpc.15031. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32658357.

44. Ueda P, Cnattingius S, Stephansson O et al. Cerebrovascular and ischemic heart disease in young adults born preterm: a population-based Swedish cohort study. *Eur J Epidemiol*. 2014 Apr;29(4):253-60. doi: 10.1007/s10654-014-9892-5. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24687624.

45. Hee Chung E, Chou J, Brown KA. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants: a recent literature review. *Transl Pediatr.* 2020 Feb;9(Suppl 1):S3-S8. doi: 10.21037/tp.2019.09.10. PMID: 32206579; PMCID: PMC7082240.
46. Battajon N, Bechini C, De Osti F et al. Neurodevelopmental outcomes of very low birth weight preterms in preschool childhood: a prospective cohort study. *Ital J Pediatr.* 2023 May 12;49(1):56. doi: 10.1186/s13052-023-01467-y. PMID: 37173776; PMCID: PMC10182701.
47. Yadav S, Lee B, Kamity R. Neonatal Respiratory Distress Syndrome. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 32809614.
48. Martin R. Overview of neonatal respiratory distress and disorders of transition. UpToDate. Updated: Jul 29, 2022 <https://www.uptodate.com>.
49. Rubarth LB, Quinn J. Respiratory Development and Respiratory Distress Syndrome. *Neonatal Netw.* 2015;34(4):231-8. doi: 10.1891/0730-0832.34.4.231. PMID: 26802638.
50. Shaver CM, Bastarache JA. Clinical and biological heterogeneity in acute respiratory distress syndrome: direct versus indirect lung injury. *Clin Chest Med.* 2014 Dec;35(4):639-53. doi: 10.1016/j.ccm.2014.08.004. Epub 2014 Sep 23. PMID: 25453415; PMCID: PMC4254695.
51. De Luca D, Tingay DG, van Kaam AH et al. Epidemiology of Neonatal Acute Respiratory Distress Syndrome: Prospective, Multicenter, International Cohort Study. *Pediatr Crit Care Med.* 2022 Jul 1;23(7):524-534. doi: 10.1097/PCC.0000000000002961. Epub 2022 May 9. PMID: 35543390.
52. Loor S, Urrutia M, Huacón J et al. Factors associated with severe neonatal respiratory distress syndrome. *Revista Ecuatoriana de Pediatría* 2022;23(2):93-100 doi: <https://doi.org/10.52011/160>
53. Li H, Gao C, Cheng S et al. Risk factors for respiratory assistance in premature infants. *Exp Ther Med* 21: 237, 2021. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9668>
54. Good WV. Retinopathy of Prematurity Incidence in Children. *Ophthalmology.* 2020 Apr;127(4S):S82-S83. doi: 10.1016/j.opthta.2019.11.026. PMID: 32200830.

55. de Las Rivas Ramírez N, Luque Aranda G, Rius Díaz F, Pérez Frías FJ, Sánchez Tamayo T. Risk factors associated with Retinopathy of Prematurity development and progression. *Sci Rep.* 2022 Dec 20;12(1):21977. doi: 10.1038/s41598-022-26229-4. PMID: 36539470; PMCID: PMC9767907.

56. Sorokina OY, Bolonska AV. Predictors of bronchopulmonary dysplasia development and comorbidities of prematurity associated with respiratory support techniques in premature neonates. *Wiad Lek.* 2021;74(7):1699-1706. doi: 10.36740/WLek202107125. PMID: 34459774.

57. Kim SJ, Port AD, Swan R et al. Retinopathy of prematurity: a review of risk factors and their clinical significance. *Surv Ophthalmol.* 2018 Sep-Oct;63(5):618-637. doi: 10.1016/j.survophthal.2018.04.002. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29679617; PMCID: PMC6089661.

58. Coats DK. Retinopathy of prematurity: pathogenesis, epidemiology, classification and screening. *UpToDate.* Updated: Oct 31, 2022 <https://www.uptodate.com>.

59. Наказ МОЗ України «Про затвердження Протоколу з лікування дітей з ретинопатією недоношених» №683 від 21.09.2009 року.

60. Duijts L, van Meel ER, Moschino L. et al. European Respiratory Society guideline on long-term management of children with bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J.* 2020. Jan 2;55(1):1900788. doi: 10.1183/13993003.00788-2019. PMID: 31558663.

61. Thébaud B, Goss KN, Laughon M et al. Bronchopulmonary dysplasia. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Nov 14;5(1):78. doi: 10.1038/s41572-019-0127-7. PMID: 31727986; PMCID: PMC6986462.

62. Kalikkot Thekkeveedu R, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology. *Respir Med.* 2017 Nov;132:170-177. doi: 10.1016/j.rmed.2017.10.014. Epub 2017 Oct 24. PMID: 29229093; PMCID: PMC5729938.

63. Eichenwald EC, Stark AR. Bronchopulmonary dysplasia: Definition, pathogenesis, and clinical features. UpToDate. Updated: Jul 28, 2021. <https://www.uptodate.com>.
64. Cokyaman T, Kavuncuoglu S. Bronchopulmonary dysplasia frequency and risk factors in very low birth weight infants: A 3-year retrospective study. *North Clin Istanbul*. 2019 Aug 9;7(2):124-130. doi: 10.14744/nci.2019.23427. PMID: 32259033; PMCID: PMC7117633.
65. Geetha O, Rajadurai VS, Anand AJ et al. New BPD-prevalence and risk factors for bronchopulmonary dysplasia/mortality in extremely low gestational age infants  $\leq 28$  weeks. *J Perinatol*. 2021 Aug;41(8):1943-1950. doi: 10.1038/s41372-021-01095-6. Epub 2021 May 24. PMID: 34031514; PMCID: PMC8280382.
66. Ito M, Kato S, Saito M et al. Bronchopulmonary Dysplasia in Extremely Premature Infants: A Scoping Review for Identifying Risk Factors. *Biomedicines*. 2023 Feb 14;11(2):553. doi: 10.3390/biomedicines11020553. PMID: 36831089; PMCID: PMC9953397.
67. Yang T, Shen Q, Wang S et al. Risk factors that affect the degree of bronchopulmonary dysplasia in very preterm infants: a 5-year retrospective study. *BMC Pediatr*. 2022 Apr 12;22(1):200. doi: 10.1186/s12887-022-03273-7. PMID: 35413820; PMCID: PMC9004103.
68. Villamor-Martinez E, Pierro M, Cavallaro G et al. Donor Human Milk Protects against Bronchopulmonary Dysplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2018;10:238. doi: 10.3390/nu10020238.
69. Huang J, Zhang L, Tang J et al. Human milk as a protective factor for bronchopulmonary dysplasia: A systematic review and meta-analysis. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 2019;104:F128–F136. doi: 10.1136/archdischild-2017-314205.
70. Kim LY, McGrath-Morrow SA, Collaco JM. Impact of breast milk on respiratory outcomes in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*. 2019 Mar;54(3):313-318. doi: 10.1002/ppul.24228. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30609293; PMCID: PMC6518393.

71. Davidson LM, Berkelhamer SK. Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes. *J Clin Med*. 2017 Jan 6;6(1):4. doi: 10.3390/jcm6010004. PMID: 28067830; PMCID: PMC5294957.
72. Aoyama BC, Rice JL, McGrath-Morrow SA, Collaco JM. Mortality in Outpatients with Bronchopulmonary Dysplasia. *J Pediatr*. 2022 Feb;241:48-53.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2021.09.055. Epub 2021 Oct 6. PMID: 34624317; PMCID: PMC8792178.
73. Сороколат ЮВ, Клименко ТМ, Карапетян ОЮ, Калуцька ОМ. Сценарії перебігу бронхолегеневої дисплазії у передчасно народжених дітей з відкритою артеріальною протокою в катамнезі до 3-х років. *Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина*, 11(4(42)), 15–20. <https://doi.org/10.24061/2413-4260.XI.4.42.2021.3>.
74. Bardanzellu F, Neroni P, Dessì A. et al. Paracetamol in Patent Ductus Arteriosus Treatment: Efficacious and Safe? *Biomed Res Int*. 2017;2017:1438038. doi: 10.1155/2017/1438038. Epub 2017 Jul 30. PMID: 28828381; PMCID: PMC5554551.
75. Hamrick SEG, Sallmon H, Rose AT et al. Patent Ductus Arteriosus of the Preterm Infant. *Pediatrics*. 2020 Nov;146(5):e20201209. doi: 10.1542/peds.2020-1209. PMID: 33093140; PMCID: PMC7605084.
76. Atasay B, Erdeve Ö, Sallmon H, Singh Y. Editorial: Management of Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants. *Front Pediatr*. 2021 Apr 14;9:681393. doi: 10.3389/fped.2021.681393. PMID: 33937158; PMCID: PMC8079752.
77. Lee JA, Sohn JA, Oh S, Choi BM. Perinatal risk factors of symptomatic preterm patent ductus arteriosus and secondary ligation. *Pediatr Neonatol*. 2020 Aug;61(4):439-446. doi: 10.1016/j.pedneo.2020.03.016. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32362475.
78. Humberg A, Fortmann I, Siller B et al. Preterm birth and sustained inflammation: consequences for the neonate. *Semin Immunopathol*. 2020 Aug;42(4):451-468. doi: 10.1007/s00281-020-00803-2. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32661735; PMCID: PMC7508934.
79. Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol*. 2012



Oct;145(1):61-8. doi: 10.1016/j.clim.2012.08.006. Epub 2012 Aug 17. PMID: 22926079; PMCID: PMC4556448.

80. Lambert L, Culley FJ. Innate Immunity to Respiratory Infection in Early Life. *Front Immunol.* 2017 Nov 14;8:1570. doi: 10.3389/fimmu.2017.01570. PMID: 29184555; PMCID: PMC5694434.

81. Sampah MES, Hackam DJ. Dysregulated Mucosal Immunity and Associated Pathogeneses in Preterm Neonates. *Front Immunol.* 2020 May 15;11:899. doi: 10.3389/fimmu.2020.00899. PMID: 32499778; PMCID: PMC7243348.

82. Parra-Llorca A, Pinilla-Gonzalez A, Torrejón-Rodríguez L et al. Effects of Sepsis on Immune Response, Microbiome and Oxidative Metabolism in Preterm Infants. *Children (Basel).* 2023 Mar 22;10(3):602. doi: 10.3390/children10030602. PMID: 36980160; PMCID: PMC10046958.

83. Kobayashi T, Iwatani S, Hirata A et al. Rapid changes in serum IL-6 levels in preterm newborns with Gram-negative early-onset sepsis. *Cytokine.* 2021 Feb;138:155371. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155371. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33243627.

84. Ebenebe CU, Hesse F, Blohm ME et al. Diagnostic accuracy of interleukin-6 for early-onset sepsis in preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021 Jan;34(2):253-258. doi: 10.1080/14767058.2019.1606194. Epub 2019 Apr 29. PMID: 30966828.

85. Jung E, Romero R, Yeo L et al. The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2020 Aug;25(4):101146. doi: 10.1016/j.siny.2020.101146. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33164775.

86. Kurul Ş, Simons SHP, Ramakers CRB et al. Association of inflammatory biomarkers with subsequent clinical course in suspected late onset sepsis in preterm neonates. *Crit Care.* 2021 Jan 6;25(1):12. doi: 10.1186/s13054-020-03423-2. PMID: 33407770; PMCID: PMC7788923.

87. Nadeau-Vallee M, Obari D, Beaudry-Richard A et al. Preterm Birth and Neonatal Injuries: Importance of Interleukin-1 and Potential of Interleukin-1 Receptor

Antagonists. *Curr Pharm Des.* 2017;23(40):6132-6141. doi: 10.2174/1381612823666170825145114. PMID: 28847304.

88. Eichberger J, Resch E, Resch B. Diagnosis of Neonatal Sepsis: The Role of Inflammatory Markers. *Front Pediatr.* 2022 Mar 8;10:840288. doi: 10.3389/fped.2022.840288. PMID: 35345614; PMCID: PMC895722.

89. Kurt-Jones EA, Belko J, Yu C et al. The role of toll-like receptors in herpes simplex infection in neonates. *J Infect Dis.* (2005) 191:746–8. doi: 10.1086/427339.

90. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 2009;15(21):2377-92. doi: 10.2174/138161209788682325. PMID: 19601838; PMCID: PMC2750833.

91. Collins A, Weitkamp JH, Wynn JL. Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2018 Jul;103(4):F391-F394. doi: 10.1136/archdischild-2017-313595. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29382648; PMCID: PMC6013388.

92. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev. Immunol.* 2007; 7:379–90. Online. [PubMed: 17457344].

93. Lewis ED, Richard C, Larsen BM, Field CJ. The Importance of Human Milk for Immunity in Preterm Infants. *Clin Perinatol.* 2017 Mar;44(1):23-47. doi: 10.1016/j.clp.2016.11.008. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28159208.

94. Qazi KR, Jensen GB, van der Heiden M et al. Extremely preterm infants have significant alterations in their conventional T cell compartment during the first weeks of life. *J Immunol.* 2020. 204:68–77. doi: 10.4049/jimmunol.1900941.

95. De Zuani M, Lazničková P, Tomašková V et al. High CD4-to-CD8 ratio identifies an at-risk population susceptible to lethal COVID-19. *Scand J Immunol.* 2022 Mar;95(3):e13125. doi: 10.1111/sji.13125. Epub 2021 Dec 13. PMID: 34861051.

96. Rennó C, Nadaf MI, Zago CA et al. Healthy Preterm Newborns Show an Increased Frequency of CD4(+) CD25(high) CD127(low) FOXP3(+) Regulatory T Cells with a Naive Phenotype and High Expression of Gut-Homing Receptors. *Scand J Immunol.* 2016 Jun;83(6):445-55. doi: 10.1111/sji.12435. PMID: 27007547.

97. Zahran AM, Saad K, Abdel-Raheem YF et al. Characterization of Regulatory T Cells in Preterm and Term Infants. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019 Feb;67(1):49-54. doi: 10.1007/s00005-018-0530-x. Epub 2018 Oct 29. PMID: 30374518.
98. Ahmad HI, Jabbar A, Mushtaq N et al. Immune Tolerance vs. Immune Resistance: The Interaction Between Host and Pathogens in Infectious Diseases. *Front Vet Sci*. 2022 Mar 29;9:827407. doi: 10.3389/fvets.2022.827407. PMID: 35425833; PMCID: PMC9001959.
99. Hu W, Wang ZM, Feng YY et al. Regulatory T cells function in established systemic inflammation and reverse fatal autoimmunity. *Nat Immunol*. 2021 Sep;22(9):1163-1174. doi: 10.1038/s41590-021-01001-4. Epub 2021 Aug 23. PMID: 34426690; PMCID: PMC9341271.
100. Arslanoglu S, Boquien CY, King C et al. Fortification of Human Milk for Preterm Infants: Update and Recommendations of the European Milk Bank Association (EMBA) Working Group on Human Milk Fortification. *Front Pediatr*. 2019 Mar 22;7:76. doi: 10.3389/fped.2019.00076. PMID: 30968003; PMCID: PMC6439523.
101. Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am*. 2013 February ; 60(1): 189–207. doi:10.1016/j.pcl.2012.09.008.
102. Sánchez C, Franco L, Regal P, Lamas A, Cepeda A, Fente C. Breast Milk: A Source of Functional Compounds with Potential Application in Nutrition and Therapy. *Nutrients*. 2021 Mar 22;13(3):1026. doi: 10.3390/nu13031026. PMID: 33810073; PMCID: PMC8005182.
103. Chatterton DE, Nguyen DN, Bering SB, Sangild PT. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Aug;45(8):1730-47. doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.028. Epub 2013 May 6. PMID: 23660296.
104. Boquien CY. Human Milk: An Ideal Food for Nutrition of Preterm Newborn. *Front Pediatr*. 2018 Oct 16;6:295. doi: 10.3389/fped.2018.00295. PMID: 30386758; PMCID: PMC6198081.

105. 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. PMID: 32102231; PMCID: PMC7071406.

106. Lu J., Jilling T., Li D., Caplan M.S. Polyunsaturated fatty acid supplementation alters proinflammatory gene expression and reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr. Res.* 2007. 61:427–432. doi: 10.1203/pdr.0b013e3180332ca5.

107. Wijendran V., Brenna J.T., Wang D.H., Zhu W., Meng D., Ganguli K., Kothapalli K.S., Requena P., Innis S., Walker W.A. Long-chain polyunsaturated fatty acids attenuate the IL-1beta-induced proinflammatory response in human fetal intestinal epithelial cells. *Pediatr. Res.* 2015;78:626–633. doi: 10.1038/pr.2015.154.

108. Ramiro-Cortijo D, Singh P, Liu Y et al. Breast Milk Lipids and Fatty Acids in Regulating Neonatal Intestinal Development and Protecting against Intestinal Injury. *Nutrients*. 2020 Feb 19;12(2):534. doi: 10.3390/nu12020534. PMID: 32092925; PMCID: PMC7071444.

109. Quitadamo PA, Comegna L, Cristalli P. Anti-Infective, Anti-Inflammatory, and Immunomodulatory Properties of Breast Milk Factors for the Protection of Infants in the Pandemic From COVID-19. *Front Public Health*. 2021 Mar 2;8:589736. doi: 10.3389/fpubh.2020.589736. PMID: 33738273; PMCID: PMC7960784.

110. Zempleni J, Sukreet S, Zhou F et al. MilkDerived Exosomes and Metabolic Regulation. *Annu Rev Anim Biosci.* 2019. Feb 15. 7: 245262. doi: 10.1146/annurevanimal020518115300.

111. 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. PMID: 33643310; PMCID: PMC7909314.

112. Абатуров ОЄ, Завгородняя НЮ, Бабич ВЛ.. МикроРНК при заболеваниях гепатобилиарной системы. Днепр. 2018. ТОВ «ДОМІНАНТА ПРИНТ». 336 с.

113. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018;173:20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>.

114. McGeary SE, Lin KS, Shi ChY et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*. 2019;366(6472):aav1741. doi: 10.1126/science.aav1741.
115. Schmiedel JM et al. Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise. *Science*. 2015;348:128-32.
116. Kim D, Sung YM, Park J et al. General rules for functional microRNA targeting. *Nat Genet*. 2016 Dec;48(12):1517-1526. doi: 10.1038/ng.3694. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27776116.
117. Londin E, Loher P, Telonis AG et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015 Mar;112(10):E1106-15. doi: 10.1073/pnas.1420955112.
118. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol*. 2018;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
119. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting MicroRNAs in Cancer: Rationale, Strategies and Challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct;9(10):775–89. doi: 10.1038/nrd3179.
120. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*. 2015;16:421–33. doi:10.1038/nrg3965.
121. Kim H, Kim J, Kim K et al. Bias-minimized quantification of microRNA reveals widespread alternative processing and 3' end modification. *Nucleic Acids Research*. 2019;5(47):2630–40. doi: 10.1093/nar/gky1293.
122. van Herwijnen MJC, Driedonks TAP, Snoek BL et al. Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Front Nutr*. 2018 Sep 18;5:81. doi: 10.3389/fnut.2018.00081. PMID: 30280098; PMCID: PMC6153340.
123. Xu Y, Yu Z, Li Q et al. Dose-dependent effect of human milk on Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. *BMC Pediatr*. 2020 Nov 16;20(1):522. doi: 10.1186/s12887-020-02394-1. PMID: 33190629; PMCID: PMC7666971.

124. Melnik BC, Stremmel W, Weiskirchen R et al. Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules* 2021. 11. 851. <https://doi.org/10.3390/biom11060851>.

125. Golan-Gerstl R, Elbaum Shiff Y, Moshayoff V et al. Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017. 61(10), 1700009. doi:10.1002/mnfr.201700009.

126. Alsaweed M, Lai CT, Hartmann PE et al. Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of fractionated milk. *Sci Rep*. 2016 Feb 8;6:20680. doi: 10.1038/srep20680. PMID: 26854194; PMCID: PMC4745068.

127. Jiang X, You L, Zhang Z et al. Biological Properties of Milk-Derived Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions in Infant. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 25;9:693534. doi: 10.3389/fcell.2021.693534. PMID: 34249944; PMCID: PMC8267587.

128. Melnik, BC, John SM, Schmitz G. Milk: an exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy?. *J Transl Med*. 2014. 12, (43). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-43>.

129. Smyczynska U, Bartłomiejczyk MA, Stanczak MM et al. Impact of processing method on donated human breast milk microRNA content. *PLoS One*. 2020 Jul 15;15(7):e0236126. doi: 10.1371/journal.pone.0236126. PMID: 32667939; PMCID: PMC7363072.

130. Howard KM, Jati Kusuma R, Baier SR et al. Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk. *J Agric Food Chem*. 2015 Jan 21;63(2):588-92. doi: 10.1021/jf505526w. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25565082; PMCID: PMC4387787.

131. Vélez-Ixta JM, Benítez-Guerrero T, Aguilera-Hernández A et al. Detection and Quantification of Immunoregulatory miRNAs in Human Milk and Infant Milk Formula. *BioTech (Basel)*. 2022 Apr 20;11(2):11. doi: 10.3390/biotech11020011. PMID: 35822784; PMCID: PMC9264398.

132. CarrilloLozano E, SebastianValles F, KnottTorcal C. Circulating microRNAs in Breast Milk and Their Potential Impact on the Infant. *Nutrients*. 2020. 12 (10): 3066. Published 2020 Oct 8. doi: 10.3390/nu12103066
133. Lukasik A, Brzozowska I, Zielenkiewicz U, Zielenkiewicz P. Detection of Plant miRNAs Abundance in Human Breast Milk. *Int J Mol Sci*. 2018. 19: 37. doi: 10.3390/ijms19010037.
134. Ahlberg E, Al-Kaabawi A, Thune R et al Breast milk microRNAs: Potential players in oral tolerance development. *Front Immunol*. 2023 Mar 14;14:1154211. doi: 10.3389/fimmu.2023.1154211. PMID: 36999032; PMCID: PMC10045994.
135. Carney MC, Tarasiuk A, DiAngelo SL et al. Metabolismrelated microRNAs in maternal breast milk are influenced by premature delivery. *Pediatr Res*. 2017, Aug. 82 (2): 226—236. URL:[www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5552431/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5552431/). doi: 10.1038/pr.2017.54.
136. Hicks SD, Confair A, Warren K, Chandran D. Levels of Breast Milk MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs Are Impacted by Milk Maturity and Maternal Diet. *Front Immunol*. 2022 Jan 14;12:785217. doi: 10.3389/fimmu.2021.785217. PMID: 35095859; PMCID: PMC8796169.
137. The Human Gene Database. <https://www.genecards.org>.
138. Hatmal MM, Al-Hatamleh MAI, Olaimat AN et al. Immunomodulatory Properties of Human Breast Milk: MicroRNA Contents and Potential Epigenetic Effects. *Biomedicines* 2022, 10, 1219. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061219>.
139. Tingö L, Ahlberg E, Johansson L et al. Non-Coding RNAs in Human Breast Milk: A Systematic Review. *Front. Immunol*. 2021. 12:725323. doi: 10.3389/fimmu.2021.725323
140. Na RS, E GX, Sun W et al. Expressional analysis of immune-related miRNAs in breast milk. *Genet Mol Res*. 2015 Sep 25;14(3):11371-6. doi: 10.4238/2015.September.25.4. PMID: 26436378.
141. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. MicroRNA as a New ImmuneRegulatory Agent in Breast Milk. *Silence* (2010) 1(1):7. doi: 10.1186/1758-907X-1-7.

142. Zhou Q, Li M, Wang X et al. Immunerelated microRNAs are abundant in breast milk exo somes. *Int J Biol Sci.* 2012. 8 (1): 118123. doi: 10.7150/ijbs.8.118.
143. Kahn S, Liao Y, Du X et al. Exosomal MicroRNAs in Milk from Mothers Delivering Preterm Infants Survive in Vitro Digestion and Are Taken Up by Human Intestinal Cells. *Mol Nutr Food Res.* 2018 Jun;62(11):e1701050. doi: 10.1002/mnfr.201701050. Epub 2018 May 18. PMID: 29644801.
144. Shiff YE, Reif S, Marom R et al. MiRNA-320a is less expressed and miRNA-148a more expressed in preterm human milk compared to term human milk. *Journal of Functional Foods* 2019, 57, 68 – 74.
145. Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The Role of Mir-148a in Cancer. *J Cancer.* 2016 Jun 21;7(10):1233-41. doi: 10.7150/jca.14616. PMID: 27390598; PMCID: PMC4934031.
146. Friedrich M, Pracht K, Mashreghi MF et al. The role of the miR-148/-152 family in physiology and disease. *Eur J Immunol.* 2017 Dec;47(12):2026-2038. doi: 10.1002/eji.201747132. Epub 2017 Sep 29. PMID: 28880997.
147. Liu X, Zhan Z, Xu L et al. MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKII $\alpha$ . *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7244-51. doi: 10.4049/jimmunol.1001573. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21068402.
148. Chiba T, Kooka A, Kowatari K et al. Expression profiles of hsa-miR-148a-3p and hsa-miR-125b-5p in human breast milk and infant formulae. *Int Breastfeed J.* 2022 Jan 3;17(1):1. doi: 10.1186/s13006-021-00436-7. PMID: 34980190; PMCID: PMC8725387.
149. Chiba T, Takaguri A, Kooka A et al. Suppression of milk-derived miR-148a caused by stress plays a role in the decrease in intestinal ZO-1 expression in infants. *Clin Nutr.* 2022 Dec;41(12):2691-2698. doi: 10.1016/j.clnu.2022.10.004. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36343560.
150. 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. Epub 2022 Jan 29. PMID: 35091894.



151. Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z et al. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis.* 2016 May 26;7(5):e2234. doi: 10.1038/cddis.2016.140. PMID: 27228349; PMCID: PMC4917669.
152. Jiang K, Yang J, Yang C et al. miR-148a suppresses inflammation in lipopolysaccharide-induced endometritis. *J Cell Mol Med.* 2020 Jan;24(1):405-417. doi: 10.1111/jcmm.14744. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31756048; PMCID: PMC6933404.
153. Muroi M, Tanamoto K. TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF-kappaB. *J Leukoc Biol.* 2008 Mar;83(3):702-7. doi: 10.1189/jlb.0907629. Epub 2007 Dec 10. PMID: 18070982.
154. Fields JK, Günther S, Sundberg EJ. Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling. *Front Immunol.* 2019 Jun 20;10:1412. doi: 10.3389/fimmu.2019.01412. PMID: 31281320; PMCID: PMC6596353.
155. Tang K, Wu Z, Sun M et al. Elevated MMP10/13 mediated barrier disruption and NF-κB activation aggravate colitis and colon tumorigenesis in both individual or full miR-148/152 family knockout mice. *Cancer Lett.* 2022 Mar 31;529:53-69. doi: 10.1016/j.canlet.2021.12.033. Epub 2022 Jan 1. PMID: 34979166.
156. Goswami R, Kaplan MH. STAT Transcription Factors in T Cell Control of Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;331:123-180. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.012. Epub 2016 Nov 9. PMID: 28325211.
157. Porstner M, Winkelmann R, Daum P et al. miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors *Mitf* and *Bach2*. *Eur J Immunol.* 2015 Apr;45(4):1206-15. doi: 10.1002/eji.201444637. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25678371.
158. Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.* 2018 Oct;285(20):3695-3716. doi: 10.1111/febs.14482. Epub 2018 May 6. PMID: 29688631.
159. Jia Y, Wei Y. Modulators of MicroRNA Function in the Immune System. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 29;21(7):2357. doi: 10.3390/ijms21072357. PMID: 32235299; PMCID: PMC7177468.

160. He X, Jing Z, Cheng G. MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *Biomed Res Int*. 2014;2014:945169. doi:10.1155/2014/945169
161. Sly LM, Ho V, Antignano F et al. The role of SHIP in macrophages. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:2836-48. doi: 10.2741/2276. PMID: 17485263.
162. Cremer TJ, Butchar JP, Tridandapani S. Francisella Subverts Innate Immune Signaling: Focus On PI3K/Akt. *Front Microbiol*. 2011 Feb 7;5:13. doi: 10.3389/fmicb.2011.00013. PMID: 21686123; PMCID: PMC3916764.
163. McCormick S, Heller N. Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins.. *Front. Immunol*. 6:549. 2015. doi:10.3389/fimmu.2015.00549.
164. Momen-Heravi F, Bala S. miRNA regulation of innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2018 Apr 14. doi: 10.1002/JLB.3MIR1117-459R. Epub ahead of print. PMID: 29656417.
165. 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. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23091595; PMCID: PMC3473054.
166. Lu LF, Thai TH, Calado DP et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009, 30, 80–91.
167. Wilson HM. SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Front Immunol*. 2014 Jul 28;5:357. doi: 10.3389/fimmu.2014.00357. PMID: 25120543; PMCID: PMC4112788.
168. Del Gaizo M, Sergio I, Lazzari S et al. MicroRNAs as Modulators of the Immune Response in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 13;23(2):829. doi: 10.3390/ijms23020829. PMID: 35055013; PMCID: PMC8776227.
169. Wang H, Wang J, Xia Y. Defective Suppressor of Cytokine Signaling 1 Signaling Contributes to the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2017 Oct 16;8:1292. doi: 10.3389/fimmu.2017.01292. PMID: 29085365; PMCID: PMC5650678.

170. Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C et al. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):2578-82. doi: 10.4049/jimmunol.0803162. PMID: 19234151.
171. Mahesh G, Biswas R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2019 39:6, 321-330. Published Online: 13 Jun 2019 <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0155>.
172. Brown CY, Dayan S, Wong SW et al. FOXP3 and miR-155 cooperate to control the invasive potential of human breast cancer cells by down regulating ZEB2 independently of ZEB1. *Oncotarget.* 2018. 9(45):27708–27727.
173. McInnes N, Sadlon TJ, Brown CY et al. FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells. *Oncogene.* 2012 Feb 23;31(8):1045-54. doi: 10.1038/onc.2011.293. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21743493.
174. Hu L, Mao L, Liu S et al. Functional Role of MicroRNAs in Thymocyte Development. *Int Arch Allergy Immunol.* 2019;178(4):315-322. doi: 10.1159/000496093. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30861526; PMCID: PMC6518860.
175. Chen M, Wang F, Xia H, Yao S. MicroRNA-155: Regulation of Immune Cells in Sepsis. *Mediators Inflamm.* 2021 Jan 8;2021:8874854. doi: 10.1155/2021/8874854. PMID: 33505221; PMCID: PMC7810547.
176. Han Y, Li Y, Jiang Y. The Prognostic Value of Plasma MicroRNA-155 and MicroRNA-146a Level in Severe Sepsis and Sepsis-Induced Acute Lung Injury Patients. *Clin Lab.* 2016 Dec 1;62(12):2355-2360. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.160511. PMID: 28164567.
177. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI et al. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J.* 2015 Sep;29(9):3595-611. doi: 10.1096/fj.14-260323. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26065857.
178. Абатуров АЕ, Волосовец АП, Юлиш ЕИ. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 4. Внутриклеточные сигнальные пути TLR. *Здоровье ребёнка.* 2012. № 8 (43). 163 – 167 с.

179. Patra MC, Choi S. Recent Progress in the Molecular Recognition and Therapeutic Importance of Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4. *Molecules*. 2016;21(11):1529. Published 2016 Nov 13. doi:10.3390/molecules21111529.

180. Yang L, Seki E. Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Front Physiol*. 2012 May 22;3:138. doi: 10.3389/fphys.2012.00138. PMID: 22661952; PMCID: PMC3357552.

181. 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):2735-40. doi: 10.1073/pnas.0811073106. Epub 2009 Feb 4. PMID: 19193853; PMCID: PMC2650335.

182. Nishiyama C: Molecular mechanism of allergy-related gene regulation and hematopoietic cell development by transcription factors. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006, 70:1–9.

183. Tao Y, Ai R, Hao Y et al. Role of miR-155 in immune regulation and its relevance in oral lichen planus. *Exp Ther Med*. 2019 Jan;17(1):575-586. doi: 10.3892/etm.2018.7019. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30651838; PMCID: PMC6307429.

184. Donda K, Torres BA, Maheshwari A. Non-coding RNAs in Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Newborn (Clarksville)*. 2022 Jan-Mar;1(1):120-130. doi: 10.5005/jp-journals-11002-0012. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35754997; PMCID: PMC9219563.

185. Guo JG, Rao YF, Jiang J, Li X, Zhu SM. MicroRNA-155-5p inhibition alleviates irritable bowel syndrome by increasing claudin-1 and ZO-1 expression. *Ann Transl Med*. 2023 Jan 31;11(2):34. doi: 10.21037/atm-22-4859. Epub 2022 Dec 21. PMID: 36819593; PMCID: PMC9929797.

186. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Exp Mol Med*. 2015 May 22;47(5):e164. doi: 10.1038/emm.2015.21. PMID: 25998827; PMCID: PMC4454995.

187. Lu ZJ, Wu JJ, Jiang WL et al. MicroRNA-155 promotes the pathogenesis of experimental colitis by repressing SHIP-1 expression. *World J Gastroenterol*. 2017 Feb 14;23(6):976-985. doi: 10.3748/wjg.v23.i6.976. PMID: 28246471; PMCID: PMC5311107.
188. Cao YY, Wang Z, Wang ZH et al. Inhibition of miR-155 alleviates sepsis-induced inflammation and intestinal barrier dysfunction by inactivating NF- $\kappa$ B signaling. *Int Immunopharmacol*. 2021 Jan;90:107218. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107218. Epub 2020 Dec 6. PMID: 33296782.
189. Македонський ІО, Знаменська ТК, Мавропуло ТК та ін. Некротизуючий ентероколіт у новонароджених. Житомир. Видавець О.О. Євєнюк. 2019. 208 с.
190. Moore TA, Wilson ME, Schmid KK et al. Relations between feeding intolerance and stress biomarkers in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Sep;57(3):356-62. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182953093. PMID: 23575303.
191. Gupta BK, Bista R, Shresta S. et al. Incidence, Clinical Signs and Comorbidities of Feeding Intolerance among Preterm Infants Aged 28-34 Weeks of Gestation in a Tertiary Care Hospital of Western Nepal- A Prospective Observational Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2021. 15. SC01-SC05. 10.7860/JCDR/2021/49172.15228.
192. Fanaro S. Feeding intolerance in the preterm infant. *Early Hum Dev*. 2013 Oct;89 Suppl 2:S13-20. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2013.07.013. Epub 2013 Aug 17. PMID: 23962482.
193. Hu X, Chang Y, Wang Z et al. Altered gut microbiota is associated with feeding intolerance in preterm infants. *Turk J Pediatr*. 2021;63(2):206-217. doi: 10.24953/turkjped.2021.02.004. PMID: 33929110.
194. Gounaris AK, Grivea IN, Baltogianni M et al. Caffeine and Gastric Emptying Time in Very Preterm Neonates. *J Clin Med*. 2020 Jun 1;9(6):1676. doi: 10.3390/jcm9061676. PMID: 32492933; PMCID: PMC7356267.
195. Clyman R, Wickremasinghe A, Jhaveri N et al. Ductus Arteriosus Feed or Fast with Indomethacin or Ibuprofen (DAFFII) Investigators. Enteral feeding during indomethacin and ibuprofen treatment of a patent ductus arteriosus. *J Pediatr*. 2013

Aug;163(2):406-11. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.01.057. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23472765; PMCID: PMC3683087.

196. Manuyakorn W, Benjaponpitak S, Siripool K, et al. Cow milk protein allergy presenting as feeding intolerance and eosinophilia: case reports of three preterm neonates. *Paediatr Int Child Health* 2015;35(04):337–341.

197. Cordova J, Sriram S, Patton T et al. Manifestations of Cow's-Milk Protein Intolerance in Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016 Jan;62(1):140-4. doi: 10.1097/MPG.0000000000000933. PMID: 26252918.

198. Ferretti E, Pilon S, Boland M, El Demellawy D. Early Onset Allergic Proctitis in a Preterm Neonate-A Case Report and Review of the Literature. *Pediatr Dev Pathol.* 2019 Mar-Apr;22(2):152-156. doi: 10.1177/1093526618803770. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30286677.

199. Albraik RK, Shatla E, Abdulla YM, Ahmed EH. Neonatal Feeding Intolerance and Its Characteristics: A Descriptive Study. *Cureus.* 2022 Sep 18;14(9):e29291. doi: 10.7759/cureus.29291. PMID: 36277537; PMCID: PMC9578381.

200. Alhamad MMA, Kumar A, Chaaban H et al. Platelets and Immature Neutrophils in Preterm Infants with Feeding Intolerance. *Am J Perinatol.* 2021 Sep;38(11):1150-1157. doi: 10.1055/s-0040-1710555. Epub 2020 May 23. PMID: 32446253; PMCID: PMC9536080.

201. Su BH, Lin HY, Huang FK, Tsai ML. Gastric residuals, feeding intolerance, and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Pediatr Neonatol.* 2015 Apr;56(2):136-7. doi: 10.1016/j.pedneo.2014.10.005. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25530225.

202. Weeks CL, Marino LV, Johnson MJ. A systematic review of the definitions and prevalence of feeding intolerance in preterm infants. *Clin Nutr.* 2021 Nov;40(11):5576-5586. doi: 10.1016/j.clnu.2021.09.010. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34656954.

203. Bazacliu C, Neu J. Necrotizing Enterocolitis: Long Term Complications. *Curr Pediatr Rev.* 2019;15(2):115-124. doi: 10.2174/1573396315666190312093119. PMID: 30864508.

204. Neu J: Necrotizing Enterocolitis: The Future. *Neonatology* 2020;117:240-244. doi: 10.1159/000506866.

205. Bellodas Sanchez J, Kadrofske M. Necrotizing enterocolitis. *Neurogastroenterol Motil.* 2019 Mar;31(3):e13569. doi: 10.1111/nmo.13569. PMID: 30793842.
206. Moschino L, Duci M, Fascetti Leon F et al. Optimizing Nutritional Strategies to Prevent Necrotizing Enterocolitis and Growth Failure after Bowel Resection. *Nutrients.* 2021 Jan 24;13(2):340. doi: 10.3390/nu13020340. PMID: 33498880; PMCID: PMC7910892.
207. Alganabi M, Lee C, Bindi E et al. Recent advances in understanding necrotizing enterocolitis. *F1000Res.* 2019 Jan 25;8:F1000 Faculty Rev-107. doi: 10.12688/f1000research.17228.1. PMID: 30740215; PMCID: PMC6348433.
208. Jones IH, Hall NJ. Contemporary Outcomes for Infants with Necrotizing Enterocolitis-A Systematic Review. *J Pediatr.* 2020 May;220:86-92.e3. doi: 10.1016/j.jpeds.2019.11.011. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31982088.
209. Знаменська ТК, Воробйова ОВ, Клименко ТМ. Патоморфологічні особливості ураження кишечника у новонароджених при ентероколітах різної етіології. *Неонаталогія, хірургія та перинатальна медицина.* 2018.. VIII, No 3(29). 25–33 с. <https://doi.org/10.24061/2413-4260.VIII.3.29.2018.5>.
210. Cho SX, Rudloff I, Lao JC et al. Characterization of the pathoimmunology of necrotizing enterocolitis reveals novel therapeutic opportunities. *Nat Commun.* 2020 Nov 13;11(1):5794. doi: 10.1038/s41467-020-19400-w. PMID: 33188181; PMCID: PMC7666196.
211. Duchon J, Barbian ME, Denning PW. Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2021 Jun;48(2):229-250. doi: 10.1016/j.clp.2021.03.002. PMID: 34030811.
212. De Fazio L, Beghetti I, Bertuccio SN et al. Necrotizing Enterocolitis: Overview on In Vitro Models. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 23;22(13):6761. doi: 10.3390/ijms22136761. PMID: 34201786; PMCID: PMC8268427.
213. Pammi M, De Plaen IG, Maheshwari A. Recent Advances in Necrotizing Enterocolitis Research: Strategies for Implementation in Clinical Practice. *Clin Perinatol.* 2020 Jun;47(2):383-397. doi: 10.1016/j.clp.2020.02.011. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32439118; PMCID: PMC7245582.

214. Cai X, Golubkova A, Hunter CJ. Advances in our understanding of the molecular pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *BMC Pediatr.* 2022 Apr 25;22(1):225. doi: 10.1186/s12887-022-03277-3. PMID: 35468817; PMCID: PMC9036771.
215. Klose CS, Kiss EA, Schwierzeck V et al. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Nature.* 2013 Feb 14;494(7436):261-5. doi: 10.1038/nature11813. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23334414.
216. Müller MJ, Paul T, Seeliger S. Necrotizing enterocolitis in premature infants and newborns. *J Neonatal Perinatal Med.* 2016 Sep 16;9(3):233-42. doi: 10.3233/NPM-16915130. PMID: 27589549.
217. Knell J, Han SM, Jaksic T, Modi BP. Current Status of Necrotizing Enterocolitis. *Curr Probl Surg.* 2019 Jan;56(1):11-38. doi: 10.1067/j.cpsurg.2018.11.005. Epub 2018 Dec 1. PMID: 30691547.
218. KIM JH. Neonatal necrotizing enterocolitis: pathology and pathogenesis. UpToDate: Updated Mar 2023. <https://www.uptodate.com>.
219. Rich BS, Dolgin SE. Necrotizing Enterocolitis. *Pediatr Rev.* 2017 Dec;38(12):552-559. doi: 10.1542/pir.2017-0002. PMID: 29196510.
220. Patel RM, Ferguson J, McElroy SJ et al. Defining necrotizing enterocolitis: current difficulties and future opportunities. *Pediatr Res.* 2020 Aug;88(Suppl 1):10-15. doi: 10.1038/s41390-020-1074-4. PMID: 32855506; PMCID: PMC8096612.
221. Gunasekaran A, Devette C, Levin S, Chaaban H. Biomarkers of Necrotizing Enterocolitis: The Search Continues. *Clin Perinatol.* 2022 Mar;49(1):181-194. doi: 10.1016/j.clp.2021.11.011. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35210000.
222. Hickey M, Georgieff M, Ramel S. Neurodevelopmental outcomes following necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018 Dec;23(6):426-432. doi: 10.1016/j.siny.2018.08.005. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30145060.
223. National Library of Medicine. website of the United States government. FOXP3 forkhead box P3 [ *Homo sapiens (human)* ] Gene ID: 50943, updated on 21-May-2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50943/>



224. Vent-Schmidt J, Han JM, MacDonald KG, Levings MK. The role of FOXP3 in regulating immune responses. *Int Rev Immunol*. 2014 Mar;33(2):110-28. doi: 10.3109/08830185.2013.811657. Epub 2013 Aug 15. PMID: 23947341.
225. Ono M. Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes. *Immunology*. 2020 May;160(1):24-37. doi: 10.1111/imm.13178. Epub 2020 Mar 9. Erratum in: *Immunology*. 2020 Aug;160(4):393. PMID: 32022254; PMCID: PMC7160660.
226. Vaeth M, Schliesser U, Müller G et al. Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):16258-63. doi: 10.1073/pnas.1203870109. Epub 2012 Sep 18. PMID: 22991461; PMCID: PMC3479579.
227. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006;126(2):375–387.
228. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5138-43. doi: 10.1073/pnas.0501675102. Epub 2005 Mar 24. PMID: 15790681; PMCID: PMC555574.
229. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023–. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23. Epub 2017 Jul 14. PMID: 29158945; PMCID: PMC5661633.
230. Kitoh A, Ono M, Naoe Y et al.. Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunity*. 2009 Oct 16;31(4):609-20. doi: 10.1016/j.immuni.2009.09.003. Epub 2009 Oct 1. PMID: 19800266.
231. Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol*. 2015 Sep;12(5):558-65. doi: 10.1038/cmi.2015.10. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25683611; PMCID: PMC4579651.
232. Jung MK, Kwak JE, Shin EC. IL-17A-Producing Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells and Human Diseases. *Immune Netw*. 2017 Oct;17(5):276-286. doi: 10.4110/in.2017.17.5.276. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29093649; PMCID: PMC5662777.

233. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, et al. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2010;11(7):618–627.

234. Di Giovangiulio M, Rizzo A, Franzè E, Caprioli F, Facciotti F, Onali S, Favale A, Stolfi C, Fehling HJ, Monteleone G, Fantini MC. Tbet Expression in Regulatory T Cells Is Required to Initiate Th1-Mediated Colitis. *Front Immunol*. 2019 Sep 11;10:2158. doi: 10.3389/fimmu.2019.02158. PMID: 31572375; PMCID: PMC6749075.

235. Pratama A, Schnell A, Mathis D, Benoist C. Developmental and cellular age direct conversion of CD4<sup>+</sup> T cells into ROR $\gamma$ <sup>+</sup> or Helios<sup>+</sup> colon Treg cells. *J Exp Med* 2019; 217:e20190428.

236. Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. *Nature* 2008; 453:236.

237. Yang BH, Hagemann S, Mamareli P et al. Foxp3(+) T cells expressing ROR $\gamma$ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2016 Mar;9(2):444-57. doi: 10.1038/mi.2015.74. Epub 2015 Aug 26. PMID: 26307665.

238. Jung MK, Kwak JE, Shin EC. IL-17A-Producing Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells and Human Diseases. *Immune Netw*. 2017 Oct;17(5):276-286. doi: 10.4110/in.2017.17.5.276. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29093649; PMCID: PMC5662777.

239. Lal G, Yin N, Xu J et al. Distinct inflammatory signals have physiologically divergent effects on epigenetic regulation of Foxp3 expression and Treg function. *Am J Transplant*. 2011 Feb;11(2):203-14. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03389.x. Epub 2011 Jan 10. Erratum in: *Am J Transplant*. 2011 Mar;11(3):638. PMID: 21219575; PMCID: PMC3079560.

240. Kim JH, Hwang J, Jung JH et al. Molecular networks of FOXP family: dual biologic functions, interplay with other molecules and clinical implications in cancer progression. *Mol Cancer*. 2019 Dec 9;18(1):180. doi: 10.1186/s12943-019-1110-3. PMID: 31815635; PMCID: PMC6900861.

241. Egan CE, Sodhi CP, Good M et al. Toll-like receptor 4-mediated lymphocyte influx induces neonatal necrotizing enterocolitis. *J Clin Invest*. 2016 Feb;126(2):495-508. doi: 10.1172/JCI83356. PMID: 26690704; PMCID: PMC4731173.
242. Sampah MES, Hackam DJ. Dysregulated Mucosal Immunity and Associated Pathogenesis in Preterm Neonates. *Front Immunol*. 2020 May 15;11:899. doi: 10.3389/fimmu.2020.00899. PMID: 32499778; PMCID: PMC7243348.
243. Tong L, Hao H, Zhang Z et al. Milk-derived extracellular vesicles alleviate ulcerative colitis by regulating the gut immunity and reshaping the gut microbiota. *Theranostics*. 2021 Jul 25;11(17):8570-8586. doi: 10.7150/thno.62046. PMID: 34373759; PMCID: PMC8344018.
244. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007 Feb 15;445(7129):771-5. doi: 10.1038/nature05543. Epub 2007 Jan 14. PMID: 17220874.
245. Pesenacker AM, Cook L, Levings MK. The role of FOXP3 in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2016 Dec;43:16-23. doi: 10.1016/j.coi.2016.07.004. Epub 2016 Aug 19. PMID: 27544816.
246. Colamatteo A, Carbone F, Bruzzaniti S et al. Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Front Immunol*. 2020 Feb 3;10:3136. doi: 10.3389/fimmu.2019.03136. PMID: 32117202; PMCID: PMC7008726.
247. Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S et al. Frequency of Foxp3+CD4CD25+ T cells is associated with the phenotypes of allergic asthma. *Respirology*. 2009;14(2):187-94.
248. Sardecka-Milewska I, Łoś-Rycharska E, Gawryjolek J et al. Role of FOXP3 Expression and Serum Vitamin D and C Concentrations When Predicting Acquisition of Tolerance in Infants With Cow's Milk Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020;30(3):182-190. doi: 10.18176/jiaci.0422. Epub 2019 Jun 7. PMID: 31172951.
249. 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. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23091595; PMCID: PMC3473054.

250. Zhang J, Wei B, Hu H, Liu F, Tu Y, Zhao M and Wu D: Preliminary study on decreasing the expression of FOXP3 with miR-155 to inhibit diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Lett* 14: 1711-1718, 2017.

251. 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. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28461115.

252. 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. PMID: 32106541; PMCID: PMC7179228.

253. National Library of Medicine. website of the United States government. TBX21 T-box transcription factor 21 [*Homo sapiens* (human) ] Gene ID: 30009, updated on 4-Dec-2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/30009>

254. Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol*. 2011 Jun 20;12(7):597-606. doi: 10.1038/ni.2059. PMID: 21685955; PMCID: PMC6290474.

255. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Nov;13(11):777-89. doi: 10.1038/nri3536. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24113868; PMCID: PMC6290922.

256. Huang C, Bi J. Expression Regulation and Function of T-Bet in NK Cells. *Front Immunol*. 2021 Oct 5;12:761920. doi: 10.3389/fimmu.2021.761920. PMID: 34675939; PMCID: PMC8524037.

257. Fenimore J, A Young H. Regulation of IFN- $\gamma$  Expression. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:1-19. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5\_1. PMID: 27734406.

258. Ivashkiv LB. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018 Sep;18(9):545-558. doi: 10.1038/s41577-018-0029-z. PMID: 29921905; PMCID: PMC6340644.

259. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts*. 2018 May 30;9(1):64-79. doi: 10.1515/bmc-2018-0007. PMID: 29856726.

260. De Benedetti F, Prencipe G, Bracaglia C et al. Targeting interferon- $\gamma$  in hyperinflammation: opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Nov;17(11):678-691. doi: 10.1038/s41584-021-00694-z. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34611329.

261. Knox JJ, Myles A, Cancro MP. T-bet<sup>+</sup> memory B cells: Generation, function, and fate. *Immunol Rev*. 2019 Mar;288(1):149-160. doi: 10.1111/imr.12736. PMID: 30874358; PMCID: PMC6626622.

262. Amado T, Amorim A, Enguita FJ et al. MicroRNA-181a regulates IFN- $\gamma$  expression in effector CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Mol Med (Berl)*. 2020 Feb;98(2):309-320. doi: 10.1007/s00109-019-01865-y. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32002568; PMCID: PMC7007887.

263. Hope JL, Stairiker CJ, Spantidea PI et al. The Transcription Factor T-Bet Is Regulated by MicroRNA-155 in Murine Anti-Viral CD8<sup>+</sup> T Cells *via* SHIP-1. *Front Immunol*. 2017 Dec 6;8:1696. doi: 10.3389/fimmu.2017.01696. PMID: 29358931; PMCID: PMC5765282.

264. Zhu L, Qiu C, Dai L et al. Hsa-miR-31 Governs T-Cell Homeostasis in HIV Protection *via* IFN- $\gamma$ -Stat1-T-Bet Axis. *Front Immunol*. 2021 Nov 5;12:771279. doi: 10.3389/fimmu.2021.771279. PMID: 34804062; PMCID: PMC8602903.

265. Wu Y Clinical features, diagnosis and treatment of neonatal encephalopathy. UpToDate. Updated: Mar 13, 2023. <https://www.uptodate.com>.

266. de Vries LS, Leijser LM. Germinal matrix hemorrhage and intraventricular hemorrhage (GMH-IV) in the newborn: pathogenesis, clinical presentation and diagnosis. UpToDate. Updated: Mar 19, 2021. <https://www.uptodate.com>.

267. Уніфікований клінічний протокол «Початкова, реанімаційна і післяреанімаційна допомога новонародженим в Україні», затверджений наказом МОЗ України № 228 від 28.03.2014 р.

268. Уніфікований клінічний протокол вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Ентеральне харчування недоношених немовлят», затверджений наказом МОЗ України №870 від 05.05.2021 р.

269. Зупанец ІА, Мисюрева СВ, Прописнова ВВ и др. Под ред. Зупанца. ІА. Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования: Учеб. пособие.. Харьков: Изд-во НФаУ: Золотые страницы. 2005:200 с.
270. Лаповець ЛЄ, Лебідь РБ, Ястремська ОО та ін. Клінічна лабораторна діагностика: підручник, 2-е видання. Київ. Медицина. 2019. 472 с ISBN 978-617-505-838-1.
271. Куповицька ІГ, Ерстенюк АМ. Під ред. Ерстенюк АМ. Лабораторна діагностика. Навч посібник. Вінниця. Нова книга 2017. 320 с.
272. Provan D, editor Oxford Handbook of Clinical and Laboratory Investigations, 4<sup>th</sup> edition. Oxford University Press 2018. 970 p. ISBN 978-0-19-876653-7.
273. Kim Ю, editor. Radiology illustrated: Pediatric Radiology. Springer. 2014. 1077 p. ISBN 978-3-642-35572-1. ISBN 978-3-642-35573-8 (eBook).
274. Штаатц Г, Хоннеф Д. Под ред. Штаатц Г. Лучевая диагностика. Детские болезни, 2-е изд. М: Медэкспресс-информ. 2016 г. 400 с.
275. Seidenbusch M, Rösenberger V, Schneider K. Imaging practice and radiation protection in pediatric radiology: conventional radiography. 1<sup>st</sup> ed. Springer. 2019. 922p. ISBN-10 :3030185028. ISBN-13 : 978-3030185022.
276. Trizol RNA Prep. Набор реагентов для выделения тотальной РНК из различного биологического материала. ООО «Спутник-К». янв.2015.
277. Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. Curr Protoc Mol Biol. 2011 Jul;Chapter 15:Unit 15.10. doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95. PMID: 21732315; PMCID: PMC3152947.
278. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2005 Nov 27;33(20):e179. doi: 10.1093/nar/gni178. PMID: 16314309; PMCID: PMC1292995.
279. Антомонов М. Ю. Математична обробка та аналіз медико-біологічних даних. 2-е видання. К. Медінформ. 2018. 579 с.
280. Yadav SK, Singh S, Gupta R. Biomedical Statistics. A Beginner's Guide. 1-st ed. Springer, Singapore; 2019. 342 p.

281. Толбатов Ю.А. Статистика засобами Excel. К. університет «Україна» . 2018 .326 с.
282. Гур'янов ВГ, Лях ЮЄ, Парій ВД та ін. Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R–statistics): Навчальний посібник. К. Вістка, 2018. 208 с. ISBN 978-617-7157-67-9.
283. Barton B, Peat J. Medical statistics. A guide to SPSS, data analysis, and critical. John Wiley & Sons Ltd. Oxford. UK. 2014. 411 p.
284. Грузєва Т.С., Лехан В.М., Огнєв В.А. та ін. Під ред. Грузєва. Т.С. Біостатистика: підручник для студентів. Вінниця: Нова Книга, 2020. 384 с.
285. Москаленко ВФ, редактор. Біостатистика. К.: Книга плюс; 2009. 184 с.
286. Simon LV, Hashmi MF, Bragg BN. APGAR Score. [Updated 2023 Feb 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470569>.
287. Kotagal S. Neurologic examination of the newborn. last updated: May 21, 2020. <https://www.uptodate.com/contents/neurologic-examination-of-the-newborn/print>
288. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. Clin Med Insights Pediatr. 2016 Jul 14;10:67-83. doi: 10.4137/CMPed.S40070. PMID: 27441006; PMCID: PMC4946587
289. Клінічна настанова, заснована на доказах «ВІЛ-інфекція» від 16.11.2022. МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ №КН 2022-2092.
290. Maier RF, Blondel, B, Piedvache A et al. Duration and Time Trends in Hospital Stay for Very Preterm Infants Differ Across European Regions\*. Pediatric Critical Care Medicine 19(12):p 1153-1161, December 2018. | DOI: 10.1097/PCC.0000000000001756.
291. Sahiledengle B, Tekalegn Y, Zenbaba D et al. Which Factors Predict Hospital Length-of-Stay for Children Admitted to the Neonatal Intensive Care Unit and Pediatric Ward? A Hospital-Based Prospective Study. Glob Pediatr Health. 2020 Nov 3;7:2333794X20968715. doi: 10.1177/2333794X20968715. PMID: 33225021; PMCID: PMC7649955.

292. Fu M, Song W, Yu G et al. Risk factors for length of NICU stay of newborns: A systematic review. *Front Pediatr.* 2023 Mar 13;11:1121406. doi: 10.3389/fped.2023.1121406. PMID: 36994438; PMCID: PMC10040659.
293. Sewell E, Roberts J, Mukhopadhyay S. Association of Infection in Neonates and Long-Term Neurodevelopmental Outcome. *Clin Perinatol.* 2021 Jun;48(2):251-261. doi: 10.1016/j.clp.2021.03.001. PMID: 34030812; PMCID: PMC8260078.
294. Murki S, Vardhelli V, Deshabhotla S et al. Predictors of length of hospital stay among preterm infants admitted to neonatal intensive care unit: Data from a multicentre collaborative network from India (INNC: Indian National Neonatal Collaborative). *J Paediatr Child Health.* 2020 Oct;56(10):1584-1589. doi: 10.1111/jpc.15031. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32658357.
295. Waitzman NJ, Jalali A, Grosse SD. Preterm birth lifetime costs in the United States in 2016: An update. *Semin Perinatol.* 2021 Apr;45(3):151390. doi: 10.1016/j.semperi.2021.151390. Epub 2021 Jan 24. PMID: 33541716.
296. Tinelli A, Vinciguerra M, Malvasi A et al. Uterine Fibroids and Diet. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Jan 25;18(3):1066. doi: 10.3390/ijerph18031066. PMID: 33504114; PMCID: PMC7908561.
297. Moro E, Degli Esposti E, Borghese G et al. The Impact of Hormonal Replacement Treatment in Postmenopausal Women with Uterine Fibroids: A State-of-the-Art Review of the Literature. *Medicina (Kaunas).* 2019 Aug 30;55(9):549. doi: 10.3390/medicina55090549. PMID: 31480288; PMCID: PMC6780684.
298. Malherbe K, Khan M, Fatima S. Fibrocystic Breast Disease. 2022 Aug 8. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31869073.
299. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int.* 2022 Apr 18;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439. PMID: 35480139; PMCID: PMC9038417.
300. Jiangsu Multicenter Study Collaborative Group for Breastmilk Feeding in Neonatal Intensive Care Units. [Clinical characteristics and risk factors of very low birth weight and extremely low birth weight infants with bronchopulmonary dysplasia:



multicenter retrospective analysis]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2019 Jan 2;57(1):33-39. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2019.01.009. PMID: 30630229.

301. Du JF, Liu TT, Wu H. [Risk factors for patent ductus arteriosus in early preterm infants: a case-control study]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2016 Jan;18(1):15-9. Chinese. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.01.004. PMID: 26781406; PMCID: PMC7390094.

302. Daruich A, Bremond-Gignac D, Behar-Cohen F, Kermorvant E. Rétinopathie du prématuré : de la prévention au traitement [Retinopathy of prematurity: from prevention to treatment]. *Med Sci (Paris)*. 2020 Oct;36(10):900-907. French. doi: 10.1051/medsci/2020163. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33026333.

303. Сорокін А.С. До питання валідації моделі логістичної регресії в кредитному скорингу. *Науковедение*. 2014;(2): 173E VN214. (російською).

304. Рижов О.А., Пенкін Ю.М. Статистичні методи опрацювання результатів медико-біологічних досліджень. *Магнолія* 2006. 2022. 160с.

305. European Perinatal Health Report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe from 2015 to 2019. <https://www.europeristat.com/>

306. Mandy GT. Preterm birth: Definitions of prematurity, epidemiology, and risk factors for infant mortality. Last updated: Sep 22, 2022. Official reprint from UpToDate® [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)

307. Campos-Martinez AM, Expósito-Herrera J, Gonzalez-Bolívar M et al. Evaluation of Risk and Preventive Factors for Necrotizing Enterocolitis in Premature Newborns. A Systematic Review of the Literature. *Front Pediatr*. 2022 May 17;10:874976. doi: 10.3389/fped.2022.874976. PMID: 35656377; PMCID: PMC9152085.

308. Huang P, Zhou J, Yin Y et al. Effects of breast-feeding compared with formula-feeding on preterm infant body composition: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*. 2016 Jul;116(1):132-41. doi: 10.1017/S0007114516001720. Epub 2016 May 16. PMID: 27181767.

309. Gianni ML, Roggero P, Mosca F. Human milk protein vs. formula protein and their use in preterm infants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2019 Jan;22(1):76-81. doi: 10.1097/MCO.0000000000000528. PMID: 30407223.

310. Mól N, Zasada M, Kwinta P. Does type of feeding affect body composition in very low birth weight infants? - A prospective cohort study. *Pediatr Neonatol*. 2019 Apr;60(2):135-140. doi: 10.1016/j.pedneo.2018.04.010. Epub 2018 May 4. PMID: 29784603.

311. Cerasani J, Ceroni F, De Cosmi V et al. Human Milk Feeding and Preterm Infants' Growth and Body Composition: A Literature Review. *Nutrients*. 2020 Apr 21;12(4):1155. doi: 10.3390/nu12041155. PMID: 32326178; PMCID: PMC7230190.

312. Brown JVE, Walsh V, McGuire W. Formula versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Aug 12;8(8):CD002972. doi: 10.1002/14651858.CD002972.pub3. PMID: 31452191; PMCID: PMC6710607.

313. Walsh V, McGuire W. Immunonutrition for preterm infants. *Neonatology* 2019;115(4):398-405. [DOI: 10.1159/000497332] [PMID: 30974431].

314. Kim EJ, Lee NM, Chung SH. A retrospective study on the effects of exclusive donor human milk feeding in a short period after birth on morbidity and growth of preterm infants during hospitalization. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Sep;96(35):e7970. doi: 10.1097/MD.0000000000007970. PMID: 28858132; PMCID: PMC5585526.

315. Pados BF. State of the Science on the Benefits of Human Milk for Hospitalized, Vulnerable Neonates. *Nurs Womens Health*. 2023 Apr;27(2):121-140. doi: 10.1016/j.nwh.2023.01.008. Epub 2023 Mar 3. PMID: 36871597.

316. Strobel NA, Adams C, McAullay DR, Edmond KM. Mother's Own Milk Compared With Formula Milk for Feeding Preterm or Low Birth Weight Infants: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatrics*. 2022 Aug 1;150(Suppl 1):e2022057092D. doi: 10.1542/peds.2022-057092D. PMID: 35921674.

317. Cortez J, Makker K, Kraemer DF et al. Maternal milk feedings reduce sepsis, necrotizing enterocolitis and improve outcomes of premature infants. *J Perinatol*. 2018 Jan;38(1):71-74. doi: 10.1038/jp.2017.149. Epub 2017 Sep 28. PMID: 29048409.

318. Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Jun

20;6(6):CD002971. doi: 10.1002/14651858.CD002971.pub4. Update in: Cochrane Database Syst Rev. 2019 Jul 19;7:CD002971. PMID: 29926476; PMCID: PMC6513381.

319. Tosh K Feeding preterm infants with formula rather than donor breast milk is associated with faster rates of short-term growth, but increased risk of developing necrotising enterocolitis *Evidence-Based Nursing* 2019;**22**:18.

320. Ou J, Courtney CM, Steinberger AE, Tecos ME, Warner BW. Nutrition in Necrotizing Enterocolitis and Following Intestinal Resection. *Nutrients*. 2020 Feb 18;12(2):520. doi: 10.3390/nu12020520. PMID: 32085587; PMCID: PMC7071274.

321. Sodhi CP, Fulton WB, Good M et al. Fat composition in infant formula contributes to the severity of necrotising enterocolitis. *Br J Nutr*. 2018 Sep;120(6):665-680. doi: 10.1017/S0007114518001836. PMID: 30176959; PMCID: PMC6126914.

322. Chen C, Yin Q, Wu H et al. Different Effects of Premature Infant Formula and Breast Milk on Intestinal Microecological Development in Premature Infants. *Front Microbiol*. 2020 Jan 17;10:3020. doi: 10.3389/fmicb.2019.03020. PMID: 32010090; PMCID: PMC6978717.

323. Chen Y, Koike Y, Chi L et al. Formula feeding and immature gut microcirculation promote intestinal hypoxia, leading to necrotizing enterocolitis. *Dis Model Mech*. 2019 Dec 9;12(12):dmm040998. doi: 10.1242/dmm.040998. PMID: 31704804; PMCID: PMC6918740.

324. Wisgrill L, Weinhandl A, Unterasinger L et al. Interleukin-6 serum levels predict surgical intervention in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2019 Mar;54(3):449-454. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2018.08.003. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30213531

325. Li G, Tang X, Chen H, Sun W, Yuan F. miR-148a inhibits pro-inflammatory cytokines released by intervertebral disc cells by regulating the p38/MAPK pathway. *Exp Ther Med*. 2018 Sep;16(3):2665-2669. doi: 10.3892/etm.2018.6516. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30186499; PMCID: PMC6122492

326. Ahlberg E, Martí M, Govindaraj D et al. Immune-related microRNAs in breast milk and their relation to regulatory T cells in breastfed children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2023 Apr;34(4):e13952. doi: 10.1111/pai.13952. PMID: 37102392.

327. Shah KB, Chernausek SD, Garman LD et al. Human Milk Exosomal MicroRNA: Associations with Maternal Overweight/Obesity and Infant Body Composition at 1 Month of Life. *Nutrients*. 2021 Mar 27;13(4):1091. doi: 10.3390/nu13041091. PMID: 33801634; PMCID: PMC8066780

328. Díez-Sainz E, Lorente-Cebrián S, Aranaz P et al. Potential Mechanisms Linking Food-Derived MicroRNAs, Gut Microbiota and Intestinal Barrier Functions in the Context of Nutrition and Human Health. *Front Nutr*. 2021 Mar 9;8:586564. doi: 10.3389/fnut.2021.586564. PMID: 33768107; PMCID: PMC7985180.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

*Наукові роботи, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації*

1. Abaturov OE, Tovarnytska AO. Anti-inflammatory effect of breast milk miR-148a on the state of mucous membranes in premature newborns. *Child`s Health (Ukraine)*, 2023, 18 (1). С. 59-66. ISSN 2224-0551 (print), 2307-1168 (online). <https://doi.org/10.22141/2224-0551.18.1.2023.1556>. *(Дисертантом особисто проведено набір матеріалу для досліджень; проведено статистичну обробку та написання роботи, аналіз даних проводився спільно зі співавтором.)*
2. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Вплив miR-155 грудного молока на стан здоров'я недоношених новонароджених. *Child`s Health (Ukraine)*, 2022, 17(7), 347–353. ISSN 2224-0551 (print), ISSN 2307-1168 (online). <https://doi.org/10.22141/2224-0551.17.7.2022.1539>. *(Дисертантом самостійно проведено набір пацієнтів для виконання дослідження, проведено клінічне обстеження, забір матеріалу для лабораторних аналізів, статистично опрацьовано результати, підготовлено матеріал для публікацій, аналіз і інтерпретацію даних проводили разом із співавтором.)*
3. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Фактор транскрипції T-bet — діагностичний маркер розвитку некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених. *Сучасна педіатрія (Україна)*. 2022, 8 (128). С. 6-11. ISSN 2663-7553 (print); 2706-6134 (online). doi 10.15574/SP.2022.128.6. *(Дисертантом особисто здійснено теоретичне обґрунтування дизайну дослідження, проведено клінічне обстеження хворих, набрано матеріал для лабораторної діагностики, статистично опрацьовано результати, обґрунтовано висновки роботи, здійснено підбір літератури і її узагальнення.)*
4. Товарницька А.О. Вплив грудного вигодовування на закриття відкритої артеріальної протоки в недоношених новонароджених. *Здоров'я дитини (Україна)*. 2022, 17(4), 184–191. ISSN 2224-0551 (print), ISSN 2307-1168 (online). doi: 10.22141/2224-0551.17.4.2022.1515. *(Дисертантом особисто здійснено теоретичне обґрунтування дизайну дослідження, проведено набір матеріалу, статистично*

*опрацьовано результати, обґрунтовано висновки роботи, здійснено підбір літератури і її узагальнення)*

*Наукові праці, які засвідчують апробацію дисертації.*

5. Абатуров О.Є., Товарницька А.О. Прогностична значимість впливу мікроРНК грудного молока на імунну відповідь новонародженого із затримкою внутрішньоутробного розвитку. Сучасна педіатрія (Україна). 2021, 1 (113). С. 53-61. ISSN 2663-7553 (print); 2706-6134 (online). Doi 10.15574/SP.2021.113.53. *(Дисертантом самостійно проведено відбір та аналіз сучасних джерел літератури за темою. Аналіз результатів, формування висновків та написання статті виконано спільно зі співавтором)*
6. Tovarnytska A., Samokhina I., Bogomolna L. Anti-inflammatory impact of miR-148a of breast milk on neonatal immune response. Modern Rends of Scientific development, Vancouver, Canada, Jan 2022. ISBN: 978-1-68564-505-2. doi: 10.46299/ISG.2022.I.II/
7. Tovarnytska A. MiR-155 in maternal breast milk is a natural modulator of inflammatory response for preterm neonates. XXI International Scientific and Practical Conference “Information, modern and recent theories of development”, Madrid, Spain, 29-31 May, 2023. <https://eu-conf.com/events/informational-modern-and-recent-theories-of-development/>.
8. Абатуров О.Є. Товарницька А.О. Усна доповідь, тези. Епігенетичний вплив грудного молока на імунну толерантність в передчасно народжених дітей. Науково-практична конференція з міжнародною участю: «ХІ наукова сесія інституту гастроентерології НАМН України. Новітні технології в теоретичній та клінічній гастроентерології» м. Дніпро, 14-15 червня 2023.
9. Товарницька А.О. Постерна доповідь «Вплив мікроРНК молока матері на рівень експресії прозапальних факторів транскрипції дитини». ХХІІІ Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання педіатрії» (Сидельниковські читання), м.Київ, 15-17 вересня 2021 р..
10. Товарницька А.О. Усна доповідь «Вплив мікроРНК-155 грудного молока на імунну відповідь новонародженої дитини». Науково-практична конференція з

міжнародною участю, присвячена пам'яті академіка Б.Я. Резника «Новітні технології в педіатричній науці, практиці та освіті», м. Одеса, 28-29 жовтня 2021 р..

11. Товарницька А.О. Постерна доповідь «Вплив мікроРНК-148а грудного молока на імунну відповідь новонароджених дітей». Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Педіатричні здобутки сьогодення», м. Харків, 13-14 січня 2022 р..

12. Товарницька А.О. Постерна доповідь «Т-bet – індикатор розвитку НЕК в новонароджених дітей». Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена пам'яті академіка Б.Я. Резника «Сучасні новітні технології в педіатричній науці, практиці, сімейній медицині та освіті», м. Одеса 24-25 листопада 2022р..

13. Tovarnytska A. Oral presentation “Connection of neonatal RDS and miR-148a expression level in maternal breast milk”. 2d International conference on Pediatrics and Neonatology, Rome, 13-14 February 2023.

## Акти впровадження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Генеральний директор  
КНП «Міська багатoproфільна клінічна лікарня  
матері та дитини ім. проф. М.Ф. Руднева» ДМР  
Ігор МАКЕДОНСЬКИЙ  
«15» 03 2023р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Пропозиції для впровадження:** підвищення ефективності лікувально-профілактичних заходів при веденні передчасно народжених новонароджених за рахунок ранньої діагностики некротизуючого ентероколіту за допомогою визначення рівня експресії факторів транскрипції T-bet та Foxp3 в клітинах зішребу букальної слизової оболонки методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

**2. Установа-розробник, автор:** Дніпровський державний медичний університет, 49044, м. Дніпро, вул. Володимира Вернадського, 9, кафедра педіатрії 1 та медичної генетики, зав. кафедри, д.мед.н., професор Абатуров О.С., к.мед., аспірант Товарницька А. О., тел. +38 (056) 766-48-48.

**3. Джерела інформації:**

1. Спосіб персоніфікованого прогнозування розвитку некротизуючого ентероколіту в недоношених новонароджених. Перелік наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я. ДНП «Центр тестування». Національна академія медичних наук України. МОЗ України. Київ. Випуск 9. Березень, 2023 р. <https://www.testcentr.org.ua/uk/naukova-naukovo-tekhnichna-produktsiia>.

**4. Термін впровадження:** березень 2023 – травень 2023

**5. Базова установа, яка проводить впровадження:** КНП «Міська багатoproфільна клінічна лікарня матері та дитини ім. проф. М.Ф. Руднева » ДМР

**6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** ефективність впровадження відповідає критеріям, вказаним в джерелі інформації.

Впровадження даної методики дозволяє проводити ранню діагностику запалення кишечника в передчасно народжених дітей для покращення ефективності проведення лікувально-профілактичних заходів.

**7. Область застосування:** лікувально-профілактична робота ✓

**8. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
завіуюча відділенням  
патології новонароджених та  
недоношених дітей з  
інфекційними захворюваннями



Світлана ДРОБИЧ



