ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БОНДАРЬ ВАЛЕРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ НОВОЙ ФОРМЫ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

14.01.08 – Педиатрия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

Давыдова Ирина Владимировна

Научный консультант:

доктор биологических наук,

Савостьянов Кирилл Викторович

Москва – 2022

Оглавление

Список сокращений 4

ВВЕДЕНИЕ 7

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ И ВКЛАД ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ЕЕ РАЗВИТИЕ ... 15

1.1. Определение, эпидемиология, патогенез и классификация бронхолегочной дисплазии 15

1.2. Осложнения и исходы бронхолегочной дисплазии 20

1.3. Генетические факторы риска развития новой формы бронхолегочной дисплазии 23

1.3.1. Развитие легких и роль генов сурфактанта в формировании бронхолегочной дисплазии 26

1.3.2. Потенциальная роль генов-кандидатов бронхолегочной дисплазии, участвующих в воспалительном ответе 29

1.3.3. Роль генов-кандидатов бронхолегочной дисплазии, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса 32

1.3.4. Роль генов, кодирующих факторы ангиогенеза, в формировании бронхолегочной дисплазии 35

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 44

2.1. Дизайн исследования. Критерии включения и исключения пациентов из исследования 44

2.2. Клинико-анамнестическая характеристика недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию 48

2.3. Методы исследования 49

2.3.1. Амбиспективный анализ данных медицинской документации за период 2012–2021 гг. 50

2.3.2. Выделение ДНК методом фенол-хлороформом экстракции из клеток буккального эпителия и пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге 50

2.3.3. Массовое параллельное секвенирование полного экзома 51

2.3.4. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени 52

2.3.5. Методы статистической обработки результатов исследования 54

ГЛАВА 3. ДИНАМИКА СООТНОШЕНИЯ ВАРИАНТОВ РАЗВИТИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С

РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ НОВОРОЖДЕННЫХ В АНАМНЕЗЕ И ИХ КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ……55

3.1. Динамика соотношения вариантов развития бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в анамнезе..... 55

3.2. Сравнительная оценка клинико-анамнестических характеристик исследуемых групп..... 57

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЧАСТОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ, У ДЕТЕЙ, СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ БРОНХОЛЕГОЧНУЮ ДИСПЛАЗИЮ 67

4.1. Результаты проведения полноэкзомного секвенирования у пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию..... 67

4.2. Результаты проведения ПЦР в режиме реального времени у пациентов, сформировавших и не сформировавших новую форму бронхолегочной дисплазии 72

4.3. Результаты количественного описания связи генетических вариантов, показавших статистически значимые различия частот аллелей у детей, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию 72

4.4. Шкала прогнозирования развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей..... 74

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ..... 78

ВЫВОДЫ 89

Практические рекомендации..... 92

Список литературы 93

Список сокращений

АГ – артериальная гипертензия

БЛД – бронхолегочная дисплазия

БЭН – белково-энергетическая недостаточность

ВЖК – внутрижелудочковое кровоизлияние

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИФН-γ – интерферон-гамма

ЛГ – легочная гипертензия

НМТ – низкая масса тела

ОНМТ – очень низкая масса тела

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ОФВ1 – объем форсированного выдоха за 1 секунду

ОШ – отношение шансов

ПКВ – постконцептуальный возраст

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РДСН – респираторный дистресс-синдром новорожденных

РСВ – респираторно-синцитиальный вирус

ФПН – фетоплацентарная недостаточность

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких

ЭНМТ – экстремально низкая масса тела

Ang (angiopoietin) – ангиопоэтин

Biphasic (Biphasic Positive Airway Pressure) – вентиляция с двухфазным положительным давлением

CPAP (continious positive airway pressure) — постоянное положительное давление в дыхательных путях

CRP (C-reactive protein) – С-реактивный белок

CTGF (connective tissue growth factor) – фактор роста соединительной ткани

GWAS (genome-wide association studies) – полногеномный поиск ассоциаций

IGF1 (insulin-like growth factor 1) – инсулиноподобный фактор роста-1

IL1 (interleukin-1) – интерлейкин-1

IL8 (interleukin-8) – интерлейкин-8

iNOS (inducible NO synthase) – индуцируемая синтаза оксида азота

IPPV (intermittent positive pressure ventilation) — перемежающаяся ИВЛ с положительным давлением

HGMD (Human Gene Mutation Database) – база данных мутаций в генах человека, которые вызывают наследственные заболевания или связаны с ними

IGFBP-3 (insulin-like growth factor-binding protein 3) – белок-3, связывающий инсулиноподобный фактор роста

LBP (lipopolysaccharide binding protein) – липополисахарид-связывающий белок

LTP (lymphoid tyrosine phosphatase) – лимфоидспецифическая тирозинфосфатаза

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

MIF (macrophage migration inhibitory factor) – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов

MMP (matrix metalloproteinase) – матриксные металлопротеиназы (ММП)

NCPAP (nasal continious positive airway pressure) – респираторная поддержка через назальные канюли с постоянным положительным давлением в дыхательных путях

NGS (next generation sequencing) – секвенирование нового поколения

NIPPV (non-invasive positive pressure ventilation) – неинвазивная вентиляция с положительным давлением

NOS (NO-synthase) – синтаза оксида азота

PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PEDF (pigment epithelium-derived factor) – фактор дифференцировки пигментного эпителия

SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

sFlt-1 (Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1) – растворимая fms-подобная тирозинкиназа 1

TGF-β1 (transforming growth factor beta 1) – трансформирующий фактор роста β1

TLRs (toll-like receptors) – Toll-подобные рецепторы

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

VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) – это заболевание, развивающееся в результате взаимодействия пренатальных и постнатальных факторов, приводящих к нарушению развития нижних дыхательных путей и сосудов легких, а также формированию хронической патологии легких, сопровождающейся дыхательной недостаточностью. Благодаря развитию перинатальной помощи выживаемость детей с экстремально низкой и очень низкой массой тела при рождении заметно увеличилась, также изменился и патогенез БЛД. Новая форма данной патологии является результатом незавершенного альвеологенеза и ангиогенеза сосудов малого круга кровообращения [70; 155]. Факторами, нарушающими рост и развитие альвеол, являются высокие концентрации кислорода во вдыхаемой смеси (приводящие к повреждению реснитчатого эпителия дыхательных путей, воспалительному процессу слизистой оболочки, нарушению дренажной функции); волюмо- и баротравма; инфекционные заболевания, запускающие воспалительный ответ; недостаточная нутритивная поддержка и др. [18].

Новая форма бронхолегочной дисплазии является многофакторной патологией. На развитие БЛД оказывают влияние эндогенные и экзогенные, модифицируемые и немодифицируемые факторы риска. Генетическая предрасположенность относится к эндогенным немодифицируемым факторам [13]. С точки зрения молекулярной генетики, бронхолегочная дисплазия относится к заболеваниям, в патогенезе которых определяется сложное взаимодействие, как генетических факторов, так и факторов внешней среды. Наследственные основы формирования БЛД активно изучаются с 90-х годов XX века, однако полученные результаты в настоящее время не позволяют однозначно выделить ведущую роль какого-либо из исследованных генов в развитии патологии [5].

Накопленные литературные данные получены с использованием традиционных и современных исследовательских методик:

- близнецовый метод,
- изучение животных моделей,
- анализ сцепления и ассоциаций,
- эпигенетические исследования,
- полногеномный поиск ассоциаций [5].

Полученные данные свидетельствуют о наличии генетической предрасположенности к бронхолегочной дисплазии. Все гены – кандидаты для формирования БЛД в зависимости от роли в патогенезе развития заболевания можно разделить на следующие группы:

- гены, кодирующие ферменты антиоксидантной системы;
- гены цитокинового каскада;
- гены, кодирующие матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы;
- гены, кодирующие толл-подобные рецепторы;
- гены, кодирующие белки сурфактантов;
- гены, кодирующие главный комплекс гистосовместимости (MHC);
- гены, кодирующие клеточные медиаторы воспаления и апоптоза;
- другие гены [5].

Изучение полиморфизма генов адаптационных и защитных систем в настоящее время отражено в исследованиях, как отечественных, так и зарубежных ученых [20].

Поиск генов-кандидатов развития бронхолегочной дисплазии ведется на протяжении последних десятилетий. Технология секвенирования нового поколения (NGS) используется относительно недавно, и результаты проведенных исследований зачастую не имеют достаточной статистической мощности в связи с небольшим размером выборки [58].

Эндогенные механизмы формирования БЛД нуждаются в дальнейшем изучении, в том числе с точки зрения клинико-генетического анализа, с целью выявления предикторов развития данного заболевания уже в раннем неонатальном периоде.

Степень разработанности темы

Количество исследований на тему прогнозирования формирования бронхолегочной дисплазии, представленных в отечественной и зарубежной литературе, возрастает по мере увеличения количества недоношенных новорожденных и, соответственно, заболеваемости БЛД. Несмотря на то, что клиника и терапевтические подходы тщательно изучены, генетическая основа остается в значительной степени неясна [89; 127; 171].

Полигенная природа заболевания доказана относительно недавно, а исследования, основанные на массовом параллельном секвенировании полного экзома, единичны. В настоящий момент выявлено более 258 генов-кандидатов бронхолегочной дисплазии. Согласно нескольким исследованиям, большинство обнаруженных генов ответственны за организацию фибрилл коллагена [127; 178]. Помимо этого, выявленные гены-кандидаты были связаны с системой сурфактантных белков, морфогенезом эмбрионального эпителия, регуляцией сигнального пути Wnt, организацией внеклеточного матрикса, иммуновоспалительным ответом др. [127].

Изучение молекулярно-генетических механизмов формирования БЛД может помочь усовершенствовать подходы к прогнозированию, профилактике и диагностике патологии у недоношенных новорожденных, а также снизить риск развития тяжелых форм заболевания.

Цель исследования

Выявить клинико-генетические предикторы развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей и определить степень их влияния на формирование заболевания.

Задачи исследования:

1. Проанализировать динамику соотношения больных с классической и новой формами бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей за 10-летний период по данным ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

2. Провести клинико-анамнестическую оценку групп недоношенных детей с диагностированным ранее респираторным дистресс-синдромом новорожденных, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию, и создать современную клиническую модель пациента с новой формой бронхолегочной дисплазии.
3. Провести секвенирование полного экзома с последующим выявлением диагностически значимых генетических вариантов у пациентов с новой формой бронхолегочной дисплазии.
4. Проанализировать зависимость развития новой формы бронхолегочной дисплазии от выявленных генетических вариантов.
5. Создать шкалу балльной оценки прогнозирования развития бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации проведено секвенирование полного экзома у 100 детей, сформировавших новую форму БЛД, и определены диагностически значимые генетические предикторы развития новой формы этого заболевания.

Впервые сопоставлены клинико-анамнестические и молекулярно-генетические предикторы развития новой формы БЛД у недоношенных детей.

Впервые получены убедительные данные о взаимосвязи выявленных генетических вариантов с развитием новой формы бронхолегочной дисплазии.

Впервые создана шкала прогнозирования развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей с целью её внедрения в педиатрическую практику.

Теоретическая и практическая значимость

Проведение полноэкзомного секвенирования у пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию, позволило выявить значимые молекулярно-генетические предикторы формирования заболевания, которые могут быть использованы в раннем выявлении пациентов с РДСН, угрожаемых по развитию новой формы бронхолегочной дисплазии.

Клинико-анамнестические и генетические предикторы развития новой формы БЛД, определенные в исследовании, имеют большое значение для применения в клинической практике. Разработанная шкала прогнозирования развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей, включающая выявленные предикторы, может быть использована в раннем неонатальном периоде в целях профилактики и снижения риска развития этого заболевания.

Методология и методы исследования

При выполнении исследования был осуществлён анализ литературы, актуальных научных исследований, посвященных выявлению клинико-анамнестических и генетических предикторов развития новой формы БЛД у недоношенных детей. Особое внимание уделено изучению анамнестических и клинических характеристик пациентов с респираторным дистресс-синдромом новорожденных (РДСН) в анамнезе. Исследование носило как ретроспективный, так и проспективный характер. Был проведен анализ данных историй болезни и результатов клинико-лабораторного обследования 170 детей с РДСН, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию. Оценка медицинской документации проведена за десятилетний период (2012-2021 гг).

Молекулярно-генетическое исследование включало в себя 3 этапа: выделение ДНК фенол-хлороформным методом, проведение полноэкзомного секвенирования и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Накопление данных, их корректировка и систематизация с последующей визуализацией полученных результатов формировалась с использованием программ Microsoft Excel 2019 и STATISTICA 10 (разработчик - StatSoft.Inc). Для проверки характера распределения использовали непараметрический тест Колмогорова-Смирнова. Анализ статистической значимости различий количественных признаков для двух независимых групп применялся U-критерий Манна-Уиттни, критерии рангов Вилкоксона. Для выявления силы и направления корреляционной взаимосвязи двух признаков применялся

непараметрический коэффициент корреляции Спирмена (r). В исследованиях случай-контроль относительный риск развития заболевания оценивался с помощью показателя отношения шансов (ОШ).

Основные положения, выносимые на защиту

1. За прошедший 10-летний период (с 2012 по 2021 гг.) отмечается увеличение частоты развития новой формы бронхолегочной дисплазии по сравнению с классической формой. С 2020 по 2021 гг. у всех пациентов, госпитализированных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, диагностирована новая форма заболевания.
2. Современная модель пациента с новой формой бронхолегочной дисплазии представляет собой недоношенного ребенка с респираторным дистресс-синдромом новорожденных, с гестационным возрастом до 28 недель и экстремально низкой массой тела при рождении, оцененного по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах от 4 до 6 баллов, нуждающегося во введении препаратов сурфактанта и длительной респираторной поддержке с применением традиционной ИВЛ, CPAP (Biphasic) и дополнительной оксигенацией в постнеонатальном периоде.
3. Наличие генетического варианта rs12489516 в гене *CPA3* позволяет предположить, что недоношенный ребёнок не будет кислородозависим в возрасте после 28 суток жизни и/или 36 недель постконцептуального возраста.
4. Наличие генетического варианта rs45488997 в гене *CTGF* является фактором, предрасполагающим к развитию новой формы БЛД у недоношенных детей в неонатальном периоде.

Внедрение результатов исследования в практическое здравоохранение

Результаты работы и рекомендации внедрены в клиническую практику отделения патологии новорожденных детей ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»

Минздрава России и отделении патологии новорожденных ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского».

Степень достоверности результатов исследования

Исследование основывается на современных представлениях о факторах риска, патогенезе, клинической картине, профилактике и лечении новой формы бронхолегочной дисплазии, которые представлены в отечественной и иностранной литературе. Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, статистическим анализом информации.

Апробация материалов исследования

Результаты научно-исследовательской работы доложены и обсуждены на VII Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (18-20 февраля 2021 г.), II Всероссийском конгрессе с международным участием «5П Детская медицина» (2 апреля 2021 г.), IV Европейском конгрессе педиатров - EUROPAEDIATRICS-2021 (7-9 октября 2021 г.), XXIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (4-7 апреля 2022 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе статей в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, – 5 (из них в журнале, индексируемом в SCOPUS – 1), тезисов о результатах в изданиях – 4 (из них в журнале, индексируемом в SCOPUS – 2).

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах подготовки диссертации: анализе литературы; постановке цели и задач; разработке методических подходов; формировании базы данных; ретро- и проспективном анализе историй болезни; клиническом наблюдении недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших новую форму бронхолегочной дисплазии; выделении ДНК фенол-хлороформным методом из

клеток буккального эпителия и сухих пятен крови, с дальнейшим проведением полноэкзомного секвенирования. Также автором выполнена статистическая обработка полученных данных и анализ результатов, на основании которого были сформулированы основные положения исследования, выводы, практические рекомендации и подготовлены публикации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, 2-х глав с описанием результатов собственного исследования, выводов и практических рекомендаций. Работа содержит 14 рисунков, 6 таблиц. Библиографический список включает 207 источников, из них 26 отечественных и 181 зарубежная работа.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ И ВКЛАД ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ЕЕ РАЗВИТИЕ

1.1. Определение, эпидемиология, патогенез и классификация бронхолегочной дисплазии

Бронхолегочная дисплазия — это хроническое интерстициальное заболевание легких, развивающееся у недоношенных детей в исходе респираторного дистресс-синдрома новорожденных, диагностируемое на основании кислородозависимости в возрасте 28 суток жизни и/или 36 недель постконцептуального возраста. БЛД является причиной многих осложнений: острой и хронической дыхательной недостаточности, белково-энергетической недостаточности (БЭН), легочной гипертензии (ЛГ) и легочного сердца. По мере роста ребёнка характерен регресс клинических проявлений заболевания, несмотря на продолжающуюся персистенцию морфологических изменений лёгочной ткани и нарушений дыхательной функции [18].

В ходе исследования, проведенного в Национальном институте детского здоровья и развития человека, частота развития тяжелой БЛД составила 16% у младенцев, родившихся с гестационным возрастом до 32 недель и массой тела менее 1000 г. [80]. По данным исследований с использованием когорт новорожденных из Скандинавии, частота тяжелой бронхолегочной дисплазии составила 25% у младенцев с гестационным возрастом менее 27 недель, родившихся в Швеции, и у 20% детей, родившихся на сроке менее 28 недель гестации в Норвегии [81; 82]. В 2011 году, в исследовании Laughon M.M. и соавт. было показано, что младенцы мужского пола более склонны к развитию тяжелой бронхолегочной дисплазии и ИВЛ. Открытый артериальный проток, сепсис и некротический энтероколит также ассоциированы с развитием БЛД тяжелой степени [120].

В 1967 W.H. Northway впервые описал БЛД. На тот момент существовала единственная форма заболевания, которой затем присвоят название «классической». Классическая форма БЛД характеризуется кистозными

изменениями, выраженным пневмофиброзом на фоне проведения механической ИВЛ. Этим младенцам требуется респираторная терапия с высокими концентрациями кислорода, которая, с одной стороны, является адекватным лечением, а с другой стороны - способствует повреждению легочной ткани с образованием ателектазов, участков гиперинфляции, тяжелым эпителиальным повреждением и гиперплазией гладких мышц дыхательных путей, а также фиброзом и изменением стенки сосудов [187]. Большинство пациентов с экстремально низкой или очень низкой массой тела при рождении (ЭНМТ, ОНМТ) ранее не выживали, соответственно бронхолегочная дисплазия диагностировалась только у доношенных новорожденных или рожденных на поздних сроках гестации [155].

За последние 25 лет внедрение современных методов интенсивной терапии недоношенных детей и таких методов лечения, как пренатальная стероидная терапия и интратрахеальное введение сурфактанта, значительно снизило заболеваемость и смертность от РДСН, и, как следствие, увеличилась частота развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей [44]. Оптимизация протоколов неонатальной реанимации, антенатальная стероидная поддержка беременных, позволили сохранять жизнь глубоко недоношенным детям. Как следствие, постепенно менялся и патогенез БЛД. Требовались новые подходы к диагностике и лечению таких пациентов, поэтому в 2011 году Alan H Jobe ввел понятие «новая» бронхолегочная дисплазия [108]. Патоморфоз заболевания связывают с антенатальными особенностями развития недоношенных детей, для которых характерна незрелая дыхательная мускулатура, открытый артериальный проток, инфекции, повреждение легких вследствие длительной кислородной терапии, недостаточная эластичность легочной ткани. Низкий гестационный возраст характеризуется недоразвитием альвеолярно-капиллярных сосудов, более крупными и уплощенными альвеолами, выраженным интерстициальным фиброзом и аномальной сосудистой сетью легких с прекапиллярными артериовенозными анастомозами [70]. В большинстве случаев новая форма

БЛД является следствием нарушения развития легких, при котором недоношенность и ряд других факторов риска, включая генетическую предрасположенность, могут играть ключевую роль. Анализ выживаемости глубоко недоношенных детей с ЭНМТ и ОНМТ показал, что прослеживается обратно пропорциональная зависимость частоты развития новой формы БЛД с гестационным возрастом при рождении [28].

На современном этапе преобладанию новой формы бронхолегочной дисплазии способствовал переход РФ на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ в 2012 году. Дети с массой тела ≥ 500 г. и гестационным возрастом ≥ 22 недели стали объектом пристального внимания неонатологов и пульмонологов, так как главным фактором риска развития РДСН и БЛД оказалось недоразвитие легочных структур. Антенатальная профилактика РДСН, заместительная терапия сурфактантом, малоинвазивная респираторная поддержка стали ключевыми факторами помощи таким детям. Новая форма заболевания уже сейчас является основной, одним из доказательств является опыт работы с пациентами с бронхолегочной дисплазией в ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России. Анализ динамики частоты развития классической и новой форм БЛД за период 2012-2019 гг. показал постепенное нарастание числа пациентов с новой формой бронхолегочной дисплазии. Паритетное соотношение приходится на 2013 год, что соответствует периоду перехода Российской Федерации на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ [1]. С 2014 г. более чем у половины пациентов с БЛД была верифицирована новая форма заболевания (64,8%). К концу 2019 г. этот показатель достиг 80% [10; 21].

Сегодня бронхолегочная дисплазия чаще возникает у глубоко недоношенных детей и характеризуется иной патофизиологией, в отличие от патологии, описанной более 55 лет назад [38]. Основные отличительные признаки классической и новой форм БЛД приведены в таблице 1.1.1 [11,13,18,20].

Таблица 1.1. Основные отличия классической и новой форм БЛД.

	Классическая форма	**Новая форма**
Этиология	Проведение ИВЛ с «жесткими параметрами»	Глубокая недоношенность
Патогенез	Постнатальный воспалительный процесс и фиброзирование легочной ткани вследствие волюмо- и баротравмы	Незавершенные ангио- и альвеологенез, внутриутробное воспаление
Патоморфология	Ателектазы, чередующиеся с эмфизематозными участками; гиперплазия и метаплазия эпителия, выстилающего респираторные пути; диффузное фиброзирование; гиперплазия гладкомышечных клеток; ремоделирование лёгочных сосудов	Незначительное утолщение гладкомышечного слоя клеток; меньшее количество и «упрощение» альвеол; дисморфизм артерий; невыраженный фиброз
Гестационный возраст	28-37 недель	Менее 28 недель
Масса тела при рождении	Любая	Чаще < 1000 г
Развитие кислородозависимости	После рождения	Отсроченно, зачастую через несколько дней или недель после рождения («светлый» промежуток)
Характерные рентгенологические признаки	Отёк интерстициального пространства лёгочной ткани, повышенная воздушность, чередующиеся с лентообразными уплотнениями	Отсутствие гомогенности лёгочной ткани, при тяжёлой степени повышенная воздушность

Также БЛД классифицируют по степени тяжести течения заболевания. Одна из последних предложенных классификаций была опубликована Higgins

R.D. и соавт. в 2018 году. Предлагается использовать степени тяжести I, II и III, что соответствует легкой, среднетяжелой и тяжелой степени патологии (таблица 1.1.2.) [99].

Таблица 1.2. Критерии степени тяжести течения бронхолегочной дисплазии; FiO2, %

Степень тяжести	Инвазивная IPPV (intermittent positive pressure ventilation — перемежающаяся ИВЛ с положительным давлением) *	NCPAP, NIPPV или назальная канюля со скоростью потока более 3 л/мин	Назальная канюля со скоростью потока от 1 до 3 л/мин	Подача кислорода	Скорость потока через назальную канюлю менее 1 л/мин
I	–	21	22–29	22–29	22–70
II	21	22–29	>30	>30	>70
III	>21	>30	–	–	–
III (A)	Ранняя смерть (между 14 днями постнатального возраста и 36 неделями ПКВ), обусловленная стойким паренхиматозным поражением легочной ткани и дыхательной недостаточностью, которую нельзя объяснить другими неонатальными заболеваниями (например, внутрижелудочковым кровоизлиянием (ВЖК), некротизирующим энтероколитом, некорректной терапией, сепсисом и т.д.)				

* Исключая новорожденных, которым ИВЛ проводится по поводу другого заболевания дыхательных путей или заболеваний, связанных с поражением дыхательного центра.

Все перечисленные исследования указывают на то, что новая форма бронхолегочной дисплазии является угрозой для недоношенного ребёнка, а частота развития этой патологии неуклонно растёт. Прогнозировать данную патологию возможно лишь при детальном изучении клинико-генетических особенностей развития, что в будущем может позволить проводить адекватную и своевременную профилактику формирования БЛД.

1.2. Осложнения и исходы бронхолегочной дисплазии

Бронхолегочная дисплазия – многофакторное заболевание, формирующееся, как правило, у недоношенных детей. У пациентов с бронхолегочной дисплазией могут наблюдаться значительное нарушение функции легких, формирование хронической патологии дыхательных путей, сопровождающееся непереносимостью физической нагрузки. Со временем у этих пациентов может развиться астма или хроническая обструктивная болезнь легких. Наиболее серьезным долгосрочным осложнением является развитие легочных сосудистых заболеваний и легочной гипертензии [166].

Бронхолегочная дисплазия связана с высоким риском развития опасных осложнений, в том числе острой дыхательной недостаточности. Как правило, данное осложнение развивается при присоединении вирусной инфекции, поражающей нижние дыхательные пути – бронхиолита или пневмонии, но также возможно в результате аспирации [13; 18]. В большинстве случаев причиной данных инфекций являются респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), риновирус и метапневмовирус. Эти инфекции зачастую являются причиной госпитализации, в том числе в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), потребности в ИВЛ, летальному исходу либо имеют нозокомиальный характер. Иммунопрофилактика РСВ, пневмококковой, гемофильной инфекции и гриппа предотвращает не только развитие тяжелого течения заболевания, но также предотвращает частоту обострений БЛД [15]. Хроническая дыхательная недостаточность является естественным исходом несовершенной альвеоляризации, нарушенного развития сосудов лёгких, иммунного воспаления, оксидативного стресса и других факторов, приводящих к формированию БЛД [43; 143; 156; 182]. Помимо дыхательной недостаточности данные изменения могут приводить к повторным эпизодам бронхиальной обструкции и формированию хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ). [105; 173; 183]. Также в развитии обструкции дыхательных путей ведущую роль играет ослабление эластических свойств лёгкого, что приводит к коллапсу мелких бронхов, не имеющих хрящевого

каркаса и лишённых эластической тяги. Повышение внутригрудного давления во время выдоха и увеличение сопротивления дыхательных путей у детей с БЛД приводит к формированию воздушных ловушек, а также к снижению индекса Тиффно (отношения объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1) к форсированной жизненной емкости легких). Ремоделирование дыхательных путей, замедление роста альвеол в результате недостаточной васкуляризации, а также осложнения, связанные с механической вентиляцией, такие как трахеомаляция и бронхомаляция, способствуют возникновению стойких аномалий дыхательных путей у детей, перенесших БЛД [83; 160; 173; 183].

Повышение среднего давления в легочной артерии более 25 мм рт. ст., определенного в покое методом катетеризации правых камер сердца для детей 3 месяцев и старше является критерием диагностики такого осложнения бронхолегочной дисплазии, как лёгочная гипертензия. Несовершенный ангиогенез и легочная вазоконстрикция являются главными предикторами развития ЛГ и в последствии лёгочного сердца у детей с БЛД [18; 94]. В исследовании Weismann C.G. и соавт., были изучена частота развития ЛГ у детей с и без БЛД. Было обследовано 204 ребенка (средний гестационный возраст - 25,9±2 недели, средняя масса тела при рождении - 831±286 г). Распространенность ЛГ в группе БЛД была выше, чем в группе без БЛД (44/159 (28%) против 5/45 (11%) соответственно; p=0,028) [194]. Легочное сердце опасно развитием не только симптомов правожелудочковой сердечной недостаточности (увеличение печени с нарушением ее функции, периферические отёки и др.), но и формированием БЭН в случае хронизации этого процесса [24].

Белково-энергетическая недостаточность — это патологическое состояние, которое является следствием преимущественно белкового и/или энергетического голодания, характеризующееся дефицитом массы тела и/или роста и сочетанным нарушением работы различных систем организма, обеспечивающих его гомеостаз [18]. Постнатальный дефицит энергии и

основных нутриентов у детей с БЛД начинает формироваться на первых неделях жизни на фоне вынужденной инфузионной терапии и парентерального питания [4; 25; 139]. Помимо сниженной активности ферментных систем желудочно-кишечного тракта, особенностей обменных процессов и высоких потребностей в нутриентах, характерных в целом для недоношенных с ОНМТ и ЭНМТ, необходимая им в неонатальном периоде респираторная поддержка оказывает влияние на созревание и функционирование различных органов, главным образом легких [9; 25]. В исследовании Скворцовой В.А. и соавт. было доказано, что недостаточная скорость динамики антропометрических показателей недоношенных детей с ОНМТ, особенно сформировавших БЛД, свидетельствует о необходимости своевременной коррекции их питания [25]. Среди причин, способствующих формированию белковой энергетической недостаточности в ОРИТ, следует выделить недостаточное поступление питательных веществ вследствие

- ограничения объема вводимой жидкости,
- трудностей с обеспечением адекватного питания,
- частого прерывания энтерального питания (как результат снижения толерантности к пище),
- нарушения работы других органов и систем (сердечная/почечная недостаточность, некротизирующий энтероколит) [16].

Развитие артериальной гипертензии (АГ) также является опасным осложнением БЛД, так как эндотелий легочных сосудов в ответ на повреждение и в результате хронического воспаления начинает синтезировать большое количество вазоконстрикторов. Это приводит к нарушению секреторной функции эндотелиальных клеток, а также к постоянно повышенному уровню провоспалительных цитокинов и оксидативному стрессу. Опасным следствием этого процесса является активация свободных радикалов и возникновение дисбаланса между сосудосуживающими и сосудорасширяющими субстанциями. Нарушению сосудистого тонуса

способствуют также симпатикотония и нарушение клиренса норадреналина сосудами легких у детей с БЛД [18].

Представленные осложнения и исходы доказывает, что БЛД относится к заболеваниям, требующим мультидисциплинарного подхода при оказании как стационарной, так и амбулаторной помощи [13].

1.3. Генетические факторы риска развития новой формы бронхолегочной дисплазии

Изучение этиопатогенетических механизмов развития БЛД позволило модифицировать подход к диагностике БЛД и выделить основные системы, участвующие в развитии заболевания, а именно, система сурфактантных белков, антиоксидантов, факторов роста, металлопротеиназ, цитокинов и др. Вклад генетических методов исследования выходит на первый план, так как ранняя диагностика способствует быстрому старту профилактики заболевания, и, следственно, улучшению прогноза для пациентов [193]. В близнецовом исследовании Bandari V. и соавт. у 53% пациентов, включенных в исследование, высокий риск развития бронхолегочной дисплазии был связан с молекулярно-генетическими факторами [49]. О значимой роли генетических предикторов в развитии БЛД сообщают Pascal M.L. и соавт. На основании исследования близнецов с гестационным возрастом менее 30 недель, вклад генетических факторов в развитие легкой БЛД составил 78%, для среднетяжелой и тяжелой – 82% [122]. Близнецовый метод исследования остается одним из ведущих на протяжении многих лет, одни из последних данные были опубликованы в 2018 году в Journal of Pediatrics [151]. В целом, генетический компонент в развитии БЛД в большинстве близнецовых исследований достигает 50-80%, однако гены-кандидаты в данных исследованиях не рассматривались [125].

Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS- genome-wide association studies) – это направление генетических исследований, которое позволяет установить связь между фенотипическими признаками и генетическими

маркерами. Зачастую в роли последних выступают однонуклеотидные полиморфизмы (SNP - single nucleotide polymorphism) [125].

В исследовании Hadchouel и соавт. с участием 418 недоношенных детей с ЭНМТ, была выявлена ассоциация аллеля С варианта rs1245560 гена *SPOCK2* с формированием бронхолегочной дисплазии. У детей с БЛД ген *SPOCK2* был определен как ключевое регулирующее звено альвеоляризации [91]. Так как БЛД является многофакторным заболеванием, определены потенциально ответственные за формирование заболевания патофизиологические пути и соответствующие им гены-кандидаты, которые могут рассматриваться в качестве предикторов развития БЛД. Нарушение нуклеотидной последовательности в генах-кандидатах приводит к продукции дефектных белков, участвующих в процессах ангиогенеза, альвеолизации, апоптоза, антиоксидантной защиты, а также белков сурфактанта, протеолиза и иммунного ответа [128]. В одном из последних исследований, проведенном Mahlman M. и соавт., полиморфизм rs11265269 был идентифицирован как фактор риска формирования БЛД, независимо от пренатальных факторов риска [129]. В исследовании Пожарищенской В.К. и соавт. была идентифицирована ассоциация между развитием БЛД и двумя генетическими вариантами в генах, кодирующих матриксную металлопротеиназу 12 и белки воспалительного ответа (с аллелем С генотипами СС и ТС варианта rs652438 гена *MMP-12* и аллелем С, генотипами СС и ТС варианта rs694739 гена *LOC102723878* соответсвенно). Было доказано, что недоношенные дети, имеющие помимо клинико-анамнестических предикторов развития бронхолегочной дисплазии, и генетические факторы риска в виде представленных вариантов, риск формирования заболевания повышен в 3 раза (для детей, обладающих генотипами ТС и СС варианта rs652438 гена *MMP-12*) и в 6 раз (для детей, обладающих генотипами ТС и СС варианта rs694739 гена LOC102723878) [21].

Современным подходом к изучению генетических предикторов БЛД является исследование микро-РНК. Микро-РНК (miRNA) представляют собой короткие некодирующие РНК длиной ~22 нуклеотида, участвующие в

посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Rogers и соавт., в 2015 году показали, что экспрессия кластера генов микро-РНК-17-92, который включал 6 микро-РНК, значительно снижена в ткани легких у детей, которые умерли от БЛД [161]. Syed и соавт. продемонстрировали, что уровни miR-34a значительно повышены как в легких новорожденных мышей, так и в альвеолоцитах 2 типа у младенцев, подвергшихся гипероксии. Кроме того, было доказано, что сверхэкспрессия miR-34a коррелирует с тяжёлым течением БЛД и ее сочетанием с легочной гипертензией [179].

Секвенирование «нового поколения» (NGS - next generation sequencing) в качестве высокопроизводительной диагностической и прогностической молекулярно-генетической методики активно внедряется в практическую медицину. Помимо полноэкзомных исследований, в настоящее время доступны и различные таргентные панели для NGS. В исследовании Jingjing Li и соавт. [127], было проведено полноэкзомное секвенирование у 50 пар близнецов, из которых 51 ребенок страдал БЛД. ДНК пациентов были выделены из сухих пятен крови. Были выявлены 258 генов с редкими миссенс-мутациями у пациентов с БЛД, что подтвердило полигенную природу этого заболевания. Авторы подтвердили, что к генам-кандидатам БЛД относятся гены, отвечающие за организацию коллагеновых фибрилл и внеклеточного матрикса, морфогенез эмбрионального эпителия, регуляцию сигнального пути Wnt. Изучая 14 исследуемых генов, отвечающих за организацию внеклеточного матрикса (*ADAMTS3, COL12A1, COL5A2, COL6A3, DMP1, FN1, ITGA1, ITGA2, ITGA9, ITGB6, KDR, LAMB2, NID2 и SDC2*), авторы обнаружили, что большая часть белков, кодируемых этими генами, относятся к различным типам коллагена (*COL12A1, COL5A2 и COL6A3*) или опосредуют связывание коллагена, в том числе интегрины (*ITGA1, ITGA2 и ITGA9*). В исследовании Aaron Hamvas и соавт., было проведено полноэкзомное секвенирование 146 пациентов (85 с БЛД и 61 без БЛД). Было идентифицировано 345 генов с вариантами, уникальными для пациентов с БЛД, и 292 гена для пациентов без БЛД. Из 345 генов, 13 – были выявлены в исследовании Jingjing Li et al. [127] у

детей с тяжелым течением бронхолегочной дисплазии (*CDH23, CHST10, DAAM1, DYDC1, FIGN, KIAA1468, MDN1, MYOZ1, NID2, NRXN3, NUP93, PICALM, ROR1, SETBP1, SYDE2, TBC1D1, TGFBI, YLPM1, ZHX3*). Дальнейший анализ 345 генов определил 30 главных «систем», представляющих интерес в исследовании, включая протеинкиназу А, систему кортикотропин-рилизинг гормона, протеинкиназу, активируемую АМФ и др. [92].

Совершенствование диагностических подходов к выявлению бронхолегочной дисплазии, в том числе молекулярно-генетических, представляет особую ценность в клинической практике и может быть использована для прогнозирования развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей в раннем постнатальном периоде с целью заблаговременного назначения профилактики данного заболевания.

1.3.1. Развитие легких и роль генов сурфактанта в формировании бронхолегочной дисплазии

Формирование легких начинается между 3 и 6 неделями беременности. Сложные взаимодействия между мезенхимальными, гладкомышечными, эпителиальными и другими клетками обеспечивают формирование легочной паренхимы [88; 100; 195]. Ацинарные структуры расширяются позже, образуя периферические мешочки (примитивные участки газообмена) и альвеолы. Во время морфогенеза легкое трансформируется из железистоподобной ткани в открытую альвеолярную структуру, в которой может происходить газообмен. В течение последнего триместра альвеолярные мешочки подвергаются процессу разделения, тем самым увеличивая площадь поверхности для газообмена. Эпителиальные клетки созревают до альвеолоцитов I и II типов. Главная функция альвеолоцитов II типа – образование сурфактанта. Таким образом, недоношенные дети, рожденные на 22-23 неделе гестации, начинают вентиляцию легких на каникулярной или саккулярной стадии развития легких, задолго до завершения морфогенеза и альвеолярной дифференцировки (рис. 1.1) [182].

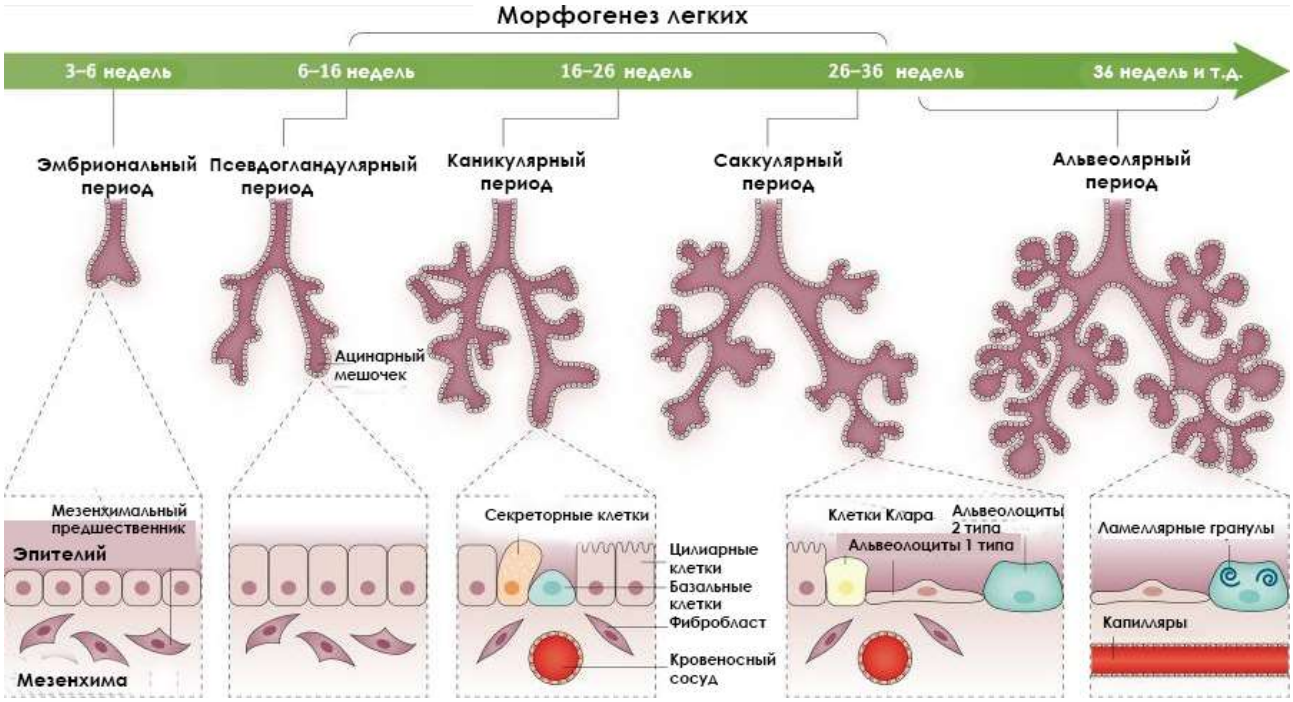


Рис. 1.1. Этапы формирования легких в процессе органогенеза

Легочный сурфактант – это сложная смесь фосфолипидов, в первую очередь фосфатидилхолина, и белков сурфактанта SP-A, SP-B, SP-C и SP-D, которые вместе определяют физическую структуру, функцию и метаболизм сурфактанта в альвеолах. Синтез липидов и белков зависит от дифференцировки альвеолоцитов II типа. Недостаток сурфактанта в результате их неполной дифференцировки приводит к формированию респираторного дистресс-синдрома новорожденных [196]. Введение экзогенного сурфактанта новорожденным с клиническими симптомами РДСН значительно уменьшает потребность в кислороде и вспомогательной вентиляции после рождения, таким образом, улучшается выживаемость, но и увеличивается количество младенцев с бронхолегочной дисплазией [182].

Ассоциация генетических вариантов гена *SFTPA2* с развитием РДСН и БЛД описана в исследовании Kelli K. Ryckman и соавт. Ген *SFTPA2* кодирует сурфактантный белок А (SP-A – surfactant protein-A). SP-A является частью сложной смеси, в которую входят фосфолипиды, в первую очередь фосфатидилхолин, и белки сурфактанта SP-B, SP-C и SP-D, которые совместно

определяют физическую структуру, функцию и метаболизм сурфактанта в альвеолах [162; 196].

Ген, отвечающий за образование SP-B белка сурфактанта, расположен на коротком плече 2-й хромосомы. Дефицит SP-B как у генно-инженерных мышей, так и у новорожденных детей разрушительно влияет на функцию дыхания [206]. Одной из причин врожденного альвеолярного протеиноза (редкого смертельного заболевания легких у доношенных новорожденных) является полное отсутствие SP-B. Наиболее частой причиной этого заболевания является инсерция двух нуклеотидов в кодон 121 экзона 4, приводящая к преждевременноиу завершению трансляции [150]. Feitong Zhang и соавт. изучили влияние вариантов гена, ответственного за развитие белка сурфактанта SP-B, на формирование бронхолегочной дисплазии. В исследовании были обнаружены 2 варианта гена, кодирующего SP-B, в экзоне 2 и экзоне 5, включая V1 (экзон 2: c. [5A> C] + [5A> C] или c. [5A> C] + [=]) и V2 (экзон 5: c. [428C> T] + [428C> T] или c. [428C> T] + [=]). Группу пациентов с БЛД составили 33 младенца с двумя видами варианта гена V1 и V2 – 18 и 15 детей соответственно. В контрольной группе было 19 пациентов без БЛД, из которых генетический вариант V1 имели 7 детей, V2 – 12 детей. Между двумя группами наблюдалась значительная разница в количестве пациентов с генетическим вариантом V1, в связи с чем, ученые сделали вывод, что именно этот вариант связан с риском формирования бронхолегочной дисплазии [206].

В исследовании Paola Carrera и соавт., стратегия выбора предполагаемых генов-кандидатов БЛД была следующей: в первую очередь внимание было сосредоточено на вариантах, идентифицированных в генах, ранее связанных с бронхолегочной дисплазией. В частности, рассматривались гены системы сурфактанта (*SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, STPTC, SFTPD, ABCA3*), гены ремоделирования внеклеточного матрикса (*MMP2, MMP16, MMP14, SPOCK2*), гены ангиогенеза (*VEGFC, ACE, GSTP1*), гены, связанные с окислительным стрессом, (*MTHFR, EPHX1, EPHX2*), гены, связанные с воспалительным ответом (*TLR, MBL1, MBL2*). В общей сложности был идентифицирован 61

вариант в 19 генах, подтвержденных секвенированием по Сэнгеру. Одним из интересных открытий было выявление 2-х новых вариантов в гене *ABCA3* (*p.R1035C* и *p.Q403P*), известном ассоциацией с синтезом сурфактанта [58]. Белок, кодируемый геном *ABCA3*, входит в состав мембраны альвеолоцитов II типа, являясь транспортным переносчиком различных молекул [144]. Также, в связи со значимым вкладом этого белка в метаболизм сурфактанта, вероятнее всего, *ABCA3* является предиктором лёгочных заболеваний, связанных с его дефицитом [17].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что бронхолегочная дисплазия, безусловно, не является моногенным заболеванием, и многие из вариантов, идентифицированных в исследованиях, находятся в гетерозиготном состоянии. Связанные с патологией локусы дозочувствительны, и потеря одной копии вносит свой вклад в развитие заболевания [127].

1.3.2. Потенциальная роль генов-кандидатов бронхолегочной дисплазии, участвующих в воспалительном ответе

Воспаление играет одну из ключевых ролей в патогенезе БЛД, однако его генетические механизмы в настоящее время остаются неизученными. В исследовании Mari Mahlman и соавт., изучили влияние гена *CRP* (C-Reactive Protein – С-реактивный белок) на формирование бронхолегочной дисплазии. Чтобы сделать результаты более обобщаемыми, были изучены две группы детей с БЛД из Финляндии и две из Канады и Франции. Полногеномный поиск ассоциаций был проведён у 60 пациентов с БЛД средней и тяжелой степени и у 114 пациентов без БЛД (контрольная группа). Был выявлен однонуклеотидный полиморфизм rs11265269, который располагается между генами *CRP* и *DUSP23* и является наиболее значимым в формировании БЛД. В дополнение к rs11265269, два SNP (rs3093059 и rs12091403) в этом регионе продемонстрировали свою ассоциацию с бронхолегочной дисплазией. Младенцы, несущие предрасполагающие к БЛД полиморфизмы, а именно rs11265269 и rs3093059, имели более высокий уровень С-реактивного белка по

результатам проведённых исследований. Аналогичная ассоциация с rs12091403 не была обнаружена [129]. Ген *CRP*, кодирует С-реактивный белок, широко известный в клинической практике. CRP принадлежит к семейству пентраксинов, которое также включает амилоидный компонент Р сыворотки и пентраксин-3. Белок участвует в нескольких биологических процессах, связанных с иммунной защитой, основываясь на своей способности распознавать чужеродные патогены и поврежденные клетки хозяина и инициировать их устранение, взаимодействуя с гуморальными и клеточными эффекторными системами в крови. Следовательно, уровень этого белка в плазме сильно увеличивается во время острой фазы ответа на повреждение ткани, инфекцию или другие провоспалительные стимулы [84]

Исследование Paolo Carrera и соавт. подтверждает роль гена *CRP* в развитии патологии, но помимо этого гена-кандидата, учёные доказали значимое влияние и других генов, влияющих на формирование воспалительной реакции (таблица 1.3.1) [58].

Таблица 1.3. Гены-кандидаты бронхолегочной дисплазии, участвующие в воспалительном ответе

Ген	Референсная последова-тельность	Геномная координата (GRCh37)	Частота* %	Нуклеотид-ный вариант	Амикокислот-ный вариант
NOS2	NM_00625.4	chr17:26093594	0.011	c.2188A>G	p.K730E
TLR1	NM_003263.3	chr4:38798255	0.011	c.2198C>T	p.P733L
		chr4:38799955	0.011	c.496_ 497delinsT	p.K166Wfs*6
LBP	NM_004139.4	chr20:36993333	0.032	c.848A>G	p.D283G
CRP	NM_001329057.1	chr1:159683814	0.032	c.176C>T	p.T59M

*- согласно базе 1000 Genome project

Ген *NOS2* кодирует белок под названием iNOS (inducible nitric oxide synthase - индуцируемая синтаза оксида озота), изоформу синтазы оксида азота (NOS), экспрессия которой индуцируется липополисахаридом в сочетании с различными цитокинами. После индукции iNOS производит оксид азота (NO) с высокой скоростью. Роль NO в развитии легких и уменьшении воспалительных

изменений легочной ткани в настоящее время до конца не изучена. Действительно, он опосредует переход от эмбриональной к неонатальной жизни. По этой причине NO иногда используется в качестве терапии бронхолегочной дисплазии, поскольку по результатам нескольких исследований NO способствовал развитию легких и уменьшал активность воспаления. Также NO является свободным радикалом, участвующим во многих сигнальных процессах [58].

Белок, кодируемый геном *TLR1*, является членом семейства толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors - TLRs), которые играют фундаментальную роль в распознавании патогенов и активации врожденного иммунитета. TLR распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs - pathogen-associated molecular patterns), которые экспрессируются на инфекционных агентах, и опосредуют производство цитокинов, необходимых для развития эффективного иммунного ответа [102].

Ген *LBP* кодирует белок, который участвует в острой фазе иммунологического ответа на грамотрицательные бактериальные агенты. Грамотрицательные бактерии содержат липополисахарид в своей клеточной стенке. Вместе с бактерицидным белком, увеличивающим проницаемость, кодируемый белок связывает ЛПС и взаимодействует с рецептором CD14, играя роль в регуляции ЛПС-зависимых ответов моноцитов [79; 101].

Помимо представленных генов, кодирующих компоненты иммунного ответа, также описаны следующие гены: *TLR5*, *PTPN22*, *CPA3*. Ген *TLR5*, также, как и *TLR1*, кодирует мембранный белок, входящий в семейство толл-подобных рецепторов, обеспечивающих функционирование врождённого иммунного ответа. TLR активно участвуют в воспалительном ответе, а также окислительных реакциях при повреждении лёгочной ткани. В 2012 г. в США было проведено масштабное исследование на базе 4-х медицинских центров с целью определения предикторного потенциала 9 генов (*TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR9*, *IRAK1*, *MAL*, *TIRAP*, *NFKB1*, *NFKBIA*) в развитии БЛД у недоношенных детей. Среди всех вариантов статистически значимым в отношении

формирования бронхолегочной дисплазии оказался полиморфизм *c.1174C>T* гена *TLR5* [20; 130; 163].

Продукт гена *PTPN22* известен как лимфоидспецифическая тирозинфосфатаза (lymphoid tyrosine phosphatase – LTP) и является мощным ингибитором активации Т-клеток [55]. Мутации гена *PTPN22* были описаны в качестве предикторов преждевременного рождения в исследовательской работе Jevon Anastasia Plunkett [153].

Ген *CPA3* кодирует карбоксипептидазу А3, относящуюся к семейству цинковых металлопротеаз. Экспрессия данного гена является специфичной для тучных клеток, ассоциация с БЛД описана в исследовании Yue Ren и соавт. [158]. Существует 2 основных фенотипа тучных клеток, участвующих в иммунной защите дыхательной системы: тучные клетки слизистых и соединительной ткани. Карбоксипептидаза А3 – фермент, вырабатываемый тучными клетками соединительной ткани, выполняющий не только протективную, но и гомеостатическую функцию. Белок, кодируемый *CPA3*, описан в качестве предикторов таких заболеваний, как ХОБЛ и бронхиальная астма [152; 197].

1.3.3. Роль генов-кандидатов бронхолегочной дисплазии, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса

Подтверждением значимой роли генов, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса, является крупное исследование Aaron Hamvas и соавт., результаты которого были опубликованы в 2018 году. Ученые идентифицировали более 300 генетических вариантов, уникальных для пациентов с патологией, 19 из них повторяли результаты исследования Li J и соавт. [92; 127]. Одна из групп генов, ассоциированных с бронхолегочной дисплазией, включала *ADAM17*, *MMP14*, *MMP15*, *THBS2*, *MMP17*, *MMP9*. 4 гена из этой группы кодируют белки, относящихся к матриксным металлопротеиназам (ММП). ММП являются кальций-зависимыми цинксодержащими эндопептидазами. Матриксные металлопротеиназы (или

матриксные металлопептидазы) способны разрушать все виды белков внеклеточного матрикса, участвуют в высвобождении апоптотических лигандов и инактивации цитокинов. Помимо этого, белки семейства ММП играют важную роль в клеточной пролиферации, миграции, дифференцировке, ангиогенезе, воспалении и др. [92].

Матриксные металлопротеиназы ингибируются 4-мя видами тканевых ингибиторов металлопротеиназ [74]. Помимо специфических регуляторов активности ММП, активные формы кислорода также способны влиять на активность матриксных металлопротеиназ, стимулируя транскрипционный фактор «каппа-би» (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-kB) [146]. NF-kB, активирует транскрипцию генов, ответственных за продукцию провоспалительных цитокинов, в том числе интерлейкина-1, интерлекина-8, фактора некроза опухоли-α (TNF-α). Активные формы кислорода, образующиеся после привлечения нейтрофилов в очаг воспаления, способствуют активации ММП и, следовательно, деградации внеклеточного матрикса с развитием фибротических изменений легочной ткани [12; 20]. В исследовании Paolo Carrera и соавт. особое внимание было уделено гену *MMP1*, так как вклад этого гена в развитие патологии была доказана полноэкзомным секвенированием и подтверждена секвенированием по Сэнгеру. ММП-1 синтезируется нормальными и трансформированными фибробластами, макрофагами, хондроцитами и эндотелиальными клетками [58; 109].

Значительное внимание к нарушению метаболизма легочного коллагена в формировании БЛД уделено в исследовании M. Rezvani и соавт. В цитируемой работе не было обнаружено полиморфизмов, ассоциированных с бронхолегочной дисплазией, среди 11 различных генов, кодирующих ММП: *MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-14, MMP-16* [159]. Однако экспрессия ММП-14 может являться причиной продолжающегося активного лёгочного фиброза в отсутствие клинических симптомов заболевания [12].

Доказала значимую роль генов, участвующих в ремоделировании матрикса, и Alice Hadchouel и соавт. посредством полногеномного поиска

ассоциаций (genome-wide association studies – GWAS). Учёные определили *SPOCK2* как новый ген-кандидат формирования бронхолегочной дисплазии, который является единственным ассоциированным с формированием заболевания. В цитируемом исследовании получены данные о нескольких однонуклеотидных полиморфизмах (single nucleotide polymorphism – SNP), ассоциированных с БЛД. Полиморфизм rs1245560 был определён как статистически значимый среди финской популяции [91]. Белок, кодируемый геном *SPOCK2*, связывается с гликозаминогликанами, формируя внеклеточный матрикс. В основном роль этого гена была исследована в центральной нервной системе, однако исследователями была выявлена и его экспрессия в легких у мышей [167; 185]. Было показано, что экспрессия *SPOCK2* была незначительной с 16-й по 36-ю неделю внутриутробного развития лёгочной ткани у крыс и начинала возрастать к началу формирования зрелых альвеол. Наибольшая экспрессия *SPOCK2* у крыс была выявлена на 18-е сутки жизни после формировании зрелых альвеол и оставалась высокой до 28-го дня жизни. Помимо этого, учёными было продемонстрировано, что одним из факторов, увеличивающих экспрессию *SPOCK2*, была гипероксия [54]. Результаты, полученные в этом исследовании, показывают необходимость дальнейшего изучения роли *SPOCK2* в развитии легочной ткани. Также *SPOCK2* взаимодействует с *MMP-14* [145], чья ключевая роль в формировании легких была установлена ранее [5; 40; 53].

Ген *COL8A1* кодирует одну из двух альфа-цепей коллагена VIII типа. Продукт гена представляет собой короткоцепочечный коллаген и главный компонент базальной мембраны эндотелия роговицы. Значительная разница в экспрессии данного гена у пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД, была описана в исследовании Bhattacharya S. и соавт. [52].

1.3.4. Роль генов, кодирующих факторы ангиогенеза, в формировании бронхолегочной дисплазии

Адекватная профилактика бронхолегочной дисплазии является труднодостижимой задачей, поэтому поиск биомаркёров и генов-кандидатов патологии является целью многих исследований [36; 38; 117; 128; 135; 188]. Большое количество предикторов БЛД были изучены, некоторые из них еще не прошли валидацию в качестве значимых факторов риска формирования БЛД. Каждый из предикторов является звеном патогенеза развития бронхолегочной дисплазии. «Васкулярная гипотеза» является одной из самых перспективных и малоизученных в формировании новой формы БЛД, согласно которой данное заболевание является результатом нарушения развития легочных сосудов с последующим нарушением развития альвеол [184]. В настоящий момент особое внимание уделяется таким факторам ангиогенеза, как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); оксид азота (NO); ангиопоэтины (Ang); инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF1); трансформирующий фактор роста β1 (TGF-β1**)**; тромбоспондин-1; фактор дифференцировки пигментного эпителия (PEDF); фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF); фактор роста соединительной ткани (CTGF) и др. [38; 77; 128; 135; 140; 156; 182].

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)

VEGF занимает особое место в группе проангиогенных факторов благодаря своей критической роли в развитии сосудов и присутствию в высоковаскуляризированных тканях [48; 87; 181]. Он был определен как ключевой регулятор ангиогенеза и созревания легких благодаря своей роли в координации разветвления дыхательных путей и ангиогенеза [175]. Нарушение синтеза VEGF может привести к нарушению развития паренхимы и долгосрочному повреждению легких [114].

При беременности с осложненным течением, заметное повышение уровня эндогенного ингибитора фактора роста эндотелия сосудов в амниотической жидкости может способствовать развитию преэклампсии [35; 126; 133; 142; 168; 174; 199; 204]. Помимо этого, доказано, что патологические состояния

плаценты, связанные с гипоперфузией, ассоциированы с низким уровнем VEGF и других проангиогенных факторов, что связано с задержкой внутриутробного развития плода и повышенным риском формирования у него бронхолегочной дисплазии, осложненной легочной гипертензией [112; 137; 138]. Также было показано, что у недоношенных новорождённых низкий уровень фактора роста эндотелия сосудов в образцах трахеальной жидкости коррелирует с высоким риском развития БЛД, подтверждая гипотезу, что ранний дисбаланс про- и антиангиогенных факторов способствует формированию бронхолегочной дисплазии на фоне нарушения развития лёгочных сосудов [97; 119].

VEGF как ключевое звено ангиогенеза играет важную роль в механизме развития БЛД. Прямое ингибирование активности VEGF у недоношенных детей является достаточным для нарушения ангиогенеза и роста дистальных отделов дыхательных путей, что приводит к повышению давления и развитию легочной гипертензии у новорожденных и детенышей крыс [106; 124]. Экспрессия VEGF крайне важна в раннем постнатальном периоде, так как этот фактор обеспечивает правильное формирование и функционирование альвеол и микрососудистой системы легких. В связи с этим, согласно этой теории, именно недоношенные дети становятся главными претендентами на развитие новой формы БЛД [46; 85; 136; 189].

Гены, кодирующие фактор роста эндотелия сосудов и рецептор к VEGF 2-го типа, были изучены в качестве предикторов БЛД в исследовании Mahlman M. и соавт. Ученые доказали, что однонуклеотидный полиморфизм *VEGFR2* (rs4576072) был ассоциирован с бронхолегочной дисплазией с частотой минорного аллеля 23,9% по сравнению с 9,1% контрольной группы (p = 0,0005, ОШ - 3,15; 95% ДИ: 1,62-6,12) [128].

В исследовании P. Kwinta и соавт. при проведении генетического исследования была установлена связь гена *VEGF* с высоким риском формирования БЛД [115]. K. Fujioka и соавт. также в результате изучения ассоциации *VEGF* и развития БЛД, установили, что у детей генетический

вариант 634C>G в гене *VEGF* является фактором, способствующим формированию бронхолегочной дисплазии [5; 85].

Оксид азота (NO)

NO является одним из самых известных факторов релаксации, регулируя продукцию эндотелием эндоплазматического фактора гиперполяризации, простациклина и эндотелина-1. Оксид азота образуется из L-аргинина под действием NO-синтазы 3-х видов:

1. индуцибельная NOS (кодируемая геном *NOS2A*);
2. нейрональная NOS (кодируемая геном *NOS1*);
3. эндотелиальная NOS (или eNOS, кодируемая геном *NOS3*).

NOS3 является важным регулятором постнатального ангиогенеза [5; 33].

Помимо экспрессии гена *NOS2*, описанного ранее, экспрессия генов *NOS1* и *NOS3* увеличивается по мере развития легочной ткани, и, по-видимому, они играют значимую роль в процессе ветвления бронхиального дерева [58; 203]. Работы, в которых объектом изучения был ангиогенез в опухолевых тканях, показали, что NO оказывает стимулирующее действие на рост кровеносных сосудов, активируя синтез эндотелиального фактора роста, но при этом тормозит миграцию гладкомышечных клеток в стенку новообразованных сосудов [207]. Гены *NOS1* и *NOS3* в качестве кандидатов бронхолегочной дисплазии практически не изучены, однако в работе P. Vannemreddy и соавт. была выявлена ассоциация варианта -786C гена *NOS3* с бронхолегочной дисплазией и внутрижелудочковыми кровоизлияниями [186].

Ангиопоэтины (Ang1 и Ang2)

Ангиопоэтины 1-го и 2-го типов являются ведущими регуляторами физиологической и патологической неоваскуляризации. Продукция Ang1 и Ang2 связана с синтезом фактора роста эндотелия сосудов. В исследовании T. Sato и соавт. было показано, что комбинированная генная терапия VEGF и Ang1, которая была применена у новорожденных крысят, стимулировала развитие легочной ткани и ангиогенез лёгочных сосудов более эффективно, чем однокомпонентное введение VEGF [165].

Вместе с тем, Ang1 способен взаимодействовать с фактором роста эндотелия сосудов. Ангиопоэтин 2-го типа также совместно с VEGF стимулирует ангиогенез в условиях гипоксического состояния, но в отсутствие сильных проангиогенных сигналов может вызывать гибель эндотелиоцитов и регрессию развития сосудов. Данный эффект Ang2 может является одним из звеньев патогенеза бронхолегочной дисплазии [32; 50].

Процесс воспаления также является одним из стимулирующих ангиогенез факторов, поскольку продукция Ang1 регулируется не только VEGF, но и такими провоспалительными факторами, как IL-1β, TGF-β и TNF-α [8; 23]. Ангиопоэтин 1-го типа является основным агонистом рецептора тирозинкиназы, замедляет процессы апоптоза и оказывает прямое митогенное действие на эндотелиальные клетки. В то же время, несмотря на повышение уровня провоспалительного фактора некроза опухоли α, имеются данные о снижении уровня Ang1 в трахеобронхиальном содержимом у детей с БЛД [23; 180]. Несмотря на то, что роль ангиопоэтинов в формировании бронхолегочной дисплазии бесспорна, гены, кодирующие данные факторы, в качестве молекулярно-генетических предикторов практически не изучены.

Инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1)

Инсулиноподобный фактор роста-1 также относится к группе регуляторов ангиогенеза легких и эмбрионального роста развития. Концентрация IGF-1 значительно возрастает на протяжении третьего триместра беременности. При преждевременных родах, концентрация этого фактора, способного проникать через плаценту, остается на низком уровне и с повышением постконцептуального возраста (ПКВ) его уровень снижается [66].

В связи с этим, исследователями установлена корреляция низкого уровня IGF-1, развития новой формы БЛД и ретинопатии у недоношенных детей. Однако существует и противоположное мнение, согласно которому в образцах легочной ткани, взятых при аутопсии детей с новой формой БЛД, выявлено значительное увеличение уровня IGF-1 [64; 98].

Функция IGF-1 заключается в усилении локальной пролиферации фибробластов легочной ткани плода и увеличении выработки коллагена, участвуя в процессах повреждения и восстановления легких [57].

Мутации гена *IGF-1* приводят к снижению сывороточных уровней или аффинности связывания IGF-1; для таких пациентов характерны тяжелая задержка внутриутробного развития, микроцефалия, задержка роста, выраженная задержка психомоторного развития, нейросенсорная глухота и легкие дисморфические особенности [75; 147; 192; 198].

Одним из основных регуляторов уровня IGF-1 является белок-3, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-3). По мере увеличения гестационного возраста, растёт и уровень сывороточного IGFBP-3, однако его концентрация может снижаться постнатально в случае преждевременных родов. Отличительной и значимой функцией IGFBP-3 также является снижение частоты повреждения и гибели эндотелиальных клеток, в том числе за счет снижения активности воспалительной реакции посредством уменьшения уровня ИФН- γ и регулируемых им медиаторов воспаления [111].

Трансформирующий фактор роста β1 (TGF-β1)

Аномальная активность фибробластов вносит большой вклад в патогенез бронхолегочной дисплазии. TGF-β1 представляет собой полипептид, который помимо регуляции действия фибробластов, выполняет множество клеточных функций, включая контроль клеточного роста, клеточной пролиферации, клеточной дифференцировки и апоптоза [5]. Повреждение легких в результате агрессивной респираторной терапии и воспаление приводят к индукции TGF-β1, который сдерживает воспалительные процессы и играет ключевую роль в процессах регенерации легочной ткани и её ремоделировании [141; 175].

В качестве фактора, являющегося предиктором развития БЛД, TGF-β1 также выполняет следующие функции:

- увеличивает эффективную деградацию компонентов экстрацеллюлярного матрикса,
- регулирует пролиферацию эпителиоцитов,

- ингибирует секрецию и активность ИФН-γ, TNF-α и других эффекторов воспалительного ответа.

Уровень TGF-β1 повышен в бронхоальвеолярном лаваже 4-дневных новорожденных, с угрозой формирования бронхолегочной дисплазии [113]. В исследовании Lecart C. и соавт. доказано, что уровень TGF-β1 является предиктором длительной кислородозависимости у детей с БЛД после выписки, в домашних условиях [123]. Однако исследование частоты полиморфизмов трансформирующего фактора роста β1 не выявило значимых различий в группе детей с БЛД и контрольной группе. [115]. Другие исследования также не показали значимой ассоциации полиморфизмов гена *TGF-β1* и бронхолегочной дисплазии [5; 86]. Однако публикации Li и соавт. и Aaron Hamvas и соавт. доказали обратное, полноэкзомное секвенирование образцов крайне тяжелых пациентов с бронхолегочной дисплазией выявило ген *TGFBI* в качестве предиктора тяжести течения заболевания [92; 127].

В связи с вышеизложенным очевидно, что роль *TGFBI* в качестве гена-кандидата данной патологии не является однозначной и требует дальнейшего изучения.

Тромбоспондин-1

Тромбоспондин-1 относится к семейству кальций-связывающих гликопротеинов и адгезивных белков внеклеточного матрикса и является антиангиогенным фактором [3; 76; 170]. В работе Shafiee A. и соавт. была исследована концентрация тромбоспондина-1 в аутопсийном материале лёгких недоношенных детей, находившихся на ИВЛ. Экспрессия этого адгезивного белка была значительно выше в группе пациентов, которым проводилась ИВЛ, чем в контрольной группе детей с аналогичным гестационным возрастом, но которым не был назначен этот метод респираторной поддержки [170]. В исследовании Min Yang и соавт., были изучены гены, кодирующие белки, связанные с ангиогенезом (в том числе ген *THBS1*, кодирующий тромбоспондин-1) и матриксной металлопротеиназой, у недоношенных младенцев с БЛД и без патологии. Экспрессия *THBS1* и генов ММП (*MMP8*,

MMP9 и *MMP25*) имела прямую связь с тяжестью течения бронхолегочной дисплазии и обратную связь с гестационным возрастом. Так как БЛД ассоциирована с ингибированием ангиогенеза, антиангиогенный ген *THBS1* показал высокую экспрессию у всех младенцев в группе с БЛД, что доказывает значимую роль в формировании данного заболевания [42; 47; 76; 202].

Пигментный фактор эпителиального происхождения (PEDF)

Пигментный фактор эпителиального происхождения обладает выраженным антиапоптотическим, нейротрофным и антиангиогенным эффектом. PEDF изначально был идентифицирован в пигментном эпителии сетчатки глаза, но практически одновременно он был выделен из культуры фибробластов лёгочной ткани. Антиангиогенная активность PEDF заключается в прямом ингибировании активности VEGF [45; 176]. Заметное уменьшение уровня VEGF и значительное увеличение концентрации пигментного фактора эпителиального происхождения в лёгких отмечалось в модели БЛД у мышей, которые были подвержены длительной гипероксии на этапе формирования альвеол [65; 96; 134].

Пигментный фактор эпителиального происхождения или фактор дифференцировки пигментного эпителия играет роль в формировании не только БЛД, но и ретинопатии недоношенных, при которой дисбаланс про- и антиангиогенных факторов также играет ведущую роль [176]. Генетическая составляющего данного фактора изучена недостаточно, но приведенные данные служат подтверждением его значимости в развитии новой формы БЛД и требуют дальнейшего изучения.

Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF)

MIF обладает множественным действием:

- относится к провоспалительным цитокинам,
- является проангиогенным фактором (активирует VEGF),
- стимулирует продукцию IL-8 и образование эндотелиальной трубки [63].

MIF индуцирует продукцию цитокинов макрофагами и стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов [5; 56]. Фактор, ингибирующий миграцию

макрофагов, продуцируется в макрофагах лёгочной ткани, эпителиальных клетках, выстилающих дыхательные пути, и эндотелиоцитах. Было выявлено, что концентрация MIF значительно выше у недоношенных детей с РДСН [5; 78; 116]. Prencipe и соавт. обнаружили, что экспрессия MIF была увеличена в легких и сыворотке недоношенных детей, а аллель *MIF* -173*C был связан с более низкой частотой БЛД и может быть фактором защиты от данной патологии [154].

Фактор роста соединительной ткани (CTGF)

Ген *CTGF* кодирует фактор роста соединительной ткани – одно из важнейших звеньев ангиогенеза. Уникальная молекулярная структура фактора роста соединительной ткани позволяет ему связывать различные факторы роста, такие как трансформирующий фактор роста-β, сосудистый эндотелиальный фактор роста и др. [67]. CTGF является фактором, регулирующим пролиферацию, продукцию внеклеточного матрикса посредством связывания с TGF-β. Учитывая, что CTGF способен связываться с сосудистым эндотелиальным фактором роста, становится очевидной его мощная антиангиогенная функция [110]. Помимо антиангиогенной активности этого фактора, описана его роль в адгезии, миграции и пролиферации эндотелиальных клеток [6; 67]. В настоящее время доказана гиперэкспрессия *CTGF* в альвеолоцитах II типа, вызывающего ремоделирование сосудов и приводящий к легочной гипертензии. Ингибирование CTGF моноклональным антителом CTGF улучшает альвеоляризацию и развитие сосудов, а также снижает ремоделирование легочных сосудов и легочную гипертензию, вызванную гипероксией. CTGF может быть новой мишенью для терапии БЛД у недоношенных детей. CTGF необходим для нормального развития легких. По данным нескольких исследований, ткани легких младенцев с БЛД демонстрируют повышенную экспрессию CTGF [34; 191]. Повышенная экспрессия CTGF, вызванная гипероксией, воспалением и механической вентиляцией, может нарушить альвеологенез и формирование капилляров, а также вызвать фиброз в критический период развития альвеол [200].

Сверхэкспрессия CTGF в альвеолярных эпителиальных клетках II типа нарушает альвеолизацию и развитие сосудов, что может привести к ремоделированию легочных сосудов [62].

Опираясь на результаты исследований, можно сделать вывод, что современная модель пациента с бронхолегочной дисплазией претерпела значительные изменения за последние 10 лет. Недоношенность стала главным прогностическим фактором развития данной патологии, но другие предикторы остаются не до конца изученными. В связи с этим, одной из задач исследования является создание современной модели пациента с новой формой БЛД. Помимо клинической составляющей, молекулярно-генетические предикторы также выходят на первый план в прогнозировании формирования бронхолегочной дисплазии на этапе респираторного дистресс-синдрома новорожденных.

Поиск новых нуклеотидных вариантов позволит своевременно профилактировать развитие БЛД в неонатальном периоде с помощью коррекции терапии в зависимости от наличия генетических предикторов патологии.

Необходимость изучения клинико-генетической предикции развития новой формы бронхолегочной дисплазии, и создание современного клинического портрета пациента с данной формой заболевания определили главные цели нашего исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, Фисенко Андрей Петрович), в отделении патологии новорождённых детей (заведующая отделением – кандидат медицинских наук Басаргина Милана Александровна) и Центре фундаментальных исследований в педиатрии (начальник – доктор биологических наук Савостьянов Кирилл Викторович).

2.1. Дизайн исследования. Критерии включения и исключения пациентов из исследования

На первом этапе исследования проводился ретроспективный анализ 600 историй болезни пациентов с классической и новой формами БЛД, обследованных в отделении патологии новорожденных детей ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России за 8-летний период (2012-2019 гг.).

На втором этапе проанализировано 259 историй болезни пациентов с новой формой БЛД, и проведено проспективное наблюдение за 100 недоношенными детьми первого полугодия жизни, которые вошли в исследование.

В группу сравнения вошли 70 пациентов с РДСН в анамнезе, не сформировавших БЛД.

Всего проанализировано 929 историй болезни пациентов с РДСН в анамнезе за 10-летний период (2012-2021 гг.).

У 170 детей, включенных в проспективный этап исследования, проведен клинико-анамнестический анализ и взят биологический материал (буккальный соскоб или пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге) для генетического исследования.

На третьем этапе исследования было проведено массовое параллельное секвенирование полного экзома с последующим биоинформатическим анализом у 100 пациентов с новой формой БЛД.

С целью определения различий в частотах аллелей в группе пациентов с новой формой БЛД (n = 100) по сравнению с группой пациентов, не сформировавших данное заболевание (n = 70), на четвертом этапе исследования была проведена ПЦР в режиме реального времени в двух группах.

На пятом этапе мы сопоставили клинико-анамнестические и молекулярно-генетические предикторы развития новой формы БЛД и разработали шкалу прогнозирования развития заболевания у недоношенных детей.

Дизайн исследования представлен на рис. 2.1.

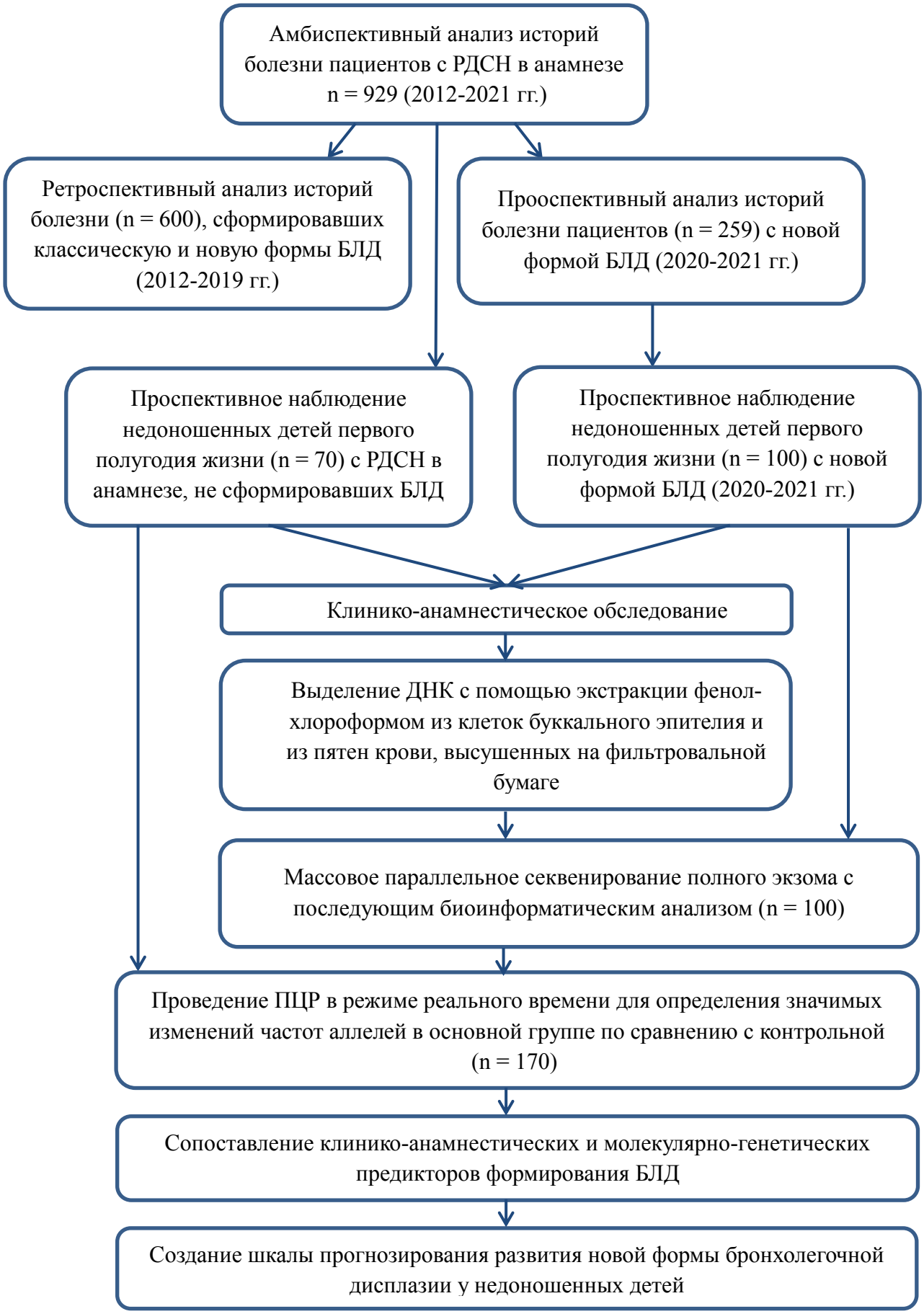


Рисунок 2.1. Дизайн исследования

Согласно определению Vermont Oxford Neonatal Network, респираторный дистресс-синдром диагностируется у детей с PaO2 <50 мм рт. ст. при комнатном воздухе, при наличии центрального цианоза при комнатном воздухе или при необходимости в дополнительном введении кислорода для поддержания PaO2 >50 мм рт. ст., а также при наличии классической рентгенологической картины при проведении рентгенографии органов грудной клетки [19].

Согласно принятой в России классификации клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей, к критериям диагностики бронхолёгочной дисплазии относятся [26]:

- клинические: ИВЛ на первой неделе жизни и/или респираторная терапия с постоянным положительным давлением в дыхательных путях через носовые катетеры; терапия кислородом более 21% в возрасте 28 дней и старше; дыхательная недостаточность, бронхиальная обструкция в возрасте 28 дней и старше, зависимость от кислорода, развивающаяся при проведении кислородотерапии (ИВЛ, NCPAP).
- рентгенологические: интерстициальный отек, чередующийся с участками повышенной прозрачности легочной ткани, фиброз, лентообразные уплотнения.

По форме различают: БЛД доношенных, БЛД недоношенных (классическую и новую формы). Классическая форма развивается у недоношенных детей, у которых не применялись препараты сурфактанта для профилактики респираторного дистресс-синдрома, имели место «жесткие» режимы ИВЛ. Рентгенологически характерны: вздутие легких, фиброз, буллы. Новая форма развивается у детей с гестационным возрастом <32 недель, у которых применялись препараты сурфактанта для профилактики респираторного дистресс-синдрома, а респираторная поддержка была щадящей.

Рентгенологически характерно гомогенное затемнение легочной ткани без ее вздутия.

Критерии включения в исследование:

- недоношенные дети с РДСН в анамнезе, сформировавшие БЛД среднетяжелой и тяжелой степени и не сформировавшие БЛД
- гестационный возраст ребенка при рождении менее 37 недель
- возраст ребенка на момент обследования не более 6 месяцев
- подписанное информированное согласие родителей/законных представителей на проведение генетического исследования у их ребенка

Критерии исключения из исследования:

- наличие у ребенка врожденного порока сердечно-сосудистой или бронхолегочной систем, муковисцидоза, врожденного стридора
- доношенные дети
- отказ родителей/законных представителей от участия их ребенка в исследовании

2.2. Клинико-анамнестическая характеристика недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию

Подробно изучены клинико-анамнестические данные пациентов (гестационный возраст при рождении, масса и длина тела при рождении, оценки по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительность кислородозависимости, длительность и виды респираторной поддержки и дополнительной оксигенации, осложнения и сопутствующая патология), ретроспективный анализ историй болезни, акушерско-гинекологического анамнеза матери.

В исследование включено 170 недоношенных детей первого полугодия жизни с респираторным дистресс-синдромом новорожденных.

Основная группа включала 100 детей, развивших новую форму бронхолегочной дисплазии среднетяжёлого и тяжелого течения. Гестационный возраст пациентов при рождении не превышал 32 недель.

В группу контроля входили 70 недоношенных детей, перенёсших РДСН, но не сформировавших БЛД. Гестационный возраст при рождении у пациентов контрольной группы не превышал 37 недель гестации.

Все пациенты, включенные в исследование, получили комплексное клинико-инструментальное обследование. Обследование инструментальными методами включало в себя нейросонографию, эхокардиографию на аппарате Logiq (General Electric, США). Оценка рентгенологических признаков структурных изменений респираторной системы проводилась методом мультислайсовой компьютерной томографии органов грудной клетки в фазе физиологического или медикаментозного сна на мультиспиральном компьютерном томографе «Aquilion» фирмы TOSHIBA.

Во время госпитализации детям, после получения письменного информированного согласия родителей или законных представителей на проведение генетического исследования у их детей, был взят соскоб буккального эпителия, либо капиллярная кровь на фильтровальную бумагу. Далее была выделена ДНК фенол-хлороформным методом, с последующим проведением полноэкзомного секвенирования и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

2.3. Методы исследования

Для решения поставленных в работе задач были использованы следующие методы:

1. Анализ динамики соотношения больных с классической и новой формами бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей за 10-летний период по данным отделения патологии новорожденных детей ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России
2. Клинико-лабораторное обследование детей согласно протоколу ведения пациентов с БЛД
3. Сбор и анализ анамнестических и клинических данных пациентов

4. Выделение ДНК с помощью экстракции фенол-хлороформом из клеток буккального эпителия и из пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге
5. Массовое параллельное секвенирование полного экзома
6. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
7. Статистический анализ полученных данных.

2.3.1. Амбиспективный анализ данных медицинской документации за период 2012–2021 гг.

В настоящем исследовании представлен ретроспективный анализ данных медицинской документации за период 2012–2019 гг. Проанализировано 369 историй болезни детей с новой формой БЛД и 231 история болезни детей с классической формой заболевания. Проспективно проанализировано 259 историй болезни (2020–2021 гг.). Определено процентное соотношение частоты развития классической и новой форм БЛД по годам за 10-летний период (2012–2021 гг.).

2.3.2. Выделение ДНК методом фенол-хлороформом экстракции из клеток буккального эпителия и пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге

Выделение ДНК было проведено методом экстракции фенол-хлороформом из образцов буккального соскоба или сухих пятен крови. Для этого к образцу материала, добавляли 300 мкл буферного раствора (10 мМ TrisHCl (pH = 8,0), 0,32 М сахароза, 10 мМ ЭДТА, 0.1М NaCl, 0,1%–ный тритон X–100), добавляли ДТТ, ДСН и фермент протеиназу-К в конечной концентрации 0,2%. Затем инкубировали либо при 37°С в течение ночи, либо 2 ч при температуре 60°С. Экстракцию ДНК проводили путём последовательной обработки фенолом, затем смесью фенол/хлороформ (1:1) и хлороформом (дважды на каждой стадии). Перенесённые образцы промыли двумя объёмами охлаждённого 96%- го этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия с

последующей инкубацией при температуре –70°С. Полученный осадок ДНК промывали 80%–м этанолом, высушить на воздухе до полного испарения спирта, и растворяли в 30 или 50 мкл бидистиллированной воды. Препараты ДНК хранили при –70°С. Качество и количество выделенной геномной ДНК оценено при помощи спектрофотомера NanoVue (GE Healthcare, США), а также флуориметрически с использованием флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen, США).

2.3.3. Массовое параллельное секвенирование полного экзома

Для поиска редких нуклеотидных вариантов всем пациентам было проведено массовое параллельное секвенирование полного экзома с последующим биоинформатическим анализом. Для этого дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) из клеток буккального эпителия была выделена с помощью фенол-хлороформной экстракции. Для создания библиотек и обогащения целевыми регионами (экзом) использовали набор реактивов Ion AmpliSeq Library Kit и панель Ion AmpliSeq Exome. При помощи пакета программ Torrent Suite, полученные прочтения триммировали, картировали на геном (hg19), проводили поиск генетических вариантов и их аннотацию.

Поиск новых генов, потенциально вовлеченных в патогенез БЛД, проводился по следующему алгоритму: все генетические варианты фильтровали по качеству и глубине чтения (QD>3), частоте минорного аллеля в популяции (MAF < 0.01 по GnomAd (Genome Aggregation Database) 2.1 [10]), эффекту на белок (Moderate или High по SnpEff [68] и Deleterious по Poliphen [31] или Sift [148]). Затем выбирали те гены, в которых было как минимум 2 подобных варианта, которые встречались более чем в 2-х аллелях среди всей основной выборки. Полученный список генов использовался как test list в программе Toppgene [60] – алгоритме предсказания возможных связей между генами, основанному на анализе их функций. В качестве обучающего списка

генов были использованы гены, связь которых с БЛД была показана ранее [3; 5; 20; 38; 77; 130; 135; 140; 163; 182].

На следующем этапе исследования было проведено сравнение встречаемости генетических вариантов в генах, ранее ассоциированных с БЛД и выбранных в данном исследовании, у пациентов с БЛД по сравнению с контрольной выборкой. Контрольная выборка состояла из 68 пациентов из Центрального и Северо-Западного федеральных округов Российской Федерации, у которых не было заболеваний бронхолёгочной системы. Массовое параллельное секвенирование генетического материала всех пациентов осуществлялось при помощи Ion S5 System Thermo Fisher Scientific с использованием одинаковых реактивов. Частоты аллелей у двух выборок сравнивались при помощи точного критерия Фишера.

2.3.4. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Амплификацию участков исследуемых генов проводили с использованием метода ПЦР в режиме реального времени на термоциклере “ABI StepOnePlus” («Applied 47 Biosystems», США) в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ буфер Трис-HCl, pH 8.8, 16.6 мМ сульфат аммония, 0.01%-ный Твин-20, 2 мМ хлорид магния, 200 нмоль каждого dNTP, 500 нмоль праймеров («Евроген», Россия), 250 нмоль флуоресцентных зондов («ДНК-Синтез», Россия), 1.5 ед. Taq ДНКполимеразы («Евроген», Россия), 50-100 нг геномной ДНК.

Условия ПЦР: 95°С/2 мин – 1-й цикл; 94°С, 10 с, 54-66°С, 60 с – 40 циклов. Используемые флуоресцентные красители в зондах – FAM (карбоксифлуоресцеин) и HEX (гексахлорофлуоресцеин), а также тушитель флуоресценции – BHQ-1. Обозначения полиморфных маркеров соответствуют принятым в базе данных dbSNP [103]. Последовательности праймеров и Taqman зондов, которые были применены для проведения ПЦР в режиме реального времени образцов пациентов, включенных в исследование, приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Последовательности праймеров и Taqman зондов для проведения ПЦР в режиме реального времени образцов пациентов, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию (n = 170)

Ген	**rs ID**	**Последовательности праймеров**	**Последовательности Taqman зондов**
CPA3	rs12489516	ggttctcattcaacaataga, ggttctcattcaacaataga	ccaCaaTccGtaAaaatagc, ccaCaaTccAtaAaaatagc
PTPN22	rs2476601	cctcaatgaactcctcaa, ctccaaggatagatgatgaa	ccacttcctgtatggacacctgaat, ccacttcctgtacggacacctgaat
COL8A1	COSV53739696	tgcctgcatttaccgccgag, cgtgtacatcacgggctcgtg	caccGgtGggGgcCcca, caccGgtTggGgcCcca
TLR5	rs5744174	cttcctcttcatcacaac, gcagacatatattgtgtgta	cctgactcgttctctggggt, cctgactcgctctctggggt
MMP14	rs1042703	gcactttgaggaacaatc, gggaagctcacttacttc	aagaCccCccCgt, aagaCccAccCgtt
CTGF	rs45488997	gtaccaccgaagatgcag, gctctggatgtgagagtg	ttggctGgaGaaGagGaag, ttggctGgaAaaGagGaag
SFTPA	rs1059046	tctcctttgacaccatctc, cttcctgagtcctgacag	agatgAggGtgAgggc, agatgAggCtgAgggc
AQP7	rs62542745	cctctgttcctggcagtg, gactgtaccgagacgtgtc	ttgTtcTccTggTccgtga, ttgTtcTccCggTccgtga

2.3.5. Методы статистической обработки результатов исследования

С целью накопления информации, ее дальнейшей корректировки и систематизации использовались программы Microsoft Excel 2019 и STATISTICA 10 (StatSoft.Inc). При статистической обработке все переменные имели отличное от нормального распределение, в связи с чем вычислялись медиана и интерквартильный размах (25-й и 75-й перцентили). Исходные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Для проверки характера распределения использовали непараметрический тест Колмогорова-Смирнова. Анализ статистической значимости различий количественных признаков для двух независимых групп применялся U-критерий Манна-Уиттни, критерии рангов Вилкоксона. Для выявления силы и направления корреляционной взаимосвязи двух признаков применялся непараметрический коэффициент корреляции Спирмена (r). Сила связи интерпретировалась при $r<0,25$ как слабая, при $0,25<r<0,75$ как умеренная и при $r>0,75$ – сильная. Относительный риск развития заболевания оценивался с помощью показателя отношения шансов. ОШ = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации; ОШ > 1 как положительную ассоциацию, ОШ < 1 – как отрицательную ассоциацию генетического варианта с заболеванием. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$.

ГЛАВА 3. ДИНАМИКА СООТНОШЕНИЯ ВАРИАНТОВ РАЗВИТИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ НОВОРОЖДЕННЫХ В АНАМНЕЗЕ И ИХ КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

3.1. Динамика соотношения вариантов развития бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в анамнезе

С целью проведения ретро- и проспективной оценки частоты формирования новой формы БЛД было проанализировано 859 историй болезни за период с 2012 по 2021 гг., из них 628 историй болезни детей с новой формой БЛД и 231 история болезни детей с классической формой заболевания на основании анализа данных ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России за 10-летний период (2012-2021 гг.).

В 2012 году отмечалось значительное преобладание классической формы БЛД над новой – 68% (156 детей) против 32% (72 ребенка) соответственно. В 2013 году свои коррективы в изменение этого соотношения (50% классическая форма и 50% новая форма заболевания) внес окончательный переход Российской Федерации на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ, согласно которым медицинскими критериями рождения являются:

1) срок беременности 22 недели и более при массе тела ребенка при рождении 500 г и более (или менее 500 г при многоплодных родах) или в случае, если масса тела ребенка при рождении неизвестна, при длине тела ребенка при рождении 25 см и более;

2) срок беременности менее 22 недель или масса тела ребенка при рождении менее 500 г, или в случае, если масса тела ребенка при рождении неизвестна, длина тела ребенка при рождении менее 25 см - при продолжительности жизни более 168 часов после рождения (7 суток) [1]

Переход Российской Федерации на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ, а также совершенствование методов неонатальной реанимации способствовало превалированию новой формы БЛД над

классической в 2014 году – 65% (57 детей) и 35% (31 ребенок) соответственно. С 2015 по 2017 гг. сохранялось превалирование новой формы над классической (2015 год – 60% и 40%, 2016 год – 57% и 43%, 2017 год – 58,1% и 41,9%).

С 2018 по 2019 гг. отмечался значительный рост количества пациентов с новой формой БЛД – 75% (75 детей из 100 обследованных) и 80% (80 детей из 100 обследованных) соответственно. Количество пациентов с классической формой постепенно уменьшалось, и 2020 год стал первым годом, когда у всех госпитализированных пациентов с БЛД (109 детей) была верифицирована новая форма. Аналогичная картина наблюдалась и в 2021 году (150 детей) (рис. 3.1).

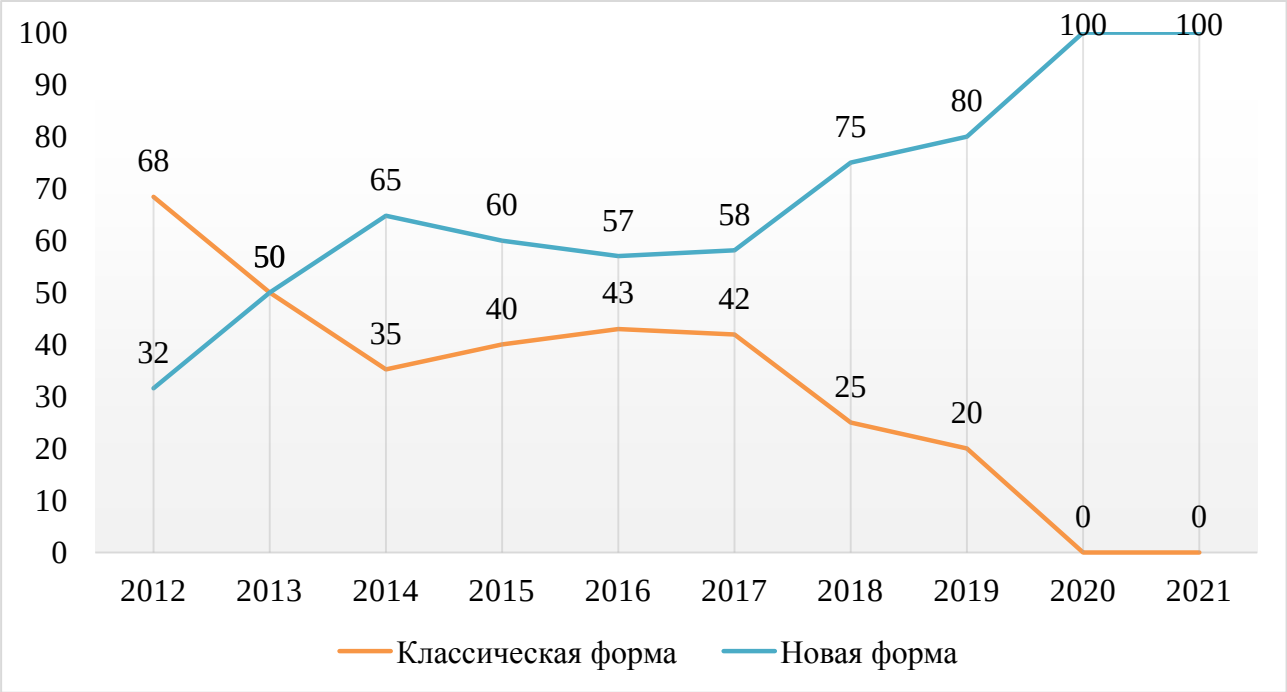


Рисунок 3.1. Динамика соотношения больных с классической и новой формами бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей за 10-летний период

Проведённый ретро- и проспективный анализ частоты встречаемости новой формы БЛД на основании анализа данных за 10-летний период доказывает актуальность исследования клинических особенностей и молекулярно-генетических предикторов патологии. Новая форма заболевания уже сейчас является основной. В дальнейшем этот вариант течения заболевания, несомненно, будет преобладать у детей, рожденных преждевременно и получавших адекватную респираторную поддержку в неонатальном периоде.

3.2. Сравнительная оценка клинико-анамнестических характеристик исследуемых групп

В исследование было включено 170 недоношенных детей. На момент сбора данных возраст ребенка не превышал полугода. У всех детей был установлен диагноз респираторный дистресс-синдром новорожденных. В соответствии с задачами исследования пациенты были разделены на 2 группы: сформировавшие бронхолегочную дисплазию к 28 дню жизни и/или 36 неделе ПКВ (основная группа, n = 100); не сформировавшие бронхолегочную дисплазию (контрольная группа, n = 70), то есть дети, которым респираторная поддержка и дополнительная оксигенация после представленных сроков не требовалась. Из исследования были исключены дети с врожденными пороками сердечно-сосудистой или бронхолегочной систем, врожденным стридором, муковисцидозом, доношенные дети.

В основную группу вошли 100 детей (мальчиков – 52, девочек – 48). В контрольную группу было включено 70 детей, их них мальчиков – 36, девочек – 34.

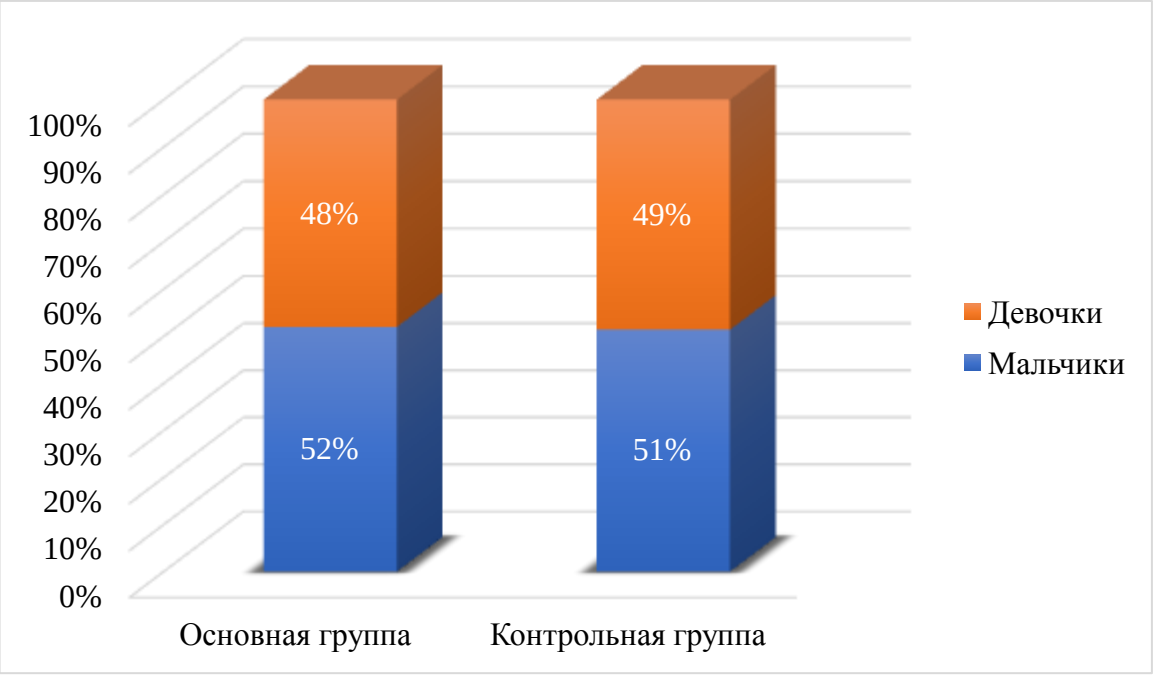


Рисунок 3.2. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по гендерному признаку

На рисунке 3.2 представлено распределение по гендерному признаку. Незначительное преобладание мальчиков как в основной, так и в контрольной группах не дало статистически значимых различий по гендерному признаку в обеих группах (p>0,05).

Распределение детей по гестационному возрасту при рождении в основной группе было следующим:

- от 20 недель до 28 недель 6 дней – 85%
- от 29 недель до 31 недели 6 дней – 15%

Медианный гестационный возраст при рождении – 27 [25;28] недель.

В контрольной группе распределение по гестационному возрасту отличалось от аналогичных показателей в основной группе:

- от 24 недель до 28 недель 6 дней – 14%
- от 29 недель до 31 недели 6 дней – 49%
- от 32 недель до 36 недели 6 дней – 37%

Медианный гестационный возраст при рождении у детей, не сформировавших БЛД, – 31 [29;32] неделя.

Медианный гестационный возраст при рождении у детей основной группы статистически значимо отличается от аналогичного показателя в контрольной группе (p<0,001), что связано с преимущественным формированием БЛД у глубоко недоношенных детей (рис. 3.3).

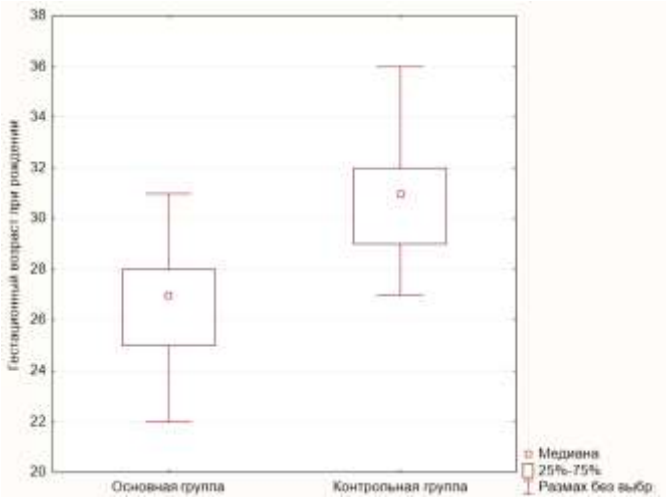


Рисунок 3.3. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по гестационному возрасту при рождении. Примечание: * p<0,001.

Анализ антропометрических данных основной и контрольной групп показывает, что дети, сформировавшие БЛД, были рождены с меньшими показателями массы и длины тела. Медиана средней массы тела при рождении в основной группе – 800 [690;980] г, что является экстремально низкой массой тела (500г - 999г), в контрольной группе – 1426 [1179;1652] г, что относится к категории ОНМТ (1000г - 1499г).

Большинство детей (81%), сформировавших новую форму бронхолегочной дисплазии, имели ЭНМТ (менее 999г) при рождении, остальные дети (19%) родились с ОНМТ (1000г - 1499г) при рождении. В контрольной группе превалировали дети с массой тела от 1000г до 1499г (32 ребенка или 46% детей), 24 ребёнка имели низкую массу тела при рождении - от 1500г до 2500г (34%), остальные родились с ЭНМТ (14 детей или 20% контрольной группы). Данные представлены на рис. 3.4.

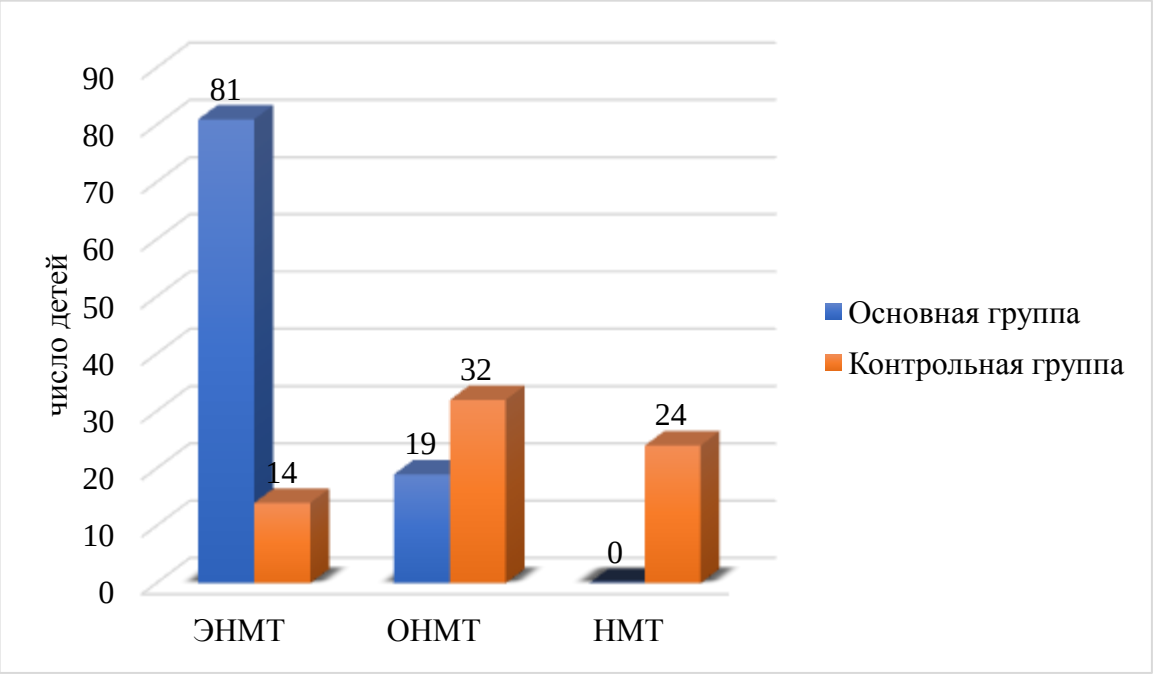


Рисунок 3.4. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по массе тела при рождении. Примечание: * $p<0,001$.

Значения медиан длины тела при рождении в основной и контрольной группах – 32 [30,5;35] см и 39 [37;42] см соответственно, данные представлены

на рис. 3.5. Наименьшие показатели длины тела при рождении отмечены в группе пациентов, сформировавших БЛД.

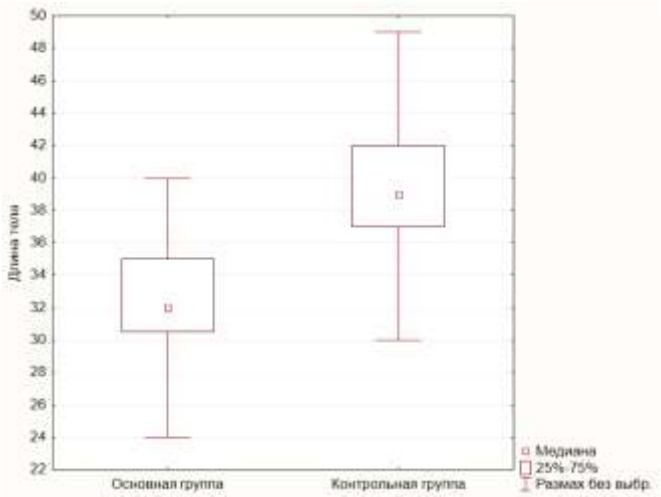


Рисунок 3.5. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по длине тела. Примечание: * p<0,001.

При статистической оценке выявлено достоверное различие значений массы и длины тела при рождении в исследуемых группах (p<0,001), что доказывает связь новой формы БЛД с глубокой недоношенностью и, следовательно, с низкими массо-ростовыми показателями.

У недоношенных детей, сформировавших новую форму бронхолегочной дисплазии, сумма баллов по шкале APGAR не увеличивалась к 5-й минуте после рождения и составляла от 4 до 6 баллов. Доля пациентов, имевших оценку 4-6 баллов на 1-й и 5-й минутах после рождения, составляла 84% и 71% соответственно.

Всем детям основной группы потребовалось эндотрахеальное введение препаратов экзогенного сурфактанта при рождении с целью снижения поверхностного натяжения в альвеолах и предотвращения развития РДСН. Однако даже двукратное введение препаратов сурфактанта (в 24% случаев) не предотвратило развитие данного синдрома у наблюдаемых пациентов.

В контрольной группе более половины пациентов (55%) были оценены от 4 до 6 баллов по шкале APGAR на 1 минуте после рождения. К 5-й минуте после рождения, преобладающей стала оценка по шкале APGAR в 7 баллов и

более (85%). В этой группе введение препаратов сурфактанта применялось в 65% случаев. Данные представлены на рисунках 3.6. и 3.7.

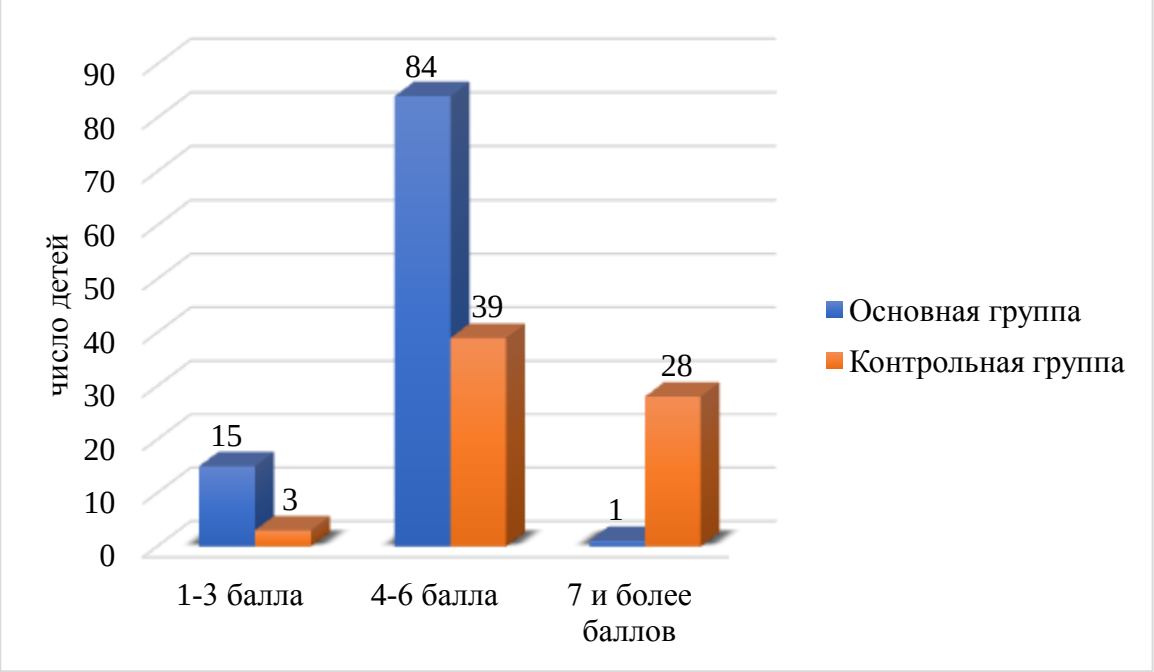


Рисунок 3.6. Оценка по шкале APGAR в группах недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, на 1 минуте жизни.

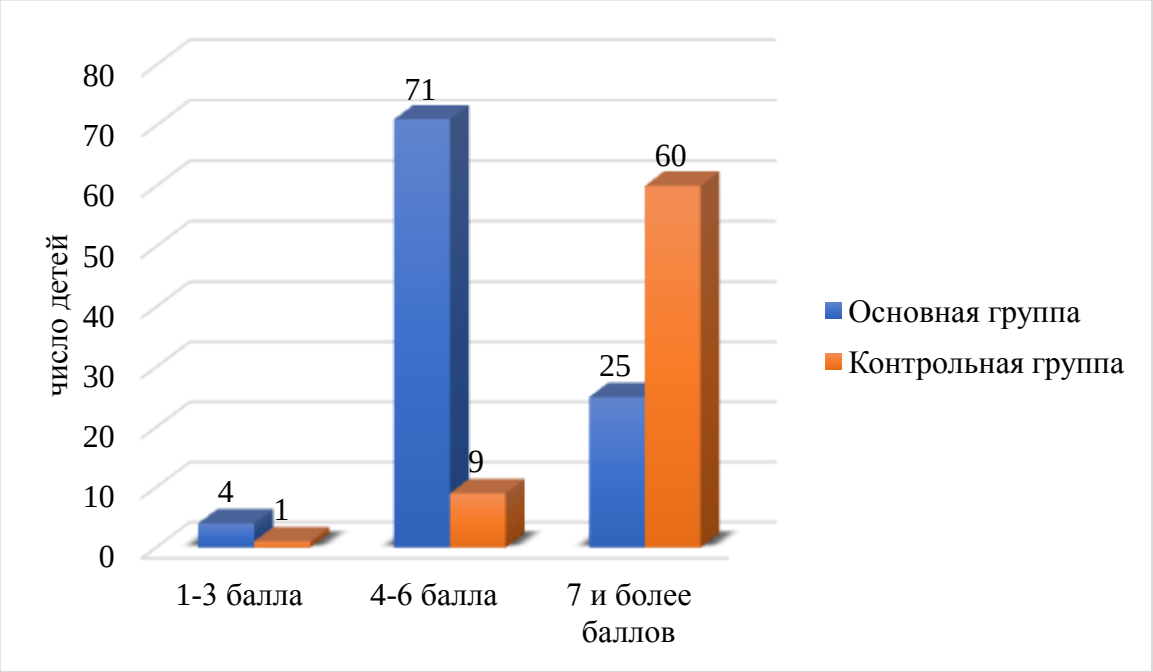


Рисунок 3.7. Оценка по шкале APGAR в группах недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, на 5 минуте жизни.

В исследовании также было проанализировано влияние факторов неблагоприятного течения беременности у матери на формирование бронхолегочной дисплазии у её ребенка (рис. 3.8).

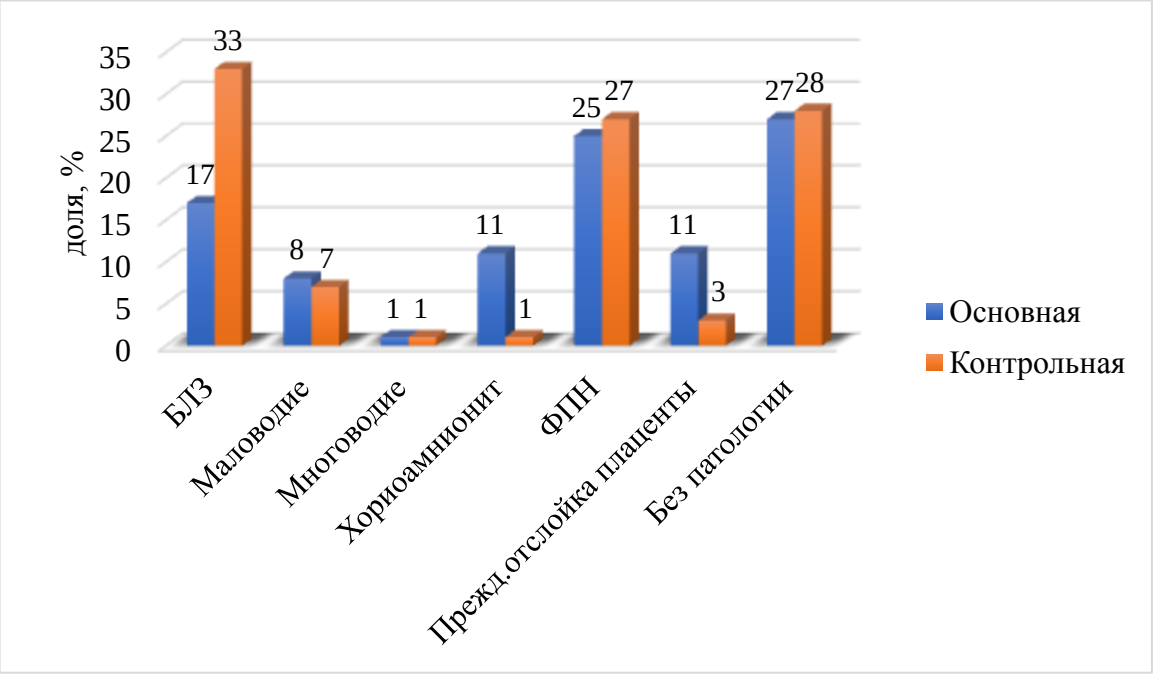


Рисунок 3.8. Частота неблагоприятных факторов, связанных с течением беременности у женщин, родивших детей с РДСН.

При расчете ранговой корреляции Спирмена показано, что связь материнских факторов (хронические бронхолегочные заболевания, маловодие, многоводие, хориоамнионит, фетоплацентарная недостаточность (ФПН), преждевременная отслойка плаценты) с развитием новой формы БЛД у недоношенных детей слабая ($r<0,25$). Данный факт может говорить о том, что вышеперечисленные неблагоприятные факторы, связанные с течением беременности, могут влиять на развитие респираторного дистресс-синдрома у новорождённого ребенка, но не формирование бронхолегочной дисплазии.

Респираторная поддержка была необходима всем детям, как сформировавшим, так и не сформировавшим БЛД, однако вид терапии и ее продолжительность отличались в исследуемых группах. Различные методы респираторной поддержки могли применяться по отношению к одному и тому же пациенту. Традиционная ИВЛ была проведена 95 детям основной группы,

медиана продолжительности составила - 18 [5;34] дней, в то время как в контрольной группе лишь у 3-х пациентов была необходимость в этом методе респираторной поддержки (медиана составила 3 [2;6] дня). Респираторная поддержка методом CPAP была проведена 50 детям из основной группы и 46 детям из контрольной, медиана продолжительности составила – 8 [5;13] дней и 4 [3;7] дня соответственно. Метод Biphasic использовался также в 2-х группах: у 50 детей из 100 в основной группе (медиана продолжительности – 12 [5;19] дней) и у 28 детей из 70 в контрольной группе (медиана продолжительности – 3 [2;7] дня) был применен этот метод. Из видов кислородной поддержки в основной группе можно выделить масочную терапию (n=20), подачу увлажненного кислорода через носовые канюли (n=67) и в кювез (n=25), медиана продолжительности составила 14 дней [11,5;27], 17 дней [8;27] и 19 дней [7;28] соответственно. В контрольной группе также применялись данные виды кислородной поддержки: масочная терапия (n = 22) – медиана продолжительности – 5 [2;17] дней, подача кислорода через носовые канюли (n = 26) - медиана продолжительности – 4 [3;8] дней, и в кювез (n = 1) - медиана продолжительности – 12 [12;12] дней.

Данные представлены на рисунках 3.9. и 3.10. и свидетельствуют о том, что у детей, не сформировавших БЛД, чаще применялись щадящие методы респираторной поддержки, их длительность, также как и длительность дополнительной оксигенации, была существенно меньше.

Медиана общей продолжительности кислородозависимости у детей в основной группе – 49 [37;67] дней, в контрольной – 9 [4;19] дней. Выявлено статистически значимое различие между значениями этого показателя в 2-х группах ($p<0,001$).

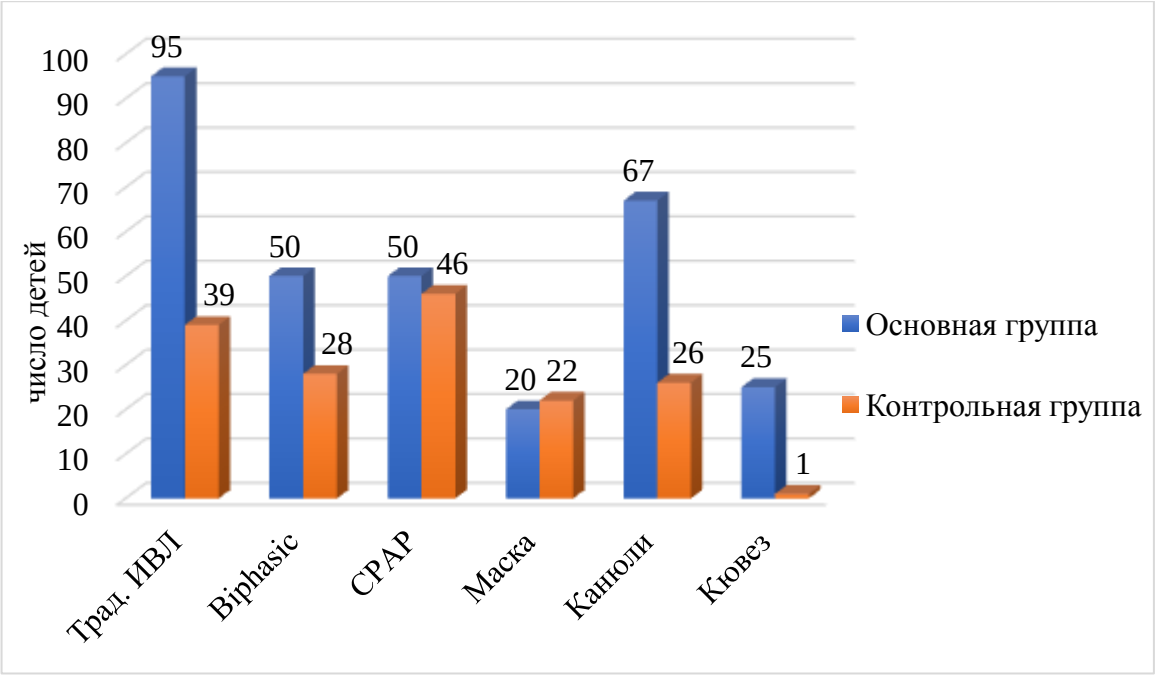


Рисунок 3.9. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по методам респираторной поддержки.

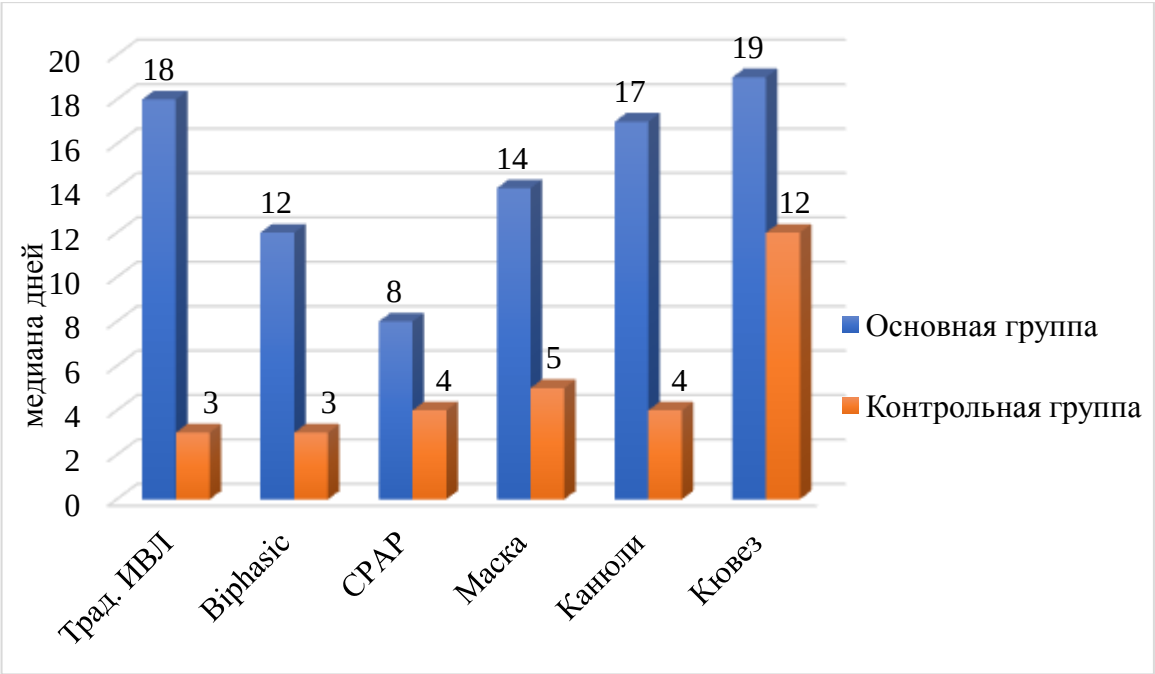


Рисунок 3.10. Распределение продолжительности методов респираторной поддержки у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

При проведении корреляционного анализа были выявлены сильные обратные взаимосвязи между развитием новой формы БЛД и гестационным возрастом, массой и длиной тела при рождении, оценками по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. Длительность кислородозависимости имела прямую сильную связь с формированием БЛД (рис. 3.11).

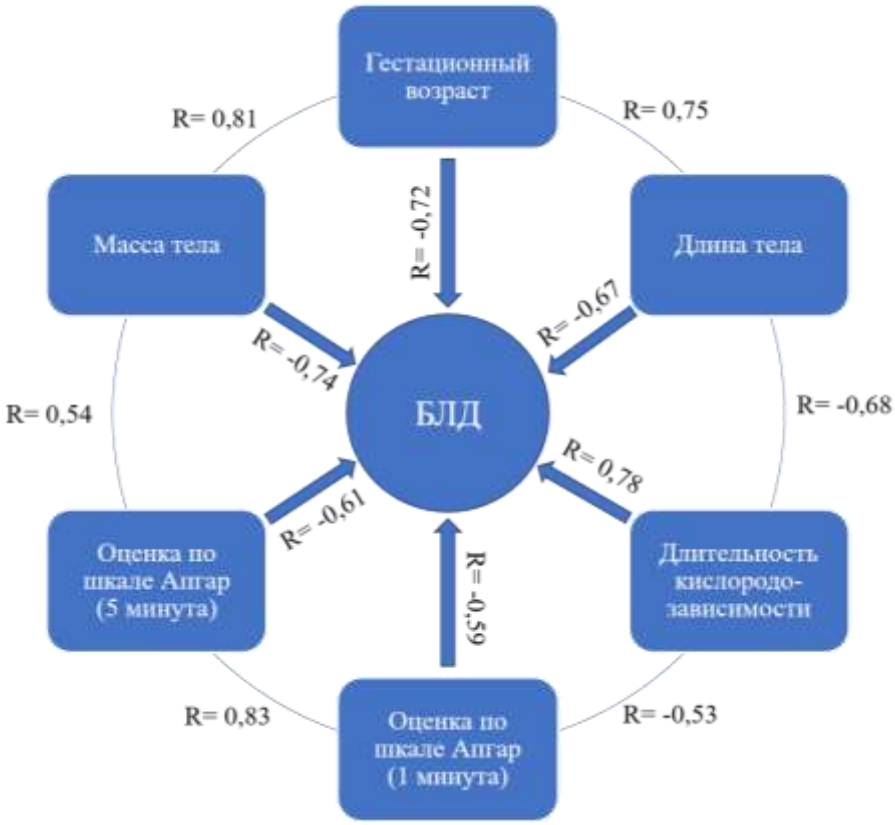


Рисунок 3.11. Взаимосвязи между формированием БЛД, массой, длиной тела и гестационным возрастом при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительностью кислородозависимости ($p<0,05$)

Из 100 пациентов основной группы, только у 7% детей на втором месяце жизни была выявлена легочная гипертензия. В анамнезе более, чем у половины пациентов исследуемой группы (54%) диагностирована врожденная пневмония. Внутрижелудочковые кровоизлияния выявлены у 83 пациентов (83%). В контрольной группе в 69% случаев в анамнезе была диагностирована врожденная пневмония, легочная гипертензия не была диагностирована ни у одного пациента, внутрижелудочковые кровоизлияния выявлены у 13% детей. Данные представлены на рисунке 3.12.

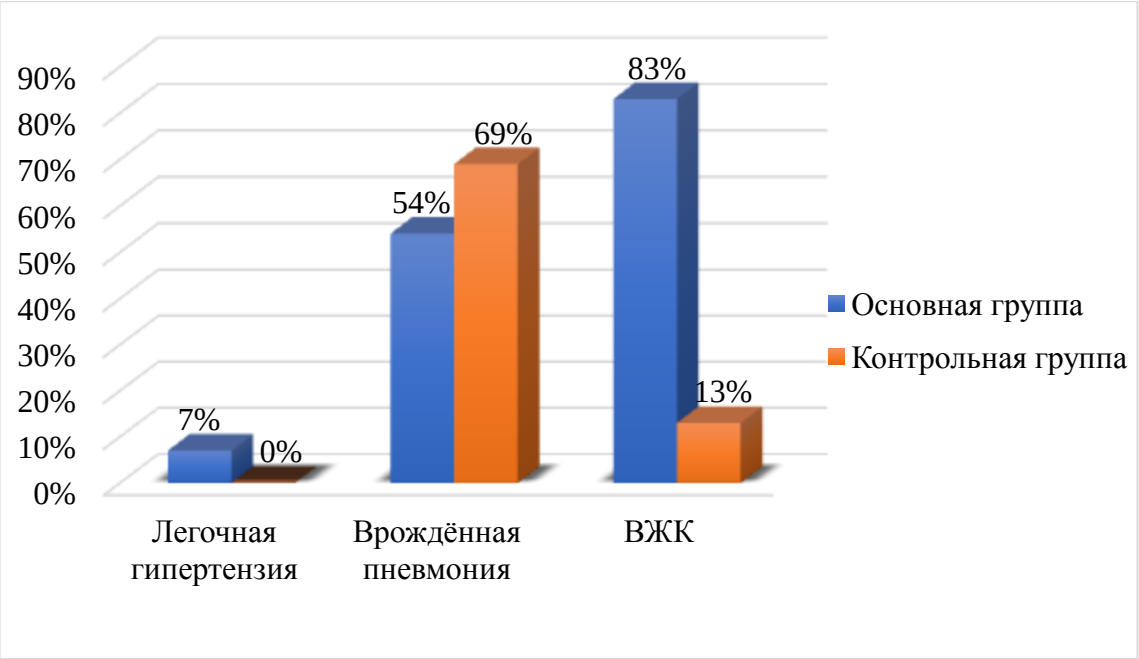


Рисунок 3.12. Распределение частоты встречаемости осложнений и сопутствующих заболеваний у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

Согласно проведенному статистическому анализу с использованием критерия Манна-Уитни были выявлены статистически значимые различия медиан гестационного возраста, массы и длины тела при рождении, а также оценок по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни и длительности кислородозависимости в 2-х группах ($p<0,001$).

На основании этого анализа определена современная модель пациента с новой формой БЛД – это недоношенный ребенок с РДСН, рожденный до 28 недели гестации (на каникулярной или саккулярной стадии развития легких) с ЭНМТ, оцененный по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах после рождения 4-6 баллов, нуждающийся во введении препаратов сурфактанта и длительной респираторной поддержке с применением традиционной ИВЛ, а далее поэтапно - CPAP/Biphasic с дополнительной оксигенацией. У таких пациентов в более, чем 80% случаев будет диагностировано ВЖК, и с вероятностью более 50% будет отмечена врожденная пневмония в анамнезе. Как правило, эти пациенты требуют коллегиального ведения с привлечением профильных специалистов в связи с сочетанными последствиями перинатальной патологии.

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЧАСТОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ, У ДЕТЕЙ, СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ БРОНХОЛЕГОЧНУЮ ДИСПЛАЗИЮ

4.1. Результаты проведения полноэкзомного секвенирования у пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию

По мере развития технологий молекулярно-генетической диагностики, в том числе NGS-технологий, наблюдается неуклонный рост интереса к выявлению предикторов многофакторных заболеваний. Поиск предикторов бронхолегочной дисплазии ведется более 20 лет, однако именно возможность использования технологии полноэкзомного секвенирования с целью выявления нуклеотидных вариантов, предрасполагающих к формированию БЛД или предотвращающих её развитие, стала доступна только в последнее время и на небольших выборках пациентов [5; 115; 125; 127; 129].

В данной научной работе мы провели полноэкзомное секвенирование 100 пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию. На первом этапе исследования в результате проведения полноэкзомного секвенирования и приоритезации генов, исходя из статистической значимости были выбраны 17 генов, которые потенциально могут участвовать в патогенезе БЛД: *AMH, AQP7, ARHGEF11, AUP1, GALR2, HTRA2, HYAL3, MAPK8IP3, TTN, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10.* Среди генов, описанных ранее в исследованиях, посвящённых бронхолегочной дисплазии, и найденных в рамках данного исследования, нами было отобрано 8 генетических вариантов, частота представленности которых у пациентов с БЛД значимо отличалась от контрольной выборки: rs12489516 (*CPA3*), rs2476601 (*PTPN22*), rs1042703 (*MMP14*), rs5744174 (*TLR5*), COSV53739696 (*COL8A1*), rs45488997 (*CTGF*), rs1059046 (*SFTPA2*), rs62542745 (*AQP7*). Фильтрация генетических вариантов осуществлялась на основании данных о популяционных частотах,

встречаемости в исследуемой и контрольной выборках, а также патогенетической роли в формировании БЛД.

Найденные генетические варианты могут потенциально нарушать работу кодируемых белков, влияя на функционирование следующих систем: сурфактанта; ангиогенеза; иммуновоспалительного ответа; организации внеклеточного матрикса и его деградации; трансмембранного транспорта (таблица 4.1).

Таблица 4.1. Генетические варианты, отобранные в результате проведения массового параллельного секвенирования ДНК пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию

Ген, кодируемый белок	Референсная последователь-ность	Геномная координата (GRCh37)	Частота по GnomAd, %	Нуклеотид-ный вариант	Аминокислот-ный вариант
CPA3, карбоксипептидаза А3	NM_0018704	chr3:148879825	0,08	*c.512C>T*	*p.T171M*
PTPN22, лимфоид-специфическая тирозинфосфатаза	NM_015967.7	chr1:113834946	0,15	*c.1858C>T*	*p.R565W*
COL8A1, а-цепь коллагена VIII типа	NM_020351.4	chr3:99514632	н/д	*c.1887G>T*	-
TLR5, толл-подобный рецептор	NM_003268.6	chr1:223111186	0,5	*c.1846T>C*	*p.F616L*
MMP14, тканевая коллагеназа 14	NM_004995.4	chr14:22836839	0,3	*c.22C>T*	*p.P8S*
CTGF, фактор роста соединительной ткани	NM_001901.3	chr6:131950812	0,008	*c.247G>T*	*p.D83H*
SFTPA2, сурфактантный белок А	NM_001098668.4	chr10:81319184	н/д	*c.56C>G*	*p.A19G*
AQP7, аквапорин 7	NM_001376193.1	chr9:33385817	0,07	*c.575A>G*	*p.Q135R*

Биологическая роль белков, кодируемых потенциально значимыми в формировании БЛД генами, разнообразна. Так, ген *CPA3* кодирует карбоксипептидазу А3, которая является специфической протеазой тучных клеток. Карбоксипептидаза А3 принимает участие в регуляции состояния специфического тканевого микроокружения и компонентов метаболической среды при адаптивных и патологических процессах, затрагивая реализацию врожденного иммунитета, механизмы ангиогенеза, процессы ремоделирования межклеточного матрикса и др. [39]. По данным международной базы Human Gene Mutation Database (HGMD) Professional, версия 2022.1, генетический вариант rs12489516 в гене *CPA3* ранее не описан, однако ассоциация нуклеотидного варианта в этом гене описана у пациентов с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом [164; 201]. Взаимосвязь экспрессии *CPA3* с развитием перечисленных заболеваний обратная, так как карбоксипептидаза А3 ограничивает действие эндотелина – главного сосудосуживающего пептида. С помощью этой протеазы тучные клетки оказывают существенные воздействия на состояние легочной паренхимы и системный кровоток, опосредованно способствуя вазо- и бронходилатации [104;132].

Генетический вариант rs2476601 в гене *PTPN22*, кодирующем лимфоидспецифическую тирозинфосфатазу, по информации из базы данных HGMD, может быть связан с развитием ряда аутоиммунных заболеваний, включающих в себя ревматоидный артрит, системную красную волчанку, сахарный диабет 1 типа, рассеянный склероз, тиреоидит Хашимото, ювенильный ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона, язвенный колит), псориаз, синдром Шегрена. Белок, кодируемый *PTPN22,* регулирует порог активации Т-клеточных рецепторов, участвует в регулировании сигнальной трансдукции, то есть ретранслирует сигналы извне в ядро клетки. Эти сигналы помогают клетке расти, делиться и выполнять специализированные функции [69; 73].

Ген *COL8A1* кодирует одну из альфа-цепей коллагена VIII типа. Несмотря на то, что основная локализация белка, кодируемого геном *COL8A1*,

это базальная мембрана эндотелия роговицы, в исследовании Ling Chen и соавт. доказано наличие этого белка в гладкой мускулатуре дыхательных путей и подтверждена повышенная экспрессия у пациентов с ХОБЛ [61]. В доступной нам отечественной и зарубежной литературе генетический вариант COSV53739696 не описан, однако в исследовании Bhattacharya S. и соавт. описаны другие варианты этого гена в качестве предиктора развития бронхолегочной дисплазии [52].

Мембранный белок – толл-подобный рецептор TLR5, кодируемый геном *TLR5*, участвует в противовоспалительном ответе, в частности, высказывается предположение, что TLR5 играет важную роль в осуществлении ответа врожденного иммунитета в эпителиальных клетках легких [14]. TLR5 необходим для распознавания флагеллина, компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий. У детей, находящихся на аппарате ИВЛ, колонизация трахеи грамотрицательными бактериями была связана с повышенным риском формирования БЛД [71; 130]. Генетический вариант rs5744174 в гене *TLR5* описан в базе HGMD со ссылкой на исследование Christine L. E. Siezen и соавт., у недоношенных детей с бронхиолитом, вызванным респираторно-синцитиальным вирусом, что подтверждает повышенный риск развития инфекции у преждевременно рожденных младенцев [172].

Генетический вариант rs1042703, расположенный в гене *MMP14* в международной базе HGMD ранее не описан, однако роль эндопептидаз подсемейства матриксных металлопротеиназ в формировании бронхолегочной дисплазии доказана в многочисленных отечественных и зарубежных исследованиях [12; 59; 90; 95; 183]. Матриксные металлопротеиназы являются ключевыми эффекторами тканевого ремоделирования, в связи с чем роль тканевой коллагеназы ММП14, функция которой связана с деградацией соединительнотканного матрикса, в формировании БЛД очевидна.

Фактор роста соединительной ткани, кодируемый геном *CTGF*, секретируется эндотелиальными клетками сосудов и играет ведущую роль в

ангиогенезе. Антиангиогенная роль этого фактора доказана ранее, также как и положительная динамика клинических проявлений у пациентов при лечении моноклональным антителом CTGF в связи со снижением ремоделирования легочных сосудов и, соответственно, с уменьшением риска развития легочной гипертензии [191]. Ранее генетический вариант rs45488997 в гене *CTGF* по данным международной базы HGMD не был описан.

Ген *SFTPA2* кодирует поверхностно-активный белок А2, синтезируемый в легочных альвеолярных клетках II типа. Легочный сурфактант необходим для снижения поверхностного натяжения в альвеолах и предотвращения коллапса во время выдоха. Белковый компонент сурфактанта задействован в модуляции врожденного иммунного ответа и воспалительных процессов. Ассоциация генетического варианта rs1059046, выявленного в исследовании, с развитием бронхолегочной дисплазии, ранее не описана, однако ассоциация генетического варианта rs721917 в гене *SFTPD*, кодирующем сурфактантный белок D, с развитием РДСН и БЛД описана в исследовании Kelli K. Ryckman и соавт. [162].

Аквапорины (AQP) – водные каналы, играют важную роль в транспорте воды и поддержании водного баланса. AQP активны в раннем постнатальном периоде, так как одной из ведущих функций является удаление жидкости из легочной ткани [7]. Ген *AQP7* кодирует аквапорин 7 типа, который локализуется на плазматической мембране и обеспечивает перемещение воды, глицерина и мочевины через клеточные мембраны. Ассоциация генетического варианта rs62542745 гена *AQP7* с развитием БЛД не описана, однако взаимосвязь нарушения работы авквапоринов других типов (1, 3, 4 и 5 типов) с формированием респираторного дистресс-синдрома и бронхолегочной дисплазии описана в исследовании Marina Zelenina и соавт. [205].

4.2. Результаты проведения ПЦР в режиме реального времени у пациентов, сформировавших и не сформировавших новую форму бронхолегочной дисплазии

Для определения различий в частотах аллелей между основной контрольной группами была проведена ПЦР в режиме реального времени.

Из 8 генетических вариантов, отобранных в результате проведения полноэкзомного секвенирования, генетические варианты rs12489516 в гене *CPA3* (98.5% в основной группе; 93,5% в контрольной группе) и rs45488997 в гене *CTGF* (4% в основной группе; 0,1% в контрольной группе) показали статистически значимые различия ($p<0,05$) частот аллелей в основной группе по сравнению с контрольной.

Для оставшихся 6 генетических вариантов rs2476601 гена *PTPN22*, кодирующего лимфоидспецифическую тирозинфосфатазу, rs1042703 гена *MMP14*, кодирующего тканевую коллагеназу, rs5744174 гена *TLR5*, кодирующего мембранный белок, входящий в семейство толл-подобных рецепторов, COSV53739696 гена *COL8A1*, кодирующего одну из двух альфа-цепей коллагена VIII типа, rs1059046 гена *SFTPA2*, кодирующего сурфактантный белок А, rs62542745 гена *AQP7*, кодирующего белок группы аквапоринов, не было найдено статистически достоверных различий в относительных частотах аллелей в 2-х исследуемых группах детей.

4.3. Результаты количественного описания связи генетических вариантов, показавших статистически значимые различия частот аллелей у детей, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию

Для количественного описания связи между развитием БЛД и выявленными 2-мя нуклеотидными вариантами rs12489516 в гене *CPA3* и rs45488997 в гене *CTGF* было рассчитано отношение шансов (ОШ). В результате получены следующие данные:

- представленность генетического варианта rs45488997 в гене *CTGF* превалировала у пациентов, сформировавших БЛД. Данный

нуклеотидный вариант можно отнести к факторам, способствующим формированию заболевания. Шансы развития бронхолегочной дисплазии у пациентов с выявленным генетическим вариантом выше в 1,5 раза (ОШ = 1,5, (ДИ95%[1.075; 5.184])).

- представленность генетического варианта rs12489516 в гене *CPA3* превалировала у пациентов из контрольной группы, в связи с чем данный нуклеотидный вариант можно отнести к защитным факторам, предотвращающим формирование заболевания. Шансы сформировать БЛД у пациентов с данным генетическим вариантом ниже в 4,5 раза (ОШ = 0,22; (ДИ95%[0.048; 0.901])).

Полученные результаты генетического исследования могут указывать на участие фактора роста соединительной ткани в развитии бронхолегочной дисплазии, следовательно, и терапия моноклональным антителом CTGF, которое ингибирует выработку этого фактора, может иметь положительные результаты у пациентов с высоким риском формирования заболевания [191].

Карбоксипептидаза А3, выполняющая протективную и гомеостатическую функцию, доказала свою значимость для пациентов, не сформировавших БЛД. Выявление генетического варианта rs12489516 у пациента может являться предиктором благоприятного исхода РДСН, позволяющим предотвратить развитие БЛД в неонатальном периоде.

Выявленные клинико-анамнестические факторы риска развития новой формы бронхолегочной дисплазии и генетические варианты, ассоциированные с повышенным и пониженным риском формирования бронхолегочной дисплазии (rs45488997 в гене *CTGF* и rs12489516 в гене *CPA3* соответственно), обосновывают возможность оценки пациентов с респираторным дистресс-синдромом новорожденных согласно предложенной шкале прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей, включающей генетические предикторы.

4.4. Шкала прогнозирования развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей

В исследовании проводилась валидация собственной прогностической шкалы развития новой формы БЛД, включающей 7 параметров. Оценка от 0 до 3 баллов соответствует высокому риску развития новой формы БЛД, от 4 до 7 баллов – низкому. Проверку достоверности модели производили на основной (n=100) и контрольной группах пациентов (n=70). Чувствительность разработанной шкалы составила 92%, специфичность – 94%.

Таблица 4.2. Шкала прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей

Факторы	**0 баллов**	**1 балл**
Гестационный возраст при рождении	≥ 29	< 29
Масса тела	≥ 1080 г.	< 1080 г.
Длина тела	> 36 см.	≤ 36 см.
Оценка по шкале APGAR на 1 минуте	≥ 6	< 6
Оценка по шкале APGAR на 5 минуте	≥ 7	< 7
Наличие rs12489516 (*CPA3*)	да	нет
Наличие rs45488997 (*CTGF*)	нет	да

Оценка **0-3 балла** соответствует **низкому** риску формирования БЛД

Оценка **4-7 баллов** соответствует **высокому** риску формирования БЛД

Результаты оценки представлены в клинических примерах.

Клинический пример №1

Ребенок Н., 2 месяца.

Родился у женщины 25 лет; беременность 2, роды 2 (1 беременность – экстренное кесарево сечение на 32 неделе гестации).

Течение беременности: 1 триместр – угроза прерывания, ретрохориальная гематома; 2 триместр – нарастание титра антиэритроцитарных антител к 25 неделе, анемия плода.

Течение родов: 2 экстренные, оперативные на 26 неделе гестации.

Масса тела при рождении – 660 г, длина тела при рождении – 34 см. Оценка по шкале APGAR 1/3 баллов.

Состояние после рождения крайне тяжелое за счет дыхательной недостаточности, неврологической симптоматики. В родильном зале проведена интубация трахеи, эндотрахеально введен адреналин. На 14-й минуте жизни введён препарат экзогенного сурфактанта с целью профилактики РДСН. После стабилизации состояния был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии новорождённых, продолжена ИВЛ. В течение месяца нахождения в ОРИТ сохранялась потребность в жестких параметрах вентиляции, потребность в высоких концентрациях кислорода, проводилась инсуффляция оксида азота с целью купирования легочной гипертензии. На 37 сутки жизни начата терапия БЛД дексаметазоном. В связи с выраженной дыхательной недостаточностью на фоне респираторного дистресс-синдрома новорожденных ребенок находился на аппарате ИВЛ в течение 43 суток жизни, респираторная поддержка методом BIPAP проводилась 13 суток, подача увлажненного кислорода через лицевую маску – на протяжении 6 суток. С 62 суток жизни ребёнок на самостоятельном дыхании.

Была выполнена МРТ головного мозга, выявлено диффузное ишемическое поражение вещества незрелого головного мозга; внутрижелудочковое кровоизлияние 3 степени. Проведена консультация офтальмолога – ретинопатия, 2 степень, активная.

В возрасте 2 месяца 20 дней выписан домой с диагнозом: Бронхолегочная дисплазия тяжёлой степени, новая форма. Крайняя незрелость 26 недель. Внутрижелудочковое кровоизлияние 3-й степени. Ретинопатия недоношенных. Умеренная белково-энергетическая недостаточность.

У этого пациента был взят буккальный соскоб для дальнейшего выделения ДНК фенол-хлороформным методом, выполнения полноэкзомного секвенирования и ПЦР в режиме реального времени. По результатам молекулярно-генетического исследования был выявлен генетический вариант rs45488997 в гене *CTGF*. В нашем исследовании показано, что данный генетический вариант ассоциирован с развитием новой формы БЛД у недоношенных детей (ОШ = 1,5).

При оценке по предложенной нами шкале, пациент в этом клиническом примере имеет 6 баллов из 7, имел высокий риск развития новой формы БЛД и сформировал данное заболевание.

Клинический пример №2

Ребенок С., 2 месяца.

Родился у женщины 22 лет; беременность 1, роды 1.

Течение беременности: 1 триместр – кольпит; 2 триместр – угроза прерывания в 22 недели, умеренное маловодие.

Течение родов: 1, оперативные на 31 неделе гестации.

Масса тела при рождении – 990 г, длина тела при рождении – 36 см. Оценка по шкале APGAR 6/7 баллов.

Состояние после рождения тяжелое за счет дыхательной недостаточности. В родильном зале начата терапия CPAP, к концу 2-го часа жизни введен препарат сурфактанта. На 6 сутки жизни, учитывая положительную динамику, респираторная терапия CPAP отменена и ребенок переведен на подачу увлажненного кислорода через носовые канюли. Общая продолжительность кислородозависимости – 15 дней.

В связи с синдромом цитолиза, заподозрена цитомегаловирусная инфекция. При проведении ПЦР выявлен высокий титр цитомегаловируса в слюне и крови, начата специфическая терапия.

Проведена консультация офтальмолога – ретинопатия недоношенных, 2 степень, активная.

В возрасте 2 месяца 22 дней выписана домой с диагнозом: Врожденная цитомеголовирусная инфекция. Крайняя незрелость 31 неделя. Ретинопатия недоношенных. Тяжелая белково-энергетическая недостаточность.

У пациента также был взят буккальный соскоб для проведения аналогичных этапов молекулярно-генетического исследования. Был выявлен генетический вариант rs12489516 в гене *CPA3*. В нашем исследовании показано, что данный генетический вариант является предиктором благоприятного исхода РДСН у недоношенных детей (ОШ = 4,5).

При оценке по предложенной нами шкале, пациент во втором клиническом примере имел 3 балла из 7, что соответствует низкому риску развития новой формы БЛД. Пациент С. не нуждался в дополнительной оксигенации к 16 дню жизни и не сформировал БЛД.

Данные клинические примеры показывают актуальность и необходимость молекулярно-генетической диагностики новой формы бронхолегочной дисплазии в неонатальном периоде. Несмотря на сопоставимые массо-ростовые показатели и низкий гестационный возраст при рождении в обоих клинических случаях, ребёнок из первого примера сформировал БЛД, во втором случае – нет. Проведение генетического прогнозирования помогло бы в раннем постнатальном периоде определить наличие факторов риска развития новой формы бронхолегочной дисплазии и скорректировать план терапии в соответствии с полученными результатами.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бронхолегочная дисплазия является самым частым хроническим заболеванием легких у грудных детей [5; 183]. Технологии выхаживания младенцев и реанимационные стратегии непрерывно совершенствуются, давая возможность сохранения жизни маленьким пациентам. Последнее десятилетие показывает, что уровень заболеваемости БЛД растет на фоне успехов неонатальной реанимации, поскольку удается стабилизировать состояние значительной части глубоко недоношенных детей за счет применения современных реанимационных стратегий [11].

При прочих равных условиях, в том числе при сопоставимом гестационном возрасте и массо-ростовых показателях при рождении, а также при наличии РДСН в неонатальном периоде, недоношенные дети могут сформировать или не сформировать БЛД за счет генетических особенностей, отражающихся на функционировании разных систем организма. Выявление предикторов формирования данной патологии имеет огромное значение в прогнозировании и профилактике заболевания в неонатальном периоде. Несмотря на многофакторность БЛД, которая доказана многими отечественными и зарубежными учеными, активный поиск молекулярно-генетических факторов риска ведется сравнительно недавно и этому есть несколько причин. [20; 51; 115; 121]. Ранее считалось, что материнские факторы вносят значительный вклад в формирование БЛД [27; 41; 93; 183]. В нашем исследовании при анализе 6 факторов, связанных с неблагоприятным течением беременности (хронические бронхолегочные заболевания матери, маловодие, многоводие, хориоамнионит, фетоплацентарная недостаточность, преждевременная отслойка плаценты), было выявлено отсутствие статистически значимых различий между этими признаками у женщин, дети которых сформировали и не сформировали заболевание.

Следующей причиной, определяющей значимость настоящего исследования, является увеличение количества пациентов с новой формой БЛД, выявленного по результатам ретро- и проспективного анализа данных ФГАУ «НМИЦ

здоровья детей» Минздрава России за 10-летний период. Принимая во внимание многолетний опыт клиники по ведению пациентов с новой формой бронхолегочной дисплазии, актуальность вопроса о генетической верификации диагноза и оценке клинических особенностей при данном заболевании становится очевидной.

Исследования с использованием NGS в мире проводятся давно, однако на территории РФ подобные данные до настоящего момента отсутствовали у данной категории больных. Технология полноэкзомного секвенирования позволила нам выявить новые, ранее не изученные молекулярно-генетические предикторы БЛД.

Целью нашей работы являлось выявление клинико-генетических предикторов развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей и определение степени их влияния на формирование заболевания.

Работа выполнена в отделении патологии новорождённых детей (заведующая отделением – кандидат медицинских наук Басаргина Милана Александровна) и лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии (руководитель – доктор биологических наук Савостьянов Кирилл Викторович).

В исследование было включено 170 пациентов с РДСН, 100 из которых (основная группа) сформировали БЛД. 70 детей контрольной группы не были кислородозависимы в возрасте 28 суток жизни и/или 36 недель ПКВ и не сформировали данную патологию.

Всего в исследовании проанализировано 929 историй болезни недоношенных детей с РДСН, наблюдаемых в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

В ходе проспективного исследования было изучено 259 историй болезни пациентов с новой формой БЛД и проанализированы их клинико-анамнестические характеристики и 70 историй болезни пациентов, не сформировавших данное заболевание (2020-2021 гг.).

Помимо проспективного исследования, была проведена ретроспективная оценка частоты развития новой формы БЛД на основании анализа 600 историй болезни за период с 2012 по 2019 гг., из них 369 историй болезни детей с новой формой БЛД и 231 история болезни детей с классической формой заболевания. Результаты проведенного анализа, представленные на рис. 3.1, подтверждают роль перехода Российской Федерации на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ в увеличение количества больных с новой формой БЛД [1]. Живорождением стал считаться момент отделения плода от организма матери посредством родов при сроке беременности 22 недели и более при массе тела новорожденного 500 г и более (или менее 500 г при многоплодных родах) или в случае, если масса тела ребенка при рождении неизвестна, при длине тела новорожденного 25 см и более при наличии у новорожденного признаков живорождения (дыхание, сердцебиение, пульсация пуповины или произвольные движения мускулатуры независимо от того, перерезана пуповина и отделилась ли плацента) [22]. Необходимость обеспечения жизнедеятельности недоношенных детей способствовала быстрому развитию методов неонатальной реанимации. Дети с ЭНМТ и ОНМТ оказались в группе риска формирования БЛД, но патогенез отличался от ранее изученного при классической форме заболевания. Таким детям требовалось введение препаратов сурфактанта, так как большинство из них были рождены на каникулярной или саккулярной стадиях развития легких, задолго до завершения морфогенеза и альвеолярной дифференцировки и, соответственно, в отсутствии альвеолоцитов 2 типа, продуцирующих сурфактант. Также им требовались щадящие режимы вентиляции, уменьшающие повреждение незрелой легочной ткани. В исследовании Stoll B.J. и соавт., было показано, что общая заболеваемость новой формой БЛД у детей, рожденных <28 недель гестационного возраста, составляет от 48 до 68% [177; 183].

Изучение современной клинической модели пациента с новой формой БЛД и сравнение ее с характеристиками пациентов, не сформировавших заболевание, являлось одной из главной задач исследования.

Проведена сравнительная гендерная характеристика, обнаружившая незначительное преобладание мальчиков, как в основной (52%), так и в контрольной группах (51%), однако статистически значимых различий между детьми обеих групп выявлено не было, в отличие от гендерных различий с преобладанием пациентов мужского пола среди сформировавших классическую форму БЛД [37; 72; 107].

Следующие показатели были проанализированы в исследовании:

- гестационный возраст,
- массо-ростовые показатели,
- оценки по шкале APGAR на 1-й и 5-й минуте после рождения,
- продолжительность и вид респираторной поддержки и дополнительной оксигенации,
- частота развития осложнений.

Малый гестационный возраст является общеизвестным предиктором развития БЛД. Медианный гестационный возраст детей основной группы достоверно отличался от показателя контрольной группы (31 неделя и 27 недель соответственно). Таким образом, было подтверждено преимущественное развитие новой формы БЛД у глубоко недоношенных детей.

Согласно результатам исследования, все пациенты, сформировавшие БЛД, имели либо экстремально низкую (от 500г до 999г), либо очень низкую массу тела (1000г - 1499г) при рождении, в то время как в контрольной группе 80% детей относились к группам ОНМТ и НМТ (1500г - 2000г). Медиана длины тела также была ниже в контрольной группе. Было выявлено статистически значимое различие массо-ростовых показателей при рождении в 2-х группах, что подтвердило связь новой формы БЛД с глубокой недоношенностью и, следовательно, низкими показателями массы и длины тела.

Связь перечисленных факторов с развитием РДСН и дальнейшим формированием БЛД была изучена в многоцентровом исследовании Barbara J. Stoll и соавт. Из 8515 детей, выживших в течение 12 часов после рождения с гестационным возрастом 22-28 недель, массой тела 401г-1500г, у 93%

пациентов был диагностирован респираторный дистресс-синдром новорожденных. Из этой группы только 7023 ребенка дожили до 36 недели постконцептуального возраста, и сформировали БЛД – 68%. Частота развития новой формы БЛД также имела обратную связь с гестационным возрастом и массо-ростовыми показателями.

Оценка состояния ребенка при рождении всегда была актуальной для неонатологов, анестезиологов-реаниматологов, педиатров. Оценка по шкале APGAR дает возможность получить представление о состоянии ребенка после рождения и о его реакции на реанимационные мероприятия. Этот показатель является полезным инструментом для принятия решений в родильном зале во время оказания помощи новорожденному, но не используется для краткосрочного и долгосрочного прогноза состояния здоровья. В исследовании Barbara J. Stoll и соавт. также были проанализированы результаты оценки по шкале APGAR, но учитывались только показатели ниже или равные 3 баллам. Из 9575 детей, включенных в исследование, 42% и 16% были оценены ≤ 3 баллов на 1-й и 5-й минутах после рождения соответственно [177]. В нашем исследовании все дети были разделены на 3 группы: оцененные в 1-3 балла, 4-6 баллов и 7 баллов и более. В основной группе более 80% детей имели оценку 4-6 баллов на 1-й минуте и более 70% пациентов были оценены так же на 5-й минуте после рождения. В группе пациентов, не сформировавших БЛД на 1-й минуте после рождения превалировала оценка от 4 до 6 баллов, но к 5-й минуте оценка увеличилась до 7 баллов и выше в более, чем в 80% случаев.

С учетом степени тяжести дыхательной недостаточности все дети, включенные в исследование, получали респираторную поддержку и дополнительную оксигенацию. Анализ статистических данных свидетельствует о том, что новорожденные, не сформировавшие БЛД, получали наиболее кратковременную и щадящую вентиляционную поддержку по сравнению с пациентами, развившими БЛД. Среди 100 пациентов, сформировавших заболевание, 95 потребовалась ИВЛ, далее поэтапно Biphasic (50 детям), CPAP (50 детям), канюли с подачей увлажненного кислорода (67 детям). У пациентов

контрольной группы наиболее часто применялась респираторная поддержка методом CPAP (65%). Также было выявлено достоверное различие ($p<0,001$) общей продолжительности кислородозависимости у детей в 2-х группах (в основной – 49 [37;67] дней, в контрольной – 9 [4;19] дней).

Взаимосвязь применения различных методов респираторной поддержки и гестационного возраста ребенка при рождении также была описана в исследовании Barbara J. Stoll и соавт. Все дети, включенные в это исследование (n = 9575), были разделены на 7 групп в зависимости от гестационного возраста (22-28 недель). Частота интубации и назначение терапии препаратом сурфактанта была ниже у детей, родившихся на 28 неделе гестации. Частота использования CPAP после рождения была выше у пациентов с гестационным возрастом 24 недели и выше. Частота применения ИВЛ была выше у пациентов, родившихся на 22-й неделе гестации (96% детей) и снизилась до 40% в группе пациентов с гестационным возрастом 28 недель и более. Процентное соотношение детей, у которых был применен CPAP, наоборот, возрастало с увеличением гестационного возраста при рождении (с 0% до 38%) [177].

В ходе настоящего исследования оценивали связь осложнений и сопутствующей патологии с тяжестью течения БЛД. Анализировали следующие состояния: легочная гипертензия, внутрижелудочковое кровоизлияние, пневмония. У пациентов основной группы наиболее часто было диагностировано ВЖК (83% пациентов), у пациентов контрольной группы – врожденная пневмония в анамнезе (69% пациентов). Легочная гипертензия была диагностирована на втором месяце жизни лишь у 7% детей, сформировавших БЛД.

При проведении корреляционного анализа перечисленных показателей отмечается обратная зависимость между массо-ростовыми показателями и гестационным возрастом при рождении, оценками по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни и развитием новой формы БЛД. Прямая корреляция выявлена только между длительностью кислородозависимости и развитием заболевания.

Таким образом, согласно проведенному клинико-анамнестическому исследованию можно утверждать, что современной клинической моделью пациента с новой формой БЛД является недоношенный ребенок с гестационным возрастом менее 28 недель и ЭНМТ при рождении, оценками по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах после рождения 6 и менее баллов, с длительными сроками респираторной поддержки с применением традиционной ИВЛ.

Несмотря на выявленные ранее закономерности развития новой формы бронхолегочной дисплазии, у ряда недоношенных детей с аналогичными условиями выхаживания, режимами респираторной поддержки, БЛД не развивалась, что побудило к дальнейшему изучению патогенетических механизмов с использованием технологии полноэкзомного секвенирования.

Детальное изучение патогенеза бронхолегочной дисплазии позволило определить векторы поиска молекулярно-генетических механизмов формирования заболевания, каковыми являются системы сурфактантных белков и ферментов антиоксидантной защиты; факторы роста; металлопротеиназы; цитокиновый каскад и др.

Подавляющее большинство мутаций, имеющих медицинскую значимость, локализуются в экзонах, то есть участках ДНК, кодирующих белки. Суммарная протяженность этих участков составляет всего 1% генома. С целью выявления дефектов в интересующих нас известных генах в обычной практике применяется методика создания диагностических панелей, что сужает зону поиска значимых генетических вариантов. Полноэкзомное секвенирование лишено данного ограничения, так как оно позволяет найти мутации не только в известных генах, но и дает возможность открытия новых генетических вариантов, способствующих формированию заболевания [149].

Данная методика применялась и ранее для поиска предикторов формирования бронхолегочной дисплазии, однако не во всех проведенных исследованиях поиск генетических вариантов, способствующих формированию БЛД, увенчался успехом. Например, в исследование Alice Hadchouel и соавт. в

2020 году, было включено 14 детей, 6 из которых сформировали БЛД тяжелой степени, 8 пациентов были в группе контроля. У выбранных недоношенных детей с тяжелой бронхолегочной дисплазией и в контрольной группе ученым не удалось найти ни одного генетического варианта, характерного для нескольких детей с тяжелой степенью БЛД. Однако их результаты не согласуются с результатами других исследований, а отрицательный результат объясняется малой выборкой и полигенной предрасположенностью к данному заболеванию [58; 89; 118; 127]. Carrera и соавт. выполнили полноэкзомное секвенирование 26 итальянских младенцев европеоидной расы с тяжелой формой БЛД, отобранных из большей проспективной когорты (366 недоношенных детей из 12 отделений интенсивной терапии). Всего было идентифицировано 745 потенциально участвующих в развитии БЛД генов. Чтобы сузить список, анализ данных был сосредоточен на генах, ранее ассоциированных с развитием БЛД, и на новых генах-кандидатах, кодирующих белки, участвующих в известных патогенетических механизмах развития заболевания. Генами-кандидатами, выявленными в этом исследовании, стали *NOS2*, *MMP1*, *CRP*, *LBP* и семейство *TLR* [58]. Также полноэкзомное секвенирование в качестве основной технологии было применено в исследовании Jingjing Li и соавт. 50 пар близнецов, включенных в исследование, имели гестационный возраст от 25 недель до 29 недель и 6 дней, в каждой паре один из близнецов имел массу тела при рождении менее 1500 г. Всем детям, включенным в это исследование, требовалась непрерывная вентиляция легких с положительным давлением в течение как минимум 3 дней и кислородная поддержка в течение периода госпитализации. Гены, выявленные в цитируемом исследовании в качестве предикторов БЛД, кодировали белки, участвующие в следующих механизмах: организация коллагеновых фибрилл, морфогенез эмбрионального эпителия, а также в сигнальном пути, регулирующем эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей [127].

Среди генов, описанных в ранее проведенных исследованиях у пациентов с БЛД и найденных в рамках нашего исследования, было выделено 8

генетических вариантов, относительные частоты которых у пациентов значимо отличались от референсного популяционного значения: rs12489516 (*CPA3*), rs2476601 (*PTPN22*), rs1042703 (*MMP14*), rs5744174 (*TLR5*), COSV53739696 (*COL8A1*), rs45488997 (*CTGF*), rs1059046 (*SFTPA2*), rs62542745 (*AQP7*). Для 6 генетических вариантов rs2476601, rs1042703, rs5744174, COSV53739696, rs1059046, rs62542745 не было найдено статистически достоверных различий в относительных частотах аллелей в группах детей, сформировавших и не сформировавших БЛД. 2 генетических варианта rs12489516 в гене *CPA3* и rs45488997 в гене *CTGF* показали статистически значимые изменения частот аллелей в основной группе по сравнению с контрольной. Представленность генетического варианта rs45488997 в гене *CTGF* превалировала в группе пациентов, сформировавших БЛД, а представленность варианта rs12489516 в гене *CPA3* была выше в контрольной группе. Таким образом первый вариант можно отнести к фактору, предрасполагающему к формированию БЛД, второй вариант – к защитному фактору.

Результаты данного исследования совпадают с рядом ранее проведенных работ. Тяжелая БЛД характеризуется чрезмерным ремоделированием легочных сосудов и гипертрофией правого желудочка, что вносит значительный вклад в смертность детей с новой формой бронхолегочной дисплазии.

Фактор роста соединительной ткани (CTGF) представляет собой многофункциональный белок, который координирует сложные биологические процессы во время развития и ремоделирования тканей. Ранее в исследовании Shaoyi Chen и соавт. было показано, что сверхэкспрессия CTGF в эпителии дыхательных путей приводит к БЛД-подобной легочной картине у новорожденных мышей. Также сверхэкспрессия CTGF вызывала выраженную макрофагальную и нейтрофильную инфильтрацию в альвеолярных воздушных пространствах и периваскулярных областях, и значительно снижала темпы альвеоляризации и ангиогенеза. Более того, сверхэкспрессия CTGF индуцировала ремоделирование легочных сосудов и легочную гипертензию [62]. Задержка альвеолярного и сосудистого развития у недоношенных детей

представляет собой серьезную проблему в ведении пациентов с БЛД. В период неонатального развития такие пациенты подвержены стрессовым влияниям в виде гипоксии, гипероксии и жестких режимов вентиляции, что приводит к окислительному и воспалительному стрессу, который вызывает дальнейшее повреждение альвеол легких и сосудистой сети [131]. Исследование, проведенное в 2019 году, показало, что ингибирование CTGF моноклональным антителом CTGF улучшало альвеоляризацию и развитие сосудов, а также уменьшало ремоделирование легочных сосудов и легочную гипертензию у пациентов с БЛД. Таким образом, CTGF может быть новой мишенью для терапии бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей [191].

Карбоксипептидаза А3, кодируемая геном *CPA3*, принимает участие в регуляции состояния специфического тканевого микроокружения, затрагивая реализацию врожденного иммунитета, механизмы ангиогенеза, процессы ремоделирования межклеточного матрикса и др. [39]. Многочисленные биологические эффекты CPA3, включая участие в регуляции состояния легочной паренхимы и системного кровотока, определяют важность исследований ассоциации этого гена в качестве защитного фактора, предотвращающего развитие бронхолегочной дисплазии. На сегодняшний день экспрессия гена *CPA3* обнаружена только в тучных клетках. Известно, что ранее генетические варианты в этом гене ассоциировались только с формированием ХОБЛ, бронхиальной астмы и аллергического ринита. В настоящее время предполагается, что белок, кодируемый этим геном, может играть ключевую роль и в развитии бронхолегочной дисплазии, так как карбоксипептидаза А3 ограничивает действие эндотелина 1 [104; 132; 164; 190; 197; 201]. Кроме того, было показано, что CPA3 тучных клеток опосредованно обладает вазодилаторными и бронходилаторными эффектами благодаря способности к трансформации лейкотриена С4 в лейкотриен F4, тем самым снижая вероятность образования лейкотриенов D4 и E4 с более мощными бронхо- и сосудосуживающим эффектами [39; 157]. Генетический вариант rs12489516 в гене *CPA3*, выявленный в нашем исследовании, по сути является

новым, перспективным прогностическим фактором, связанным с предотвращением формирования бронхолегочной дисплазии.

На основании клинико-анамнестических и молекулярно-генетических предикторов развития новой формы бронхолегочной дисплазии, была разработана шкала прогнозирования заболевания у недоношенных детей. Семь показателей, включенных в шкалу, включая генетические предикторы, позволяют оценить вероятность развития новой формы БЛД уже в первые дни жизни пациента с РДСН и провести индивидуальную профилактику формирования данного заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Ретроспективная оценка медицинской документации показала преобладание новой формы бронхолегочной дисплазии по сравнению с классической формой у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в период с 2013 по 2021 гг., после окончательного перехода Российской Федерации на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ в 2012 году. В 2021 году у всех включенных в исследование пациентов с БЛД была диагностирована новая форма заболевания, что связано с увеличением выживаемости глубоко недоношенных детей за счет совершенствования методов неонатальной реанимации.
2. Клинико-анамнестическими факторами высокого риска развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных являются гестационный возраст менее 28 недель, экстремально низкая и очень низкая масса тела при рождении, оценки по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах жизни менее 6 баллов, длительная респираторная поддержка в неонатальном периоде с применением традиционной ИВЛ.
3. В результате полноэкзомного секвенирования и биоинформатического анализа было обнаружено 8 генетических вариантов, относительные частоты которых у пациентов с бронхолегочной дисплазией значимо отличались от референсного популяционного значения: rs12489516 (*CPA3*), rs2476601 (*PTPN22*), rs1042703 (*MMP14*), rs5744174 (*TLR5*), COSV53739696 (*COL8A1*), rs45488997 (*CTGF*), rs1059046 (*SFTPA2*), rs62542745 (*AQP7*). Найденные генетические варианты могут потенциально влиять на функционирование следующих систем: сурфактантную; иммуновоспалительного ответа; организации внеклеточного матрикса и его деградации; ангиогенеза; трансмембранного транспорта.

4. Анализ изменения частот аллелей в основной группе по сравнению с контрольной показал статистически значимый результат для генетического варианта rs45488997 в гене *CTGF*. Представленность данного нуклеотидного варианта превалировала у пациентов, сформировавших БЛД, что позволяет отнести его к факторам, предрасполагающим к формированию заболевания. Шансы развития бронхолегочной дисплазии у пациентов с выявленным генетическим вариантом выше в 1,5 раза. Представленность генетического варианта rs12489516 в гене *CPA3* превалировала у пациентов контрольной группы, в связи с чем данный нуклеотидный вариант можно отнести к защитным факторам, предотвращающим формирование заболевания. Шансы сформировать БЛД у пациентов с данным генетическим вариантом ниже в 4,5 раза.
5. Из 8 генетических вариантов, относительные частоты которых значимо отличались от референсного популяционного значения, 6 генетических вариантов: rs2476601 гена *PTPN22*, кодирующего лимфоидспецифическую тирозинфосфатазу, rs1042703 гена *MMP14*, кодирующего тканевую коллагеназу, rs5744174 гена *TLR5*, кодирующего мембранный белок, входящий в семейство толл-подобных рецепторов, COSV53739696 гена *COL8A1*, кодирующего одну из двух альфа-цепей коллагена VIII типа, rs1059046 гена *SFTPA2*, кодирующего сурфактантный белок А, rs62542745 гена *AQP7*, кодирующего белок группы аквапоринов - не показали различий в их представленности в группах детей, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию.
6. Выявленные клинико-анамнестические факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии и генетические варианты, обладающие повышенным и пониженным риском развития заболевания (rs45488997 в гене *CTGF* и rs12489516 в гене *CPA3* соответственно), дают возможность прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей с респираторным

дистресс-синдромом новорожденных с помощью разработанной нами шкалы балльной оценки.

Практические рекомендации

I. Клинико-анамнестические и молекулярно-генетические факторы риска развития новой формы бронхолегочной дисплазии рекомендованы для проведения клинико-генетического прогнозирования развития БЛД в раннем постнатальном периоде у недоношенных детей с РДСН с целью определения групп риска и проведения своевременной индивидуальной профилактики формирования данного заболевания.

II. Предложенная шкала прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей рекомендуется для использования в перинатальных центрах и других учреждениях родовспоможения с целью выработки индивидуальной тактики ведения пациентов, относящихся к группе высокого риска формирования БЛД.

Список литературы

1. Антонов А.Г., Борисевич О.А., Буркова А.С. и др., Байбарина Е.Н., Дегтярев Д.Н., Широкова В.И., ред. Интенсивная терапия и принципы выхаживания детей с экстремально низкой и очень низкой массой тела при рождении. Методическое письмо Минздравсоцразвития России от 16.12.2011. № 15-0/10/2-11336. М. 2011: 36.
2. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Володин Н.Н., Давыдова И.В., Овсянников Д.Ю., Иванов Д.О., Бойцова Е.В., Яцык Г.В., Антонов А.Г., Ионов О.В., Рындин А.Ю., Гребенников В.А., Солдатова И.Г., Чубарова А.И. Ведение детей с бронхолегочной дисплазией. Педиатрическая фармакология. 2016; 13(4): 319-333.
3. Басаргина М.А., Фисенко А.П., Давыдова И.В., Бондарь В.А. Ранняя диагностика бронхолегочной дисплазии: актуальный вектор научных исследований. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2021; 1: 90-99.
4. Беляева И.А., Бомбардирова Е.П., Турти Т.В., Приходько Е.А. Использование специализированного лечебного продукта у недоношенного ребенка с постнатальной недостаточностью питания: клинический случай. Вопросы современной педиатрии. 2021; 20(6): 521-529.
5. Беляшова М. А., Овсянников Д. Ю., Огородова Л. М. Молекулярно-генетические механизмы развития бронхолегочной дисплазии. Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. 2015; 3 (9): 50-68.
6. Васильева О.В., Голубцова Н.Н., Филиппов Ф.Н., Гунин А.Г. Фактор роста соединительной ткани (CTGF) в дерме человека в онтогенезе. Онтогенез. 2016; 47 (2): 75-82.
7. Володин Н.Н. Неонатология. Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013: 71.
8. Волосовец А.П., Абатуров А.Е., Герасименко О.Н., Высочина И.Л. Молекулярно-генетические механизмы развития и современные методы лечения легочной артериальной гипертензии у детей. Здоровье ребенка. 2010; 5: 137-145.

9. Давыдова И. В. Проблемы питания детей с бронхолегочной дисплазией. Вопросы детской диетологии. 2009; 7 (3): 70-73.
10. Давыдова И.В., Намазова-Баранова Л.С., Яцык Г.В., Маянский Н.А., Зимина Е.П., Островская А.С. Профилактические стратегии на этапах формирования и течения бронхолегочной дисплазии. Педиатрическая фармакология. 2014; 11(2): 34-40.
11. Давыдова И.В., Фисенко А.П., Пожарищенская В.К., Казакова К.А., Басаргина Е.Ю., Бондарь В.А. Новая форма бронхолегочной дисплазии: реалии сегодняшнего дня. Доктор.Ру. 2020; 19 (10): 6–9
12. Давыдова И.В., Яцык Г.В., Бершова Т.В., Басаргина М.А., Баканов М.И. Матриксные металлопротеиназы как биомаркеры формирования бронхолегочной дисплазии у детей. Пульмонология. 2009; 4: 80-84.
13. Клинические рекомендации «Бронхолегочная дисплазия», Союз Педиатров России, 2016.
14. Майданник В.Г. Toll-подобные рецепторы и почки. Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии. 2014; 6 (1): 98-108.
15. Намазова-Баранова Л. С., Федосеенко М. В., Казакова К. А., Ткаченко Н. Е., Акоев Ю. С. Иммунизация больных с бронхолегочной дисплазией против респираторных патогенов. Российский педиатрический журнал. 2017; 20 (4): 245-249.
16. Овсянников Д.Ю., Ахведиани С.Д. Нарушения питания и нутритивная поддержка у детей с бронхолегочной дисплазией. Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. 2016; 1 (11): 55-73.
17. Овсянников Д.Ю., Беляшова М.А., Крушельницкий А.А. Врожденный дефицит белков сурфактанта. Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. 2014; 1 (3).
18. Овсянников Д.Ю., Геппе Н.А., Малахов А.Б. и др., ред. Бронхолегочная дисплазия. М.; 2020.

19. Овсянников Д.Ю., Кршеминская И.В., Абрамян М.А. [и др.]. Педиатрия: учебник: в 5 томах. Москва. Т.1: Сердечно-легочная реанимация, неонатология, лихорадка и основы антибиотикотерапии. 2021. – 476.
20. Пожарищенская В.К., Давыдова И.В., Савостьянов К.В., Намазова-Баранова Л.С., Павлинова Е.Б., Пушков А.В. Генетическая детерминация формирования бронхолегочной дисплазии: за и против. Педиатрическая фармакология. 2017;14 (1):24-32.
21. Пожарищенская В.К., Давыдова И.В., Савостьянов К.В., Пушков А.А. Клинико-анамнестические и молекулярно-генетические факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2019; 98(6): 78–85.
22. Приказ Минздравсоцразвития России от 27.12.2011 N 1687н (ред. от 13.10.2021) "О медицинских критериях рождения, форме документа о рождении и порядке его выдачи" (Зарегистрировано в Минюсте России 15.03.2012 N 23490).
23. Прометной Д.В., Александрович Ю.С., Вороненко И.И. Факторы риска, предикторы и современная диагностика бронхолегочной дисплазии. Педиатр. 2017; 8 (3): 142-150.
24. Савва Н. Н., Овсянников Д. Ю., Жесткова М. А. Тяжелая бронхолегочная дисплазия: Медицинское сопровождение на дому. 2020.
25. Скворцова В.А., Давыдова И.В., Фисенко А.П., Пинаева-Слыш Е.Л., Боровик Т.Э., Басаргина М.А., Казюкова Т.В., Бондарь В.А., Казакова К.А., Грызунова А.С. Особенности нутритивного статуса недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией в первом полугодии жизни. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2021; 100 (4): 161-170.
26. Чучалин А.Г, Геппе Н.А., Розинова Н.Н. [и др.]. Классификация клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей. М.: Российское респираторное общество. 2009. 18с.
27. Abman S.H. Bronchopulmonary Dysplasia: “A Vascular Hypothesis”. American journal of respiratory and critical care medicine. 2001; 164 (10): 1755-1756.

28. Abman S.H., Bancalari E., Jobe A. The evolution of bronchopulmonary dysplasia after 50 years. American journal of respiratory and critical care medicine. 2017; 195 (4): 421-424.
29. Abman S.H., Collaco J.M., Shepherd E.G., Keszler M., Cuevas-Guaman M., Welty S.E., Truog W.E., McGrath-Morrow S.A., Moore P.E., Rhein L.M., Kirpalani H., Zhang H., Gratny L.L., Lynch S.K., Curtiss J., Stonestreet B.S., McKinney R.L., Dysart K.C., Gien J., Baker C.D., Donohue P.K., Austin E., Fike C., Nelin L.D. Interdisciplinary care of children with severe bronchopulmonary dysplasia. The Journal of pediatrics. 2017; 181: 12-28.
30. Abman S.H., Mourani P.M., Sontag M. Bronchopulmonary dysplasia: a genetic disease. Pediatrics. 2008; 122 (3): 658-659.
31. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010; 7 (4): 248-249.
32. Aghai Z.H., Faqiri S., Saslow J.G., Nakhla T., Farhath S., Kumar A., Eydelman R., Strande L., Stahl G., Leone P., Bhandari V. Angiopoietin 2 concentrations in infants developing bronchopulmonary dysplasia: attenuation by dexamethasone. Journal of Perinatology. 2008; 28 (2): 149-155.
33. Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C., Urbich C., Ihling C., Technau-Ihling K., Zeiher A.M., Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. Nature medicine. – 2003; 9 (11): 1370-1376.
34. Alapati D., Rong M., Chen S., Hehre D., Rodriguez M.M., Lipson K.E., Wu S. Connective tissue growth factor antibody therapy attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2011; 45 (6): 1169-1177.
35. Allen R.E., Rogozinska E., Cleverly K., Aquilina J., Thangaratinam S. Abnormal blood biomarkers in early pregnancy are associated with preeclampsia: a meta-analysis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014; 182: 194-201.

36. Alvarez-Fuente M., Moreno L., Lopez-Ortego P., Arruza L., Avila-Alvarez A., Muro M., Gutierrez E., Zozaya C., Sanchez-Helguera G., Elorza D., Martinez-Ramas A., Villar G., Labrandero C., Martinez L., Casado T., Cuadrado I., Del Cerro M.J. Exploring clinical, echocardiographic and molecular biomarkers to predict bronchopulmonary dysplasia. PloS One. 2019; 14 (3): e0213210.
37. Ambalavanan N., Van Meurs K.P., Perritt R., Carlo W.A., Ehrenkranz R.A., Stevenson D.K., Lemons J.A., Poole W.K., Higgins R.D. Predictors of death or bronchopulmonary dysplasia in preterm infants with respiratory failure. Journal of perinatology. 2008; 28 (6): 420-426.
38. Aschner J.L., Bancalari E.H., McEvoy C.T. Can we prevent bronchopulmonary dysplasia? The Journal of pediatrics. 2017: 189: 26-30.
39. Atiakshin D.A., Kostin A.A., Trotsenko I D., Shishkina V.V., Tiemann M., Buchwalow I.B. Carboxypeptidase A3 in the structure of the protease phenotype of mast cells: cytophysiological aspects. RUDN Journal of Medicine. 2022; 26 (1): 9-33.
40. Atkinson J.J., Holmbeck K., Yamada S., Birkedal- Hansen H., Parks W.C., Senior R.M. Membrane- type 1 matrix metalloproteinase is required for normal alveolar development. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 2005; 232 (4): 1079-1090.
41. Backes C. H., Markham K., Moorehead P., Cordero L., Nankervis C.A., Giannone P.J. Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. Journal of pregnancy. 2011; 2011: 214365.
42. Baker C.D., Abman S.H. Impaired pulmonary vascular development in bronchopulmonary dysplasia. Neonatology. 2015; 107 (4): 344-351.
43. Ballard P.L., Truog W.E., Merrill J.D., Gow A., Posencheg M., Golombek S.G., Parton L.A., Luan X., Cnaan A., Ballard R.A. Plasma biomarkers of oxidative stress: relationship to lung disease and inhaled nitric oxide therapy in premature infants. Pediatrics. 2008; 121 (3): 555-561.

44. Bancalari E. H., Jobe A. H. The respiratory course of extremely preterm infants: a dilemma for diagnosis and terminology. The Journal of pediatrics. 2012; 161 (4): 585-588.
45. Becerra S.P., Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. Nature Reviews Cancer. 2013. 13 (4): 258-271.
46. Been J.V., Debeer A., van Iwaarden J.F., Kloosterboer N., Passos V.L., Naulaers G., Zimmermann L.J. Early alterations of growth factor patterns in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia. Pediatric research. 2010; 67 (1): 83-89.
47. Bhandari A., Bhandari V. Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia. Pediatrics. 2009; 123 (6): 1562-1573.
48. Bhandari V. Hyperoxia-derived lung damage in preterm infants. Seminars in fetal and neonatal medicine. WB Saunders. 2010; 15 (4): 223-229.
49. Bhandari V, Bizzarro M.J., Shetty A., Zhong X., Page G.P., Zhang H., Ment L.R., Gruen J.R. Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. Pediatrics. 2006; 117 (6): 1901-1906.
50. Bhandari V., Choo-Wing R., Lee C.G., Zhu Z., Nedrelow J.H., Chupp G.L., Zhang X., Matthay M.A., Ware L.B., Homer R.J., Lee P.J., Geick A., de Fougerolles A.R., Elias J.A. Hyperoxia causes angiopoietin 2–mediated acute lung injury and necrotic cell death. Nature medicine. 2006. 12 (11): 1286-1293.
51. Bhandari V., Gruen J.R. The genetics of bronchopulmonary dysplasia. Seminars in perinatology. WB Saunders. 2006; 30 (4): 185-191.
52. Bhattacharya S., Go D., Krenitsky D.L., Huyck H.L., Solleti S.K., Lunger V.A., Metlay L., Srisuma S., Wert S.E., Mariani T.J., Pryhuber G.S. Genome-wide transcriptional profiling reveals connective tissue mast cell accumulation in bronchopulmonary dysplasia. American journal of respiratory and critical care medicine. 2012; 186 (4): 349-358.
53. Boucherat O., Bourbon J.R., Barlier-Mur A.M., Chailley-Heu B., D'ortho M.P., Delacourt C. Differential expression of matrix metalloproteinases and inhibitors

in developing rat lung mesenchymal and epithelial cells. Pediatric research. 2007; 62 (1): 20-25.

54. Boucherat O., Franco-Montoya M.L., Thibault C., Incitti R., Chailley-Heu B., Delacourt C., Bourbon J.R. Gene expression profiling in lung fibroblasts reveals new players in alveolarization. Physiological genomics. 2007; 32 (1): 128-141.
55. Budding K., van Setten J., van de Graaf E.A., van Rossum O.A., Kardol-Hoefnagel T., Kwakkel-van Erp J.M., Oudijk E.D., Hack C.E., Otten H.G. The autoimmune-associated single nucleotide polymorphism within PTPN22 correlates with clinical outcome after lung transplantation. Frontiers in Immunology. 2019; 9: 3105.
56. Calandra T., Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nature reviews immunology. 2003; 3 (10): 791-800.
57. Capoluongo E., Ameglio F., Lulli P., Minucci A., Santonocito C., Concolino P., Di Stasio E., Boccacci S., Vendettuoli V., Giuratrabocchetta G., De Cunto A., Tana M., Romagnoli C., Zuppi C., Vento G. Epithelial lining fluid free IGF-I-to-PAPP-A ratio is associated with bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2007; 292 (1): 308-313.
58. Carrera P., Di Resta C., Volonteri C., Castiglioni E., Bonfiglio S., Lazarevic D., Cittaro D., Stupka E., Ferrari M., Somaschini M. BPD and Genetics Study Group. Exome sequencing and pathway analysis for identification of genetic variability relevant for bronchopulmonary dysplasia in preterm newborns: A pilot study. Clinica chimica acta. 2015; 451: 39-45.
59. Cederqvist K. Sorsa T, Tervahartiala T, Maisi P, Reunanen K, Lassus P, Andersson S. Matrix metalloproteinases-2,-8, and-9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress. Pediatrics. 2001; 108: 686-692.
60. Chen J., Aronow B.J., Jegga, A.G. Disease candidate gene identification and prioritization using protein interaction networks. BMC Bioinformatics. 2009; 10: 73.

61. Chen L., Ge Q., Tjin G., Alkhouri H., Deng L., Brandsma C.A., Adcock I., Timens W., Postma D., Burgess J.K., Black J.L., Oliver B.G. Effects of cigarette smoke extract on human airway smooth muscle cells in COPD. European Respiratory Journal. 2014; 44 (3): 634-646.
62. Chen S., Rong M., Platteau A., Hehre D., Smith H., Ruiz P., Wu S. CTGF disrupts alveolarization and induces pulmonary hypertension in neonatal mice: implication in the pathogenesis of severe bronchopulmonary dysplasia. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2011; 300 (3): 330-340.
63. Chesney J., Metz C., Bacher M., Peng T., Meinhardt A., Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. Molecular Medicine. – 1999; 5 (3): 181-191.
64. Chetty A., Andersson S., Lassus P., Nielsen H.C. Insulin- like growth factor- 1 (IGF- 1) and IGF- 1 receptor (IGF- 1R) expression in human lung in RDS and BPD. Pediatric pulmonology. 2004; 37 (2): 128-136.
65. Chetty A., Bennett M., Dang L., Nakamura D., Cao G.J., Mujahid S., Volpe M., Herman I., Becerra S.P., Nielsen H.C. Pigment Epithelium–Derived Factor Mediates Impaired Lung Vascular Development in Neonatal Hyperoxia. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2015; 52 (3): 295-303.
66. Chetty A., Cao G.J., Nielsen H.C. Insulin-like Growth Factor-I signaling mechanisms, type I collagen and alpha smooth muscle actin in human fetal lung fibroblasts. Pediatric research. 2006; 60 (4): 389-394.
67. Cicha I., Goppelt-Struebe M., Yilmaz A., Daniel W.G., Garlichs C.D. Endothelial dysfunction and monocyte recruitment in cells exposed to non-uniform shear stress //Clinical hemorheology and microcirculation. 2008; 39, 1–4: 13-119.
68. Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. A program for annotating and predicting the effects of single

nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. Fly (Austin). 2012; 6 (2): 80-92.

69. Clarke F., Jordan C.K., Gutiérrez-Martinez E., Bibby J.A., Sanchez-Blanco C., Cornish G.H., Dai X., Rawlings D.J., Zamoyska R., Guermonprez P., Cope A.P., Purvis H.A. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 is dispensable for dendritic cell antigen processing and promotion of T-cell activation by dendritic cells. PloS one. 2017; 12 (10): e0186625.
70. Coalson J. J. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. Seminars in neonatology. WB Saunders. 2003; 8 (1): 73-81.
71. Cordero L., Ayers L. W., Davis K. Neonatal airway colonization with gram-negative bacilli: association with severity of bronchopulmonary dysplasia. The Pediatric infectious disease journal. 1997; 16 (1): 18-23.
72. Costeloe K.L., Hennessy E.M., Haider S., Stacey F., Marlow N., Draper E.S. Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). Bmj. 2012; 345.
73. Criswell L.A., Pfeiffer K.A., Lum R.F., Gonzales B., Novitzke J., Kern M., Moser K.L., Begovich A.B., Carlton V.E., Li W., Lee A.T., Ortmann W., Behrens T.W., Gregersen P.K. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. The American Journal of Human Genetics. 2005; 76 (4): 561-571.
74. Cunningham L.A., Wetzel M., Rosenberg G.A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. Glia. 2005; 50 (4): 329-339.
75. Denley A., Wang C.C., McNeil K.A., Walenkamp M.J., van Duyvenvoorde H., Wit J.M., Wallace J.C., Norton R.S., Karperien M., Forbes B.E. Structural and functional characteristics of the Val44Met insulin-like growth factor I missense mutation: correlation with effects on growth and development. Molecular Endocrinology. 2005; 19 (3): 711-721.

76. De Paepe M.E., Greco D., Mao Q. Angiogenesis-related gene expression profiling in ventilated preterm human lungs. Experimental lung research. 2010; 36 (7): 399-410.

77. De Paepe M.E., Patel C., Tsai A., Gundavarapu S., Mao Q. Endoglin (CD105) up-regulation in pulmonary microvasculature of ventilated preterm infants. American journal of respiratory and critical care medicine. 2008; 178 (2): 180-187.

78. Donnelly S.C., Haslett C., Reid P.T., Grant I.S., Wallace W.A., Metz C.N., Bruce L.J., Bucala R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. Nature medicine. 1997; 3 (3): 320-323.

79. Eckert J.K., Kim Y.J., Kim J.I., Gürtler K., Oh D.Y., Sur S., Lundvall L., Hamann L., van der Ploeg A., Pickkers P., Giamarellos-Bourboulis E., Kubarenko A.V., Weber A.N., Kabesch M., Kumpf O., An H.J., Lee J.O., Schumann R.R. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. Immunity. 2013; 39 (4): 647-660.

80. Ehrenkranz R.A., Walsh M.C., Vohr B.R., Jobe A.H., Wright L.L., Fanaroff A.A., Wrage L.A., Poole K. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. Pediatrics. 2005; 116 (6): 1353-1360.

81. Express Group. Incidence of and risk factors for neonatal morbidity after active perinatal care: extremely preterm infants study in Sweden (EXPRESS). Acta paediatrica. 2010; 99 (7): 978-992.

82. Farstad T., Bratlid D., Medbo S., Markestad T. Norwegian Extreme Prematurity Study Group. Bronchopulmonary dysplasia–prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. Acta paediatrica. 2011; 100 (1): 53-58.

83. Filbrun A.G., Popova A.P., Linn M.J., McIntosh N.A., Hershenson M.B. Longitudinal measures of lung function in infants with bronchopulmonary dysplasia. Pediatric pulmonology. 2011; 46 (4): 369-375.

84. Fruchter O., Rosengarten D., Goldberg E., Ben- Zvi H., Tor R., Kramer, M. R. Airway bacterial colonization and serum C- reactive protein are associated with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation following bronchoscopic lung volume reduction. The Clinical Respiratory Journal. 2016; 10 (2): 239-245.
85. Fujioka K., Shibata A., Yokota T., Koda T., Nagasaka M., Yagi M., Takeshima Y., Yamada H., Iijima K., Morioka I. Association of a vascular endothelial growth factor polymorphism with the development of bronchopulmonary dysplasia in Japanese premature newborns. Scientific reports. 2014; 4 (1): 1-5.
86. Gauldie J., Galt T., Bonniaud P., Robbins C., Kelly M., Warburton D. Transfer of the active form of transforming growth factor-β1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia //The American journal of pathology. 2003; 163 (6): 2575-2584.
87. Glaser K., Speer C.P. Pre and postnatal inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. Bronchopulmonary Dysplasia. Humana Press, Cham. 2016: 55-77.
88. Guo M., Du Y., Gokey J.J., Ray S., Bell S.M., Adam M., Sudha P., Perl A.K., Deshmukh H., Potter S.S., Whitsett J.A., Xu Y. Single cell RNA analysis identifies cellular heterogeneity and adaptive responses of the lung at birth. Nature communications. 2019; 10 (1): 1-16.
89. Hadchouel A., Decobert F., Besmond C., Delacourt C. Exome sequencing of extreme phenotypes in bronchopulmonary dysplasia. European Journal of Pediatrics. 2020; 179 (4): 579-586.
90. Hadchouel A., Decobert F., Franco-Montoya M.L., Halphen I., Jarreau P.H., Boucherat O., Martin E., Benachi A., Amselem S., Bourbon J., Danan C., Delacourt C. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia: identification of MMP16 as a new player in lung development. PloS one. 2008; 3 (9): e3188.
91. Hadchouel A., Durrmeyer X., Bouzigon E., Incitti R., Huusko J., Jarreau P.H., Lenclen R., Demenais F., Franco-Montoya M.L., Layouni I., Patkai J., Bourbon J., Hallman M., Danan C., Delacourt C. Identification of SPOCK2 as a

susceptibility gene for bronchopulmonary dysplasia. American journal of respiratory and critical care medicine. 2011; 184 (10): 1164-1170.

92. Hamvas A., Feng R., Bi Y., Wang F., Bhattacharya S., Mereness J., Kaushal M., Cotten C.M., Ballard P.L., Mariani T.J. Exome sequencing identifies gene variants and networks associated with extreme respiratory outcomes following preterm birth. BMC genetics. 2018; 19 (1): 1-10.
93. Hansen A.R., Barnés C.M., Folkman J., McElrath T.F. Maternal preeclampsia predicts the development of bronchopulmonary dysplasia. The Journal of pediatrics. 2010; 156 (4): 532-536.
94. Hansmann G., Sallmon H., Roehr C.C., Kourembanas S., Austin E.D., Koestenberger M. Pulmonary hypertension in bronchopulmonary dysplasia. Pediatric Research. 2021; 89 (3): 446-455.
95. Harijith A., Choo-Wing R., Cataltepe S., Yasumatsu R., Aghai Z.H., Janér J., Andersson S., Homer R.J., Bhandari V. A role for matrix metalloproteinase 9 in IFNγ-mediated injury in developing lungs: relevance to bronchopulmonary dysplasia. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2011; 44 (5): 621-630.
96. Hartmann J.S., Thompson H., Wang H., Kanekar S., Huang W., Budd S.J., Hartnett M.E. Expression of vascular endothelial growth factor and pigment epithelial-derived factor in a rat model of retinopathy of prematurity. Molecular vision. 2011; 17: 1577.
97. Hasan J., Beharry K.D., Valencia A.M., Strauss A., Modanlou H.D. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in tracheal aspirate fluid of preterm neonates at birth may be predictive of bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease. Pediatrics. 2009; 123 (6): 1541-1547.
98. Hellström A., Engström E., Hård A.L., Albertsson-Wikland K., Carlsson B., Niklasson A., Löfqvist C., Svensson E., Holm S., Ewald U., Holmström G., Smith L.E. Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth. Pediatrics. 2003; 112 (5): 1016-1020.

99. Higgins R.D., Jobe A.H., Koso-Thomas M., Bancalari E., Viscardi R.M., Hartert T.V., Ryan R.M., Kallapur S.G., Steinhorn R.H., Konduri G.G., Davis S.D., Thebaud B., Clyman R.I., Collaco J.M., Martin C.R., Woods J.C., Finer N.N., Raju T.N.K. Bronchopulmonary dysplasia: executive summary of a workshop. The Journal of pediatrics. 2018; 197: 300-308.

100. Hogan B.L., Barkauskas C.E., Chapman H.A., Epstein J.A., Jain R., Hsia C.C., Niklason L., Calle E., Le A., Randell S.H., Rock J., Snitow M., Krummel M., Stripp B.R., Vu T., White E.S., Whitsett J.A., Morrisey E.E. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. Cell stem cell. 2014; 15 (2): 123-138.

101. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LBP

102. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR1

103. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/

104. Hültner L., Ehrenreich H. Mast cells and endothelin-1: a life-saving biological liaison? Trends in immunology. 2005; 26 (5): 235-238.

105. Islam J.Y., Keller R.L., Aschner J.L., Hartert T.V., Moore P.E. Understanding the short-and long-term respiratory outcomes of prematurity and bronchopulmonary dysplasia. American journal of respiratory and critical care medicine. 2015; 192 (2): 134-156.

106. Jakkula M., Le Cras T.D., Gebb S., Hirth K.P., Tuder R.M., Voelkel N.F., Abman S.H. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2000; 279 (3): 600-607.

107. Jensen E.A., Schmidt B. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology. 2014; 100 (3): 145-157.

108. Jobe A.H. The new bronchopulmonary dysplasia. Current opinion in pediatrics. 2011; 23 (2): 167.

109. Joos L., He J.Q., Shepherdson M.B., Connett J.E., Anthonisen N.R., Paré P.D., Sandford A.J. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. Human molecular genetics. 2002; 11 (5): 569-576.

110. Kapoor M., Liu S., Huh K., Parapuram S., Kennedy L., Leask A. Connective tissue growth factor promoter activity in normal and wounded skin. Fibrogenesis & tissue repair. 2008; 1 (1): 1-9.

111. Kielczewski J.L., Jarajapu Y.P., McFarland E.L., Cai J., Afzal A., Li Calzi S., Chang K.H., Lydic T., Shaw L.C., Busik J., Hughes J., Cardounel A.J., Wilson K., Lyons T.J., Boulton M.E., Mames R.N., Chan-Ling T., Grant M.B. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates vascular repair by enhancing nitric oxide generation. Circulation research. 2009; 105 (9): 897-905.

112. Korzeniewski S.J., Romero R., Chaiworapongsa T., Chaemsaithong P., Kim C.J., Kim Y.M., Kim J.S., Yoon B.H., Hassan S.S., Yeo L. Maternal plasma angiogenic index-1 (placental growth factor/soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) is a biomarker for the burden of placental lesions consistent with uteroplacental underperfusion: a longitudinal case-cohort study. American journal of obstetrics and gynecology. 2016; 214 (5): 629.

113. Kotecha S., Wangoo A., Silverman M., Shaw R.J. Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity. The Journal of pediatrics. 1996; 128 (4): 464-469.

114. Kunig A.M., Balasubramaniam V., Markham N.E., Morgan D., Montgomery G., Grover T.R., Abman, S. H. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2005; 289 (4): 529-535.

115. Kwinta P., Bik-Multanowski M., Mitkowska Z., Tomasik T., Legutko M., Pietrzyk J.J. Genetic risk factors of bronchopulmonary dysplasia. Pediatric research. 2008; 64 (6): 682-688.

116. Lai K.N., Leung J.C., Metz C.N., Lai F.M., Bucala R., Lan H.Y. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome.

The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 2003; 199 (4): 496-508.

117. Lal C.V., Ambalavann N. Biomarkers, early diagnosis, and clinical predictors of bronchopulmonary dysplasia. Clinics in perinatology. 2015; 42 (4): 739-754.

118. Lal C.V., Ambalavanan N. Genetic predisposition to bronchopulmonary dysplasia. Seminars in perinatology. WB Saunders. 2015; 39 (8): 584-591.

119. Lassus P., Turanlahti M., Heikkilä P., Andersson L.C., Nupponen I., Sarnesto A., Andersson S. Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn. American journal of respiratory and critical care medicine. 2001; 164 (10): 1981-1987.

120. Laughon M.M., Langer J.C., Bose C.L., Smith P.B., Ambalavanan N., Kennedy K.A., Stoll B.J., Buchter S., Laptook A.R., Ehrenkranz R.A., Cotten C.M., Wilson-Costello D.E., Shankaran S., Van Meurs K.P., Davis A.S., Gantz M.G., Finer N.N., Yoder B.A., Faix R.G., Carlo W.A., Schibler K.R., Newman N.S., Rich W., Das A., Higgins R.D., Walsh M.C. Prediction of bronchopulmonary dysplasia by postnatal age in extremely premature infants. American journal of respiratory and critical care medicine. 2011; 183 (12): 1715-1722.

121. Lavoie P.M., Dubé M.P. Genetics of bronchopulmonary dysplasia in the age of genomics. Current opinion in pediatrics. 2010; 22 (2): 134.

122. Lavoie P.M., Pham C., Jang K.L. Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health. Pediatrics. 2008; 122 (3): 479-485.

123. Lecart C., Cayabyab R., Buckley S., Morrison J., Kwong K.Y., Warburton D., Ramanathan R., Jones C.A., Minoo P. Bioactive transforming growth factor-beta in the lungs of extremely low birthweight neonates predicts the need for home oxygen supplementation. Neonatology. 2000; 77 (4): 217-223.

124. Le Cras T.D., Markham N.E., Tuder R.M., Voelkel N.F., Abman S.H. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes

pulmonary hypertension and abnormal lung structure. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.2002; 283 (3): 555-562.

125. Leong M. Genetic approaches to bronchopulmonary dysplasia. Neoreviews. 2019; 20 (5): 272-279.

126. Levine R.J., Maynard S.E., Qian C., Lim K.H., England L.J., Yu K.F., Schisterman E.F., Thadhani R., Sachs B.P., Epstein F.H., Sibai B.M., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. New England journal of medicine. 2004; 350 (7): 672-683.

127. Li J., Yu K.H., Oehlert J., Jeliffe-Pawlowski L.L., Gould J.B., Stevenson D.K., Snyder M., Shaw G.M., O'Brodovich H.M. Exome Sequencing of Neonatal Blood Spots and the Identification of Genes Implicated in Bronchopulmonary Dysplasia. American journal of respiratory and critical care medicine. 2015; 192 (5): 589-596.

128. Mahlman M., Huusko J.M., Karjalainen M.K., Kaukola T., Marttila R., Ojaniemi M., Haataja R., Lavoie P.M., Rämet M., Hallman M. Genes encoding vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and VEGF receptor 2 (VEGFR-2) and risk for bronchopulmonary dysplasia. Neonatology. 2015; 108 (1): 53-59.

129. Mahlman M., Karjalainen M.K., Huusko J.M., Andersson S., Kari M.A., Tammela O.K.T., Sankilampi U., Lehtonen L., Marttila R.H., Bassler D., Poets C.F., Lacaze-Masmonteil T., Danan C., Delacourt C., Palotie A., Muglia L.J., Lavoie P.M., Hadchouel A., Rämet M., Hallman M. Genome-wide association study of bronchopulmonary dysplasia: a potential role for variants near the CRP gene. Scientific reports. 2017; 7 (1): 1-10.

130. Malash A.H., Ali A.A., Samy R.M., Shamma R.A. Association of TLR polymorphisms with bronchopulmonary dysplasia. Gene. 2016; 592 (1): 23-28.

131. Mathew R. Signaling pathways involved in the development of bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension. Children. 2020; 7 (8): 100.

132. Maurer M., Wedemeyer J., Metz M., Piliponsky A.M., Weller K., Chatterjea D., Clouthier D.E., Yanagisawa M.M., Tsai M., Galli S.J. Mast cells promote

homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. Nature. 2004; 432 (7016): 512-516.

133. Maynard S.E., Min J.Y., Merchan J., Lim K.H., Li J., Mondal S., Libermann T.A., Morgan J.P., Sellke F.W., Stillman I.E., Epstein F.H., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. The Journal of clinical investigation. 2003; 111 (5): 649-658.

134. McColm J.R., Geisen P., Hartnett M.E. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: relevance to clinical ROP. Molecular vision. 2004; 10: 512.

135. McEvoy C.T., Jain L., Schmidt B., Abman S., Bancalari E., Aschner J. L. Bronchopulmonary dysplasia: NHLBI workshop on the primary prevention of chronic lung diseases. Annals of the American Thoracic Society. 2014; 11. Supplement 3: 146-153.

136. Meller S., Bhandari V. VEGF levels in humans and animal models with RDS and BPD: temporal relationships. Experimental lung research. 2012; 38 (4): 192-203.

137. Mestan K.K., Check J., Minturn L., Yallapragada S., Farrow K.N., Liu X., Su E., Porta N., Gotteiner N., Ernst L.M. Placental pathologic changes of maternal vascular underperfusion in bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension. Placenta. 2014; 35 (8): 570-574.

138. Mestan K.K., Gotteiner N., Porta N., Grobman W., Su E.J., Ernst L.M. Cord blood biomarkers of placental maternal vascular underperfusion predict bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension. The Journal of pediatrics. 2017; 185: 33-41.

139. Milanesi B.G., Lima P.A., Villela L.D., Martins A.S., Gomes-Junior S.C.S., Moreira M.E., Méio M. D. Assessment of early nutritional intake in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: A cohort study. European Journal of Pediatrics. 2021; 180 (5): 1423-1430.

140. Mohamed W.A.W., Niyazy W.H., Mahfouz A.A. Angiopoietin-1 and endostatin levels in cord plasma predict the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. Journal of tropical pediatrics. 2011; 57 (5): 385-388.

141. Mohammad N.S., Nazli R., Zafar H., Fatima S. Effects of lipid based Multiple Micronutrients Supplement on the birth outcome of underweight pre-eclamptic women: A randomized clinical trial. Pakistan Journal of Medical Sciences. 2022; 38 (1): 219.

142. Mol B.W., Roberts C.T., Thangaratinam S., Magee L.A., De Groot C.J., Hofmeyr G.J. Pre-eclampsia. The Lancet. 2016; 387 (10022): 999-1011.

143. Mourani P.M., Sontag M.K., Younoszai A., Miller J.I., Kinsella J.P., Baker C.D., Poindexter B.B., Ingram D.A., Abman S.H. Early pulmonary vascular disease in preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. American journal of respiratory and critical care medicine. 2015; 191 (1): 87-95.

144. Mulugeta S., Gray J.M., Notarfrancesco K.L., Gonzales L.W., Koval M., Feinstein S.I., Ballard P.L., Fisher A.B., Shuman H. Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. Journal of Biological Chemistry. 2002; 277 (25): 22147-22155.

145. Nakada M., Yamada A., Takino T., Miyamori H., Takahashi T., Yamashita J., Sato H. Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. Cancer research. 2001; 61 (24): 8896-8902.

146. Nelson K.K., Melendez J.A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. Free Radical Biology and Medicine. 2004; 37 (6): 768-784.

147. Netchine I., Azzi S., Le Bouc Y., Savage M.O. IGF1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2011; 25 (1): 181-190.

148. Ng P.C., Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Research. 2003; 31 (13): 3812-3814.

149. Ng S.B., Buckingham K.J., Lee C., Bigham A.W., Tabor H.K., Dent K.M., Huff C.D., Shannon P.T., Jabs E.W., Nickerson D.A., Shendure J., Bamshad M.J. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nature genetics. 2010; 42 (1): 30-35.

150. Nogee L.M., Garnier G., Dietz H.C., Singer L., Murphy A.M., DeMello D. E., Colten H. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. The Journal of clinical investigation. 1994; 93 (4): 1860-1863.

151. Parad R.B., Winston A.B., Kalish L.A., Gupta M., Thompson I., Sheldon Y., Morey J., Van Marter L.J. Role of genetic susceptibility in the development of bronchopulmonary dysplasia. The Journal of pediatrics. 2018; 203: 234-241.

152. Pejler G. The emerging role of mast cell proteases in asthma. European Respiratory Journal. 2019; 54 (4).

153. Plunkett J. A. Genetic influences on preterm birth. Washington University in St. Louis. 2010.

154. Prencipe G., Auriti C., Inglese R., Devito R., Ronchetti M.P., Seganti G., Ravà L., Orzalesi M., De Benedetti F. A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor promoter is associated with bronchopulmonary dysplasia. Pediatric research. 2011; 69 (2): 142-147.

155. Principi N., Di Pietro G. M., Esposito S. Bronchopulmonary dysplasia: clinical aspects and preventive and therapeutic strategies. Journal of translational medicine. 2018; 16 (1): 1-13.

156. Qi Y., Jiang, Q., Chen, C., Cao, Y., Qian, L. Circulating endothelial progenitor cells decrease in infants with bronchopulmonary dysplasia and increase after inhaled nitric oxide. PLoS One. 2013; 8 (11): e79060.

157. Reddanna P., Prabhu K.S., Whelan J., Reddy C.C. Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4. Archives of biochemistry and biophysics. 2003; 413 (2): 158-163.

158. Ren Y., Lyu Y., Mereness J.A., Wang S., Pang J., Mariani T. J. Rare Pulmonary Connective Tissue Type Mast Cells Regulate Lung Endothelial Cell Angiogenesis. The American Journal of Pathology. 2020; 190 (8): 1763-1773.

159. Rezvani M., Wilde J., Vitt P., Mailaparambil B., Grychtol R., Krueger M., Heinzman A. Association of a FGFR-4 gene polymorphism with bronchopulmonary dysplasia and neonatal respiratory distress. Disease markers. 2013; 35 (6): 633-640.

160. Robin B., Kim Y.J., Huth J., Klocksieben J., Torres M., Tepper R.S., Castile R.G., Solway J., Hershenson M.B., Goldstein-Filbrun A. Pulmonary function in bronchopulmonary dysplasia. Pediatric pulmonology. 2004; 37 (3): 236-242.

161. Rogers L.K., Robbins M., Dakhlallah D., Yang Z., Lee L.J., Mikhail M., Nuovo G., Pryhuber G.S., McGwin G., Marsh C.B., Tipple T.E. Attenuation of miR-17∼92 cluster in bronchopulmonary dysplasia. Annals of the American Thoracic Society. 2015; 12 (10): 1506-1513.

162. Ryckman K.K., Dagle J.M., Kelsey K., Momany A.M., Murray J.C. Genetic associations of surfactant protein D and angiotensin-converting enzyme with lung disease in preterm neonates. Journal of Perinatology. 2012; 32 (5): 349-355.

163. Sampath V., Garland J.S., Le M., Patel A.L., Konduri G.G., Cohen J.D., Simpson P.M., Hines R.N. A TLR5 (g.1174C > T) variant that encodes a stop codon (R392X) is associated with bronchopulmonary dysplasia. Pediatric Pulmonology. 2012; 47: 460–468.

164. Sánchez- Ovando S., Baines K.J., Barker D., Wark P.A., Simpson J.L. Six gene and TH2 signature expression in endobronchial biopsies of participants with asthma. Immunity, inflammation and disease. 2020; 8 (1): 40-49.

165. Sato T., Shima C., Kusaka S. Vitreous levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in eyes with retinopathy of prematurity //American journal of ophthalmology. 2011; 151 (2): 353-357.

166. Schmidt A. R., Ramamoorthy C. Bronchopulmonary dysplasia. Pediatric Anesthesia. 2022. 32 (2): 174-180.

167. Schnepp A., Lindgren P.K., Hülsmann H., Kröger S., Paulsson M., Hartmann U. Mouse testican-2: expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth. Journal of Biological Chemistry. 2005; 280 (12): 11274-11280.

168. Schrey-Petersen S., Stepan H. Anti-angiogenesis and preeclampsia in 2016. Current hypertension reports. 2017; 19 (1): 1-8.

169. Schulzke S.M., Pillow J.J. The management of evolving bronchopulmonary dysplasia. Paediatric respiratory reviews. 2010; 11 (3): 143-148.

170. Shafiee A., Penn J.S., Krutzsch H.C., Inman J.K., Roberts D.D., Blake D.A. Inhibition of retinal angiogenesis by peptides derived from thrombospondin-1. Investigative ophthalmology & visual science. 2000; 41 (8): 2378-2388.

171. Shaw G. M., O'Brodovich H. M. Progress in understanding the genetics of bronchopulmonary dysplasia. Seminars in perinatology. WB Saunders. 2013; 37 (2): 85-93.

172. Siezen C.L., Bont L., Hodemaekers H.M., Ermers M.J., Doornbos G., Van't Slot R., Wijmenga C., Houwelingen H.C., Kimpen J.L., Kimman T.G., Hoebee B., Janssen R. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis in preterm children is associated with airway remodeling genes and innate immune genes. The Pediatric infectious disease journal. 2009; 28 (4): 333-335.

173. Simpson S. J., Hall G. L., Wilson A. C. Lung function following very preterm birth in the era of ‘new’ bronchopulmonary dysplasia. Respirology. 2015; 20 (4): 535-540.

174. Sircar M., Thadhani R., Karumanchi S.A. Pathogenesis of preeclampsia. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 2015; 24(2): 131-138.

175. Speer C.P. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. WB Saunders. 2006; 11 (5): 354-362.

176. Stark A., Dammann C., Nielsen H.C., Volpe M.V. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases. Frontiers in pediatrics. 2018; 6: 125.

177. Stoll B.J., Hansen N.I., Bell E.F., Shankaran S., Laptook A.R., Walsh M.C., Hale E.C., Newman N.S., Schibler K., Carlo W.A., Kennedy K.A., Poindexter

B.B., Finer N.N., Ehrenkranz R.A., Duara S., Sánchez P.J., O'Shea T.M., Goldberg R.N., Van Meurs K.P., Faix R.G., Phelps D.L., Frantz I.D. 3rd, Watterberg K.L., Saha S., Das A., Higgins R.D. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. Pediatrics. 2010; 126 (3): 443-456.

178. Sweet D.G., McMahon K.J., Curley A.E., O'Connor C.M., Halliday H.L. Type I collagenases in bronchoalveolar lavage fluid from preterm babies at risk of developing chronic lung disease. Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition. 2001; 84 (3): 168-171.

179. Syed M., Das P., Pawar A., Aghai Z.H., Kaskinen A., Zhuang Z.W., Ambalavanan N., Pryhuber G., Andersson S., Bhandari V. Hyperoxia causes miR-34a-mediated injury via angiopoietin-1 in neonatal lungs. Nature communications. 2017; 8 (1): 1-17.

180. Thébaud B. Angiogenesis in lung development, injury and repair: implications for chronic lung disease of prematurity. Neonatology. 2007; 91 (4): 291-297.

181. Thébaud B., Abman S.H. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2007; 175 (10): 978-985.

182. Thébaud B., Goss K.N., Laughon M., Whitsett J.A., Abman S.H., Steinhorn R.H., Aschner J.L., Davis P.G., McGrath-Morrow S.A., Soll R.F., Jobe A.H. Bronchopulmonary dysplasia. Nature reviews Disease primers. 2019; 5 (1): 1-23.

183. Thekkeveedu R.K., Guaman M.C., Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: a review of pathogenesis and pathophysiology. Respiratory medicine. 2017; 132: 170-177.

184. Thomas W., Speer C.P. Современный взгляд на профилактику и лечение бронхолегочной дисплазии //детская медицина северо-Запада. 2012; 3 (2): 50-60.

185. Vannahme C., Schübel S., Herud M., Gösling S., Hülsmann H., Paulsson M., Hartmann U., Maurer P. Molecular cloning of testican- 2: defining a novel calcium- binding proteoglycan family expressed in brain. Journal of neurochemistry. 1999; 73 (1): 12-20.

186. Vannemreddy P., Notarianni C., Yanamandra K., Napper D., Bocchini J. Is an endothelial nitric oxide synthase gene mutation a risk factor in the origin of intraventricular hemorrhage? Neurosurgical Focus; 2010; 28 (1): 11.

187. Voynow J. A. "New" bronchopulmonary dysplasia and chronic lung disease. Paediatric respiratory reviews. 2017; 24: 17-18.

188. Wai K.C., Kohn M.A., Ballard R.A., Truog W.E., Black D.M., Asselin J.M., Ballard P.L., Rogers E.E., Keller R.L. Early cumulative supplemental oxygen predicts bronchopulmonary dysplasia in high risk extremely low gestational age newborns. The Journal of pediatrics. 2016; 177: 97-102.

189. Wallace B., Peisl A., Seedorf G., Nowlin T., Kim C., Bosco J., Kenniston J., Keefe D., Abman S.H. Anti–sFlt-1 therapy preserves lung alveolar and vascular growth in antenatal models of bronchopulmonary dysplasia. American journal of respiratory and critical care medicine. 2018; 197 (6): 776-787.

190. Wang G., Baines K.J., Fu J.J., Wood L.G., Simpson J.L., McDonald V.M., Cowan D.C., Taylor D.R., Cowan J.O., Gibson P.G. Sputum mast cell subtypes relate to eosinophilia and corticosteroid response in asthma. European Respiratory Journal. 2016; 47 (4): 1123-1133.

191. Wang X., Cui H., Wu S. CTGF: A potential therapeutic target for Bronchopulmonary dysplasia. European journal of pharmacology. 2019; 860: 172588.

192. Wang Z., Li W., Guo Q., Wang Y., Ma L., Zhang X. Insulin-like growth factor-1 signaling in lung development and inflammatory lung diseases. BioMed research international. 2018. T. 2018.

193. Wawrusiewicz- Kurylonek N., Koper- Lenkiewicz O.M., Gościk J., Myśliwiec J., Pawłowski P., Krętowski A. J. Association of PTPN 22 polymorphism and its correlation with Graves' disease susceptibility in Polish

adult population—A preliminary study. Molecular Genetics & Genomic Medicine. 2019; 7 (6): 661.

194. Weismann C.G., Asnes J.D., Bazzy-Asaad A., Tolomeo C., Ehrenkranz R.A., Bizzarro M.J. Pulmonary hypertension in preterm infants: results of a prospective screening program. Journal of Perinatology. 2017; 37 (5): 572-577.

195. Whitsett J.A., Kalin T.V., Xu Y., Kalinichenko V.V. Building and regenerating the lung cell by cell. Physiological reviews. 2019; 99 (1): 513-554.

196. Whitsett J.A., Wert S.E., Weaver T.E. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2015; 10: 371-393.

197. Winter N.A., Gibson P.G., McDonald V.M., Fricker M. Sputum Gene Expression Reveals Dysregulation of Mast Cells and Basophils in Eosinophilic COPD. International journal of chronic obstructive pulmonary disease. 2021; 16: 2165.

198. Woods K.A., Camacho-Hübner C., Savage M.O., Clark A.J. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. New England Journal of Medicine. 1996; 335 (18): 1363-1367.

199. Wu F.T., Stefanini M.O., Gabhann F.M., Kontos C.D., Annex B.H., Popel A.S. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. Journal of cellular and molecular medicine. 2010; 14 (3): 528-552.

200. Wu S., Platteau A., Chen S., McNamara G., Whitsett J., Bancalari E. Conditional overexpression of connective tissue growth factor disrupts postnatal lung development. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2010; 42 (5): 552-563.

201. Yan Z., Liu L., Jiao L., Wen X., Liu J., Wang N. Bioinformatics analysis and identification of underlying biomarkers potentially linking allergic rhinitis and asthma. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. 2020; 26: 924934-1.

202. Yang M., Chen B.L., Huang J.B., Meng Y.N., Duan X.J., Chen L., Li L.R., Chen Y.P. Angiogenesis-related genes may be a more important factor than matrix metalloproteinases in bronchopulmonary dysplasia development. Oncotarget. 2017; 8 (12): 18670.

203. Young S.L., Evans K., Eu J.P. Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2002; 282 (3): 379-385.

204. Zeisler H., Llurba E., Chantraine F., Vatish M., Staff A.C., Sennström M., Olovsson M., Brennecke S.P., Stepan H., Allegranza D., Dilba P., Schoedl M., Hund M., Verlohren S. Predictive value of the sFlt-1: PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. New England journal of medicine. 2016; 374: 13-22.

205. Zelenina M., Zelenin S., Aperia A. Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation. Pediatric research. 2005; 57 (7): 47-53.

206. Zhang F., Jia C., Lin X., Su Z., Wu F., Li Y., Lin L., Liu G. The association between surfactant protein B gene variation and bronchopulmonary dysplasia in Chinese premature newborns. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2018; 11 (7): 3753-3758.

207. Ziche M., Morbidelli L., Choudhuri R., Zhang H.T., Donnini S., Granger H.J., Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. The Journal of clinical investigation. 1997; 99 (11): 2625-2634.