

VAXTINDAN ƏVVƏL DOĞULANLARDA NEKROTİK ENTEROKOLİTİN PATOGENEZİNDƏ TLR4 VƏ SİGİRR GEN PROFİLİ ÜZRƏ DƏYİŞİKLİKLƏRİN ROLU

¹Əliyeva A.M.*, ¹Poluxova A.Ə., ²Məmmədova N.M.

¹K.Y.Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutu, Bakı, Azərbaycan;

²Azərbaycan Tibb Universiteti, II Uşaq xəstəlikləri kafedrası, Bakı, Azərbaycan

Məqsəd. Tədqiqatın məqsədi vaxtından əvvəl doğulmuş yenidoğulanlarda nekrotik enterokolitin (NEK) inkişafı zamanı Toll-like reseptor 4 (TLR4) ekspressiyası və SIGIRR geninin metilləşmə profilində baş verən dəyişiklikləri qiymətləndirmək, onların hestasiya yaşı və doğuş kütləsi ilə əlaqəsini araşdırmaq və NEK patogenezində mümkün əhəmiyyətini müəyyən etmək olmuşdur. **Material və metodlar.** Tədqiqat K.Y. Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutunda aparılmış, laborator analizlər İnsan Genetikası Laboratoriyasında və Ankara şəhərində yerləşən DIAGEN və INTERGEN laboratoriyalarında yerinə yetirilmişdir. TLR4 gen ekspressiyası 50 qan nümunəsində real-time polimeraza zəncirvari reaksiyası üsulu ilə qiymətləndirilmişdir. SIGIRR geninin metilləşmə profili 52 qan nümunəsində 36 gen lokusu üzrə təhlil edilmişdir. İştirakçılar doğuş kütləsinə görə 1500 q-dan az və 1500 q-dan çox olan qruplara ayrılmış, NEK olan uşaqlar müvafiq müqayisə qrupları ilə qarşılaşdırılmışdır. Qruplararası fərqlər Mann–Whitney U meyarı ilə, dəyişənlər arasındakı əlaqələr isə Spearman ranq korrelyasiyası ilə qiymətləndirilmişdir; $p < 0,05$ statistik əhəmiyyət həddi kimi qəbul edilmişdir. **Nəticələr.** TLR4 $\Delta\Delta C_t$ göstəricisi hestasiya yaşı ilə mənfi korrelyasiya göstərmişdir ($p = -0,419$; $p = 0,006$); eyni göstərici ilə doğuş kütləsi arasında da mənfi korrelyasiya müəyyən edilmişdir ($p = -0,424$; $p = 0,006$). Doğuş kütləsi 1500 q-dan az olan uşaqlarda SIGIRR geninin %C90, %C100, %C102 və %C258 lokuslarında metilləşmə göstəricilərində müqayisə qrupuna nisbətən fərqlər aşkar edilmişdir. 1500 q-dan çox olan uşaqlarda %C327 və %C123 lokuslarında dəyişikliklər qeydə alınmışdır. SIGIRR metilləşmə göstəriciləri ilə TLR4 parametrləri arasında bir sıra statistik əhəmiyyətli korrelyasiyalar müəyyən edilmişdir. **Yekun.** Vaxtından əvvəl doğulmuş yenidoğulanlarda NEK TLR4 ekspressiyası və SIGIRR geninin metilləşmə profilində dəyişikliklərlə müşayiət olunur. Hestasiya yaşı və doğuş kütləsi TLR4 göstəriciləri ilə əlaqəli olmuşdur. SIGIRR lokuslarında metilləşmə dəyişiklikləri ilə TLR4 göstəriciləri arasındakı əlaqələr bu iki signal mexanizminin NEK patogenezində qarşılıqlı rolunu ehtimal etməyə əsas verir. Bu göstəricilərin erkən diaqnostik və proqnostik əhəmiyyətini müəyyən etmək üçün daha böyük nümunələrdə əlavə tədqiqatlara ehtiyac vardır.

Açar sözlər: nekrotik enterokolit, vaxtından əvvəl doğulmuş yenidoğulan, TLR4, SIGIRR, gen ekspressiyası

Giriş. Vaxtından əvvəl doğulanlara (VƏD) qulluqla bağlı əhəmiyyətli nailiyyətlər əldə olunmasına baxmayaraq nekrotik enterokolitdən (NEK) ölüm yüksək səviyyədə qalır. NEK zamanı yüksək ölüm göstəriciləri onun patogenezinin öyrənilməsi istiqamətində çoxsaylı müayinələrin aparılmasının əsas səbəbidir. Patoloji prosesin bir çox mexanizmləri tam aydın deyil, yaxud öyrənilməyib. Ona görə də bu xəstəliyin patogenezinin ümumi qəbul olunmuş konsepsiyası yoxdur. Tədqiqatçılar NEK-in öyrənilməsində molekulyar biologiyanın son nailiyyətlərindən istifadə edirlər [1-5].

Ədəbiyyatda mənbələrində bağırsaqla Toll-like reseptorların patoloji aktivləşməsinin NEK patogenezində mühüm rol oynadığına dair məlumatlar olsa da, prosesin mexanizmi tam olaraq tədqiq edilməmişdir [6-8].

Bu sahədə aparılan eksperimental tədqiqatları əhatə edən ədəbiyyat məlumatlarına görə bağırsaq divarındakı iltihabi prosesin aktivləşməsini

stimulyasiya edən Toll-like reseptorlar arasında TLR4 daha informativ əhəmiyyətə malikdir. Müəyyən olunmuşdur ki, yenidoğulanların nazik bağırsağında Toll bənzər reseptor 4-ün (TLR4) bakterial lipopolisaxaridlər (LPS) tərəfindən aktivləşməsi NEK-in inkişafına səbəb olur. Belə ki, TLR4-ün aktivləşməsi iltihab ocağına istiqamətlənmiş enterositlərin miqrasiyasını ingibə edir və onların apoptozuna səbəb olur. TLR4 signalının ingibisiyası isə, əksinə bağırsaq epitelində apoptozu ləngidərək NEK-in inkişafının qarşısını alır. Bağırsaq Toll reseptorlarını ingibə edən SIGIRR geni aşkar olunub. SIGIRR (Single Ig İl-1-related receptor) NEK-in inkişafında iştirak edən qram mənfi bakteriyaların membran komponenti olan LPS-in törətdiyi iltihabı ingibə edir. Müəyyən olunmuşdur ki, NEK inkişaf edən VƏD-lərdə identifikasiya olunan SIGIRR-in genetik variantlarının funksiyasının itirilməsi LPS-ə yönəlmiş iltihabi reaksiyasının artmasına səbəb olur [9-12].

*e-mail: dr.aliyeva-a@mail.ru

Tədqiqatın məqsədi. NEK inkişafı zamanı orqanizmdə sistemli immun cavab reaksiyasını və multisistem zədələnmələrin inkişafını öncədən proqnozlaşdırma bilən genetik dəyişikliklərin və bu dəyişikliklərin vaxtından əvvəl doğulmuşlarda NEK zamanı erkən klinik diaqnostik əhəmiyyətinin öyrənilməsi olmuşdur.

Material və metodlar. *Tədqiqatın dizaynı və aparıldığı baza.* Tədqiqat müqayisəli klinik-laborator tədqiqat kimi K.Y. Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutunda aparılmışdır. Molekulyar-genetik müayinələr Genetik Ehtiyatlar İnstitutunun İnsan Genetikası Laboratoriyasında, həmçinin Türkiyə Respublikasının Ankara şəhərində yerləşən DIAGEN və INTERGEN laboratoriyalarında yerinə yetirilmişdir.

Tədqiqat iştirakçıları. Vaxtından əvvəl doğulmuş yenidoğulanlar doğuş kütləsinə görə 1500 q-dan az və 1500 q-dan çox olan yarımqruplara ayrılmışdır. TLR4 ekspressiyasının təhlilinə 50 qan nümunəsi daxil edilmişdir: NEK olan, doğuş kütləsi 1500 q-dan az olan 16 uşaq (I qrup), NEK olan, doğuş kütləsi 1500 q-dan çox olan 25 uşaq (II qrup), müvafiq müqayisə qruplarında isə 3 (IIIa qrup) və 6 (IIIb qrup) uşaq. SIGIRR geninin metilləşmə analizinə 52 qan nümunəsi daxil edilmişdir: müvafiq olaraq I, II, IIIa və IIIb qruplarında 18, 26, 3 və 5 nümunə.

Laborator müayinələr. TLR4 geninin mRNT ekspressiyası real-time polimeraza zəncirvari reaksiyası vasitəsilə qiymətləndirilmişdir. ACTB referens gen kimi istifadə edilmiş, nisbi gen ekspressiyası ΔCt və $\Delta\Delta Ct$ göstəriciləri və $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu əsasında hesablanmışdır. SIGIRR genində epigenetik dəyişikliklər 36 gen lokusu üzrə metilləşmə göstəriciləri Sanger sekvenləşmə üsulu ilə aparılmışdır.

Statistik təhlil. Kəmiyyət göstəriciləri cədvəllərdə orta qiymət və standart xəta ($M \pm m$), həmçinin 25-ci və 75-ci persentillərlə təqdim edilmişdir. İki müstəqil qrup arasında fərqlər Mann–Whitney U meyarı ilə qiymətləndirilmişdir. Dəyişənlər arasındakı əlaqələrin öyrənilməsi üçün Spearman rəq korrelyasiya əmsalından (ρ) istifadə edilmişdir. Statistik əhəmiyyət həddi $p < 0,05$ qəbul edilmişdir.

Tədqiqatın etik aspektləri. Tədqiqat Ümumdünya Tibbi Assosiasiyasının Helsinki Bəyannaməsinin prinsiplərinə uyğun aparılmışdır. Tədqiqat protokolu Azərbaycan Tibb Universitetinin Etik

Komitəsi tərəfindən 04.02.2022-ci il tarixli, №22 qərarla təsdiq edilmişdir.

Nəticələr və onların müzakirəsi. NEK inkişaf edən VƏD-lərdə TLR4 aktivləşməsi göstəriciləri cədv. 1-də təqdim edilmişdir. TLR4 üçün ΔCt I qrupda $-7,20 \pm 7,10$, IIIa qrupunda $-2,23 \pm 2,51$ -ə bərabərdir. Bu, hədəf genlə (TLR4) ev geninin (ACTB) arasındakı fərq deməkdir və bu göstərici nə qədər kiçikdirsə, TLR4 ekspressiyası bir o qədər artmışdır deməkdir. Nəticə statistik olaraq dürüstdür ($p < 0,05$). $\Delta\Delta Ct$ göstəricisi xəstə və kontrol qrup göstəriciləri arasında fərq deməkdir və 0-dan yüksək göstərici ekspressiyanın azalmasından xəbər verir. I qrupda $0,00 \pm 0,10$, IIIa qrupunda $4,78 \pm 4,69$ -dur, nəticə statistik olaraq dürüstdür ($p < 0,05$). $FC_TLR4 (2^{-\Delta\Delta Ct})$ göstəricisi 1-dən aşağıdırsa zəif ekspressiyanı göstərir, I qrupda TLR4 ekspressiyasının 12,5 dəfə IIIa qrupu ilə müqayisədə artdığı müəyyən olunmuşdur, nəticə statistik olaraq dürüstdür ($p < 0,05$). $FC_TLR4 \log_2$ göstəricisi 0-dan kiçikdirsə ekspressiya zəifdir deməkdir, IIIa qrupunda bu göstərici $-4,78 \pm 4,69$ -a bərabərdir ki, bu I qrupla müqayisədə TLR4 ekspressiyasının əhəmiyyətli dərəcədə az olmasını göstərir, nəticə statistik olaraq dürüstdür ($p < 0,05$). Orta loqarifmik nəticələrin analizi göstərir ki, bədən kütləsi 1500 qramdan yüksək olan uşaqlarda Toll-like reseptorların səviyyəsi NEK olan uşaqlarda müqayisə qrupuna nisbətən fərqlənməmişdir. Bədən kütləsi 1500 qramdan az olan uşaqlarda isə TLR4 göstəricisi üzrə müqayisə qrupuna görə əhəmiyyətli dərəcədə fərq aşkar edilmişdir ($p < 0,05$). Məlumdur ki, Toll-like reseptorlar əsasən iltihabi proseslərə təkan verən mikroorqanizmlərin əsas tanınma reseptoru olub, ifrat aktivləşdiyi zaman təkcə bağırsaq divarında deyil, bütün orqanizmdə generalizə olunmuş iltihabi prosesin əsas təkanverici amili ola bilər. Yuxarıda qeyd edildiyi kimi hazırkı tədqiqatda bədən kütləsindən və hestasiya yaşından asılı olaraq NEK zamanı Toll-like reseptorların aktivləşmə səviyyəsi fərqli olmuşdur. Erkən doğulmuş körpələrin mədə-bağırsaq traktının TLR daha yüksək həssaslığına bir sıra faktorlar səbəb ola bilər. Məlumdur ki, bağırsaq mikrobiotası selikli qişanın homeostazının qorunmasında mühüm rol oynayaraq immun tolerantlığın qorunmasında və bakterial invazianın qarşısının alınmasında əsas amillərdən biridir [13].

Tədqiqat qruplarında aparılan TLR4-ün nəticələri

Göstərici	Qruplar	N	M±m	Persentil 25-75	P _U
TLR4 ΔCt	I	16	-7,20±-7,10	(-8,32--6,18)	0,025*
	IIIa	3	-2,23±-2,51	(-4,88--1,26)	
	II	25	-3,86±-3,88	(-4,80--2,89)	0,960
	IIIb	6	-3,09±-4,03	(-6,22--1,26)	
TLR4 ΔΔCt	I	16	0,00±0,10	(-1,12--1,02)	0,034*
	IIIa	3	4,78±4,69	(2,33--5,94)	
	II	25	0,41±0,27	(-0,65--1,26)	0,617
	IIIb	6	1,57±1,08	(-1,50--5,41)	
FC_TLR4 (2 ^{ΔΔCt})	I	16	1,20±0,93	(0,49--2,17)	0,033*
	IIIa	3	0,87±0,04	(0,02--0,20)	
	II	25	6,18±0,83	(0,42--1,57)	0,582
	IIIb	6	1,35±0,53	(0,02--2,82)	
FC_TLR4 log2	I	16	0,00±-0,10	(-1,02--1,12)	0,034*
	IIIa	3	-4,78±-4,69	(-5,94--2,33)	
	II	25	-0,41±-0,27	(-1,26--0,65)	0,617
	IIIb	6	-1,57±-1,08	(-5,41--1,50)	

Qeyd: yarımqrupların göstəriciləri arasında fərqi statistik əhəmiyyəti: P_U – Mann-Uitni meyarına görə. * – “0” hipotezi inkar edilir.

Ekspərimental tədqiqatlar göstərir ki, bağırsaq mikrobiotasının yetkin və formalaşmış olması bağırsaq disfunksiyası ilə yanaşı həm də TLR aktivasiyasının da qarşısının alınmasına səbəb olur və çox güman ki, bu da vaxtından əvvəl doğulmuş körpələrdə NEK-in patogenezinin əsasını təşkil edir. Siçanlar üzərində aparılan araşdırmanın nəticəsinə əsasən TLR4 aktivasiyası enterositlərin apoptozunu artırır və enterositlərin proliferasiyasına və miqrasiyasına nəzarətin pozulmasına, bu da öz növbəsində müxtəlif patogenlərin çoxalmasına və orqanizmə daxil olması ilə yanaşı sistemli iltihabla nəticələnir. Nanthakumar və həmmüəlliflər öz tədqiqatları ilə sübut etmişlər ki, daha aşağı hestasiya yaşı ilə doğulan körpələrdə yetkin olmayan mikroflora tərəfindən TLR-inhibitorları olan bioloji aktiv maddələrin sintezinin zəifləməsi bağırsaq epitelərinin tərəfindən TLR4 ekspressiyasının artmasına səbəb olur [12]. Hazırkı tədqiqat sübut edir ki, ümumi morfo-funksional yetkinsizlik fonunda mədə-bağırsaq traktında bakterial kolonizasiyanın pozulması NEK inkişafı üçün əhəmiyyət daşısa da, patoloji prosesin inkişafında həlledici mexanizm məhz Toll-like reseptorların ak-

tivləşməsidir. Çox güman ki, dərin yarımqıq doğulanlarda bu proseslərin hər ikisi paralel olaraq baş verdiyi halda bağırsaq divarında olan iltihab – NEK və eləcə də sistemli iltihabi reaksiya ilə müşayiət olunur. Bədənin kütləsi 1500 qramdan aşağı olan və NEK inkişaf edən uşaqlarda müqayisə qrupuna nisbətən TLR4 ekspressiyasının statistik düstür fərqlənməsi bu fikrə gəlməyə əsas verir.

Tədqiqat qruplarında TLR4-ün yenidoğulanların antropometrik göstəriciləri ilə aparılan korrelyasiya analizinin nəticələri cədv. 2-də öz əksini tapmışdır.

Cədv. 2-dən göründüyü kimi xəstələrin hestasiya yaşı ilə FC_TLR4 (2^{ΔΔCt}) ($p=0,411^{**}$, $p<0,05$) arasında güclü müsbət korrelyasiya qeyd olunur, belə ki, hestasiya yaşı artdıqca TLR4-ün nisbi ekspressiya göstəricisi də yüksək olur və bu azalmış TLR4 ekspressiyası deməkdir.

Xəstələrin kütləsi ilə TLR4 ΔΔCt ($p=-0,424^{**}$, $p<0,05$) arasında güclü mənfi, FC_TLR4 (2^{ΔΔCt}) ($p=0,420^{**}$, $p<0,05$), FC_TLR4 log2 ($p=0,424^{**}$, $p<0,05$) ilə güclü müsbət korrelyasiya qeyd olunur, bu da kütlə artdıqca TLR4 ekspressiyasının azalmasını göstərir.

TLR4 Δ Ct ilə TLR4 $\Delta\Delta$ Ct ($\rho=0,887^{**}$, $p<0,001$) arasında güclü müsbət, FC_TLR4 ($2^{-\Delta\Delta$ Ct) ($\rho=-0,887^{**}$, $p<0,001$), FC_TLR4 log2 ($\rho=-0,887^{**}$, $p<0,001$) ilə güclü mənfi korrelyasiya qəd olunur, çünki Δ Ct göstəricisinin artması nisbi ekspressiyanın azalması ilə əlaqədardır.

TLR4 $\Delta\Delta$ Ct ilə FC_TLR4 ($2^{-\Delta\Delta$ Ct) ($\rho=-0,999^{**}$, $p<0,001$), FC_TLR4 log2 ($\rho=-1,000^{**}$) ilə güclü mənfi korrelyasiya qəd olunur.

FC_TLR4 ($2^{-\Delta\Delta$ Ct) ilə FC_TLR4 log2 ($\rho=0,999^{**}$, $p<0,001$) arasında güclü müsbət korrelyasiya qəd olunur, demək olar ki, ideal əks əlaqə mövcuddur.

Cədvəl 2.

TLR4-ün yenidoğulanların antropometrik göstəriciləri ilə aparılan korrelyasiya analizinin nəticələri

Göstərici		TLR4 Δ Ct	TLR4 $\Delta\Delta$ Ct	FC_TLR4 ($2^{-\Delta\Delta$ Ct)	FC_TLR4 log2
TLR4 Δ Ct	ρ (PHO)	1,000	0,887**	-0,887**	-0,887**
	p		0,000	0,000	0,000
TLR4 $\Delta\Delta$ Ct	ρ (PHO)	0,887**	1,000	-0,999**	-1,000**
	p	0,000		0,000	
FC_TLR4 ($2^{-\Delta\Delta$ Ct)	ρ (PHO)	-0,887**	-0,999**	1,000	0,999**
	p	0,000	0,000		0,000
FC_TLR4 log2	ρ (PHO)	-0,887**	-1,000**	0,999**	1,000
	p	0,000		0,000	
Hestasiya yaşı	ρ (PHO)	-0,212	-0,419**	0,411**	0,419**
	p	0,184	0,006	0,008	0,006
Kütlə	ρ (PHO)	-0,142	-0,424**	0,420**	0,424**
	p	0,377	0,006	0,006	0,006

Qeyd: ρ (PHO) – Spirman korrelyasiya əmsali, p – korrelyasiya əmsalının statistik dürüstlüyü, * – 0 hipotezi inkar olunur.

Beləliklə, TLR4 genləri üzrə nəticələrin statistik analizi göstərir ki, bədən kütləsi 1500 qramdan yüksək olan uşaqlarda Toll-like reseptorların səviyyəsi NEK olan uşaqlarda müqayisə qrupuna nisbətən fərqlənməmişdir. Bədən kütləsi 1500 qramdan az olan uşaqlarda isə TLR4 göstəricisi üzrə müqayisə qrupuna görə əhəmiyyətli dərəcədə yüksək olması müəyyən edilmişdir ($p<0,05$).

Xəstələrin hestasiya yaşı və kütləsi ilə TLR4 $\Delta\Delta$ Ct ($\rho=-0,424^{**}$, $p<0,05$) arasında güclü mənfi korrelyasiya qeyd olunmuşdur. Hazırkı tədqiqat sübut edir ki, daha aşağı hestasiya yaşı və fiziki parametrlərlə (boy, çəki) doğulan körpələrdə yetkin olmayan mikroflora tərəfindən TLR-ingibitorları olan bioloji aktiv maddələrin sintezinin zəifləməsi bağırsaq epiteli tərəfindən TLR-4 ekspressiyasının artmasına səbəb olur.

Qarşıya qoyulmuş məqsədlərdən biri də SIGIRR gen profilindəki epigenetik dəyişikliklərin öyrənilməsi olmuşdur. Bu məqsədlə tədqiqat qruplarından 52 xəstənin qan nümunələrində SIGIRR genlərinin 36 gen lokusu üzrə baş vermiş metiliasiyası nəticəsində yaranan epigenetik dəyişikliklər təhlil edilmişdir.

Cədv. 3-dən göründüyü kimi SIGIRR genində metilləşmə %C90 üçün I və IIIa qrupunda $12,9\pm1,6$ (0,75–31,22) və $5,6\pm3,3$ (0–11,36), II və IIIb qrupunda $14,9\pm1,8$ (0–44,64) və $10,7\pm1,1$ (8,42–14,29) olmuşdur. Kütləsi 1500 q-dan kiçik olan körpələrdə nəzarət qrupu ilə müqayisədə statistik dürüst fərq qeyd olunmuşdur ($p<0,05$).

SIGIRR gen lokuslarında metilləşmə göstəriciləri

Göstərici	Qruplar	N	M±m	P _F	P _U	Qruplar	N	M±m	P _F	P _U
%C90	I	18	12,9±1,6 (0,75–31,22)	0,103	0,044*	II	26	14,9±1,8 (0–44,64)	0,312	0,119
	IIIa	3	5,6±3,3 (0–11,36)			IIIb	5	10,7±1,1 (8,42–14,29)		
%C100	I	18	25,0±2,7 (0–56,61)	0,188	0,044*	II	26	21,5±1,6 (0,9–36,9)	0,993	0,747
	IIIa	3	15,4±3,5 (8,7–20,68)			IIIb	5	21,5±1,5 (17,25–24,65)		
%C102	I	18	17,9±1,0 (10,47–27,74)	0,025*	0,044*	II	26	20,0±1,8 (0,15–42,8)	0,550	0,667
	IIIa	3	10,4±5,1 (0,24–16,82)			IIIb	5	17,5±1,8 (11,88–21,09)		
%C258	I	18	0,94±0,15 (0–1,98)	0,004*	0,044*	II	26	1,03±0,18 (0–3,65)	0,730	0,707
	IIIa	3	2,90±1,38 (1,28–5,64)			IIIb	5	0,88±0,27 (0,35–1,88)		
%C327	I	18	0,68±0,13 (0–1,76)	0,094	0,082	II	26	0,41±0,08 (0–1,49)	0,020*	0,248
	IIIa	3	0,09±0,09 (0–0,26)			IIIb	5	1,06±0,46 (0–2,32)		
%C123	I	18	0,77±0,20 (0–3,66)	0,167	0,479	II	26	0,61±0,07 (0–1,17)	0,006*	0,086
	IIIa	3	1,72±1,21 (0–4,06)			IIIb	5	1,48±0,62 (0,32–3,85)		

Qeyd: yarımqrupların göstəriciləri arasında fərqi statistik dürüstlüyü: P_F – Fisher meyarına görə, P_U – Mann-Uitni meyarına görə, * – “0” hipotezi inkar edilir.

%C100 üçün I və IIIa qruplarında 25,0±2,7 (0–56,61) və 15,4±3,5 (8,7–20,68), II və IIIb qruplarında 21,5±1,6 (0,9–36,9) və 21,5±1,5 (17,25–24,65) olmuş, kütləsi 1500 q-dan kiçik olan körpələrdə nəzarət qrupu ilə müqayisədə statistik dürüst fərq qeyd olunmuşdur ($p<0,05$).

%C102 üçün I və IIIa qruplarında 17,9±1,0 (10,47–27,74) və 10,4±5,1 (0,24–16,82), II və IIIb qruplarında isə müvafiq olaraq 20,0±1,8 (0,15–42,8) və 17,5±1,8 (11,88–21,09); %C258 üçün müvafiq olaraq 0,94±0,15 (0–1,98), 2,90±1,38 (1,28–5,64), 1,03±0,18 (0–3,65) və 0,88±0,27 (0,35–1,88) olmuşdur, hər iki gen lokusu üçün kütləsi 1500 q-dan kiçik olan körpələrdə nəzarət qrupu ilə müqayisədə statistik dürüst fərq qeyd olunmuşdur ($p<0,05$).

%C327 üçün I və IIIa qruplarında bu göstərici 0,68±0,13 (0–1,76) və 0,09±0,09 (0–0,26), II və IIIb qruplarında isə müvafiq olaraq 0,41±0,08 (0–1,49) və 1,06±0,46 (0–2,32); %C123 üçün müvafiq olaraq 0,77±0,20 (0–3,66), 1,72±1,21 (0–4,06) və

0,61±0,07 (0–1,17), 1,48±0,62 (0,32–3,85) olmuşdur, hər iki gen lokusu üçün kütləsi 1500 q-dan çox olan körpələrdə nəzarət qrupu ilə müqayisədə statistik dürüst fərq qeyd olunmuşdur ($p<0,05$).

Tədqiqat qruplarında SIGIRR gen lokuslarının metiləşmə göstəriciləri ilə TLR4 göstəriciləri arasında korrelyasiya analizinin nəticələri cədvəl 4-də öz əksini tapmışdır. Cədvəldən göründüyü kimi %C29 ($p=0,329^*$, $p<0,05$) və %C142 ($p=0,420^{**}$, $p<0,05$) ilə TLR4 ΔCt arasında, %C142 ($p=0,352^*$, $p<0,05$), %C212 ($p=0,323^*$, $p<0,05$) və %C327 ($p=0,356^*$, $p<0,05$) ilə TLR4 $\Delta\Delta Ct$ arasında müsbət korrelyasiya qeyd olunur, bu NEK-li körpələrdə SIGIRR geninin bu lokuslarında gedən epigenetik dəyişikliklərin TLR4 ekspressiyasını artırdığını göstərir.

%C100 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ($p=-0,321^*$, $p<0,05$), %C142 ($p=-0,360^*$, $p<0,05$) və %C327 ($p=-0,353^*$, $p<0,05$) ilə FC_TLR4 arasında mənfi korrelyasiya qeyd olunur, bu nisbi ekspressiyanın azalmasını göstərir.

Tədqiqat qruplarında SIGIRR gen lokusları ilə TLR4 arasında
aparılan korrelyasiya analizinin nəticələri

SIGIRR		TLR4 Δ Ct	TLR4 $\Delta\Delta$ Ct	FC_TLR4 ($2^{-\Delta\Delta$ Ct)	FC_TLR4 log2
%C29	ρ (PHO)	0,329*	0,170	-0,175	-0,170
	p	0,044	0,307	0,293	0,307
%C100	ρ (PHO)	0,202	0,319	-0,321*	-0,319
	p	0,224	0,051	0,049	0,051
%C142	ρ (PHO)	0,420**	0,352*	-0,360*	-0,352*
	p	0,009	0,030	0,026	0,030
%C212	ρ (PHO)	0,136	0,323*	-0,316	-0,323*
	p	0,417	0,048	0,054	0,048
%C327	ρ (PHO)	0,296	0,356*	-0,353*	-0,356*
	p	0,071	0,028	0,030	0,028

Qeyd: ρ (PHO) – Spirman korrelyasiya əmsalı, p – korrelyasiya əmsalının statistik dürüstlüyü, * – “0” hipotezi inkar olunur, $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$.

Yekun. SIGIRR genində 1500 q-dan %C90, %C100, %C102, %C258 üçün ($p < 0,05$), 1500 q-dan çox olan uşaqlarda %C327 və %C123 üçün statistik dürüst fərq qeyd olunmuşdur ($p < 0,05$). Bu metilyasiya dəyişkənlikləri intestinal baryerin iltihabi prosesə cavab reaksiyasının epigenetik səviyyədə pozulmasına dəlalət edir. Tədqiqat qruplarında SIGIRR gen lokuslarının metilyasiya göstəriciləri ilə TLR4 göstəriciləri arasında korrelyasiya analizinin

nəticələrinə əsasən NEK-li körpələrdə SIGIRR gen lokuslarında gedən epigenetik dəyişikliklərin TLR4 ekspressiyasını artırması qeyd olunur.

Maraqlar toqquşması. Müəlliflər hər hansı maraqlar toqquşmasının olmadığını bəyan edirlər.

Maliyyələşdirmə. Bu tədqiqat dövlət, kommersiya və ya qeyri-kommersiya sektorlarında fəaliyyət göstərən hər hansı maliyyələşdirmə qurumundan xüsusi qrant hesabına maliyyələşdirilməmişdir.

ƏDƏBİYYAT – REFERENCES – ЛИТЕРАТУРА

1. Дамиров О.Н. Обоснование тактики хирургического лечения язвенно-некротического энтероколита у новорожденных: / дисс. кандидата медицинских наук. / Москва, - 2015.
2. Карпова И.Ю. Некротический энтероколит у новорожденных (новые способы прогнозирования и лечения): / дисс. на соискание ученой степени доктора медицинских наук / - Омск, - 2017. – 242 с.
3. Трунова ТЮ, Разин МП, Ершкова ММ, и др. Особенности течения некротизирующего энтероколита у новорожденных в отделениях второго этапа выхаживания. Вятский медицинский вестник. 2019;1(61):31–35.
4. Agakidou E, Agakidis C, Gika H, Sarafidis K. Emerging biomarkers for prediction and early diagnosis of necrotizing enterocolitis in the era of metabolomics and proteomics. Front Pediatr. 2020;8:602255. doi: 10.3389/fped.2020.602255
5. Werts AD, Fulton WB, Ladd MR, et al. A novel role for necroptosis in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2020;9(3):403–423. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.11.002
6. Никитина ИВ, Донников АЕ, Крог-Йенсен ОА, и др. Молекулярно-генетические предикторы некротизирующего энтероколита у новорожденных. Акушерство и гинекология. 2020;(12):150–158. doi: 10.18565/aig.2020.12.150-158
7. Kovler ML, Gonzalez Salazar AJ, Fulton WB, et al. Toll-like receptor 4-mediated enteric glia loss is critical for the development of necrotizing enterocolitis. Sci Transl Med. 2021;13(612):eabg3459. doi: 10.1126/scitranslmed.abg3459
8. Cuna A, Yu W, Menden HL, et al. NEC-like intestinal injury is ameliorated by Lactobacillus rhamnosus GG in parallel with SIGIRR and A20 induction in neonatal mice. Pediatr Res. 2020;88(4):546–555. doi: 10.1038/s41390-020-0797-6
9. Sampath V, Menden H, Helbling D, et al. SIGIRR genetic

- variants in premature infants with necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 2015;135(6):e1530–e1534. doi: 10.1542/peds.2014-3386
10. Wu W, Wang Y, Zou J, et al. Bifidobacterium adolescentis protects against necrotizing enterocolitis and upregulates TOLLIP and SIGIRR in premature neonatal rats. *BMC Pediatr*. 2017;17(1):1. doi: 10.1186/s12887-016-0759-7
11. Fawley J, Cuna A, Menden HL, et al. Single-Immunoglobulin Interleukin-1-Related Receptor regulates vulnerability to TLR4-mediated necrotizing enterocolitis in a mouse model. *Pediatr Res*. 2018;83(1-1):164–174. doi: 10.1038/pr.2017.211
12. Sampath V, Martinez M, Caplan MS, Underwood MA, et al. Necrotizing enterocolitis in premature infants—A defect in the brakes? Evidence from clinical and animal studies. *Mucosal Immunol*. 2023;16(2):208–220. doi: 10.1016/j.mucimm.2023.02.002
13. Thänert R, Keen EC, Dantas G, Warner BB, et al. Necrotizing enterocolitis and the microbiome: current status and future directions. *J Infect Dis*. 2021;223(12 Suppl 2):S257–S263. doi: 10.1093/infdis/jiaa604

SUMMARY

THE ROLE OF TLR4 AND SIGIRR GENE PROFILE ALTERATIONS IN THE PATHOGENESIS OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN PRETERM INFANTS

¹Aliyeva A.M., ¹Polukhova A.A., ²Mammadova N.M.

¹Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Y. Farajova, Baku, Azerbaijan;

²Azerbaijan Medical University, Department of II Pediatric Diseases, Baku, Azerbaijan

Objective. To evaluate changes in Toll-like receptor 4 (TLR4) expression and the methylation profile of the SIGIRR gene in preterm newborns with necrotizing enterocolitis (NEC), to examine their associations with gestational age and birth weight, and to assess their possible significance in NEC pathogenesis. **Material and methods.** The study was conducted at the Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Y. Farajova. Laboratory analyses were performed at the Human Genetics Laboratory and at the DIAGEN and INTERGEN laboratories in Ankara. TLR4 gene expression was assessed in 50 blood samples by real-time polymerase chain reaction. The methylation profile of the SIGIRR gene was analyzed in 52 blood samples across 36 gene loci. Participants were stratified by birth weight into groups below and above 1500 g, and children with NEC were compared with corresponding comparison groups. Between-group differences were assessed using the Mann–Whitney U test, and associations between variables were evaluated by Spearman rank correlation. A p value <0.05 was considered statistically significant. **Results.** TLR4 $\Delta\Delta C_t$ correlated negatively with gestational age ($\rho=-0.419$; $p=0.006$) and birth weight ($\rho=-0.424$; $p=0.006$). In children weighing less than 1500 g, differences in methylation at the SIGIRR %C90, %C100, %C102, and %C258 loci were found compared with the comparison group. In children weighing more than 1500 g, changes at %C327 and %C123 were recorded. Several statistically significant correlations were also found between SIGIRR methylation indices and TLR4 parameters. **Conclusion.** NEC in preterm newborns is accompanied by changes in TLR4 expression and the methylation profile of the SIGIRR gene. Gestational age and birth weight were associated with TLR4 parameters. Associations between methylation changes at SIGIRR loci and TLR4 parameters suggest a possible interaction between these signaling mechanisms in NEC pathogenesis. Larger studies are needed to determine the early diagnostic and prognostic value of these markers.

Keywords: necrotizing enterocolitis, preterm newborn, TLR4, SIGIRR, gene expression

РЕЗЮМЕ

РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ TLR4 И В ПРОФИЛЕ ГЕНОВ SIGIRR В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕКРОТИЗИРУЮЩЕГО ЭНТЕРОКОЛИТА У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

¹Алиева А.М., ¹Полухова А.А., ²Мамедова Н.М.

¹Научно-Исследовательский Институт Педиатрии имени К. Фараджевой, Баку, Азербайджан;

²Азербайджанский Медицинский Университет, кафедра детских болезней № II,
Баку, Азербайджан

Цель. Оценить изменения экспрессии Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) и профиля метилирования гена SIGIRR у недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом (НЭК), изучить их взаимосвязь с гестационным

возрастом и массой тела при рождении, а также определить возможное значение этих изменений в патогенезе НЭК.

Материал и методы. Исследование проведено в Научно-исследовательском институте педиатрии имени К.Я. Фараджевой. Лабораторные исследования выполнялись в лаборатории генетики человека, а также в лабораториях DIAGEN и INTERGEN в Анкаре. Экспрессию гена TLR4 оценивали в 50 образцах крови методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Профиль метилирования гена SIGIRR анализировали в 52 образцах крови по 36 локусам. Участников распределяли на подгруппы в зависимости от массы тела при рождении — менее и более 1500 г; детей с НЭК сравнивали с соответствующими группами сравнения. Межгрупповые различия оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, взаимосвязи между показателями — методом ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Показатель TLR4 $\Delta\Delta Ct$ отрицательно коррелировал с гестационным возрастом ($r = -0,419$; $p = 0,006$) и массой тела при рождении ($r = -0,424$; $p = 0,006$). У детей с массой тела менее 1500 г выявлены различия в показателях метилирования локусов %C90, %C100, %C102 и %C258 гена SIGIRR по сравнению с группой сравнения. У детей с массой тела более 1500 г зарегистрированы изменения в локусах %C327 и %C123. Также установлены несколько статистически значимых корреляций между показателями метилирования SIGIRR и параметрами TLR4.

Заключение. НЭК у недоношенных новорожденных сопровождается изменениями экспрессии TLR4 и профиля метилирования гена SIGIRR. Гестационный возраст и масса тела при рождении были связаны с показателями TLR4. Связи между изменениями метилирования локусов SIGIRR и показателями TLR4 позволяют предположить возможное взаимодействие этих сигнальных механизмов в патогенезе НЭК. Для оценки ранней диагностической и прогностической значимости данных маркеров необходимы исследования на более крупных выборках.

Ключевые слова: некротизирующий энтероколит, недоношенный новорожденный, TLR4, SIGIRR, экспрессия генов

Redaksiyaya daxil olub: 30.01.2026

Çapa tövsiyə olunub: 27.02.2026

Rəyçi: t.e.d. A.S.Hacıyeva