

На правах рукописи

ШАКИРОВА

Ксения Павловна

**ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО
ПЕРИОДА И РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА У НЕДОНОШЕННЫХ
ДЕТЕЙ ПРИ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МОЛОЗИВА**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

14.01.08 – педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2020

Работа выполнена в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

**Черешнев
Валерий Александрович**

Доктор медицинских наук, профессор

**Чистякова
Гузель Нуховна**

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой госпитальной
педиатрии, клинической иммунологии и
аллергологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский
государственный медицинский университет»
Минздрава России

**Волосников
Дмитрий Кириллович**

Доктор медицинских наук, доцент, доцент
кафедры поликлинической педиатрии и
педиатрии факультета повышения
квалификации и профессиональной
переподготовки ФГБОУ ВО «Уральский
государственный медицинский университет»
Минздрава России

**Громада
Наталья Евгеньевна**

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) (Москва)

Защита диссертации состоится «23» декабря 2020 года в _____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02, на базе ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (ул. Софьи Ковалевской, д.20/20) и на сайте ИИФ УрО РАН – <http://iir.uran.ru>, с авторефератом – на сайте ВАК РФ <http://vak2.ed.gov.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 года

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,
доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ

И.А.Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Высокий уровень преждевременных родов способствовал совершенствованию медицинских технологий выхаживания недоношенных детей, благодаря чему удалось сократить долю неонатальной смертности с 1990 г. по 2018 г. с 5 до 2,5 миллионов (Всемирная организация здравоохранения, 2018). Общепланетарный анализ смертности детей в возрасте до 5 лет, проведенный Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2018 г., показал, что 47 % летальных случаев происходит в первый месяц жизни, треть из них в категории недоношенных новорожденных. Показатели заболеваемости, формирующейся после рождения к постконцептуальному возрасту 37-40 недель (ПКВ, постконцептуальный возраст представляет собой сумму гестационного и постнатального возраста недоношенного ребенка в неделях), остаются на достаточно высоком уровне (Петрова А.С. и соавт., 2012, Башмакова Н.В. и соавт., 2015, You D. et al., 2015, ВОЗ, 2019).

Одной из актуальных проблем современной неонатологии является изучение иммунных реакций у недоношенных новорожденных и факторов, влияющих на их формирование (Черешнев В.А. и соавт., 2011, Гришина Т.И. и соавт., 2010, Малыгина О.Г. и соавт., 2014, Olszak T. et al., 2012, Чистякова Г.Н. и соавт., 2017).

Получение грудного молока матери в первый час жизни после рождения оказывает положительное влияние на всю дальнейшую жизнь ребёнка. Позднее начало грудного вскармливания (через 2-23 часа после рождения) увеличивает риск смерти ребенка в 1,3 раза в первые 28 дней жизни (United Nations Children's Fund, 2018). Молозиво оказывает существенное влияние на иммунные реакции (Rodriguez N.A. et al., 2010, Lee J. et al., 2015, Snyder R. et al., 2017, Abd-Elgawad M. et al., 2019).

Цель исследования. Оценить особенности течения раннего постнатального периода и изменения иммунологических параметров у недоношенных детей при орофарингеальном введении молозива.

Задачи исследования:

1. Изучить клиническое состояние и структуру микробной колонизации недоношенных детей различного гестационного возраста в динамике периода наблюдения (от рождения до постконцептуального возраста 37-40 недель).

2. Определить иммунологические критерии риска реализации инфекционно-воспалительных заболеваний у недоношенных детей и разработать алгоритм обследования данной категории новорожденных.

3. Оценить функциональную активность моноцитов крови и уровень секреторного иммуноглобулина А в копрофильтратах у недоношенных детей при орофарингеальном введении молозива.

4. Выявить особенности течения раннего постнатального периода у недоношенных детей, получавших орофарингеальное введение молозива.

Научная новизна исследования. Подтверждено снижение фагоцитарной способности нейтрофильных гранулоцитов и продукции секреторного

иммуноглобулина А в копрофилтратх у недоношенных детей 24-27 недель при рождении и в постконцептуальном возрасте 37-40 недель, что отражает повышенную частоту инфекционных заболеваний. В динамике периода адаптации наблюдается повышение функциональной активности моноцитов у всех детей, вне зависимости от гестационного возраста.

Впервые разработаны: «Способ ротоглоточного (орофарингеального) двукратного введения молозива недоношенным детям с экстремально низкой массой тела» (патент РФ на изобретение № 2709258 от 17.12.2019); «Способ раннего прогнозирования инфекций специфичных для перинатального периода у недоношенных детей с экстремально низкой и очень низкой массой тела» (приоритетная справка № 2020115642 от 12.05.2020); «Способ раннего прогнозирования развития неонатальной пневмонии у недоношенных детей с экстремально низкой и очень низкой массой тела» (приоритетная справка № 2020115632 от 12.05.2020).

Теоретическая и практическая значимость работы. Расширены представления об особенностях врожденного иммунитета и микробной колонизации недоношенных детей с момента рождения и до постконцептуального возраста 37-40 недель. Результаты, полученные при апробации метода орофарингеального введения молозива, показали, что данная технология является безопасной и оказывает положительное влияние на клиническое состояние недоношенных детей. На основании разработанных способов прогнозирования инфекций перинатального периода (по международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ 10) код Р39.9) и неонатальной пневмонии предложен алгоритм обследования недоношенных новорожденных от сверхранних и ранних преждевременных родов.

Методология и методы исследования. Для достижения поставленной цели проведена двухэтапная система исследования с участием 129 недоношенных детей. На первом этапе было выполнено проспективное сравнительное когортное исследование, на втором – сравнительное рандомизированное исследование. Методология исследования базировалась на основах доказательной медицины, системном и комплексном подходе с применением общенаучных и специфических методов, включающих клинико-anamнестические, лабораторные, инструментальные, микробиологические, статистические методы. Все исследования выполнены в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных и медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и нормативных документов «Правила клинической практики в Российской Федерации, утверждённых Приказом № 226 от 19.06.2003 г. Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Федерации (далее ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ). От всех матерей получено информированное согласие на использование биологического материала в научных целях.

Положения, выносимые на защиту.

1. Реализация патологических состояний у недоношенных детей обусловлена не только гестационным возрастом, но и сниженной фагоцитарной активностью нейтрофильных гранулоцитов (на системном уровне), увеличением степени колонизации условно-патогенными микроорганизмами на фоне низкого содержания секреторного IgA (в толстом кишечнике).

2. Определение показателей С-реактивного белка, CD14+CD282+, фагоцитарной активности нейтрофилов у недоношенных детей обладает высокой прогностической значимостью в оценке риска реализации инфекционных заболеваний в неонатальном периоде.

3. Внедрение технологии орофарингеального введения молозива позволяет скорректировать транзиторную гипогликемию, сократить длительность парентерального питания, достигнуть более высоких весовых показателей, снизить риск инфекционно-воспалительных заболеваний за счет повышения продукции секреторного иммуноглобулина А на локальном уровне у недоношенных детей.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.

Исследование проводили в соответствии с принципами доказательной медицины. Достоверность результатов работы, обоснованность выводов и практических рекомендаций базируется на достаточном количестве наблюдений, применении современной аппаратуры и методов статистической обработки материала с использованием актуального программного обеспечения.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседаниях проблемной комиссии и Ученого Совета ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ, VIII конференции с международным участием «Перинатальная медицина: новые технологии и междисциплинарные подходы» (Екатеринбург, 2016), V конгрессе акушеров-гинекологов Уральского федерального округа «Перинатальная медицина – от истоков к современности» (Екатеринбург, 2017), научно-практической конференции «Современные тренды развития репродуктивной медицины» Конкурс молодых ученых (Екатеринбург, 2018), Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 2018), Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием (Иваново, 2019), Евро-Азиатском неонатальном форуме (Екатеринбург, 2019), VI конгрессе акушеров-гинекологов Уральского федерального округа с международным участием «Инновации в перинатальной и репродуктивной медицине» (Екатеринбург, 2019), XII конгрессе «Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии» Конкурс молодых ученых (Москва, 2019), VI научно-практической конференции акушеров-гинекологов Уральского федерального округа в дистанционном режиме «Малышевские чтения»:

демографические вызовы современности в условиях пандемии COVID19» (Екатеринбург, 2020), VII конгрессе акушеров-гинекологов Уральского федерального округа в дистанционном режиме «Женское здоровье: от рождения до менопаузы» (Екатеринбург, 2020).

Личный вклад соискателя осуществлялся на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, цели и задачи, определение методологии и общей концепции диссертации вырабатывались совместно с научными руководителями – академиком РАН, д.м.н., проф. Черешневым В.А. и д.м.н., проф. Чистяковой Г.Н.

Автор осуществлял сбор анамнеза, забор биологического материала для исследования, разрабатывал статистические карты, обрабатывал медицинскую информацию, выполнял статистическую обработку, проводил анализ отечественной и зарубежной литературы, интерпретировал полученные результаты, занимался написанием и оформлением рукописи диссертации, представлял результаты работы в публикациях и в виде докладов на конгрессах и конференциях.

Внедрение результатов исследования в практику. Разработанный способ ротоглоточного (орофарингеального) двукратного введения молозива недоношенным детям с экстремально низкой массой тела внедрен в практическую работу родового отделения и отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ (Екатеринбург). Материалы диссертационного исследования используются в педагогическом процессе для обучения ординаторов и слушателей циклов повышения квалификации на базе ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 6 публикаций в изданиях из перечня ВАК (РИНЦ и международная база Scopus – 3, РИНЦ – 3), получено 2 патента РФ на изобретения.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованных сокращений и библиографического указателя, включающего 164 источника, в том числе 112 иностранных. Работа иллюстрирована 43 таблицами и 8 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы работы и структура исследования. Все роды проходили на базе ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ, директор – д.м.н. Мальгина Г.Б.), с 2017 по 2019 гг. Все недоношенные новорожденные, родившиеся в сроке гестации 24-36 недель 6 дней включительно, выхаживались в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) под наблюдением врачей

анестезиологов-реаниматологов (заведующий ОРИТН – Заслуженный врач РФ, к.м.н. Русанов С.Ю.) и отделении патологии новорожденных и недоношенных детей № 1 (заведующая ОПННД № 1 – к.м.н. Ширяева Е.К.), а также в отделении № 2 (заведующая ОПННД № 2 – к.м.н. Плюснина Н.Н.). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ, от всех женщин получено информированное согласие на использование биологического материала в научных целях. Лабораторные исследования проводились на базе клинко-диагностического отделения (заведующая - к.б.н. Пестряева Л.А.) и отделения иммунологии, клинической микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики (руководитель – профессор, д.м.н. Чистякова Г.Н.).

На первом этапе было проведено проспективное сравнительное когортное обследование 90 детей, разделенных на 3 группы, в зависимости от срока гестации (категории преждевременно родившихся детей по ВОЗ, 2012): 1-я группа – 28 детей, родившихся в сроке гестации 24-27 недель 6 дней включительно (очень ранние или сверхранные преждевременные роды); 2-я – 29 детей, родившихся в сроке гестации 28-31 неделя 6 дней включительно (ранние преждевременные роды); 3-я – группа сравнения, 33 ребенка, родившихся в сроке гестации 32-36 недель 6 дней включительно (преждевременные и поздние преждевременные роды). Критерии включения: недоношенные дети, родившиеся в сроке гестации 24-36 недель 6 дней включительно. Критерии исключения: врожденные пороки развития, генетические и хромосомные заболевания, гемолитическая болезнь новорожденного, дети от женщин с сахарным диабетом I и II типа, дети от многоплодных беременностей.

На втором этапе проведена оценка эффективности орофарингеального введения молозива (2018-2019 гг.), в ходе которого было выполнено сравнительное рандомизированное исследование 39 недоношенных детей с экстремально низкой массой тела, рожденных в сроке гестации 24-27 недель 6 дней включительно. Дети были поделены на группы, в зависимости от применения орофарингеального введения молозива: 1-я группа – получающие орофарингеально молозиво (19 детей), 2-я группа – не получающие молозиво (20 детей).

Недоношенные дети, участвующие в исследовании, наблюдались с момента рождения и до достижения постконцептуального возраста 37-40 недель. Постконцептуальный возраст (ПКВ) представляет собой сумму гестационного и постнатального возраста в неделях. Постконцептуальный возраст 37-40 недель – это возраст недоношенных детей, когда они достигают возраста доношенного ребенка после рождения. Дети получали обязательный комплекс лечебных мероприятий согласно клиническим рекомендациям, который включал в себя: респираторную поддержку, антигеморрагическую терапию, антибактериальную терапию, антимикотическую терапию, аналептическую терапию, проведение парентерального питания (Клинические рекомендации российской ассоциации специалистов перинатальной медицины: «Ведение новорожденных с

респираторным дистресс синдромом», 2016; «Парентеральное питание новорожденных», 2015; «Инвазивный кандидоз у новорожденных», 2017 и «Протокол антибактериальной терапии для неонатальных подразделений ФГБУ НИИ ОММ МЗ РФ», 2015).

Методы исследования. Проведен анализ медицинской документации: индивидуальные обменные карты беременных женщин, истории родов, истории развития и болезни новорожденных.

Клинический метод. При рождении всем новорожденным проводилась оценка по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах (V. Apgar, 1952). Оценка гестационного возраста в первые сутки жизни выполнялась по шкале Баллард (Jeanne L. Ballard, 1979). Анализ антропометрических показателей с учетом гестационного возраста при рождении и по достижению постконцептуального возраста 37-40 недель выполнялся с использованием графиков роста для недоношенных мальчиков и девочек (Fenton T., 2013). Оценка длительности пребывания в родильном доме, реанимационных мероприятий и реабилитации на втором этапе выхаживания, заболеваемость в период ранней постнатальной адаптации, лабораторные и инструментальные методы исследования.

Лабораторные и инструментальные методы исследования

Гематологические методы. Исследование общего клинического анализа периферической крови (уровень гемоглобина, количество эритроцитов, тромбоцитов, гематокрит, средний объем эритроцита, количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула) проводилось на гематологическом анализаторе «Mindray BC-5300» и «Mindray BC-5150» (Китай).

Биохимические методы. Оценка уровня глюкозы в сыворотке крови выполнялась глюкозооксидазным методом, определение концентрации С-реактивного белка - методом иммунотурбидиметрии, печеночных трансаминаз – УФ методом, билирубина – методом окисления с ванадатом, мочевины – методом реакции с уреазой, креатинина – методом реакции с саркозиноксидазой. Исследования выполняли с помощью автоматического биохимического анализатора «Mindray BS-200E» (Китай) и тест-наборов фирмы «Mindray» (Китай).

Определение кислотно-основного состояния, парциального напряжения газов крови, уровня электролитов проводили с помощью автоматической системы определения ионного и газового состава крови «GemPremier 3100» производства фирмы «InstrumentationLaboratoryCo» (США) и реактивов того же производителя. Анализировались следующие параметры: кислотность крови (pH), парциальное напряжение углекислого газа (pCO₂) и кислорода (pO₂), содержание буферных оснований во внеклеточной жидкости (BE), концентрацию стандартного бикарбоната (сHCO₃⁻), содержание ионов натрия (Na⁺), калия (K⁺), кальция (Ca⁺⁺).

Иммунологические методы. Оригинальные исследования представлены определением относительного и абсолютного числа моноцитов и нейтрофилов в крови, измерением уровня экспрессии маркеров активации моноцитов

CD14+CD282+ и CD14+CD284+, CD14+HLA-DR, CD14+CD64+, CD14+CD11b+, CD14+CD11c+. Определение численности клеточных популяций основывалось на идентификации специфичных рецепторов, экспрессирующихся на поверхности клеток. Фенотипирование популяций моноцитов в пуповинной и периферической крови, осуществлялось путем двухцветного окрашивания (FITC – флуоресцеин изотиоцианат, PE – фикоэритрин) моноклональными антителами. После лизирования излишних клеточных компонентов, проводили несколько циклов отмывки. Далее исследуемые образцы анализировались методом проточной цитометрии на аппарате «FACS Calibur» фирмы «Becton Dickinson» (США), в ходе которого устанавливалось относительное содержание изучаемой популяции от числа всех лейкоцитов, гейтируемых на цитометре и определение уровня экспрессии рецепторов CD14+CD282+, CD14+CD284+, CD14+HLA-DR, CD14+CD64+, CD14+CD11b+, CD14+CD11c+.

Определение фагоцитарной активности моноцитов и гранулоцитов производилось с использованием методики Phagotest (Glycotop, Германия). В основе методики – количественное определение лейкоцитарного фагоцитоза – доли гранулоцитов и моноцитов пуповинной и периферической крови, способных к поглощению опсонизированных бактерий *Escherichia coli*, меченных флуоресцеином с использованием сине-зеленого излучения (488 нм аргоновый лазер), анализировали процент фагоцитирующих моноцитов и гранулоцитов. Абсолютное количество фагоцитирующих клеток рассчитывалось исходя из общего количества лейкоцитов и процента всей популяции моноцитов и гранулоцитов.

Для определения содержания секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и цитокинов TNF- α и IL-4 в копрофильтратах методом иммуноферментного анализа (выбор вышеназванных цитокинов был обусловлен определением индекса смещения баланса про- и противовоспалительных цитокинов – Th-1/Th-2) на тест системе Вектор-Бест (Россия). Детекцию результатов исследования проводили на иммуноферментных анализаторах «Victor» фирмы «LKBWallac» и «Multiskan MCC/340» фирмы «Labsystems» (Финляндия).

При определении sIgA в копрофильтратах был использован экстрагирующий раствор IDK Extract (производитель Immunodiagnostik AG). Образец фекалий массой 15 мг подвергали механической гомогенизации. Пробирку с образцом наполняли экстрагирующим буфером 1,5 мл, закрывали, взбалтывали до однородного состояния. По истечении 10 минут разбавляли в соотношении 1:125 промывочным буфером.

Для определения цитокинов в копрофильтрате пробу фекалий в количестве 100 мг помещали в стерильную пробирку (на 10 мл), вносили 5,0 мл физиологического раствора (NaCl 0,9 %) и интенсивно встряхивали до образования гомогенной взвеси. Далее переносили 2,0 мл гомогената в микроцентрифужную пробирку и центрифугировали 5 минут на микроцентрифуге со скоростью 3000 об/мин, затем отбирали супернатант в чистую помеченную пробирку.

Уровень секреторного IgA в молозиве и грудном молоке оценивали с использованием тест-систем «Immundiagnostik» (Германия).

Бактериологические методы. Культуральным методом в соответствии с приказом №535 от 22 апреля 1985 года «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» и согласно приказу № 263-п ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ «О порядке микробиологического мониторинга» осуществляли посев фекалий, содержимого ротоглотки, носовой полости, материала с кожи заушной складки. Забор фекалий в количестве 1 г осуществляли в стерильные лабораторные контейнеры для взятия проб биологического материала с завинчивающейся крышкой и ложкой. Отделяемое ротоглотки, носовой полости, материал с кожи заушной складки, пробы молозива и грудного молока собирали в пробирки с транспортной средой «Amies с углем» (Китай). Взятие материала осуществлялось в соответствии с правилами асептики. Видовую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с использованием бактериологического автоматического анализатора VITEK 2 compact (Bio Mérieux, Франция) согласно инструкции производителя.

Инструментальные исследования. Рентгенологическое исследование органов грудной полости проводили при помощи рентгенологического аппарата TМXR+ (США).

Ультразвуковые методы исследования. Нейросонография с цветовой и импульсной доплерографией сосудов головного мозга выполнялась на аппаратах LOGIQe (GEMedicalSistems (China) Co., LTD) и «PHILIPS HD 15» («Филипс Ультрасаунд, Инк.», США) датчиком S8-3 по стандартной методике. Оценивалось состояние паренхимы головного мозга, выраженность извилин, желудочковая система, цистерны и субарахноидальное пространство, наличия кровоизлияний, кист. ЭхоКГ проводилось на аппаратах LOGIQ e (GE Medical Sistems (China) Co., LTD) и «PHILIPS HD 15» («Филипс Ультрасаунд, Инк.»,США) с возможностью цветного картирования и доплерографией в М- и В-режимах с использованием секторного датчика с фазированной решеткой S8-3 (с частотой 8-3 МГц) и конвексного датчика С6-3 (с частотой 6-3 МГц) по стандартной методике. Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости проводилось на аппаратах LOGIQ e (GE Medical Sistems (China) Co., LTD) и «PHILIPS HD 15» («Филипс Ультрасаунд, Инк.», США) по стандартной методике.

Сроки проведения исследований. Обследование детей проводилось на 1-е сутки жизни, 7-10-е сутки жизни (завершение раннего неонатального периода) и в постконцептуальном возрасте 37-40 недель (возраст достижения недоношенными детьми срока гестации доношенного ребенка).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 16.0 для Windows 8, Statistica 6.0, IBM SPSS Statistics 23. В случае подчинения признака закону нормального распределения данные представляли в виде средней величины (M) и

стандартной ошибки средней (SD). В случае несоответствия признаку закону нормального распределения данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го перцентилей, P25 и P75). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков осуществляли с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса, при отклонении нулевой гипотезы в ходе анализа проводили попарное сравнение групп, при попарных сравнениях использовали U-критерий Манна-Уитни. Уровень значимости (p) с учетом поправки Бонферрони принимали равным или менее 0,017. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали относительную величину в процентах с использованием точного критерия Фишера и критерия хи-квадрат (χ^2). Направление и силу связи признаков определяли методом корреляционного анализа с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Корреляционную связь с коэффициентом корреляции $|r|=1-0,75$ расценивали как сильную, $|r|=0,75-0,25$ – как умеренную и $|r|<0,25$ - как слабую.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что беременность матерей протекала на фоне преэклампсии (у 42,9 %, 55,1 % и 39,4 % женщин 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно), хронической плацентарной недостаточности (у 60,8 %, 72,4 % и 63,7 % женщин 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно), нарушения маточно-плацентарного кровотока (у 60,8 %, 51,7 % и 54,6 % женщин 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно), маловодия (у 28,6%, 20,7% и 36,4 % женщин 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно), истмико-цервикальной недостаточности (у 25 %, 13,8 % и 12,1 % женщин 1-й, 2-й и 3-й группы соответственно) ($p>0,05$, во всех случаях). Длительный безводный промежуток регистрировался у 10,7 % и 24,1 % матерей 1-й и 2-й группы ($p>0,05$), хроническая внутриматочная инфекция у 25 % и 17,2 % ($p>0,05$, во всех случаях) женщин, родоразрешенных в сроке сверхранных и ранних преждевременных родов. Однако, случаи хориоамнионита отмечали чаще у матерей, родивших в сроке 24-27 недель (17,9 % против 3,4 %). Наличие у матерей данных патологических состояний явилось фактором риска развития инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных.

Более чем в 90 % случаев, женщины 1-й и 2-й групп и 100 % матерей группы сравнения были родоразрешены оперативным путем (кесарево сечение) в плановом порядке. Наиболее низкие показатели по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах жизни наблюдались у новорожденных с меньшим сроком гестации. У детей 1-й группы на первой минуте асфиксия тяжелой степени (0-3 баллов по шкале Апгар через 1 мин после рождения) регистрировалась в 4 раза чаще – в 25 % случаев по сравнению с показателями детей 2-й группы – 6,9 % случаев ($p_{1,2}>0,05$). Средняя и умеренная асфиксия при рождении (4-7 баллов через 1 мин после рождения) регистрировалась

у 75 %, 93,1 % и 100 % новорожденных 1-й, 2-й и 3-й групп ($p_{1-2}>0,05$, $p_{1-3}=0,002$, $p_{2-3}>0,05$).

Респираторный дистресс-синдром новорожденного регистрировался с частотой 100 % и 86,2 % случаев в 1-й и 2-й группе, в связи с чем, большинство новорожденных нуждались в респираторной поддержке и заместительной сурфактантной терапии на момент рождения (рисунок 1).

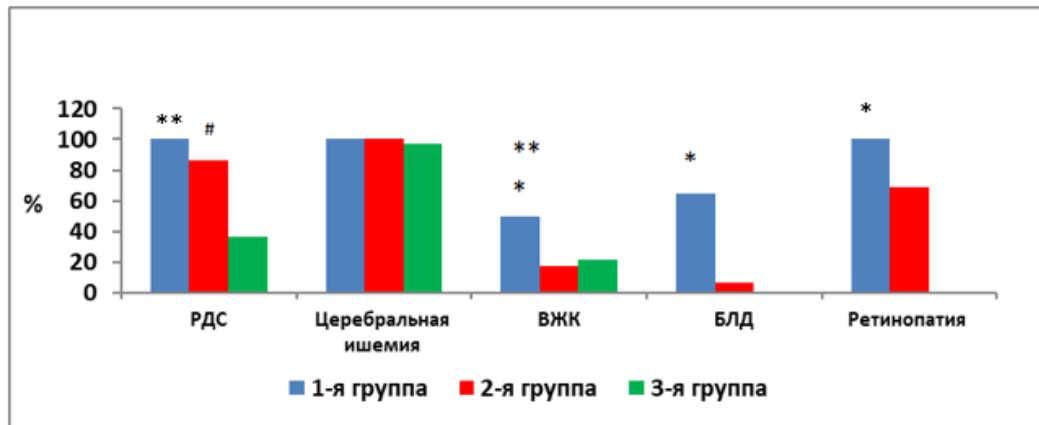


Рисунок 1 – Частота респираторного дистресс синдрома, гипоксических поражений центральной нервной системы, бронхолегочной дисплазии и ретинопатии у недоношенных детей в постконцептуальном возрасте 37-40 недель
Примечание: * - $p_{1-2}<0,05$, ** - $p_{1-3}<0,05$, # - $p_{2-3}<0,05$, РДС – респираторный дистресс синдром, ВЖК – внутрижелудочковые кровоизлияния, БЛД – бронхолегочная дисплазия

Проведение искусственной вентиляции легких (ИВЛ) чаще требовалось новорожденным 1-й группы. Во 2-й группе, напротив, большинство детей получали неинвазивную респираторную поддержку методом СРАР (Continuous Positive Airway Pressure). У новорожденных 3-й группы только 36,4 % детей имели РДС и нуждались в СРАР.

В динамике периода наблюдения, к моменту выписки из стационара (ПКВ 37-40 недель) у недоношенных детей сформировалось гипоксическое поражение центральной нервной системы (ЦНС) различной степени тяжести, обусловленное морфо-функциональной незрелостью сосудистой сети головного мозга. Церебральная ишемия регистрировалась практически у всех недоношенных детей, родившихся в сроке гестации 24-36 недель. В 1-й группе наиболее часто регистрировалась тяжелая форма церебральной ишемии (67,9 % против 24,1 % и 6,1 %, $p_{1-2}=0,001$, $p_{1-3}<0,0001$), во 2-й доминировала церебральная ишемия средней степени (69 % против 32,1 %, $p_{1-2}=0,005$). У детей группы сравнения выявлялась ишемия легкой и средней степени тяжести (48,5 % и 42,4 % случаев) (рисунок 1).

Внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) различной степени тяжести, развивающиеся вследствие примитивного строения сосудов перивентрикулярных областей и отсутствия ауторегуляции мозгового кровотока, диагностировались

чаще у детей наименьшего срока гестации по сравнению с показателями 2-й и 3-й групп (49,9 % против 17,2 % и 21,2 %, $p_{1-2}=0,005$, $p_{1-3}=0,008$) (рисунок 1).

Каждому второму ребенку 1-й группы (64,4 %) по совокупности клинических данных и результатов рентгенологического обследования в постконцептуальном возрасте 37-40 недель диагностировано наличие бронхолегочной дисплазии (БЛД), характерной для глубоконедоношенных детей ввиду незрелости легких и проведения длительной респираторной поддержки. Во 2-й группе наблюдались единичные случаи регистрации классической формы БЛД (6,9 %, $p_{1-2}<0,0001$). В группе сравнения случаев развития БЛД не выявлено. Установлены различия в частоте встречаемости ретинопатии недоношенных. Наиболее часто ретинопатия недоношенных диагностировалась у детей 1-й группы (100 % против 69 %, $p_{1-2}=0,001$) (рисунок 1).

Незрелость иммунных реакций обуславливает восприимчивость недоношенных детей к инфекционным заболеваниям, которые чаще регистрировались у детей 1-й группы. Инфекция перинатального периода, неуточненная (код по МКБ 10 P39.9) и пневмония у данной категории новорожденных регистрировались значительно чаще, чем у детей 2-й и 3-й групп ($p_{1-2, 2-3}<0,0001$) (таблица 1).

Таблица 1 - Инфекционные заболевания недоношенных детей к постконцептуальному возрасту 37-40 недель

Патология	Частота инфекционной патологии						p
	1-я группа (n=28)		2-я группа (n=29)		3-я группа (n=33)		
	абс	%	абс	%	абс	%	
Бактериальный сепсис новорожденного, ранний (P36)	3	10,7	1	3,4	0	0	
Инфекция перинатального периода, неуточненная (P39.9)	26	92,9	13	44,8	3	9,1	$p_{1-2, 1-3}<0,0001$ $p_{2-3}=0,001$
Бактериальный сепсис новорожденного, поздний (P36)	3	10,7	1	3,4	0	0	
Пневмония (J18)	14	50	2	6,9	2	6,1	$p_{1-2, 1-3}<0,0001$

Примечание: p_{1-2} , p_{1-3} , p_{2-3} – уровень значимости различий между группами детей.

Большинство недоношенных детей в раннем неонатальном периоде находились на грудном вскармливании (в 67,9 %, 82,8 %, 72,7 % случаев в 1-й, 2-й и 3-й группах соответственно, $p>0,05$ во всех случаях). К постконцептуальному возрасту 37-40 недель частота грудного вскармливания сократилась во всех группах (28,6 %, 58,6 %, 63,6 % в 1-й, 2-й и 3-й группах соответственно), однако у детей с наименьшим сроком практически в 2 раза ($p_{1-2}=0,022$, $p_{1-3}=0,006$). Продолжительность парентерального питания была наиболее длительной у детей от сверхранних преждевременных родов (в среднем 41 сутки против 17 и 2 суток, $p_{1-2, 1-3}<0,0001$). Длительность антибиотикотерапии была наибольшей у детей с наименьшим сроком гестации (в среднем 35 суток против 20 и 9 суток, $p_{1-2, 1-3}<0,0001$).

$z < 0,0001$).

У всех детей основных групп наблюдалась анемия недоношенных, чаще в первой группе (100 % против 65,5 % и 15,2 %, $p_{1-2}=0,001$, $p_{1-3}, z_{2-3} < 0,0001$). Количество проведенных трансфузий отмытых эритроцитов у детей с наименьшим сроком гестации в 4,8 раза (82,1 % против 17,2 %, $p_{1-2} < 0,0001$) превышало показатели 2-й группы, что обусловлено незрелыми механизмами эритропоэза. Для предотвращения анемий следует включать введение препаратов эритропоэтина в соответствии с рекомендациями российской ассоциации специалистов перинатальной медицины.

При проведении бактериологического исследования биоматериала толстой кишки в конце первых суток жизни было установлено, что в группе детей с наименьшим сроком гестации рост микроорганизмов зарегистрирован в двух случаях (*Staphylococcus epidermidis* и *Escherichia coli*). На 7-10 сутки жизни чаще всего отсутствие роста кишечной микрофлоры детектировалось у детей 1-й группы (78,6 % случаев против 41,5 % и 24,2 % случаев, $p_{1-2}=0,01$, $p_{1-3} < 0,001$). Из выделенных микроорганизмов в 1-й группе наиболее часто выявлялись энтеробактерии с доминированием *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca* в диагностически значимых титрах (более 10^4 КОЕ/г), во 2-й группе – грамположительные кокки, представленные коагулазонегативными стафилококками в диагностически незначимых титрах (до 10^4 КОЕ/г), в группе сравнения энтеробактерии с преобладанием *E. coli* в нормальном титре 10^7 - 10^8 КОЕ/г). Частота выявления энтеробактерий была наибольшей в группе сравнения. Коагулазонегативные стафилококки и энтерококки регистрировались реже всего у детей наименьшего гестационного возраста (таблица 2).

Таблица 2 - Микробная колонизация толстого кишечника у недоношенных детей на 7-10 сутки жизни

Микроорганизмы	Частота выделения микроорганизмов						p
	1-я группа (n=28)		2-я группа (n=29)		3-я группа (n=33)		
	abc	%	abc	%	abc	%	
Не выявлены	22	78,6	10	41,5	8	24,2	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3} < 0,0001$
Грамотрицательные неферментирующие бактерии	2	7,1	2	6,9	2	6,1	
Энтеробактерии	3	10,7	4	13,8	12	36,4	$p_{1-3}=0,02$ $p_{2-3}=0,043$
Коагулазонегативные стафилококки и энтерококки	1	3,6	7	34,4	7	21,2	$p_{1-2}=0,025$
Микробные ассоциации	0	0	1	3,4	4	12,1	

Примечание: $p_{1-2}, p_{1-3}, p_{2-3}$ – уровень значимости различий между группами детей.

При достижении недоношенными детьми постконцептуального возраста 37-40 недель у 78,6 % детей, родившихся с наименьшим сроком гестации, наблюдалась кишечная микробиота. Во 2-й группе у всех детей отмечался рост кишечной микрофлоры. В 3-й группе наличие микроорганизмов зарегистрировано в 84,9 % случаев. Во всех группах наиболее часто регистрировался рост

энтеробактерий, в 1-й и 2-й значительно чаще ($p_{1-3}=0,048$, $p_{2-3}=0,043$). В 1-й группе детей с наибольшей частотой идентифицировали *Enterobacter cloacae*, во 2-й группе преобладали *K. oxytoca* и *E. coli* в равной степени, в 3-й группе - *E. coli*. Все микроорганизмы детектировались в диагностически значимых титрах (более 10^4 КОЕ/г) (таблица 3).

Таблица 3 - Микробная колонизация толстого кишечника у недоношенных детей в постконцептуальном возрасте 37-40 недель

Микроорганизмы	Частота выделения микроорганизмов						P
	1-я группа (n=28)		2-я группа (n=29)		3-я группа (n=33)		
	абс	%	абс	%	абс	%	
Не выявлены	6	21,4	0	0	5	15,1	
Грамотрицательные неферментирующие бактерии	2	7,1	0	0	0	0	
Энтеробактерии	14	57,2	18	62,1	12	36,4	$p_{1-3}=0,048$ $p_{2-3}=0,043$
Коагулазонегативные стафилококки и энтерококки	3	10,7	10	34,4	13	39,4	
Микробные ассоциации	1	3,6	1	3,4	3	9,1	

Примечание: p_{1-2} , p_{1-3} , p_{2-3} – уровень значимости различий между группами детей.

При исследовании кишечной микрофлоры на содержание в ней *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* значимых различий между исследуемыми группами не выявлено. Рост *Lactobacillus* и *Bifidobacterium spp.* отмечался в единичных случаях.

Результаты, которые были получены нами при анализе микробиоценоза толстого кишечника, показывают, что микробная колонизация недоношенных детей характеризуется преобладанием роста грамотрицательных энтеробактерий на фоне выраженного дефицита *Lactobacillus* и *Bifidobacterium spp.* Данный факт обусловлен проведением антибактериальной терапии, а также снижением частоты грудного вскармливания недоношенных детей к постконцептуальному возрасту 37-40 недель. С учетом полученных результатов назревает необходимость пересмотра принятого ранее протокола антибактериальной терапии в учреждении и организации банка донорского грудного молока.

При оценке уровня TNF- α , IL-4 в копрофильтратах в динамике периода исследования, различий между группами не обнаружено, наблюдалось статистически значимое снижение концентрации секреторного IgA у детей со сроком гестации 24-27 недель в раннем неонатальном периоде и в постконцептуальном возрасте 37-40 недель, что способствовало повышению риска реализации инфекционной патологии в данной группе (таблица 4).

Таблица 4 - Уровень sIgA, TNF- α , IL-4 в копрофильтратах у недоношенных детей в динамике постнатального периода

Показатель, пг/мл	Уровень sIgA, TNF- α , IL-4 в копрофильтратах, Ме (25-75)			p
	1-я группа (n=28)	2-я группа (n=29)	3-я группа (n=33)	
1-е сутки				
sIgA	0,89(0,67-2,24)	0,92(0,41-3,48)	0,63(0,22-2,81)	
TNF α	2,58 (2,3-2,96)	2,25(2,12-2,48)	2,32(2,15-2,56)	
IL-4	9,7(9,5-9,9)	8,19(7,96-9,14)	8,39(7,73-12,2)	
7-10-е сутки				
sIgA	4,53(0,8-9,78)	11,45(3,98-19,58)	10,5(6,9-20,0)	p ₁₋₂ =0,014 p ₁₋₃ =0,012
TNF α	2,52(2,29-2,54)	2,02(1,95-2,65)	2,02(1,94-2,54)	
IL-4	9,18(8,58-9,87)	9,05(8,66-9,44)	8,52(8,33-8,95)	
Постконцептуальный возраст 37-40 недель				
sIgA	1,74(0,92-9,3)	11,59(4,08-19,52)	11,22(11,6-16,08)	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,001
TNF α	2,78(2,42-2,93)	2,52(1,99-3,05)	2,3 (2,12-2,47)	
IL-4	8,98(8,36-10,03)	8,79(8,72-9,18)	8,46(8,1-8,82)	

Примечание. p₁₋₂, p₁₋₃ - уровень значимости различий между группами детей.

Морфологические особенности естественных барьеров организма недоношенных детей в сочетании с многочисленными инвазивными манипуляциями, длительным пребыванием в условиях стационара способствует формированию микрофлоры кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей (Brooks V. et al., 2014). При исследовании микробиоценоза верхних дыхательных путей и кожи недоношенных детей выявлено, что с наибольшей частотой на всем протяжении периода исследования регистрировались микроорганизмы семейства *Staphylococcaceae*, в частности *Staphylococcus epidermidis* (в титре $\leq 10^4$ КОЕ/г), о чем свидетельствуют существующие данные литературы (Pammi M. et al, 2017).

Ведущая роль в защите новорожденного от патологической бактериальной колонизации кишечника принадлежит клеткам моноцитарного звена.

Повышение степени колонизации условно-патогенной микрофлоры различных локусов в динамике периода адаптации недоношенных детей, сопровождалось активацией моноцитарно-макрофагального звена иммунной системы (таблица 5).

К моменту достижения детьми постконцептуального возраста 37-40 недель у большинства недоношенных детей регистрировалась повышенная экспрессия маркеров активации моноцитов за исключением количества CD14+CD284+ клеток, содержание которых не изменилось. Необходимо отметить, что у детей 32-36 недель гестации изменения в сторону возрастания отмечались для CD14+CD11b+ и CD14+HLA-DR+ моноцитов (таблица 5).

Таблица 5 - Уровень экспрессии маркеров активации моноцитов в пуповинной и периферической крови у недоношенных детей

Показатель, %	Период исследования	Уровень экспрессии маркеров активации моноцитов, Me (25-75)		
		1-я группа (n=28)	2-я группа (n=29)	3-я группа (n=33)
CD14+CD282+	1-е сутки	36,5(12-58,7)	39,5(25,25-62,5)	54(31-73)
	ПКВ 37-40 нед.	78(69-84) ↑	67(43,5-79) ↑	77(74-78)
CD14+CD284+	1-е сутки	26(13-39,5)	35(25,25-49,5)	25(12-41)
	ПКВ 37-40 нед.	37(21-45)	29(20,5-59)	24(18,5-37,75)
CD14+CD11b+	1-е сутки	42(26-67)	54(45-65)	52(25-71)
	ПКВ 37-40 нед.	76(66-83) ↑	75(64-80,5) ↑	75(63-75) ↑
CD14+CD11c+	1-е сутки	42(23-70)	64,5(43,5-73,25)	61(45-77)
	ПКВ 37-40 нед.	83(72-88) ↑	77(74,5-85) ↑	72(68-82)
CD14+CD64+	1-е сутки	40(18-66,5)	50(41,25-66,75)	56(31-73)
	ПКВ 37-40 нед.	74(68-82) ↑	61(52-72,5)	65(48-69)
CD14+HLA-DR+	1-е сутки	38(21-59)	51(40-66,75)	59(37-73)
	ПКВ 37-40 нед.	79(71-84) ↑	76(65,5-82,5) ↑	81(78-86) ↑

Примечание: ↑ – $p < 0,05$ – уровень значимости различий между показателями врожденного иммунитета пуповинной и периферической крови; ПКВ 37-40 нед. – постконцептуальный возраст 37-40 недель.

Согласно полученным данным, наименьшее содержание фагоцитирующих клеток регистрировалось у детей гестационного возраста 24-27 недель, у детей 28-31 недели отмечалось сниженное количество нейтрофильных гранулоцитов, относительно группы сравнения. Количество фагоцитирующих моноцитов у детей с гестационным возрастом 24-27 и 28-31 недели было снижено на уровне тенденции относительно показателей группы сравнения, статистически значимых различий между 1-й и 2-й группами не выявлено (таблица 6).

Таблица 6 - Фагоцитарная активность гранулоцитов и моноцитов у недоношенных детей при рождении и в постконцептуальном возрасте 37-40 недель

Показатель, %	Фагоцитарная активность гранулоцитов и моноцитов, Me (25-75)		
	1-я группа (n=28)	2-я группа (n=29)	3-я группа (n=33)
Фаготест (гранулоциты)	1-е сутки		
	41,8(36,75—54,0)	54,0(39,0-63,0)	62,5(56,5-68,0)
	$p_{1-3}=0,0001$	$p_{2-3}=0,017$	
	Постконцептуальный возраст 37-40 недель		
	51,15(34,8-62,8)	63,0(55,97-72,0) ↑	65,2(47,0-78,65)
	$p_{1-3}=0,017$ $p_{1-2}=0,017$		
Фаготест (моноциты)	1-е сутки		
	52,62(33,25-66,3)	52,0(35,0-71,0)	59,0(44,5-72,46)
	$p_{1-3}=0,04$	$p_{2-3}=0,03$	
	Постконцептуальный возраст 37-40 недель		
	64,0(53,48-80,23) ↑	65,0(61,8-74,4) ↑	67,0(62,0-89,0) ↑

Примечание: p_{1-2} , p_{1-3} , p_{2-3} – уровень значимости различий между группами детей; ↑ – $p < 0,05$ – уровень статистической значимости между показателями врожденного иммунитета пуповинной и периферической крови.

Относительное содержание нейтрофильных гранулоцитов у детей ГВ 24-27 недель по достижению постконцептуального возраста 37-40 недель сохранялось на прежнем уровне и статистически значимо отличалось от показателей детей большего гестационного возраста. Количество моноцитов в этой группе детей достоверно возрастало относительно показателей пуповинной крови, но не отличалось от показателей 2-й и 3-й групп. В отличие от 1-й группы у детей ГВ 28-31 неделя в динамике периода адаптации статистически значимо увеличивалось относительное содержание всех фагоцитирующих клеток. Результаты исследования лейкоцитарного фагоцитоза представлены в таблице 6.

На втором этапе настоящего исследования проведена оценка влияния орофарингеального введения молозива на течение раннего постнатального периода и иммунологические параметры недоношенных детей (экспрессия клеток моноцитарного звена и уровень секреторного IgA на локальном уровне в копрофилтратках).

По результатам первого этапа исследования было установлено, что группа детей от сверхранних преждевременных родов к постконцептуальному возрасту 37-40 недель имеет наиболее тяжелые клинические исходы и в большей степени уязвима в отношении развития инфекционно-воспалительных заболеваний, поэтому на втором этапе в исследовании приняли участие дети, рожденные в сроке гестации 24-27 недель 6 дней включительно.

Путем рандомизации методом конвертов новорожденные подразделялись на две группы: 1-я группа – получающие орофарингеально молозиво при рождении (19 детей), 2-я группа – не получающие молозиво (20 детей). Осуществлялось двукратное орофарингеальное введение молозива. Первичное введение молозива в объеме по 0,35 мл (7 капель) проводилось в оперативно-родовом блоке через 30 - 40 минут после рождения ребенка с помощью пластиковой одноразовой стерильной Пастеровской пипетки вдоль слизистой правой и левой щеки по направлению к ротоглотке в течение 2 минут. Повторное введение молозива осуществлялось не позднее первых 6 часов жизни. Сцеживание молозива из груди матери производилось в родовом зале, после извлечения ребенка, предварительно обработанными перед манипуляцией руками в стерильных перчатках в стерильный одноразовый пластиковый контейнер с крышкой. Манипуляцию проводил врач-неонатолог.

Гестационный возраст в группах при рождении статистически значимо не отличался и составлял $27 \pm 0,94$ и $26,5 \pm 1,08$ недель ($p > 0,05$). Все дети имели экстремально низкую массу тела при рождении. Новорожденные были сопоставимы по антропометрическим показателям.

У большинства недоношенных детей при рождении (в пуповинной крови) регистрировалась гипогликемия (в 63,2 % и 65 % случаев), являющаяся опасным состоянием, влияющим на тяжесть неврологической патологии (Клинические рекомендации: парентеральное питание новорожденных, 2015). После двукратного введения молозива, концентрация глюкозы, исследованная через 4 часа после

рождения (в периферической крови) у детей 1-й группы увеличилась, а у недоношенных новорожденных, не получавших молозиво – практически не изменилась, и была достоверно ниже, чем у детей, получавших молозиво ($p=0,040$). Уровень глюкозы, измеренный через 6 часов после рождения в периферической крови у детей, получавших молозиво, также превышал показатели новорожденных, не получавших молозиво ($p=0,010$) (таблица 7).

Таблица 7 - Уровень глюкозы в крови у недоношенных детей при применении метода орофарингеального введения молозива

Группы	Уровень глюкозы в сыворотке крови, ммоль/л, M ±SD		
	Пуповинная кровь	Периферическая кровь	
		Через 4 часа	Через 6 часов
1-я группа, дети, получавшие молозиво орофарингеально (n=19)	2,78±0,33	3,48±0,26	3,73±0,34
2-я группа, дети, не получавшие молозиво орофарингеально (n=20)	2,53±0,13	2,59 ±0,09	2,72 ±0,08
p	>0,05	<0,05	<0,05

Примечание. p – уровень значимости различий между группами детей.

При исследовании маркеров воспаления установлено, что у новорожденных, получавших молозиво с первых часов жизни уровень С-реактивного белка, был в 1,5 раза ниже – 6,5 (4,4-22,9) против 9,82 (3,8-38,8) г/л ($p=0,04$).

Неврологические нарушения (гипоксическое поражение ЦНС), респираторный дистресс синдром, ретинопатия, бронхолегочная дисплазия к постконцептуальному возрасту 37-40 недель были сопоставимы в обеих группах.

Частота инфекции перинатального периода ($p=0,019$), бактериального сепсиса ($p=0,04$), пневмонии ($p=0,025$) на 7-10-е сутки жизни была значительно ниже в группе детей, получавших молозиво (таблица 8).

Таблица 8 - Инфекционная патология недоношенных детей при применении метода орофарингеального введения молозива на 7-10-е сутки жизни

Патология (код по МКБ 10)	Частота инфекционной патологии				p
	1-я группа, получали орофарингеально молозиво (n=19)		2-я группа, не получали орофарингеально молозиво (n=20)		
	абс	%	абс	%	
Инфекция перинатального периода, неуточненная (P39.9)	9	47,4	17	85	0,019
Бактериальный сепсис новорожденного (P36)	0	0	4	20	0,04
Неонатальная пневмония (P23, J18)	5	26,3	13	65	0,025

Примечание: p – уровень значимости различий между группами детей.

Характер антибактериальной терапии и ее продолжительность не отличались в исследуемых группах.

В группе детей, получающих молозиво орофарингеально, длительность парентерального питания была значительно короче ($41 \pm 12,48$ против $52 \pm 14,79$ суток во 2-й группе, $p=0,03$), что свидетельствует о более быстром достижении полного объема энтерального вскармливания (150 мл/кг). Кроме того, в 1-й группе отмечалась большая масса тела к выписке $2563,2 \pm 415,57$ против $2243,77 \pm 246,54$ грамм ($p=0,035$).

При исследовании микробной колонизации кишечника выявлено, что условно-патогенная микрофлора (УПМ) на 1-е сутки жизни обнаруживалась в меконии в единичных случаях. К завершению раннего неонатального периода (7-10 сутки жизни) частота ее выделения возросла до 47,4 % и 45 %. У большинства новорожденных, получавших орофарингеальное введение молозива, регистрировались грамотрицательные микроорганизмы. Энтеробактерии представленные микроорганизмами *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* в диагностически значимых титрах (более 10^4 КОЕ/г) и неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы, в частности *Stenotrophomonas maltophilia*. По достижению постконцептуального возраста 37-40 недель кишечник был колонизирован практически у всех новорожденных. В обеих группах с одинаковой частотой регистрировался рост энтеробактерий (наиболее часто встречались *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* более 10^4 КОЕ/г и *E. coli* более 10^7 КОЕ/г), однако количество грамположительных микроорганизмов в 1-й группе отмечалось значительно реже ($p=0,04$) (таблица 9).

Таблица 9 - Микробная колонизация толстого кишечника у недоношенных детей в постконцептуальном возрасте 37-40 недель при применении метода орофарингеального введения молозива

Микроорганизмы	Частота выделения микроорганизмов			
	1-я группа (n=19)		2-я группа (n=20)	
	абс	%	абс	%
Не выявлены	4	21	0	0
Грамотрицательные неферментирующие бактерии	1	5,3	0	0
Энтеробактерии	10	52,6	11	55
Коагулазонегативные стафилококки и энтерококки	3	15,8*	8	40
Микробные ассоциации	1	5,3	1	5

Примечание: * $p < 0,05$ – уровень значимости различий между группами детей.

Значительную роль в защите новорожденного от инфекции играет пассивный гуморальный иммунитет. У недоношенных детей, по существу, отсутствует транс-плацентарный перенос материнских антител и протективный иммунитет обеспечивают сывороточный и секреторный иммуноглобулин А, который ребенок начинает получать постнатально только с грудным молоком. Содержание секреторного IgA в молозиве и грудном молоке матерей обеих групп

не отличалось и составляло 40,93 (3,75-168,89) и 40,02(2,96-183,58) на 1-е сутки, 2,1(1,48-4,9) и 1,72 (1,4-2,24) на 7-10-е сутки жизни.

Результаты исследования sIgA в копрофильтратах показали, что содержание данного иммуноглобулина у недоношенных новорожденных 1-й группы достоверно превышали аналогичные показатели детей 2-й группы на протяжении первых 10 суток жизни ($p < 0,05$) (таблица 10).

Таблица 10 - Уровень секреторного IgA в копрофильтратах недоношенных детей в динамике периода наблюдения при применении метода орофарингеального введения молозива

Группы	Уровень sIgA в копрофильтратах недоношенных детей, г/л, Ме (25-75)		
	1-е сутки	7-10-е сутки	ПКВ 37-40 недель
1-я группа, дети, получавшие молозиво орофарингеально (n=19)	2,24(0,88-5,4)	11,31(7,29 - 18,37)	9,33 (4,6-15,33)
2-я группа, дети, не получавшие молозиво орофарингеально (n=20)	0,78(0,25-1,1)	5,18(0,81-14,64)	2,58 (0,81-17,2)
p	<0,05	<0,05	

Примечание. p – уровень значимости различий между группами детей; ПКВ 37-40 недель – постконцептуальный возраст 37-40 недель.

По достижению возраста доношенного ребенка, значимых различий не выявлено, однако, в 50 % случаев у детей, получавших молозиво в первые часы жизни уровень sIgA составлял более 5,0 г/л против 20 % детей 2-й группы ($p < 0,05$)

При исследовании экспрессии моноцитов к достижению постконцептуального возраста 37-40 недель в периферической крови недоношенных детей, получивших молозиво орофарингеально, отмечалось статистически значимое снижение относительного содержания моноцитов относительно первоначальных показателей, установленных при рождении ($p < 0,05$). Уровень экспрессии активированных CD14+CD282+ и CD14+CD284+ клеток практически не изменился ($p > 0,05$). Тем не менее, количество моноцитов с рецепторами CD14+CD64+, CD14+CD11b+, CD14+CD11c+ и CD14+HLA-DR+ превышало аналогичные показатели пуповинной крови ($p < 0,05$) (таблица 11). У детей, не получавших молозиво при рождении, общее количество моноцитов в динамике периода адаптации не изменялось. Однако относительное число CD14+CD282+ клеток, увеличивалось в 2,1 раза, по сравнению с первоначальным уровнем и статистически значимо превышало аналогичные показатели детей 1-й группы. Относительное содержание молекул CD14+CD64+, CD14+CD11b+, CD14+CD11c+ и CD14+HLA-DR+ также достоверно увеличивалось, как относительно значений пуповинной крови, так и по сравнению с показателями детей, получавших молозиво с первых часов жизни, что отражает активацию врожденного иммунитета на колонизацию кишечника условно-патогенными микроорганизмами.

Таблица 11 - Уровень экспрессии маркеров активации моноцитов в пуповинной и периферической крови у недоношенных детей при применении метода орофарингеального введения молозива

Показатель, %	Уровень экспрессии маркеров активации моноцитов, Me (25-75)			
	1-е сутки жизни (пуповинная кровь)		ПКВ 37-40 недель (периферическая кровь)	
	1-я группа (n=19)	2-я группа (n=20)	1-я группа (n=19)	2-я группа (n=20)
Моноциты	12,5(9,25-17,0)	11,0(8,0-15,0)	9,0 (7,0-11,5)*	12(9,0-14,5)
CD14+CD282+	48,0(30,5-69,0)	38,0(25,0-51,0)	68,5(62,8-77,8) p ₁₋₂ =0,035	79,0(68,5-85,5)#
CD14+CD284+	31,0(23,25-39,0)	35,0(25,0-55,0)	33,0(22,5-44)	29,1(18,5-60)
CD14+CD64+	51,0(40,0-68,5)	48,5(27,5-66,5)	65,0(45,5-76,5)* p ₁₋₂ =0,04	71,5(59,5-81)#
CD14+CD11b+	50,0(38,5-65,5)	48,0(34,0-63,0)	74,5(66,0-83,0)*	76(66,25-84)#
CD14+CD11c+	52,0(35,5-73,0)	68,0(44,0-71,5)	72 (65-82,5)* p ₁₋₂ =0,017	84,5(77,5-88,0)#
CD14+HLA-DR+	58,0(32,5-68,0)	46,0(32,0-51,0)	73,5 (64,5-80,3)* p ₁₋₂ =0,018	83,0 (74,0-87,5)#

Примечание: *p<0,05 – уровень значимости различий в пуповинной и периферической крови у новорожденных 1-й группы, #p<0,05 – уровень значимости различий в пуповинной и периферической крови у новорожденных 2-й группы, p₁₋₂ – уровень значимости различий в периферической крови у новорожденных 1-й и 2-й групп; ПКВ 37-40 недель – постконцептуальный возраст 37-40 недель.

В динамике периода наблюдения у детей, получавших молозиво, среднее количество нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов увеличилось незначительно, на 20 % и 30 %, соответственно. У детей, не получавших молозиво, наблюдалось статистически значимое повышение относительного числа фагоцитов, поглотивших бактерии, относительно первоначального уровня и в сравнении с детьми получивших молозиво (таблица 12).

Таблица 12 – Фагоцитарная активность моноцитов и гранулоцитов у недоношенных детей при применении метода орофарингеального введения молозива

Показатель, %	Уровень экспрессии маркеров активации моноцитов, Me (25-75)			
	1-е сутки жизни (пуповинная кровь)		ПКВ 37-40 недель (периферическая кровь)	
	1-я группа (n=19)	2-я группа (n=20)	1-я группа (n=19)	2-я группа (n=20)
Фаготест (гранулоциты)	47,5 (35,0-55,0)	46,0 (39,0-63,0)	50,0 (37,28-59,94) p ₁₋₂ =0,010	63,65 (56,2-70,8)#
Фаготест (моноциты)	50,0 (37,5-67,0)	55,23 (41,0-70,0)	61,8 (45,59-70,71) p ₁₋₂ =0,003	72,2 (62,3-81,8)#

Примечание: #p<0,05 – уровень значимости различий в пуповинной и периферической крови у новорожденных 2-й группы, p₁₋₂ – уровень значимости различий в периферической крови у новорожденных 1-й и 2-й групп; ПКВ 37-40 недель – постконцептуальный возраст 37-40 недель.

ВЫВОДЫ

1. У всех недоношенных детей на фоне развития дыхательных и неврологических нарушений, инфекционно-воспалительных заболеваний, тяжелой анемии, ретинопатии наблюдается рост эпидемиологически значимых микроорганизмов: *E. coli* (более 10^7 КОЕ/г), *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* (более 10^4 КОЕ/г).

2. Ранними информативными иммунологическими параметрами, позволяющими оценить риск реализации инфекционно-воспалительных заболеваний в неонатальном периоде у недоношенных детей являются фагоцитирующая способность нейтрофилов, содержание С-реактивного белка и уровень экспрессии CD14+CD282+.

3. Функциональная активность моноцитов крови у недоношенных детей, получавших молозиво орофарингеально, не изменяется в динамике периода наблюдения.

4. Повышенная продукция секреторного иммуноглобулина А определяемая в копрофильтратах на локальном уровне, регистрируется только у недоношенных детей, получавших молозиво орофарингеально.

5. У детей, получавших орофарингеальное введение молозива, наблюдается быстрая коррекция транзиторной гипогликемии, сокращение продолжительности парентерального питания, большая прибавка массы тела и снижение частоты инфекционных заболеваний в неонатальном периоде.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Недоношенным детям, родившимся в гестационном возрасте 24-27 недель, рекомендуется осуществлять орофарингеальное введение молозива, после стабилизации состояния в условиях операционно-родового блока, с повторным введением не позднее первых шести часов жизни.

Проведение метода: манипуляцию проводит врач-неонатолог. После извлечения ребенка необходимо выполнить сцеживание молозива из груди матери. Предварительно обработать руки, надеть стерильные перчатки. Для сцеживания молозива можно использовать стерильный одноразовый пластиковый контейнер с крышкой. Молозиво следует вводить в операционно-родовом блоке через 30-40 минут после рождения и стабилизации состояния новорожденного. Вводить 7 капель молозива с помощью пластиковой одноразовой стерильной Пастеровской пипетки вдоль слизистой правой и левой щеки по направлению к ротоглотке с каждой стороны в течение 2 минут. Повторить манипуляцию не позднее первых шести часов жизни новорожденного.

2. С целью оценки риска раннего прогнозирования формирования неонатальной пневмонии у детей от сверхранних и ранних ПР (24-31 неделя 6 дней) проводить расчет прогностического индекса по формуле:

$$PI = 1,687 \times X_1 + 0,064 \times X_2 - 0,041 \times X_3 - 47,684 \quad [1]$$

где: X_1 – гестационный возраст ребенка, недели; X_2 – процентное содержание фагоцитирующих нейтрофильных гранулоцитов, %; X_3 – процентное содержание

CD282+CD14+ моноцитов, %; 47,684 – Const. При PI более 0 прогнозируют низкий риск развития неонатальной пневмонии, а при PI менее 0 делают заключение о высоком риске развития этой патологии у недоношенных детей от сверхранних и ранних преждевременных родов.

Для раннего прогнозирования инфекций перинатального периода (по МКБ 10 P39.9) у детей, следует проводить вычисление прогностического индекса (PI) по формуле:

$$PI = 1,028 \times X1 - 0,154 \times X2 - 1,8 \times X3 - 16,17 \quad [2]$$

где: X1 – гестационный возраст ребенка, недели; X2 – уровень С-реактивного белка, X3 – шкала Апгар на 5 минуте жизни, баллы, 16,171 – Const. При PI более 0 прогнозируют низкий риск инфекций перинатального периода, а при PI менее 0 делают заключение о высоком риске развития этой патологии у недоношенных детей от сверхранних и ранних преждевременных родов.

Прогнозирование риска развития инфекционной патологии в первые сутки жизни позволит подобрать наиболее рациональную тактику антибактериальной терапии у недоношенных детей, рожденных в сроке гестации 24-31 недель 6 дней включительно.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рецензируемых ВАК, индексируемых в международных базах данных Scopus:

1. Выхаживание недоношенных детей с использованием современных технологий ухода / *К.П. Шакирова*, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, Л.С. Устьянцева, В.Е. Рюмин // Лечение и профилактика. 2020. Т.10, № 1. С. 36-40. (ВАК, ИФ РИНЦ - 0,288).

2. Особенности врожденного и адаптивного иммунитета недоношенных детей с гипоксически-ишемическим поражением центральной нервной системы / Л.С. Устьянцева, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, С.Ю. Захарова, *К.П. Шамова*, С.В. Бычкова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2017. № 62, Т.3. С.59-65. (ВАК, ИФ РИНЦ - 0,672; Scopus, CiteScore – 4).

3. Особенности иммунного ответа детей с бронхолегочной дисплазией различной степени тяжести / Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, Л.С. Устьянцева, *К.П. Шамова*, М.А. Боцьковская, С.В. Бычкова, И.А. Газиева // Медицинская иммунология. 2019. Т.21, № 3. С.515-526. (ВАК, ИФ РИНЦ - 0,706; Scopus, CiteScore – 4).

4. Особенности экспрессии маркеров активации моноцитов у недоношенных детей различного гестационного возраста / Г.Н. Чистякова, *К.П. Шамова*, И.И. Ремизова, М.А. Боцьковская, С.В. Бычкова, Л.С. Устьянцева // Лечение и профилактика. 2018. Т.8, № 1. С.56-61. (ВАК, ИФ РИНЦ - 0,288).

5. Ремизова, И.И. Функциональная активность моноцитов у детей с ЭНМТ в динамике неонатального периода / И.И. Ремизова, *К.П. Шамова*, Г.Н. Чистякова // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 3. С.480-482. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0,656).

6. *Шамова, К.П.* Содержание секреторного IgA в копрофильтратах у детей с экстремально низкой массой тела в динамике постнатального периода / К.П. Шамова, Л.С. Устьянцева // Медицинская иммунология. 2017. Т.19, специальный выпуск: Иммунологические проблемы в педиатрии. С. 250-251. (ВАК, ИФ РИНЦ - 0,706; Scopus, CiteScore – 4).

Патенты.

7. Патент РФ (11) 2 694 830 (13) С1: Способ прогнозирования развития бронхолегочной дисплазии тяжелой степени у недоношенных детей с экстремально низкой массой тела в неонатальном периоде / Л.С. Устьянцева, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, С.В. Бычкова, К.П. Шамова; Федеральная служба по интеллектуальной собственности; 04.04.2018. Бюллетень № 10. С. 1-2.

8. Патент РФ (11) 2 709 258 (13) С1: Способ ротоглоточного (орофарингеального) двукратного введения молозива недоношенным детям с экстремально низкой массой тела / Г.Н. Чистякова, К.П. Шакирова, И.И. Ремизова, Л.С. Устьянцева, С.В. Бычкова; Федеральная служба по интеллектуальной собственности; 17.12.2019; Бюллетень № 35. С. 1-13.

Публикации в других изданиях.

9. Боцьковская, М.А. Особенности популяционного состава лимфоцитов и уровень экспрессии рецепторов cd282 и cd284 моноцитами пуповинной крови недоношенных детей / М.А. Боцьковская, И.И. Ремизова, К.П. Шамова // Интеграционные процессы в науке в современных условиях: сборник статей Международной научно-практической конференции (Новосибирск, 20 марта 2018). Уфа, 2018. Ч. 3. С. 129-134.

10. Внутрибольничная колонизация кишечника детей с экстремально низкой массой тела бактериями рода *Klebsiella* в динамике постнатального периода / К.П. Шамова, Л.С. Устьянцева, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова // Перинатальная медицина: новые технологии и междисциплинарные подходы: VIII конференция с международным участием (Екатеринбург, 14-15 октября 2016). Екатеринбург, 2016. С. 67.

11. Концентрация секреторного IgA в молозиве и грудном молоке женщин, родивших раньше срока / К.П. Шакирова, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова // Тенденция развития науки и образования. 2020. № 63, ч. 1. С.64-66.

12. Особенности экспрессии толл-подобных рецепторов (tlr) tlr2 и tlr4 моноцитов у недоношенных детей различного гестационного возраста / К.П. Шакирова, И.И. Ремизова, Л.С. Устьянцева, М.А. Боцьковская // Европейский фонд инновационного развития: XL Международные чтения (памяти А.И. Ноткина) (Москва, 16 декабря 2018). Москва, 2018. С.146-150.

13. Применение технологии орофарингеального введения молозива недоношенным детям в условиях перинатального центра / К.П. Шамова, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, М.А. Боцьковская // Евразийский союз ученых: международный научно-исследовательский журнал. 2018. № 3 (48), ч. 1. С.71-73.

14. Особенности адаптивного иммунитета детей с экстремально низкой массой тела с тяжелой бронхолегочной дисплазией, родившихся в сроке сверхранных преждевременных родов / Г.Н. Чистякова, Л.С. Устьянцева, И.И. Ремизова, К.П. Шакирова // Евразийский союз ученых: международный научно-исследовательский журнал. 2018. № 3 (48), ч. 1. С. 66-68.

15. Уровень цитокинов пуповинной крови у детей, родившихся в сроке сверхранных преждевременных родов / Л.С. Устьянцева, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, К.П. Шамова // Актуальные проблемы педиатрии: XVIII Съезд педиатров России (Москва, 17-19 февраля 2017). Москва, 2017. Ч.1. С. 303.

16. Шамова, К.П. Дисбиотические нарушения кишечника у недоношенных детей с экстремально низкой массой тела в динамике постнатального периода / К.П. Шамова, Л.С. Устьянцева // Перинатальная медицина – от истоков к современности: научно-практическая конференция посвященная 140-летию ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России; V конгресс акушеров-гинекологов УФО (Екатеринбург, 13-14 октября 2017). Екатеринбург, 2017. С. 56-58.

17. Шамова, К.П. Микробиоценоз кишечника детей с ЭНМТ / К.П. Шамова, Л.С. Устьянцева // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: сборник статей II Международной (72 Всероссийской.) научно-

практической конференции (УГМУ, Екатеринбург, 12-14 апреля 2017). Екатеринбург, 2017. С. 796-799.

18. Шакирова, К.П. Содержание секреторного IgA копрофильтартах недоношенных детей при применении ротоглоточного введения молозива / К.П. Шакирова, В.А. Черешнев, Г.Н. Чистякова // Способы, модели и алгоритмы модернизации науки в современных условиях: сборник статей Международной научно-практической конференции: (Омск, 25 марта 2020). Уфа, 2020. С. 121-124.

19. Шамова, К.П. Характер микробной колонизации и цитокиновый профиль у детей с экстремально низкой массой тела в динамике постнатального периода» / К.П. Шамова, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, Л.С. Устьянцева // Интернаука: международный научный журнал. 2017. № 3 (25), т. 1. С. 62-64.

20. Features cellular and adaptive immunity of children with severe hypoxic-ischemic lesions of the central nervous system with extremely low birth weight / L.S. Ust'janceva, G.N. Chistjakova, I.I. Remizova, S.U. Zaharova, K.P. Shamova, S.V. Bychkova // *Fundamentalis scientiam*. 2017. № 2 (3). P.59-62.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БЛД – бронхолегочная дисплазия

ВЖК – внутрижелудочковые кровоизлияния

ГВ – гестационный возраст

КОЕ – колониеобразующая единица

ПКВ – постконцептуальный возраст

ПР – преждевременные роды

РДС – респираторный дистресс-синдром

РН – ретинопатия недоношенных

ЦИ – церебральная ишемия

ЭНМТ – экстремально низкая масса тела

CD – Cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

CPAP – Continuous Positive Airway Pressure

IL – interleukin (интерлейкин)

sIgA – secretory immunoglobulin A (секреторный иммуноглобулин А)

TNF- α – tumor necrosis factor-alpha (фактор некроза опухоли-альфа)

Шакирова Ксения Павловна

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА И РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МОЛОЗИВА

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

14.01.08 – педиатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук