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

На правах рукописи

ПОЖАРИЩЕНСКАЯ ВАЛЕРИЯ КОНСТАНТИНОВНА

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ 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:

кандидат биологических наук,

Савостьянов Кирилл Викторович

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений 4
Введение 7
Глава 1. Современный взгляд на клинико-генетическую детерминацию формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей 15
1.1. Эпидемиология, классификация и патогенез бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей 15
1.2. Клинико-анамнестические факторы риска формирования БЛД у недоношенных детей 16
1.3. Генетические факторы риска формирования БЛД у недоношенных детей.... 18
1.3.1 Роль генов сурфактантов в развитии БЛД у недоношенных детей 19
1.3.2 Роль генов цитокинов в развитии БЛД у недоношенных детей 25
1.3.3 Роль генов, влияющих на формирование воспалительного ответа в развитии БЛД у недоношенных детей 29
1.3.4 Роль генов антиоксидантов и металлопротеиназ в развитии БЛД у недоношенных детей 32
Глава 2. Материалы и методы исследования 39
2.1. Дизайн исследования и клинико-анамнестическая характеристика недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД..... 41
2.2. Инструментальное обследование детей в изучаемых группах 43
2.2.1. Мультислайсовая компьютерная томография органов грудной клетки у детей первого года жизни с бронхолегочной дисплазией..... 44
2.2.2. Выделение ДНК методом экстракции фенол-хлороформом из пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге 46
2.2.3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени 46
2.3. Методы статистической обработки результатов исследования..... 51
Глава 3. Сравнительная оценка факторов риска развития БЛД у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших данное заболевание 53

3.1. Особенности неонатального периода и их влияние на развитие бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей 53
3.2. Результаты инструментальных исследований у недоношенных детей, сформировавших БЛД..... 61
3.3 Клинические примеры..... 62
Глава 4. Сравнительная оценка полиморфных маркеров генов-кандидатов у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД 65
4.1. Оценка распределения частот аллелей и генотипов варианта rs652438 гена *MMP12* 66
4.2. Оценка распределения частот аллелей и генотипов варианта rs694739 гена *LOC102823878*..... 70
4.3. Оценка распределения генотипов варианта rs652438 гена *MMP12* и rs694739 гена *LOC102823878* у недоношенных детей в зависимости от степени тяжести бронхолегочной дисплазии (по данным МСКТ ОГК) 73
4.4. Клинические примеры..... 75
Глава 5. Современная оценка клинико-генетических факторов риска формирования БЛД у недоношенных детей (обсуждение результатов) 78
Выводы 89
Практические рекомендации 91
Приложение. Алгоритм ведения недоношенных детей на основании данных клинико-генетического обследования..... 92
Список литературы 93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БЛД – бронхолегочная дисплазия

ВЧОВЛ – высокочастотная осциллярная искуственная вентиляция легких

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ЛСФ - лимфоидно-специфическая фосфатаза

ММП – матриксные металлопротеиназы

МСКТ ОГК - мультислайсовая компьютерная томография органов грудной клетки

ОАП – открытый артериальный проток

ОНМТ – очень низкая масса тела

ПКВ – постконцептуальный возраст

ПМП – противомикробные пептиды

РГК – рентгенограмма грудной клетки

РДС – респираторный дистресс-синдром

ФНОα – фактор некроза опухоли альфа

ЭНМТ – экстремально низкая масса тела

AID (autoimmune disease) - аутоиммунные заболевания

EBP – (T/enhancer binding protein) энхансер-связывающий белок

FGFR 1-4 (fibroblast growth factor receptors) – гены, кодирующие рецепторы фактора роста фибробластов 1-4

FiO2 - фракция кислорода во вдыхаемом воздухе

GCL – (glutamylcysteinelygase) ген, кодирующий глутамилцистеинлигазу

GCL – (glutamylcysteinelygase) глутамилцистеинлигаза

GST – (glutation-S-transferase) глутатион-S- трансфераза

GSTM1, GSTT1 и *GSTP1* – (glutation-S-transferase) гены, кодирующие глутатион-S-трансферазу M1, T1, P1.

IL1 β, 4, 6, 8, 10, 13, 19 - (interleukin) интерлейкин-1 β, 4, 8, 10, 13, 18

IL18R1 – (interleukin 18 receptor 1) рецептор 1 интерлейкина 18

IL1RN – (interleukin receptor) антагонист рецептора интерлейкина-1

IL6R – (interleukin receptor) рецептор интерлейкина 6

IL6ST – (interleukin signal transductor) сигнальный трансдуктор интерлейкина 6

INF-гамма – интерферон-гамма

IRAK1 – (interleukin-1 receptor-associated kinase) киназа, ассоциированная с рецептором интерлейкина 1

SOD – (superoxide dismutase) супероксиддисмутаза

LOC102723878 – ген, расположенный в хромосомной области 102723878

MAL – (myelin and lymphocyte protein) белки миелина и лимфоцитов

MMP – (matrix metalloproteinase) матриксные металлопротеиназы

*SOD2 – (*superoxide dismutase, *2*) ген, кодирующий супероксиддесмутазу, 2

SOD2 – *(*superoxide dismutase, 2) супероксиддесмутаза, 2

NCPAP – (Nose Constant Positive Airway Pressure) постоянное положительное давление в дыхательных путях через носовые катетеры

NFKBIA – (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alfa) ядерный фактор каппа полипептидного гена энхансера в ингибиторах В клеток

NKX21 – ген, кодирующий фактор транскрипции щитовидной железы (TTF-1)

NR3C1 – глюкокортикоидный рецептор

PPV - Positive Pressure Ventilation (постоянное положительное давление в дыхательных путях)

PRDX5 – (peroxyredoxin) ген, кодирующий пероксиредоксин 5

PTPN22 – (protein-tyrosine phosphatase) ген, кодирующий белок тирозин фосфатазы 22

SFTPA1 – (surfactant protein A) ген, кодирующий сурфактантный белок А 1

SFTPB – (surfactant protein B) ген, кодирующий сурфактантный белок В

SFTPC – (surfactant protein C) ген, кодирующий сурфактантный белок С

SFTPD – (surfactant protein D) ген, кодирующий сурфактантный белок Д

SP-A, SFTPA – (surfactant protein A) сурфактантный белок А

SP-B, SFTPB – (surfactant protein B) сурфактантный белок В

SP-D, SFTPD – (surfactant protein D) сурфактантный белок Д

SP-C, SFTPC – (surfactant protein C) сурфактантный белок С

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

TIRAP – (toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) толл-интерлейкиновые рецепторы, содержащие адаптерный белок

T_A_C – (total antioxidant capacity) общая антиоксидантная способность крови

T_O_S – (total oxidant status) общий окислительный статус крови

TLR – (Toll-like receptors) Толл-подобные рецепторы

TLRs (1,2,3,4,5,6,7,8,9) – (toll-like receptors) толл-подобные рецепторы (1,2,3,4,5,6,7,8,9)

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

TNF-α – (tumor necrosis factor) ген, кодирующий фактор некроза опухоли

TTF 1 – (thyroid transcription factor) тиреоидный фактор транскрипции-1

TYK2 – (tyrosine kinase) ген тирозинкиназы 2

TAGAP (T cell activation RhoGTPase activating protein) – Т клеточная активация белка, активированного ГТФ-азой

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) является многофакторным хроническим заболеванием легких, встречающимся, в основном, у недоношенных детей в 15-40% случаев. Существуют общеизвестные факторы риска данного заболевания: низкая масса тела при рождении, недоношенность, респираторный дистресс-синдром (РДС), респираторная поддержка в неонатальном периоде. В настоящее время отмечается совершенствование реанимационных протоколов для недоношенных новорожденных, включающих профилактическое и терапевтическое применение препаратов сурфактанта, раннее проведение респираторной поддержки постоянным положительным давлением в дыхательных путях (CPAP), раннее медикаментозное или хирургическое закрытие гемодинамически значимого открытого артериального протока (ОАП), кофеинотерапию, применение витамина А и другие стратегии с высоким уровнем доказательности эффективности их применения [5,13,14,94].

Современная концепция этиопатогенеза БЛД включает в себя общие положения о многофакторности этой патологии, а также о сложном характере взаимодействия как наследственных, так и внешнесредовых факторов в процессе развития заболевания.

Очевидно, что не все недоношенные дети, имеющие факторы риска развития БЛД, формируют данное заболевание. Одним из важнейших моментов в профилактике развития БЛД является грамотная стратегия респираторной поддержки недоношенного ребенка с РДС в неонатальном периоде, позволяющая предотвратить формирование данного заболевания. Тем не менее, наличие значимой когорты недоношенных детей с диагнозом БЛД в исходе РДС, даже при условии проведения им адекватной респираторной поддержки в первые недели жизни, свидетельствует о наличии иных факторов, определяющих возможность хронизации бронхолегочного процесса у данной категории больных. Идея существования определенной генетической предрасположенности детей к

тяжелому течению РДС с последующим формированием бронхолегочной дисплазии, в последнее время изучается во всем мире [14,16,17,41]. В отечественной литературе доступны результаты единичных исследований по изучению ассоциации генов-кандидатов с развитием БЛД у недоношенных детей [4,8,14,16].

Предполагается, что с изучением роли генетических факторов предрасположенности к формированию БЛД будет связан научный прогресс в раскрытии патогенеза заболевания, а также в разработке эффективных методов профилактики его формирования, что приведет к уменьшению фармакоэкономических затрат за счет адекватного научно-обоснованного прогнозирования постнатального развития и тактики лечения таких больных.

Учитывая это, работы, направленные на выявление генетических предикторов формирования БЛД и их сопоставление с клинико-анамнестическими факторами риска, являются особенно актуальными, тем более, что на сегодняшний день клинически значимых результатов ассоциативных генетических исследований получено очень мало.

В мировой научной литературе последних лет отмечен существенный интерес к выявлению генетических предикторов формирования БЛД. Активно исследуется ассоциация генов-кандидатов, которые могут быть вовлечены в развитие БЛД на уровне различных систем организма: антиоксидантной, сосудистой системы легких, протеолитических ферментов, а также системы продукции белков сурфактанта [26,57,59,71,92,115].

Степень разработанности темы

Тяжесть течения заболевания и социально-экономическая значимость последствий формирования БЛД у недоношенных детей остается актуальной проблемой здравоохранения, что определяет необходимость поиска генетических предикторов формирования БЛД у недоношенных детей. При анализе научной литературы, посвященной данной проблеме, было отмечено, что вопрос генетической детерминации формирования БЛД у недоношенных детей остается недостаточно изученным [2, 4, 6, 15, 18, 29].

В отечественной и зарубежной литературе представлены научные исследования, касающиеся в основном изучения полиморфизма генов, кодирующих белки факторов роста фибробластов, белки сурфактанта, белки металлопротеиназ. Исследования, посвященные генам, кодирующим белки, влияющие на формирование воспалительного ответа, единичны [22, 24, 41, 49, 64].

В настоящее время необходимо обобщение данных мировой литературы, а также анализ собственных данных, касающихся сопоставления клинико-анамнестических и генетических факторов риска формирования БЛД у недоношенных детей, а также создание алгоритма клинико-генетической диагностики БЛД, что будет иметь как научную, так и практическую значимость.

Цель исследования

Выявить генетические факторы предрасположенности к формированию бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей и сопоставить их с клинико-анамнестическими факторами риска развития данного заболевания

Задачи исследования:

1. Провести клинико-анамнестическую и рентгенологическую оценку недоношенных детей, получавших респираторную поддержку в неонатальном периоде, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию.
2. Проанализировать однонуклеотидные варианты генов-кандидатов, кодирующих белки сурфактанта (*SFTPB, SFTPC, SFTPA*), факторы роста фибробластов (*FGFR4, FGFR2*), металлопротеиназы (*MMP2, MMP9, MMP12, MMP16*), генов, кодирующих белки, влияющие на формирование воспалительного ответа (*PTPN22, HLA-DRA, TAGAP, TYK2, LOC102723878*) у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию.
3. Определить влияние однонуклеотидных вариантов генов-кандидатов на формирование бронхолегочной дисплазии с учетом клинико-анамнестических и рентгенологических характеристик пациентов.
4. Создать алгоритм клинико-генетической диагностики бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей.

Научная новизна

Впервые создана база данных ДНК недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

Впервые обосновано включение оценки по шкале APGAR менее 4 баллов на 1 и 5 минутах жизни в группу факторов высокого риска формирования БЛД.

Впервые в Российской Федерации у недоношенных детей в одном исследовании были проанализированы однонуклеотидные варианты генов-кандидатов, кодирующих белки сурфактанта (*SFTPB, SFTPC, SFTPA*), факторы роста фибробластов (*FGFR4, FGFR2*), металлопротеиназы (*MMP2, MMP9, MMP12, MMP16*), а также генов, кодирующих белки, влияющие на формирование воспалительного ответа (*PTPN22, HLA-DRA, TAGAP, TYK2, LOC102723878*) у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

Впервые сопоставлены клинико-анамнестические и генетические факторы риска формирования БЛД у недоношенных детей.

Впервые определены генетические маркеры предрасположенности к формированию БЛД у недоношенных детей.

Впервые создан алгоритм клинико-генетической диагностики БЛД у недоношенных детей с целью внедрения его педиатрическую практику.

Теоретическая и практическая значимость

Доказано, что недоношенным детям, имеющим высокий риск развития БЛД по результатам сопоставления клинико-анамнестических и генетических факторов риска, необходимо проведение комплексной медикаментозной профилактики до 28 дня жизни.

Особую ценность для использования в клинической практике имеют определенные в исследовании генетические предикторы формирования БЛД, что позволяет использовать разработаный алгоритм клинико-генетической диагностики для прогноза формирования БЛД у недоношенных детей в неонатальном периоде для выделения группы риска и своевременного назначения медикаментозной профилактики этой патологии.

Основные результаты исследования рекомендованы для использования в

лечебных учреждениях, занимающихся выхаживанием недоношенных детей (перинатальные центры, отделения реанимации и интенсивной терапии и отделения 2 этапа выхаживания недоношенных детей).

Методология и методы исследования

При выполнении настоящей работы были изучены и проанализированы данные отечественной и иностранной научной литературы, касающиеся клинико-анамнестических и генетических факторов риска формирования БЛД у недоношенных детей.

В настоящем исследовании был проведен ретроспективный анализ данных медицинской документации (выкопировка данных из истории болезни, амбулаторных карт). Выборка репрезентативна, соответствует признакам генеральной совокупности. Исследование одномоментное(поперечное), случай-контроль.

Оценка рентгенологических признаков структурных изменений респираторной системы проводилась методом мультислайсовой компьютерной томографии органов грудной клетки (МСКТ ОГК) в фазе физиологического или медикаментозного сна на мультиспиральном компьютерном томографе «Aquilion» фирмы TOSHIBA.

Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) осуществлялось методом экстракции фенол-хлороформом из пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге, с дальнейшим проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. 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). Участки исследуемых генов амплифицировали с использованием метода ПЦР в режиме реального времени на термоциклере “ABI StepOnePlus” («Applied Biosystems», США) [56].

В исследованиях типа «случай-контроль» относительный риск развития заболевания оценивался с помощью показателя соотношения шансов (ОШ). Значение ОШ вычисляли с помощью программы «Калькулятор для расчета

статистики в исследованиях «случай-контроль» [138]. Математическая обработка материала проведена с использованием статистического пакета IBM SPSS 6.0, Microsoft Office Excel 7.0. Для статистической обработки результатов применялись методы описательной статистики в качестве основных характеристик использовались средняя арифметическая (M) при нормальном распределении, стандартное отклонение (SD), определение 95% доверительного интервала (ДИ). В случае распределения, отличающегося от нормального, или анализа порядковых переменных, использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (U) для двух независимых выборок. Для выявления корреляционной взаимосвязи двух признаков (силы и направления) применялся ранговый коэффициент корреляции Пирсона (r) и непараметрический коэффициент корреляции Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Подтверждено, что риск формирования БЛД имеют дети с ОНМТ и ЭНМТ при рождении, с низкими баллами оценки по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни и длительной кислородозависимостью. Полученные данные соответствуют общепринятым в настоящее время представлениям о влиянии клинико-анамнестических факторов риска на развитие БЛД у недоношенных детей.

2. Показана возможность влияния генотипов *TC* и *CC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12,* ответственного за процессы протеолиза легочной ткани, и варианта rs694739 гена *LOC102723878,* расположенного в области гена *PRDX5*, играющего важную роль в формировании воспалительного ответа, на формирование БЛД у недоношенных детей.

3. Ассоциации других исследованных однонуклеотидных вариантов генов-кандидатов, кодирующих факторы роста фибробластов *FGFR4* (rs376618, rs1966265), *FGFR2* (rs2981579, rs1219648), белки сурфактантов *SFTPA1* (rs4253527), *SFTPA2* (rs121917737, rs121917738), *SFTPB* (rs137853202), *SFTPC* (rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318, rs121917835, rs121917836, rs121918560) и генов, кодирующих белки, влияющие на формирование

воспалительного ответа *PTPN22* (rs2476601), *HLA-DRA* (rs9268645), *TAGAP* (rs1738074), *TYK2* (rs34536443, rs2304256), с развитием БЛД в исследовании обнаружено не было.

Внедрение результатов исследования в практическое здравоохранение

Основные научные положения, выводы и рекомендации исследования используются в научной и клинической работе 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

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается репрезентативной выборкой пациентов, использованием методологических стандартов научно-обоснованной медицинской практики, современных информативных методов лабораторного и инструментального обследования, адекватных методов анализа и статистической обработки данных.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019». МГУ (Москва, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Осенние филатовские чтения» (Пенза, 2019).

Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 7 печатных работ, включая 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автором лично выполнена основная работа на всех этапах диссертации: анализ литературных источников и подготовка обзора литературы, постановка цели и задач исследования, формирование базы данных, ретроспективный анализ медицинской документации, клиническое наблюдение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, выделение ДНК методом экстракции фенол-хлороформом из пятен крови, высушенных на фильтровальной

бумаге с дальнейшим проведением ПЦР в режиме реального времени, статистическая обработка полученных данных и их интерпретация, на основании которых были сформулированы основные положения диссертационной работы, выводы и практические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, 1 приложения. Работа содержит 12 рисунков, 12 таблиц. Библиографический список представлен 139 источниками, из них 21 отечественных и 118 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ДЕТЕРМИНАЦИЮ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

1.1. Эпидемиология, классификация и патогенез бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей

Первоначально, в 1967 году, БЛД была описана, как полиэтиологическое хроническое заболевание морфологически незрелых легких, развивающееся у новорожденных, главным образом глубоко недоношенных детей, в результате интенсивной терапии респираторного дистресс-синдрома и/или пневмонии[110], и до настоящего времени считается наиболее распространенной формой хронической патологии легких у детей первого года жизни [23].

Приблизительно у 40% детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) при рождении развивается БЛД [19], при этом в США БЛД диагностируется у 10000-15000 грудных детей ежегодно.

В 1995 году заболевание было включено в классификацию клинических форм бронхолегочной патологии у детей, после чего диагностические и классификационные критерии БЛД претерпевали многократные изменения и были утверждены в 2014 году на XVII конгрессе педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии» и Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины. Согласно принятому определению, БЛД — это полиэтиологическое хроническое заболевание морфологически незрелых легких, развивающееся у новорожденных, главным образом у глубоко недоношенных детей, в результате интенсивной терапии РДС и/или пневмонии. Протекает с преимущественным поражением бронхиол и паренхимы легких, развитием эмфиземы, фиброза и/или нарушением репликации альвеол; проявляется зависимостью от кислорода в возрасте 28 суток жизни и старше, бронхообструктивным синдромом и дыхательной недостаточностью; характеризуется специфическими рентгенологическими изменениями в первые месяцы жизни и регрессом клинических проявлений по мере роста ребенка [18]. Необходимость

кислородотерапии (Fi02 более 21%) и/или применения положительного давления (PPV или NCPAP) на 36 неделе постконцептуального возраста (ПКВ) или 28 сутки жизни отражает тяжесть состояния пациента и динамику заболевания за несколько предыдущих дней. В зависимости от необходимости дополнительной оксигенации или респираторной поддержки в 36 недель (ПКВ) или при выписке из стационара (что наступит раньше) определяется степень тяжести болезни — легкое, среднетяжелое или тяжелое течение [2].

Современная концепция этиопатогенеза БЛД включает в себя общие положения о многофакторности этой патологии, а также о сложном характере взаимодействия как генетических, так и внешнесредовых факторов в процессе развития заболевания. Наследственная предрасположенность является одним из факторов риска, наряду с незрелостью анатомических структур легкого, неполным функционированием системы сурфактанта и антиоксидантной системы у недоношенных детей, токсическим воздействием кислорода на легочную ткань, баротравмой легких в связи с применением ИВЛ, дыхательными расстройствами на фоне РДС, внутриутробными инфекциями, отеком легких, легочной гипертензией, акушерско-гинекологическими материнскими факторами риска (хроническая фетоплацентарная недостаточность, хориамнионит, колпит, преэклампсия, ожирение, курение, гестационный диабет, многоплодная беременность, родоразрешение путем кесарева сечения, респираторные инфекции во время беременности, многоводие и др.) и неонатальными факторами риска (срок гестации, масса тела и длина, а также оценка по шкале APGAR при рождении, длительность и режимы ИВЛ, длительность кислородозависимости, сопутствующая патология) [5,11,13,14,94].

1.2. Клинико-анамнестические факторы риска формирования БЛД у недоношенных детей

Клиническими критериями диагностики БЛД являются: искусственная вентиляция легких на первой неделе жизни и/или респираторная терапия с постоянным положительным давлением в дыхательных путях через носовые

катетеры; терапия кислородом более 21% во вдыхаемой смеси (FiO2>21%) в возрасте 28 дней жизни и старше (кислородозависимость); дыхательная недостаточность, бронхообструктивный синдром в возрасте 28 дней и старше. Начало развития БЛД можно предположить обычно к 7-10 дню жизни, когда у недоношенного ребенка, находящегося на ИВЛ по поводу РДС, отсутствует положительная динамика клинических симптомов, развивается стойкая дыхательная недостаточность после первичного улучшения состояния, часто связанного с введением сурфактанта [18]. Начальные проявления заболевания тесно связаны с клинической картиной респираторного дистресс-синдрома. При неосложненном РДС на 3-4-е сутки жизни обычно наступает улучшение. Первым признаком возможного формирования БЛД является затяжное течение РДС [2].

БЛД является основным хроническим заболеванием легких у недоношенных детей и часто имеет осложненное течение. К осложнениям БЛД, согласно отечественной классификации, относятся хроническая дыхательная недостаточность, острая дыхательная недостаточность на фоне хронической, ателектаз, легочная гипертензия, легочное сердце, системная артериальная гипертензия, недостаточность кровообращения, гипотрофия [18]. С тех пор, как заболевание было впервые описано, эпидемиология, патогенез и тактика лечения БЛД существенно изменились [132]. Прошедшее десятилетие ознаменовалось значимыми достижениями в изучении проблемы БЛД. На наших глазах происходит патоморфоз заболевания с формированием более легких вариантов его течения. В российской популяции начинают преобладать дети с новой формой БЛД, протекающей преимущественно в легком или среднетяжелом варианте и имеющей благоприятный исход у подавляющего большинства больных [7]. Главной причиной такого патоморфоза является совершенствование реанимационных протоколов для недоношенных новорожденных, включающих профилактику гипотермии и терапию в рамках концепции «защиты легких», в том числе профилактическое и терапевтическое применение препаратов сурфактанта, раннее проведение респираторной поддержки постоянным положительным давлением в дыхательных путях, раннее медикаментозное или хирургическое

закрытие гемодинамически значимого открытого артериального протока (ОАП), кофеинотерапию, применение витамина А и другие стратегии с высоким уровнем доказательности эффективности их применения [5]. Внедрение современных перинатальных технологий, широкое использование методов интенсивной терапии в лечении недоношенных новорожденных детей, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела, привели к существенному увеличению выживаемости данной категории пациентов [11,13].

За последнее десятилетие доля недоношенных детей, сформировавших БЛД, имеет тенденцию к уменьшению, причем классические формы заболевания при применении современных методов респираторной поддержки у детей с РДС встречаются все реже [48]. Однако, в поле зрения неонатологов и пульмонологов остается достаточно значимая когорта недоношенных детей, формирующих БЛД в исходе РДС, несмотря на адекватную респираторную поддержку в неонатальном периоде. Идея существования определенной генетической предрасположенности детей к тяжелому течению РДС с последующим формированием БЛД, в последнее время занимает умы исследователей во всем мире [40]. Заслуживает внимания тот факт, что не все недоношенные дети, имеющие клинико-анамнестические факторы риска развития БЛД, формируют данное заболевание.

1.3. Генетические факторы риска формирования БЛД у недоношенных детей

Многофакторность этиопатогенеза БЛД предопределяет широкий круг поиска генетически детерминированных механизмов, лежащих в основе повреждения легочной ткани при данном заболевании. В нашей стране и за рубежом внимание исследователей приковано к поиску ассоциации полиморфизмов генетических маркеров в генах системы сурфактантов, ферментов антиоксидантной защиты, металлопротеиназ, факторов роста, цитокинового каскада, главного комплекса гистосовместимости HLA II-го класса и др. с развитием БЛД [5,11,13,14,16,17,41]. Предполагается, что с изучением

роли генетических факторов предрасположенности к формированию БЛД будет связан научный прогресс в раскрытии патогенеза заболевания, а также в разработке эффективных методов профилактики его формирования, что приведет к уменьшению фармако-экономических затрат за счет адекватного персонифицированного научно-обоснованного прогнозирования постнатального развития и лечения таких больных. Учитывая это, работы, направленные на выявление полиморфных генетических маркеров формирования БЛД и их сопоставление с клинико-анамнестическими факторами риска, являются особенно актуальными, тем более, что на сегодняшний день клинически значимых результатов ассоциативных исследований получено очень мало.

1.3.1 Роль генов сурфактанта в развитии БЛД у недоношенных детей

Одним из самых важных звеньев в патогенезе БЛД является несовершенство сурфактантной системы новорожденного ребенка, связанное с недоношенностью, морфо-функциональной незрелостью или внутриутробным инфицированием. Особая роль в реализации РДС у недоношенных новорожденных принадлежит сурфактантам, основной функцией которых является снижение поверхностного натяжения альвеолярной стенки и препятствие спадению альвеол на выдохе, что обеспечивает нормальный газообмен. В настоящее время особое внимание уделяется изучению генетических аспектов синтезирования различных типов сурфактантов (A, B, C, D), а также их транспортных белков.

Согласно современным представлениям, генетические особенности могут аддитивно либо синергически способствовать повреждению ткани или, наоборот, обеспечивает защиту от этого повреждения. В дополнение к этому конституциональные и генетические факторы могут тесно взаимодействовать с внешнесредовыми факторами. Генетический полиморфизм в отдельных популяциях может проявляться увеличением риска развития БЛД, как, например, повышенный риск РДС у недоношенных детей выявлен и описан в финской популяции [59,115].

Установление связи определенных аллелей и генотипов с формированием тяжелой БЛД свидетельствует о вовлеченности содержащих их генов в патогенез заболевания. Гены, кодирующие сурфактантные белки, а также гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции, дифференциации, росте и альвеоляризации легочной ткани, могут оказывать влияние на развитие этой патологии [108]. Наиболее вероятными кандидатами являются гены с многофакторными функциями.

В ряде исследований была установлена тесная взаимосвязь аллельных вариантов генов, кодирующих мультифункциональные белки сурфактанта A, B, C, D (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D), с неонатальной патологией лёгких, в том числе с БЛД [5,13,34,53,60,108,109,125,127]. В исследовании в университете Johns Hopkins в 2013 году, основываясь на предполагаемой роли SP-D, предположили, что редкие полиморфные варианты гена, кодирующего сурфактант D-ассоциированный белок SFTPD, могут вызвать диффузные заболевания легких у детей. Для проверки этой гипотезы было проведено исследование последовательности гена *SFTPD* в группе пациентов с идиопатическими диффузными заболеваниями легких. В том числе, был проведен скрининг лиц с идиопатическими диффузными заболеваниями легких в отношении генетической дисфункции сурфактантной системы, при этом не было выявлено каких-либо значимых полиморфных вариантов последовательности гена *SFTPD*, которые могли бы участвовать в развитии заболеваний легких. Был сделан вывод, что полиморфные варианты гена *SFTPD* не являются частой причиной диффузных заболеваний легких у детей. Однако, эти данные не исключают возможность того, что друге редкие полиморфные варианты гена *SFTPD* могут быть ассоциированы, либо вызывать заболевания легких [24].

В исследовании, проведенном в 2013 году в Китае, у 12 пациентов было обнаружено гомозиготное носительство генотипа C/C полиморфного маркера *c.1580C>T* гена *SFTPB*, тогда как 8 пациентов оказались гетерозиготными носителями этого полиморфизма. Также было обнаружено 7 случаев носительства гетерозиготных генотипов *C/T* и 1 случай гомозиготного носительства генотипа

C/C в группе контроля. Для дальнейшей оценки взаимосвязи между концентрацией SP-B и наличием полиморфных генетических вариантов были проанализированы новорожденные с низкой экспрессией SP-B, как в группе с РДС, так и в контрольной группе. Из 15 новорожденных с РДС с низким уровнем SP-B у 12 пациентов были выявлены гомозиготные генотипы *C/C* и у 2 пациентов - гетерозиготные генотипы *C/T* в гене *SFTPB*. В результате исследования был сделан вывод о том, что носительство гомозиготного генотипа *C/C* полиморфного маркера *c.1580C>T* гена *SFTPB* ассоциировано с дефицитом SP-B в легких у новорожденных, тогда как у других гетерозиготных носителей достоверную ассоциацию выявить не удалось. Дальнейшие исследования полиморфизма маркера *c.1580C>T* гена *SFTPB* подтвердили выявленную ассоциацию гомозигот генотипа *C/C* с развитием РДС и формированием БЛД у недоношенных детей в Китае [136].

Кроме того, в 2013 году исследовали четыре полиморфизма гена *SFTPB* (*c.-18C>A*, *c.1580C>T* и *c.9306A>G*) у китайских младенцев с целью оценки влияния SFTPB на возможность формирования БЛД. В результате исследования делеционного полиморфизма в интроне 4 у 173 (58,1%) из 242 младенцев была обнаружена норма, у 52 (25,6%) – гетерозиготный генотип и у 17 (16,3%) - гомозиготный. В контрольной группе детей, не сформировавших БЛД, соответствующие частоты составили 78,8%, 19,2% и 1,9%, соответственно. У этих же пациентов изучалось распределение аллелей и генотипов в трех других однонуклеотидных полиморфизмах гена *SFTPB* (*c.-18C>A*, *c.1580C>T* и *c.9306A>G*). Частота генотипов *C/C*, *A/C* и *A/A* полиморфного маркера *c.-18C>A* у детей с БЛД составила 23,3%, 44,2% и 32,6%, тогда как в контрольной группе частота составила 38,5%, 42,3% и 19,2%, соответственно. Никаких значимых различий в распределении частот генотипов полиморфных маркеров *c.1580C>T* и *c.9306A>G* между исследуемой и контрольной группами не было найдено. Из возможных 24 гаплотипов были обнаружены 16 в группе больных БЛД и 13 в контрольной группе. Гаплотип *A-del-C-A* полиморфных маркеров *c.-18C>A*, *c.1580C>T* и *c.9306A>G* встретился в группе БЛД с частотой 0,12, тогда как в

группе контроля - с частотой 0,08, показав заметное достоверное различие (p = 0,003). Частота гаплотипа *C-del-T-A* была значительно ниже в группе детей с БЛД по сравнению с контрольной группой (p = 0,008). Гаплотипы *C-del-CG и C-del-T-G* не были обнаружены в контрольной группе, но они наблюдались в группе пациентов с БЛД [29].

В корейской обзорной статье 2013 года описывается, что наиболее распространенным полиморфизмом, обнаруженным в 60 - 70% случаев в гене *SFTPB*, является делеция нуклеотида С и инсерция 3-х пар нуклеотидов *GAA* в кодоне 121 экзона 4 гена *SFTPB c.1549delCinsGAA* [68,62]. Этот полиморфизм вызывает сдвиг рамки считывания и преждевременное прерывание трансляции, в результате чего синтезируется усеченный SF-B. Гомозиготные младенцы с аутосомно-рецессивным наследственным дефицитом сурфактанта В являются невосприимчивыми к заместительной терапии сурфактантом, что, в основном, приводит к летальному исходу в случае невозможности трансплантации легких. На основании популяционного исследования показано, что полиморфизм *c.154del9CinsGAA* гена *SFTPB* встречается довольно редко: 0,4% в штате Миссури, 0,1% в Норвегии, и 0% в Корее и Южной Африке [54]. Кроме полиморфизма *c.154del9CinsGAA*, на сегодняшний день обнаружено более 30 других полиморфизмов, приводящих к потере функции в SP-B. Wambach J.A. с соавторами сообщают о 86 полиморфных участках гена *SFTPB*, в том числе о 81 однонуклеотидном полиморфизме и 5 небольших инсерциях/делециях [63]. Несколько исследований показали, что полиморфизм *c.428C>T* гена *SFTPB* связан с развитием РДС [101, 100].

Мутации в гене *SFTPC,* как полагают, приводят к образованию неправильно свернутых молекул proSP-C, которые накапливаются в альвеолярных клетках 2-го типа и вызывают их повреждение. В отличие от мутаций гена *SFTPB*, мутации в гене *SFTPC* могут вызывать различные респираторные нарушения: от тяжелого РДС новорожденных до хронической интерстициальной болезни легких взрослых [24, 127, 37, 87]. Изменения, вызванные данными мутациями у доношенных новорожденных, соответствуют симптомам, характерным для РДС, и могут

привести к летальному исходу в неонатальном периоде. Более половины этих мутаций, как полагают, возникают спонтанно и приводят к спорадическим случаям [61]. Описано около 35 различных мутаций гена *SFTPC*, причем, наиболее распространенной является мутация, приводящая в замене изолейцина на треонин в кодоне *73 p.I73T* [37]. Lahti M с соавторами [89] показали, что патогенные варианты гена *SFTPC* связаны с риском развития РДС среди детей, рожденных на сроке <28 недель гестации.

Мутации в гене *ABCA3*, кодирующем АТФ-зависимый транспортер А3 впервые были определены у 16 из 21 пациента с тяжелым неонатальным дефицитом сурфактанта [120]. При проведении исследования легочной ткани у 4-х пациентов с различными мутациями гена *ABCA3* обнаружены аномальные пластинчатые тельца в альвеолах. Фенотипические проявления мутантного гена *ABCA3* могут сильно варьировать, приводя как к фатальному дефициту сурфактанта у доношенных новорожденных [35], имеющему сходные клинические и радиологические результаты с дефицитом SP-B, так и к хронической интерстициальной болезни легких у детей более старшего возраста [36,47].

Выявлено, что редкие полиморфные варианты гена *ABCA3* ассоциированы с неонатальным РДС в популяции недоношенных детей из Китая. Гаплотип *TGGAG* полиморфных маркеров rs150929, rs4787273, rs11867129, rs17135889 и rs13332514 встречался значительно чаще у детей с РДС, по сравненю с детьми без РДС. Частота минорного аллеля в однонуклеотидном полиморфизме *c.-539+3314C>T* была значительно выше у младенцев с РДС, что может являться фактором риска развития РДС у недоношенных детей. Однако, не было установлено значимой корреляции между генотипами *AG* и *GG* полиморфного маркера rs17135889 и клиническими данными, такими как продолжительность кислородной поддержки, потребность в ИВЛ, осложнения бронхолегочной дисплазии и смертность. Гаплотип *TGGAG* может быть фактором риска развития РДС у недоношенных детей. Необходимы дальнейшие исследования с большим размером выборки для проверки связи между однонуклеотидным полиморфизмом *c.-539+3314C>T* и

повышенным риском развития РДС у недоношенных детей [129].

Помимо системы синтеза и транспорта сурфактантов, внимание генетиков привлекают факторы транскрипции - белки, контролирующие процесс синтеза мРНК на матрице ДНК путём связывания со специфичными участками ДНК. Был выявлен ряд факторов транскрипции, в том числе тиреоидный фактор 1 (TTF 1) или тиреоидный- энхансер-связывающий белок [T/EBP] [32,135], C/EBP-альфа (C/EBPα)[96], которые влияют на формирование легких и синтез эндогенного сурфактанта. Взаимодействие TTF1 и C/EBPα регулирует синтез сурфактанта и периферическое созревание легких [99]. TTF1, кодируемый *NKX2-1*, обнаружен в щитовидной железе, головном мозге и легких [36]. Мутации в гене *NKX2-1* приводят к синдрому “мозг-легкие-щитовидная железа”, включающему тяжелое течение РДС, дыхательную недостаточность у новорожденных и интерстициальные заболевания легких у детей [64]. C/EBP-α играет важную роль в синтезе и метаболизме липидов и белков сурфактанта. Патогенные варианты гена *C/EBP-α* могут вызвать ингибирование легочной эпителиально-клеточной пролиферации и дифференцировки [99].

Были обнаружены различные однонуклеотидные полиморфизмы в кодирующих областях генов, ассоциированные по результатам исследований с РДС [64, 115, 58, 51, 73, 102, 128]. Lee K. с соавт. [91] и Kim N. с соавт. [82] представили распределение и частоты аллелей и генотипов генов *SFTPA1* и *SFTPA2* у корейских новорожденных.

Об аллельных вариантах *6A2* гена *SFTPA1* и, *1A0* гена *SFTPA2* и гаплотипах *SP-A1/SP-A2 6A2/1A0* часто сообщалось в финских и североамериканских исследованиях как о факторах риска развития РДС, тогда как аллельный вариант *6A3* гена *SFTPA1* представлялся в качестве фактора, защищающего от развития РДС [112, 58, 51]. При этом, эти модели значительно отличались от исследований корейских недоношенных детей [102], в которых аллельный вариант *1A0* гена *SFTPA2* и генотип *1A0/1A0* были связаны с защитой от РДС. Связь РДС с конкретными вариантами гена SFTPA среди различных этнических групп предполагает, что развитие РДС является многофакторным процессом со

значительной вариабельностью. В некоторых исследованиях связь между конкретными вариантами генов *SFTPB*, *SFTPA* и *SFTPD* и риском развития РДС была подтверждена на близнецах, рожденных преждевременно. Найдены достоверные ассоциации аллелей GG и CC полиморфных маркеров rs2243639 и rs721917 гена *SFTPD* с защитой от развития БЛД, а также сообщается о связи между аллельным вариантом *6A6* в гене *SFTPA1* и риском развития БЛД [51,128,91]. При этом, несмотря на многочисленные исследования связи генетических полиморфизмов генов *SFTPA1* и *SFTPA2* с развитием РДС. Точного механизма причинно-следственной связи между конкретным полиморфизмом и РДС с дальнейшим формированием БЛД установить не удалось до сих пор [122].

1.3.2 Роль генов цитокинов в развитии БЛД у недоношенных детей

Существует все больше доказательств того, что цитокин-опосредованное интерстициальное воспаление способствует развитию хронических заболеваний легких: с одной стороны, цитокины являются ключевым фактором в развитии воспалительной реакции; а с другой стороны, существует возможность того, что генетические факторы, связанные с цитокиновым каскадом, играют роль в восприимчивости к легочным заболеваниям [92].

Интерстициальное воспаление, как показал иммуногистохимический анализ крови 40 младенцев, умерших на первой неделе жизни от острой дыхательной недостаточности на фоне РДС, максимально выражено в первые 72 ч жизни. Было показано, что у недоношенных детей с РДС активация циркулирующих полиморфно-ядерных лейкоцитов с включением в процесс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов играет важную роль в патогенезе этого синдрома [50,111]. В промоторной области ряда генов цитокинов содержатся полиморфизмы, которые могут оказывать влияние на экспрессию цитокинов. Основываясь на этих наблюдениях, можно предположить, что аномальная продукция цитокинов, связанная с наличием этих полиморфизмов, может предопределять развитие РДС.

Хориоамнионит и пренатальное воспаление хорошо известны, как предикторы формирования БЛД [124,133,83]. Характерные дефекты генов,

кодирующих провоспалительные цитокины, такие, как фактор некроза опухоли альфа (ФНОα), интерлейкин-1 β (IL1β), интерлейкин-6 (IL6), интерлейкин-8 (IL8) и антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL1RN), были обнаружены при исследовании сыворотки пуповинной крови детей, рожденных от матерей с тяжелым хориоамнионитом. Повышенные уровни цитокинов при хориоамнионите коррелируют с последующим развитием БЛД [133,88]. Повышенные концентрации IL1, IL6, IL8, IL10 и INF-гамма, и более низкие концентрации интерлейкина-17 прогнозируют формирование БЛД.

Было показано, что изменения в генах, кодирующих TGF-β1, также играют важную роль в патогенезе БЛД [74,112].

Интерлейкин-10 (IL-10) является важным иммунорегуляторным цитокином, который, в основном, продуцируется моноцитами, макрофагами, Т-клетками и В-клетками. Он контролирует воспалительные процессы путем подавления экспрессии провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и антиген-представляющих и костимуляторных молекул в моноцитах, макрофагах, нейтрофилах и Т-клетках [27]. Риск РДС был значительно ниже в итальянской популяции недоношенных детей с генотипами *GG* и *GA* полиморфного маркера *c.–1082 G>A* (rs1800896) гена *IL10* по сравнению с генотипом *AA* (ДИ: 0.24-0.95; p = 0,03) [38]. Уровень противовоспалительного цитокина IL-10 был снижен в плацентах матерей пациентов с БЛД по сравнению с таковыми у детей, не сформировавших БЛД, в США [103].

Интерлейкин-18 (IL-18), являясь важным цитокином, участвующим в патогенезе многих заболеваний принадлежит к семейству IL-1. Он продуцируется макрофагами и другими клетками и является важным регулятором врожденных и приобретенных иммунных ответов [52,55]. В США ассоциации с БЛД были установлены для генотипа *AA* полиморфного маркера rs3771150 гена *IL-18RAP* и генотипа *AA* полиморфного маркера rs3771171 гена *IL-18R1* [131]. В немецком исследовании была обнаружена ассоциация ряда маркеров IL-18 с преждевременными родами [88]. Кроме того, немецкие авторы исследовали две различные популяции недоношенных младенцев для поиска ассоциации

полиморфизмов гена IL-18 с развитием БЛД и пришли к выводу, что исследованные полиморфизмы гена IL-18 не вовлечены в развитие бронхолегочной дисплазии [88].

Была оценена роль полиморфизма rs10471960 гена *IL-6* у новорожденных японских детей, формирующих БЛД. Продолжительность терапии кислородом у детей с генотипами *CG и GG* была значительно больше, чем у детей с генотипом *CC*, однако частота развития БЛД не была связана с носительством ни одного из этих генотипов (*CG* и *GG* 40,0%; CC 46,3%, p>0,05) [74]. В Финляндии были исследованы полиморфизмы генов, кодирующих рецепторы интерлейкина-6 (IL6R и IL6ST), ФНОα и глюкокортикоидные рецепторы (NR3C1). Ни один из исследованных полиморфизмов не был связан с формированием БЛД [72].

TNF-α играет важную роль в регуляции воспаления путем воздействия на высвобождение других провоспалительных цитокинов. Ассоциация гена *TNF-α* с БЛД уже была описана несколько лет назад [77]. Генотипы *AA* и *GA* полиморфного маркера *c.-238G>A* гена *TNF-α* реже встречались у детей с БЛД, по сравнению с детьми без БЛД. Аллель *c.-238A* отсутствовал у детей с тяжелым течением БЛД и встречался значительно реже у младенцев с заболеванием средней степени тяжести, по сравнению с детьми с легким течением БЛД. Носительство аллеля *c.-238A* гена *TNF-α* коррелирует обратно пропорционально с тяжестью течения БЛД, уменьшая риск формирования и тяжесть течения БЛД [79]. Тем не менее, другим исследователям не удалось воспроизвести эти результаты, что может быть связано с небольшим числом обследованных новорожденных [125]. Другие исследователи обнаружили ассоциацию полиморфного маркера *c.-238G>A* гена *TNF-α* с возникновением хориоамнионита у матери, не выявив ассоциацию с формированием БЛД у ее ребенка [78].

В результате исследования полиморфизма *c.-238G>A* гена *TNF-α* у недоношенных египетских детей удалось обнаружить ассоциацию аллеля *c.-238A* гена *TNF-α* с двухкратным риском развития БЛД (OR = 2,86; 95% CI=1.35-3.83). Аллель *c.-238A* преобладал среди детей с БЛД (23%), по сравнению с детьми без БЛД (15%). Этот аллель встречался реже у детей с легким течением БЛД (9%), по

сравнению с детьми с тяжелым (39%) или умеренным (52%) течением заболевания [47]. В США был проведен анализ однонуклеотидных полиморфизмов: *c.-1031*, *c.-857*, *c.-308*, и *c.-238* гена *TNF-α*, не выявивший значимой связи с тяжестью течения БЛД ни у одного из них [125].

Китайские ученые исследовали полиморфизм *c.-308G>*A гена *TNF-α* у недоношенных (<30 недель гестации) детей, сделав вывод, что он не является показательным маркером для прогнозирования формирования хронических заболеваний легких у населения Китая [92].

Интересны результаты определения факторов риска формирования БЛД в немецкой популяции [31]. Выявленная ассоциация полиморфизма *c.-857C>T* (rs 1799724) гена *TNF-α* оказалась достоверной p = 0,0085, при этом изученные полиморфизмы генов, кодирующих интерлейкины 8, 4, 13, 10, 18, не показали статистически значимую ассоциацию с формированием БЛД (таблица 1.3.1).

Показано, что интерлейкин-4 (IL-4) стимулирует и усиливает воспалительную реакцию, стимулирует синтез коллагена в фибробластах, способствует переходу к фиброзу, а также ингибирует синтез некоторых цитокинов, что является фактором риска формирования БЛД. В тайваньском исследовании не было выявлено существенных различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма *c.-589C>T* в интроне 3 гена *IL-4* между недоношенными детьми сформировавшими и не сформировавшими БЛД. Также не было выявлено достоверной ассоциации полиморфизма *c.-589C>T* гена *IL-4* с продолжительностью ИВЛ [93].

Факторы роста фибробластов являются секретируемыми гликопротеинами, участвующими во взаимодействиях между эпителием и мезенхимой, регулирующими клеточную миграцию и пролиферацию во время эмбрионального развития плода [79]. Передача их сигналов зависит от мембранно-локализованных рецепторов (FGFR), кодируемых четырьмя генами (*FGFR 1–4*) [97,113]. Все они преобразуются в развивающихся легких и, как предполагается, играют важную роль в модификации дистальных отделов легких во время альвеоляризации легочной ткани [134].

Таблица 1.3.1 Генетические факторы риска формирования БЛД в немецкой популяции [30].

Ген	Полиморфный маркер	Аллели	Область гена	Уровень достоверности
IL-8	rs4073	*A/T*	Промоторный регион	0,7333
	rs227306	*C/T*	Интрон	0,6578
TNF-α	rs1799964	*C/T*	5' UTR	0,0085
	rs1799724	*C/T*	5' UTR	0,5290
	rs1800629	*A/G*	Промотер	0,5037
TNF-β	rs909253	*C/T*	Интрон	0,8427
IL-4	rs2243250	*C/T*	Промотер	0,8665
IL-13	rs1881457	*A/C*	Промотер	0,5292
	rs1800925	*C/T*	Промотер	0,9130
	rs20541	*C/T*	Экзон	0,8090
IL-10	rs3024498	*A/G*	3' UTR	0,4725
	rs1800872	*A/C*	Промотер	0,4822
IL-18	rs1946518	*G/T*	Промотер	0,0539
	rs187238	*C/G*	Промотер	0,5557
	rs360718	*A/C*	Экзон	0,9225
	rs360717	*C/T*	Экзон	0,6548
	rs795467	*A/G*	Интрон	0,7640
	rs360721	*C/G*	Интрон	0,9585

1.3.3 Роль генов, влияющих на формирование воспалительного ответа, в развитии БЛД у недоношенных детей

Известно, что успешная защита от патогенов осуществляется за счёт распознавания микроорганизмов системой врожденного иммунитета [1]. Рецепторы распознавания патогена обнаружены на многих клетках иммунной

системы, включая эпителиальные клетки, фибробласты, дендроциты и нейтрофилы. Среди нескольких групп таких рецепторов, найденных у человека, наиболее значимыми являются Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR) [11]. Долгое время эпителий слизистой оболочки респираторного тракта рассматривался только как механический барьер, защищающий от неблагоприятных факторов окружающей среды. В последнее время его рассматривают как полноправного участника иммунных реакций, выполняющего свою функцию путем удаления патогена за счет мукоцилиарного клиренса, распознавания патогена Toll-подобными рецепторами (TLRs), секреции ряда цитокинов и противомикробных пептидов (ПМП) [11]. Толл-подобные рецепторы, распознающие структуры клеточной стенки бактерий (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR 6) [65], экспрессируются преимущественно на поверхности клетки [125], в то время, как TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, способные связываться с нуклеиновыми кислотами, располагаются внутриклеточно на поверхности эндосом [67].

Toll-подобные рецепторы участвуют в окислительных реакциях при травмах и воспалительных процессах в легких. Были исследованы 9 генов-кандидатов *TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, IRAK1, MAL, TIRAP, NFKB1* и *NFKBIA*, с целью поиска ассоциации с БЛД у детей, набранных в 4 медицинских центрах США в 2012 году. Не было выявлено достоверной связи генов *TLR2, TLR4, TLR9, NFKB1* и *NFKBIA* с формированием БЛД. Статистически значимым в отношении формирования БЛД оказался полиморфизм *c.1174C>T* гена *TLR5* [118]. Также было показано, что полиморфизм c.896A>G гена *TLR4* предрасполагает детей к тяжелому течению РДС. В 2012 году была исследована связь полиморфизма *c.896A>G* гена *TLR4* с риском формирования БЛД. В двух канадских центрах обследовано 269 младенцев, рожденных до 30 недели гестации. Ассоциацию изученного полиморфизма гена *TLR4* с формированием БЛД найти не удалось [90].

Не было выявлено достоверных различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма *c.1174C>T* гена *TLR 5* и полиморфизма *c.2054C>T* гена

TIRAP между недоношенными детьми с БЛД и без нее в Египте. В этом же исследовании не было выявлено статистически значимых различий в полиморфизмах указанных генов между пациентами с легким, среднетяжелым или тяжелым течением БЛД [28].

В ряде исследований был отмечен повышенный риск формирования БЛД при пролонгированной ИВЛ у недоношенных детей с низкой массой тела при рождении для полиморфных вариантов (*c.-308G>A* (rs 1800629), *c.-238G>A* (rs361525)) гена ФНОα (*TNF-α*) [77,34].

Ген, кодирующий белок тирозин фосфатазу, *PTPN22* (также известный как ЛСФ - лимфоидно-специфическая фосфатаза) играет важную роль в регуляции функций различных клеток иммунной системы, в частности, Т-клеток. Было показано, что ЛСФ на поверхности Т-клеток играет ключевую роль в предотвращении спонтанной активации Т-клеток и снижает ответ на воздействие антигенов путем дефосфорилирования и инактивации киназ (и их субстратов) [22]. Однонуклеотидные варианты гена *PTPN22* связаны со многими аутоиммунными заболеваниями, включая сахарный диабет 1 типа, который является Т-клеточным заболеванием [25], целиакию [22], системную красную волчанку [68], болезнь Грейвса [134]. Варианты гена *HLA-DRA* (лейкоцитарный ген человека) повышают риск развития волчаночного нефрита [92], являются потенциальными маркерами развития полипов носа при аспирин-толерантной астме [81] Однонуклеотидные варианты гена *TAGAP* (гена, кодирующего белок, активирующий Т-клеточную активацию ГТФ-азы) связаны с развитием целиакии [119], рассеянного склероза [72], тяжелых форм болезни Крона [42]. Имеются данные о функциональном воздействии генетических вариантов в гене тирозинкиназы 2 (*TYK2*), который связан с распространенными аутоиммунными заболеваниями: анкилозирующий спондилит [43], болезнь Крона [75], рассеянный склероз [30], псориаз [130], язвенный колит [126]. Варианты гена *PRDX5*, кодирующего цитопротективный антиоксидантный фермент пероксиредоксина, участвуют в формировании воспалительного ответа, играя важную роль в воспалительных процессах через кислород-опосредованное повреждение

митохондрий, ингибируя апоптоз [86]. В мировой литературе описано, что ген *LOC102823878*, расположенный на хромосоме 11, в области гена *PRDX5*, участвует в формировании таких воспалительных заболеваний, как анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, псориаз, склерозирующий холангит [71,26]. Имеются данные о влиянии однонуклеотидных вариантов генов, расположенных в гене *LOC102823878*, на формирование множественной эндокринной неоплазии, атаксии-телеангиэктазии, туберозного склероза и некоторых форм астмы и ринита, на метастазирование в лимфатические узлы во время эволюции опухоли [109], на течение серповидно-клеточной анемии [104].

Из вышеописанного можно сделать вывод о том, что достоверных ассоциаций полиморфизмов генов цитокинов и других компонентов воспалительного ответа с риском формирования БЛД, выявлено не было. Однако, научный поиск в этом направлении продолжается. На наш взгляд, внедрение молекулярно-генетических методов исследования воспалительного ответа может позволить научно обосновать и разработать новые подходы к диагностике и терапии БЛД.

1.3.4 Роль генов антиоксидантов и металлопротеиназ в развитии БЛД у недоношенных детей

Важную роль в патогенезе бронхолегочной дисплазии играет окислительный стресс, характеризующийся предварительной экскрецией окислительных и антиокислительных протеаз.

Среди многочисленных механизмов антиоксидантной защиты и системы цитопротекции особое место занимает семейство ферментов глутатион-S-трансфераз (GST), внутри которого наиболее частыми объектами для молекулярно-генетических исследований являются гены *GSTM1, GSTT1* и *GSTP1* [74, 137]. В 2013 году в Греции обнаружено, что гомозиготные генотипы *AA* полиморфизма *c.313A>G* гена *GSTP1* были выявлены у 23 недоношенных детей с БЛД и 23 недоношенных детей без БЛД. 4 пациентов с БЛД и 6 детей из группы контроля являлись носителями гетерозиготного генотипа *AG* полиморфизма

c.313A>G. Наконец, гомозиготное носительство *GG* полиморфизма *c.313A>G* было выявлено у 1 недоношенного ребенка с БЛД и у 4-х недоношенных детей без БЛД. Статистический анализ показал недостоверное различие в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма *c.313A>G* гена *GSTP1* между группами детей, сформировавших и не сформировавших БЛД [40].

В Китае в 2013 году изучали частоты аллелей и генотипов гена *GSTM1*. В обеих группах (с БЛД и без БЛД) было отмечено, что референсный положительный (*GSTM1-present genotype, 350, 215 bp*) генотип чаще встречался в контрольной группе (52,0%), по сравнению с группой детей с БЛД (35,0%), в то время как нулевой генотип (*GSTM1-null genotype, 350bp*) гена *GSTM1* чаще встречался у младенцев с БЛД (65,0%), по сравнению с контрольной группой (48,0%). Не было выявлено достоверных статистических различий между контрольной группой и группой детей с БЛД в частотах встречаемости аллелей и генотипов гена *GSTT1*. Кроме того, было показано, что сочетание делеций обоих генов (*GSTM1* и *GSTT1*) чаще встречалось среди пациентов с БЛД (38,3%), по сравнению с контрольной группой (21,0%), тогда как встречаемость референсных генотипов обоих генов была выше в группе пациентов без БЛД (79,0%), по сравнению с детьми контрольной группы (61,7%) [137].

Совершенствование технологических платформ по генотипированию способствовало активизации исследований в области неонатальной патологии. Обследование детей из двоен показало высокую вероятность формирования БЛД у второго ребенка, если первый болен БЛД [40, 51, 32].

Были проведены исследования по выявлению связи ряда генов-кандидатов, продукты которых участвуют в функционировании антиоксидантной и иммунной систем защиты организма, с развитием БЛД [116,59]. Например, такая взаимосвязь с риском формирования БЛД была установлена для гена глутатион-S-трансферазы-P1 [98]. В результате этих исследований было выдвинуто предположение о том, что степень повреждения легочной ткани активными факторами кислорода и тяжесть клинических проявлений заболевания могут быть

результатом действия как одного, так и нескольких полиморфных вариантов генов, кодирующих антиоксидантные ферменты.

Как отечественные, так и зарубежные авторы исследовали частоту встречаемости полиморфных вариантов генов, кодирующих марганецсупероксиддесмутазу и глутамилцистеинлигазу у недоношенных детей из группы высокого риска развития БЛД. В частности, были исследованы полиморфные маркеры *c.-60C>T* гена *SOD2* и с.*-129C/T* гена *GCL* [96, 87].

Известно, что наличие однонуклеотидных замен в генах, кодирующих антиоксидантные ферменты, может влиять на уровень экспрессии гена, активность синтезирующего белка, либо его конформацию [106, 39, 121]. У пациентов группы риска развития БЛД статистически значимо чаще регистрировались минорные аллели *c.-129T* гена *GCL* и *c.-60T* гена *SOD2*. Эти полиморфизмы могут приводить к изменениям уровня экспрессируемых ферментов, способствуя снижению антиоксидантной защиты и усилению окислительного стресса [46,106].

Вероятно, вклад аллелей и генотипов ряда однонуклеотидных замен в генах, кодирующих антиоксидантные ферменты, в патогенез заболевания заключается в изменении баланса прооксидантов и антиоксидантов в организме недоношенного ребенка и усилении патологического воздействия свободных радикалов на незрелую легочную ткань. Для уточнения этой гипотезы, у 60 недоношенных детей проспективной группы, имевших в соответствии с прогностическими параметрами высокий риск развития БЛД, были исследованы общая окислительная способность крови, общая антиоксидантная способность крови, а также содержание в сыворотке крови супероксиддисмутазы и глутатиона. Общая антиоксидантная способность у пациентов основной группы была недостаточной, а в группе детей без дыхательных расстройств значения T_A_C достигали нормального уровня и были статистически значимо выше, чем у недоношенных из группы риска развития БЛД. Кроме того, была выявлена корреляция между снижением общей антиоксидантной способности крови у детей с РДС

недоношенных и длительностью респираторной поддержки, а также неблагоприятным исходом заболевания [46].

Количественные значения фермента SOD в плазме крови снижены не только у детей из группы риска развития БЛД, но и у остальных новорожденных. Так, в исследовании Nassi N. и соавт. определялось содержание SOD в плазме и эритроцитах доношенных и недоношенных новорожденных и было показано, что снижение уровня фермента наблюдается в течение 100 дней после рождения во всех группах пациентов [106]. Однако, некоторые исследователи обнаружили нормальную или увеличенную экспрессию SOD2 и активность внеклеточной SOD в ткани легких недоношенных детей с РДС, впоследствии сформировавших БЛД [83].

В соответствие с результатами, полученными Е.Б. Павлиновой в 2012 году, у недоношенных детей, обладающих генотипом *TC* полиморфоного маркера *c.-58T>C* гена *SOD2*, значения SOD были достоверно меньше, чем у детей с генотипом *TT*. Учитывая то, что фактически 30% детей, сформировавших впоследствии БЛД, имели генотип *TC* полиморфоного маркера *c.-58T>C* гена *SOD2* и, соответственно, сниженный уровень SOD, можно предположить возможную этиологическую значимость этого полиморфного варианта в повреждении легочных структур. Вероятно, изменения связаны с тем, что фермент супероксиддисмутаза, инактивирующий супероксидный радикал, может предотвращать активацию и индукцию синтеза матриксных металлопротеиназ [15].

Матриксные металлопротеиназы (ММП) — семейство ферментов, разрушающих белки внеклеточного матрикса [57]. Установлено, что ММП играют важную роль в ряде физиологических и патологических процессов, включая эмбриогенез, заживление ран, воспаление, сердечно-сосудистые болезни, болезни легких и рак [39]. Матриксные металлопротеиназы способны денатурировать фибриллярные коллагены и активировать развитие фиброза. Активность ММП контролируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ [6]. Имеются данные об активном участии ММП в развитии процессов

деструкции внеклеточного матрикса легочной ткани, клеток альвеолярного эпителия и эндотелия капилляров с последующим развитием инициального септального фиброза. В процессе течения бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей повышается содержание матриксных металлопротеиназ-1,-2,-9 и их тканевого ингибитора-2 в сыворотке крови и трахеальном аспирате, что указывает на длительную деструкцию внеклеточного матрикса и процессов фиброзирования легочной ткани. ММП-9 является маркером и дополнительным диагностическим критерием поражения легочной ткани у детей с БЛД, его максимальная концентрация наблюдается в период наиболее выраженных клинических проявлений болезни [3].

ММП являются цинк-зависимыми протеолитическими ферментами, расщепляющими все формы компонентов внеклеточного матрикса [80]. Некоторые ММП активируются в воспалительной среде и выполняют защитную функцию. Имеются данные о том, что некоторые изоформы ММП являются важными детерминантами для альвеоляризации, особенно ММП-2 [80], ММП-9 [65] и ММП-16 [59]. Альвеоляризация требует координации ремоделирования внеклеточного матрикса с морфогенезом эпителия и ростом капилляров под контролем ММП [57]. ММП-14 играет главную роль в альвеоляризации легочной ткани. Роль ММП-16 в развитии легких ранее не изучалась, но была четко продемонстрирована его способность локализоваться на клеточной мембране и активировать про-ММП-2. Также известно, что ММП-16 имеет вариант сплайсинга, состоящий из растворимой формы, в которой отсутствует трансмембранный домен. Эта растворимая форма также может активировать про-ММП-2 [65].

В мировой литературе существуют данные об ассоциациях однонуклеотидных вариантов генов, кодирующих различные ММП, с развитием РДС у недоношенных детей [57]. Было описано увеличение активности ММП-16 во время альвеолярной стадии развития легких и обнаружено, что однонуклеотидные варианты в гене *MMP-16* связаны с более низкой активностью ММП-2 и -16 в трахее и предотвращают формирование БЛД [58].

Однонуклеотидные варианты в генах, кодирующих ММП, могут влиять на их функцию у недоношенных детей и, таким образом, приводить к формированию БЛД. Обнаружено, что однонуклеотидный вариант в промоторе гена *MMP-2* (*c.-1306 C/T*) модулирует активность промотора *MMP-2* и имеет функциональное значение [114]. Кроме того, было показано, что гаплотип четырех однонуклеотидных вариантов гена *MMP-14* (*c.-130T/ c.256T/c.6762C/c.7131C*) был связан с хронической обструктивной болезнью легких [117]. Выявлено, что генотип *TT* однонуклеотидного варианта rs2664352 и генотип *GG* однонуклеотидного варианта rs2664349 в гене *MMP-16* ассоциированы с достоверно более низким риском развития БЛД [106]. Частота аллеля *T* однонуклеотидного варианта rs2664352 была выше у детей, не сформировавших БЛД, по сравнению с группой детей, сформировавших БЛД (p=0,01). Аналогично, частота аллеля *G* однонуклеотидного варианта rs2664349 была значительно выше у детей, не сформировавших БЛД, по сравнению с детьми, сформировавшими данное заболевание (p <0,03) [65].

Другими, не менее важными регуляторами активности и синтеза ММП, по данным экспериментальных исследований, являются активные формы кислорода, эффекты которых ограничиваются энзимными и неэнзимными антиоксидантами [44]. Оксиданты стимулируют NFKBIA, которые, в свою очередь, активируют гены, ответственные за синтез IL-1, IL-8, TNF-α и других провоспалительных цитокинов, что приводит к привлечению нейтрофилов и эскалации генерации активных форм кислорода. Последние способствуют высвобождению ММП и повышают коллагеназную активность, что ведет к разрушению компонентов экстрацеллюлярного матрикса и развитию фиброза в легочной ткани [107].

Кроме того, учитывая данные о подавлении активации ММП-9 (желатиназы) неферментным антиоксидантом N-ацетилцистеином в системе *in vitro* [8], в патогенезе окислительного стресса и повреждения легких имеет значение содержание глютатиона в сыворотке крови. Известно, что содержание этого небелкового тиола значительно увеличивается у маловесных детей после рождения [123]. Показано, что содержание глютатиона у детей группы риска

формирования БЛД достоверно не отличалось от группы контроля, т.е. имело нормальные значения. Однако в группе детей, у которых диагностирован генотип *CT* полиморфного маркера с.-129C>T гена *GCL*, количество глутатиона в сыворотке крови было статистически значимо ниже, чем в группе недоношенных, не имевших данный генотип. В результате исследования почти у половины детей (44,4%), развивших БЛД, выявлен гетерозиготный генотип гена *GCL* против 21,5% случаев у пациентов, не сформировавших заболевание (χ^2=4,86, ОШ=0,35, p<0,05), что могло привести к усилению оксидативного стресса, потенцированию апоптоза бронхиальных эпителиальных клеток, дальнейшему ремоделированию стенок бронхов и формированию данного заболевания [15].

Учитывая многофакторный патогенез БЛД, представляется целесообразным не выделение конкретных этиологических генов, вовлеченных в развитие патологического процесса, а определение основных механизмов повреждения легочной ткани с позиций генетической детерминации. Перспективы исследований генетической предрасположенности к развитию БЛД в настоящее время связаны с изучением полиморфизма генов разнообразных защитных и адаптационных систем, в том числе эндогенных сурфактантов, цитокинового каскада, ферментов антиоксидантной защиты и др. Значимые результаты этих исследований могут в дальнейшем привести к возможности профилактики формирования БЛД и индивидуализации терапии в случае развития заболевания.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование проводилось в течение 2014-2018 гг. на базе ФГАУ “Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей” Министерства здравоохранения Российской Федерации, (директор – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, А.П. Фисенко), в отделении восстановительного лечения детей раннего возраста с перинатальной патологией (руководители - доктор медицинских наук И.В. Давыдова, кандидат медицинских наук Е.П. Зимина) и лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики (руководитель – кандидат биологических наук К.В. Савостьянов). Дизайн исследования представлен на рисунке 2.1.

Для решения поставленных в работе задач были использованы следующие методы:

1. Анализ анамнестических и клинических данных наблюдаемых больных и ретроспективный анализ медицинской документации (история болезни, амбулаторная карта). Сбор и анализ демографических данных (пол, возраст), акушерско-гинекологического анамнеза матери и анамнеза ребенка (гестационный возраст, масса тела, длина тела при рождении и оценка по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительность и режимы ИВЛ, длительность кислородозависимости, сопутствующая патология, анамнез настоящей болезни).
2. Инструментальное обследование детей (МСКТ ОГК)
3. Выделение ДНК методом экстракции фенол-хлороформом из пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге.
4. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.
5. Методы математической статистики и корреляционного анализа.

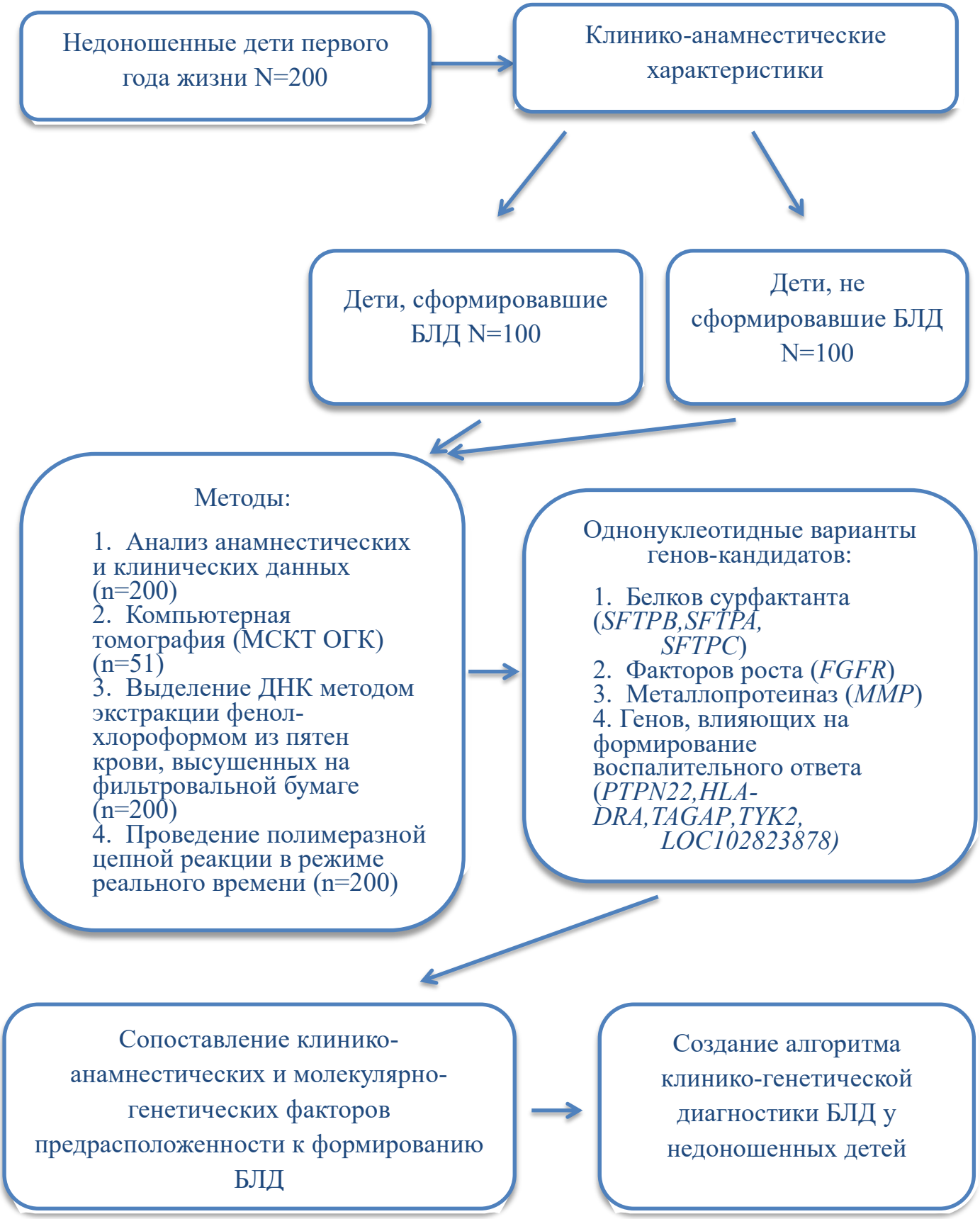


Рисунок 1. Дизайн исследования

В соответствии с целями и задачами в исследование были включены результаты ретроспективного анализа медицинской документации (история болезни, амбулаторная карта) 200 недоношенных детей, сформировавших (n=100) и не сформировавших БЛД (n=100).

Критерии включения в исследование:

1. Недоношенные дети, получавшие респираторную поддержку в неонатальном периоде в связи с РДС недоношенных, сформировавшие и не сформировавшие БЛД
2. Гестационный возраст ребенка при рождении менее 37 недель
3. Возраст ребенка на момент сбора данных не более 1 года

Критерии исключения из исследования:

1. Доношенные дети
2. Генетически обусловленные синдромальные состояния у детей
3. Дети с врожденными пороками легких, муковисцидозом, врожденным стридором

2.1. Клинико-анамнестическая характеристика недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД

Проведен анализ анамнестических и клинических данных наблюдаемых больных и ретроспективный анализ медицинской документации (история болезни, амбулаторная карта), акушерско-гинекологического анамнеза матери и анамнеза ребенка (гестационный возраст, масса тела, длина тела при рождении и оценка по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительность и режимы ИВЛ, длительность кислородозависимости, сопутствующая патология, анамнез настоящей болезни).

В исследование включены 200 недоношенных детей первого года жизни с гестационным возрастом менее 37 недель при рождении и РДС в неонатальном периоде.

Основную группу составили 100 недоношенных детей, сформировавших бронхолегочную дисплазию (мальчиков – 55, девочек – 45), с гестационном возрастом до 28 недель 6 дней – 54%, от 29 недель до 31 недели 6 дней – 34%, от 32 недель до 36 недель 6 дней – 12% и массой тела при рождении от 480 до 2910 г, в основном дети с очень низкой (ОНМТ) и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) при рождении (78%). Преобладание мальчиков среди пациентов с БЛД подтверждает факт более частого формирования патологии бронхолегочной системы у лиц мужского пола. Заместительную терапию сурфактантом в родильном доме получили 74% детей основной группы, среди детей с ЭНМТ и ОНМТ этот процент составил 92%. Новая форма БЛД верифицирована у 80% детей основной группы, классическая форма – у 20%. По степени тяжести течения заболевания дети группы с бронхолегочной дисплазией распределились таким образом: легкое течение – 22%; среднетяжелое течение – 60%; тяжелое течение – 18%.

Группу контроля составили 100 недоношенных детей, не сформировавших БЛД (мальчиков – 59, девочек – 41), со сроком гестации до 28 недель 6 дней – 9%, от 29 недель до 31 недели 6 дней – 55%, от 32 недель до 36 недель 6 дней – 36% и массой тела при рождении от 740 до 2950 граммов, дети с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении составили 45%. Заместительную терапию сурфактантом в родильном доме получили 53% детей, среди детей с ЭНМТ и ОНМТ этот процент составил 66%.

В группе детей, сформировавших БЛД, ЭНМТ при рождении отмечалась в 48% случаев; ОНМТ - в 30% случаев; НМТ в 16% случаев; дети, рожденные с массой тела более 2000г, составили 6%. В группе детей, не сформировавших БЛД, ЭНМТ при рождении отмечалась в 13% случаев; ОНМТ - в 32% случаев; НМТ в 24% случаев; дети, рожденные с массой тела более 2000 граммов, составили 31%. По шкале APGAR на первой минуте после рождения 68% детей из основной группы имели оценку от 1 до 5 баллов, 32% детей - 6 баллов и более. К 5-й минуте после рождения 27% детей имели оценку по шкале APGAR 5 баллов и ниже. В группе

контроля на первой минуте после рождения 24% детей имели оценку от 1 до 5 баллов, 76% детей - 6 баллов и более. К 5-й минуте после рождения только 5% детей имели оценку по шкале APGAR 5 баллов и ниже. У детей основной группы длительность традиционной ИВЛ составила 1–105 суток (в группе контроля 1-14 суток), Biphasic в основной группе не проводился (в группе контроля 1-18 суток), длительность CPAP в основной группе составила 1-90 суток (в группе контроля 1-18 суток), кислородная палатка в основной группе 1-37 суток (в группе контроля 2-12 суток), кислородная маска в основной группе 1-245 (в группе контроля 1-30).

Новая форма БЛД верифицирована у 80, классическая форма – у 20 из 100 недоношенных детей, сформировавших БЛД. По степени тяжести дети группы с бронхолегочной дисплазией распределились таким образом: легкое течение – 22; среднетяжелое течение – 60; тяжелое течение – 18 детей.

Все дети, включенные в исследование, получили комплексное клинико-инструментальное обследование, включавшее антропометрию, соматический осмотр пациентов. Всем детям был проведен забор капиллярной крови на фильтровальную бумагу с дальнейшим выделением ДНК методом экстракции фенол-хлороформом и проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени после получения письменного информированного согласия родителей или законных представителей на проведение генетического исследования у их детей.

2.2. Инструментальное обследование детей в изучаемых группах

Инструментальные методы:

1. Мультислайсовая компьютерная томография органов грудной клетки детям раннего возраста с бронхолегочной дисплазией

2. Выделение ДНК методом экстракции фенол-хлороформом из пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге

3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Вышеперечисленные современные высокотехнологичные методы позволили оценить тяжесть течения БЛД и обнаружить ассоциациированные с развитием БЛД у недоношенных детей полиморфные варианты генов.

Взятие крови на генетическое исследование проводилось с письменного информированного согласия законных представителей детей исследуемой группы.

2.2.1 Мультислайсовая компьютерная томография органов грудной клетки детям первого года жизни с бронхолегочной дисплазией

«Золотым стандартом» в рентгенологическом обследовании пациентов с БЛД является мультислайсовая компьютерная томография органов грудной клетки высокого разрешения. Этот метод позволяет хорошо визуализировать структурные изменения легочной ткани, не определяемые на обзорной рентгенограмме грудной клетки, а также способствует определению характера и объема поражения дыхательных путей [9,10]. МСКТ органов грудной клетки может быть использована рентгенологами, неонатологами и пульмонологами для объективизации диагностики на этапах формирования, течения и исхода заболевания.

К высокочувствительным и высокоспецифичным МСКТ-признакам БЛД можно отнести неравномерность пневматизации, утолщение стенок бронхов и наличие плевральных спаек [20].

Высокоспецифичными МСКТ-признаками БЛД, реже регистрируемыми, либо вообще не определяемыми на обзорных РГК, являются варианты эмфиземы легких, бронхоэктазы, междольковая инфильтрация, плевральные изменения, деформация и расширение сосудов [12].

В работе использована балльная оценка рентгенологических изменений с применением запатентованной в 2010 г. инновационной отечественной шкалы рентгенологической оценки степени тяжести БЛД (патент № 2401066) (таблица 2.2.1)

Таблица 2.2.1. Рентгенографическая шкала балльной оценки степени тяжести бронхолегочной дисплазии по данным мультислайсовой компьютерной томографии [21]

Признаки	Баллы		
Степень пневматизацией легочной ткани	0-1	2	3
	Умеренное повышение	Повышение, неравномерность	Резкое повышение, неравномерность, буллы
Архитектоника легочного рисунка по долям лёгких	Обеднён, не деформирован	Обеднён, умеренно деформирован, интерстиций подчёркнут	Резко обеднён на периферии, деформирован
Перибронхиальные изменения легочной ткани	Незначительные/ Отсутствует	Умеренные, просветы бронхов сужены	Выраженные, просветы деформированы, бронхоэктазы
Распространённость пневмофиброза		Невыраженный, единичные спайки	Грубый фиброз с признаками объёмного уменьшения сегментов, множественные транспульмональные тяжи
Сердечно -сосудистые изменения: лёгочная гипертензия, кардиомегалии	Отсутствуют	Умеренная лёгочная гипертензия, может быть кардиомегалия	Выраженная кардиомегалия или гипертрофия правого желудочка, лёгочная гипертензия
Результат оценки степени тяжести БЛД	Лёгкое 1 - 5 баллов	Среднетяжёлое 6-10 баллов	Тяжёлое 11-15 баллов

Для уточнения локализации и характера поражения легких у детей с БЛД применялся современный метод визуализации - мультислайсовая компьютерная томография органов грудной клетки в фазе физиологического или медикаментозного сна на мультиспиральном компьютерном томографе «Aquilion» фирмы TOSHIBA.

При этом были соблюдены следующие физико-технические условия для спирального сканирования: напряжение - 100 кV, экспозиция - 120 mAs, скорость сканирования - 10 мм/с. Количество срезов – 64, двухэнергетический, толщина среза 0,65 мм. В некоторых случаях были ретроспективно проанализированы КТ грудной клетки, выполненные в других лечебных учреждениях.

Всего методом МСКТ ОГК в нашем исследовании был обследован 51 недоношенный ребенок первого года жизни из группы сформировавших БЛД .

2.2.2 Выделение ДНК методом экстракции фенол-хлороформом из пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге

Геномная ДНК была выделена из образцов сухих пятен крови методом фенол-хлороформной экстракции. Для этого к образцу сухого пятна крови, добавляли 200 мкл буфера следующего состава (10 мМ Трис–HCl (pH = 8,0), 0,32 М сахароза, 10 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 0,1%–ный тритон X–100), добавляли ДТТ, ДСН и протеиназу К в конечной концентрации 0,2%, 40 мМ и 20 мкг/мл, соответственно, после чего инкубировали либо при 37°C в течение ночи, либо 2 ч при 60°C. Затем последовательно обрабатывали фенолом, смесью фенол/хлороформ (1:1) и хлороформом (дважды на каждой стадии). ДНК осаждали добавлением 1 мл 96%-ного этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия с последующей инкубацией при –70°C. Осадок ДНК промывали 80%–ным этанолом, сушили на воздухе и растворяли в 30 мкл бидистиллированной воды. Препараты ДНК хранили при –70°C [56]. 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).

2.2.3 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Участки исследуемых генов амплифицировали с использованием метода ПЦР в режиме реального времени на термоциклере “ABI StepOnePlus” («Applied

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 ДНК-полимеразы («Евроген», Россия), 50-100 нг геномной ДНК. Условия ПЦР: 95°C/2 мин – 1-й цикл; 94°C, 10 с, 54-66°C, 60 с – 40 циклов. Последовательности праймеров, флуоресцентных зондов и метод определения генотипов исследованных локусов приведены в таблице 2.2.2. В зондах использовались флуоресцентные красители – FAM (карбоксифлуоресцеин) и HEX (гексахлорофлуоресцеин), а также тушитель флуоресценции – BHQ-1. Обозначения полиморфных маркеров соответствуют принятым в базе данных dbSNP [139].

Таблица 2.2.2. Последовательности праймеров и зондов

Полиморфный маркер	Последовательности праймеров	Последовательности зондов
rs376618	*FGFR4*-rs376618-FJ, GGCGATCTCGTTCTTATAC *FGFR4*-rs376618-RJ, CTGGGCATTTGTTATGATTC	*FGFR4*-rs376618-FAM, FAM-tgaatgaAtaTatGagtggatg-BHQ-1 *FGFR4*-rs376618-VIC, VIC-tgaatgaAtaCatGagtggatg-BHQ-2
rs1966265	*FGFR4*- rs1966265-FJ, GGTTCTCGTTCTTATAC *FGFR4*- rs1966265-RJ, CTGGGAATTTGTTATGATTC	*FGFR4*-rs1966265-FAM, FAM-tcagcaGgaTccCcaacag-BHQ-1 *FGFR4*-rs1966265-VIC, VIC-tcagcaGgaCccCcaacag-BHQ-2
rs4253527	*SFTPA1*-rs4253527-FJ, TCCAGAGGAAAATGAGGC *SFTPA1*-rs4253527-RJ, GATGGTCAGTCGGGAGTA	*SFTPA1*-rs4253527-FAM, FAM-cgcaGgtTggGgaa-BHQ-1 *SFTPA1*-rs4253527-VIC, VIC-cgcaGgtCggGgaa-BHQ-2
rs121918559	*SFTPC*-rs121918559-FJ, CCCGAATGATCTCCAGCA *SFTPC*-rs121918559-RJ, GACAGCCCACTCTTTTCAC	*SFTPC*-rs121918559-FAM, FAM-tacaAgcCagAccctg-BHQ-1 *SFTPC*-rs121918559-VIC,

		VIC-tacaAgcCagCccctg-BHQ-2
rs121918560	*SFTPC*-rs121918560-FJ, CGCAGTGCCTACGTCTAAG *SFTPC*-rs121918560-RJ, CCGAGTTGCCTGGATGAC	*SFTPC*-rs121918560-FAM, FAM-aggtgcCgcTctActaca-BHQ-1 *SFTPC*-rs121918560-VIC, VIC-aggtgcCgcCctActaca-BHQ-2
rs2981579	*FGFR2*-rs2981579-FJ, TCTCGCCTTTCTAGGAAA *FGFR2*-rs2981579-RJ, CCTTCATCGTGTAAGAGAAG	*FGFR2*-rs2981579-FAM, FAM-cgacctCtgTagAcatcca-BHQ-1 *FGFR2*-rs2981579-VIC, VIC-cgacctCtgCagAcatcca-BHQ-2
rs1219648	*FGFR2*-rs1219648-FJ, TCCCAAAACCAAAATTACTG *FGFR2*-rs1219648-RJ, GGTCTGATTGAACAAGATG	*FGFR2*-rs1219648-FAM, FAM-ttgaaGagTgtGtgtca-BHQ-1 *FGFR2*-rs1219648-VIC, VIC-ttgaaGagCgtGtgtca-BHQ-2
rs121917737	*SFTPA2*-rs121917737-FJ, CCTGTAAACTACACCAACTG *SFTPA2*-rs121917737-RJ, GCTCTAATAGCCACAAGTG	*SFTPA2*-rs121917737-FAM, FAM-ccacTgcAcaTctgt-BHQ-1 *SFTPA2*-rs121917737-VIC, VIC-ccacTgcCcaTctgt-BHQ-2
rs121917738	*SFTPA2*-rs121917738-FJ, GTCCCAAGGAATCCAGAG *SFTPA2*-rs121917738-RJ, ATGCCTCTCAGAACTCAC	*SFTPA2*-rs121917738-FAM, FAM-tggagActTccGctac-BHQ-1 *SFTPA2*-rs121917738-VIC, VIC-tggagActCccGctac-BHQ-2
rs137853202	*SFTPB* -rs137853202-FJ, GAGGCTTGCCAAGTGAAG *SFTPB* -rs137853202-RJ, GTAGGGGGAGGAGGAGAG	*SFTPB* -rs137853202-FAM, FAM-ccagGtgTgcTgcgtg-BHQ-1 *SFTPB* -rs137853202-VIC, VIC-ccagGtgTgcCgcgtg-BHQ-2
rs121917834	*SFTPC*-rs121917834-FJ, CTGGCTGAGTAGGAAAGG *SFTPC*-rs121917834-RJ, GGTAGTCATACACCACGAG	*SFTPC*-rs121917834-FAM, FAM-tgaGcaTtgGggc-BHQ-1 *SFTPC*-rs121917834-VIC, VIC-tgaGcaCtgGggc-BHQ-2
rs34957318	*SFTPC*-rs34957318-FJ, GGGATCACACCTGCTCAC	*SFTPC*-rs34957318-FAM, FAM-ctgcaTctTgcCcctc-BHQ-

	SFTPC-rs34957318-RJ, GGGATAGAAACTCACTTCCTACA	1 *SFTPC*-rs34957318-VIC, VIC-ctgcaTctCgcCcctc-BHQ-2
rs121917835	*SFTPC*-rs121917835-FJ, TGCCTGATATACCTGAAG *SFTPC*-rs121917835-RJ, CGTCCTAGATGTAGTAGAG	*SFTPC*-rs121917835-FAM, FAM-agcaCccTgtGtgg-BHQ-1 *SFTPC*-rs121917835-VIC, VIC-agcaCccAgtGtgg-BHQ-2
rs121917836	*SFTPC*-rs121917836-FJ, AACGCCTTCTTATCGTGG *SFTPC*-rs121917836-RJ, CTCCCCTTGGACAGTTTC	*SFTPC*-rs121917836-FAM, FAM-accaTctTcgTgtgttt-BHQ-1 *SFTPC*-rs121917836-VIC, VIC-accaTctCcgTgtgttt-BHQ-2
rs121918560	*SFTPC*-rs121918560-FJ, CGCAGTGCCTACGTCTAAG *SFTPC*-rs121918560-RJ, CCGAGTTGCCTGGATGAC	*SFTPC*-rs121918560-FAM, FAM-aggtgcCgcTctActaca-BHQ-1 *SFTPC*-rs121918560-VIC, VIC-aggtgcCgcCctActaca-BHQ-2
rs2476601	*PTPN22*-rs2476601-FJ, CACACTTTATTTTATACTTACTG *PTPN22*-rs2476601-RJ, CCAAGGATAGATGATGAA	*PTPN22*-rs2476601-FAM, FAM-cctGtaTggAcacc-BHQ-1 *PTPN22*-rs2476601-VIC, VIC-cctGtaCggAcacc-BHQ-2
rs1738074	*TAGAP*-rs1738074-FJ, GGCATGTTAATATATAGTGTACTTA *TAGAP*-rs1738074-RJ, CCAGTGGACTAGAAGGAG	*TAGAP*-rs1738074-FAM, FAM-agaaacaGcaTaaCtctct-BHQ-1 *TAGAP*-rs1738074-VIC, VIC-agaaacaGcaCaaCtctct-BHQ-2
rs34536443	*TYK2*-rs34536443-FJ, CAGCCTATGCCTTTCTAA *TYK2*-rs34536443-RJ, AGGAGTATAAGTTCTACTATGC	*TYK*-rs34536443-FAM, FAM-cagAgcCccCcca-BHQ-1 *TYK2*-rs34536443-VIC, VIC-cagAgcGccCcca-BHQ-2
rs694739	*LOC102723878* -rs694739-FJ, CCCACATGGAACAATTCAGG *LOC102723878*-rs694739-RJ,	*LOC102723878* -rs694739-FAM, FAM-acagCccTcaCacct-BHQ-1

	GCAGAGAACACAGCACAG	*LOC102723878*-rs694739-VIC, VIC-acagCccCcaCacct-BHQ-2
rs9268645	*HLA-DRA*-rs9268645-FJ, GGTACAGCAGATCTTATATC *HLA-DRA* -rs9268645-RJ, GGGCAATAGAAATCTACA	*HLA-DRA* -rs9268645-FAM, FAM-ctgatattAttCtcTctcatct-BHQ-1 *HLA-DRA* -rs9268645-VIC, VIC-ctgatattAttGtcTctcatct-BHQ-2
rs2304256	*TYK2*-rs2304256-FJ, AGTGCTCTTTCAGCACCA *TYK2*-rs2304256-RJ, GGGACTTGGGAGGTCAAC	*TYK2*-rs2304256-FAM, FAM-tggcCgaAtgCctt-BHQ-1 *TYK2*-rs2304256-VIC, VIC-tggcCgaCtgCctt-BHQ-2
rs7201	*MMP2*-rs7201-FAM, FAM-cctaaAgAgAtAcTtTgata -BHQ-1 *MMP2*-rs7201-VIC, VIC-cctaaAgAgAtCcTtTgata -BHQ-2	*MMP2*-rs243865-FJ, GTTCCCTAAAACATTCCC *MMP2*-rs243865-RJ, GACAGTTGAGAGATAAGC
rs17301608	*MMP2*-rs17301608-FJ, TCCTCTTAATCACAGAAAGC *MMP2*-rs17301608-RJ, CAGTGTCTATACCACATACC	*MMP2*-rs17301608-FAM, FAM-aggaagGgtTgtAgaa -BHQ-1 *MMP2*-rs17301608-VIC, VIC-aggaagGgtCgtAgaa -BHQ-2
rs243865	*MMP2*-rs243865-FAM, FAM-cagcaCtcTacCtctt -BHQ-1 *MMP2*-rs243865-VIC, VIC-cagcaCtcCacCtctt -BHQ-2	*MMP2*-rs243865-FAM, FAM-actaGggTtcCcgt -BHQ-1 *MMP2*-rs243865-VIC, VIC-actaGggCtcCcgt -BHQ-2
rs20544	*MMP9*-rs20544-FJ, GTGACCTATGACATCCTG *MMP9*-rs20544-RJ, CACTCCAACAAAAAACAAAG	*MMP9*-rs20544-FAM, FAM-actaGggTtcCcgt -BHQ-1 *MMP9*-rs20544-VIC, VIC-actaGggCtcCcgt -BHQ-2
rs3918242	*MMP9*-rs3918242-FJ, CCTGGTCAACGTAGTGAA *MMP9*-rs3918242-RJ, CGGGTTCAAGCAATTCTC	*MMP9*-rs3918242-FAM, FAM-tggcGcaTgcCtata-BHQ-1 *MMP9*-rs3918242-VIC, VIC-tggcGcaCgcCtata -BHQ-2
rs17576	*MMP9*-rs17576-FJ, CTGAGAAATGATGAGAGATG *MMP9*-rs17576-RJ,	*MMP9*-rs17576-FAM, FAM-ccgTccTggGtgta -BHQ-1 *MMP9*-rs17576-VIC, VIC-

	CCTTGGAAGATGAATGGA	ccgTccCggGtgta -BHQ-2
rs2276109	*MMP12*-rs2276109-FJ, CTAGCCTAAGTTCCTGAA *MMP12*-rs2276109-RJ, TGTCGTCTGAATAAAGTC	*MMP12*-rs2276109-FAM, FAM-tgaCtCaTaGtTgAta-BHQ-1 *MMP12*-rs2276109-VIC, VIC-tgaCtCaCaGtTgAta -BHQ-2
rs652438	*MMP12*-rs652438-FJ, GTAGGTCCTATAAAAACG *MMP12*-rs652438-RJ, CACAGATGACAAATACTG	*MMP12*-rs652438-FAM, FAM-tggtctTaAaTtGcTaatt-BHQ-1 *MMP12*-rs652438-VIC, VIC-tggtctTaAaCtGcTaatt -BHQ-2
rs2664352	*MMP16*-rs2664352-FJ, CCTCTTTGCAAGCAGTATG *MMP16*-rs2664352-RJ, TAGGCTTAGTGTTCGTTG	*MMP16*-rs2664352-FAM, FAM-cagtcTcaTagGtgagtgg-BHQ-1 *MMP16*-rs2664352-VIC, VIC-cagtcTcaCagGtgagtgg -BHQ-2

2.3 Методы статистической обработки результатов исследования

В исследованиях случай-контроль относительный риск развития заболевания оценивался с помощью показателя отношения шансов (ОШ). Это статистический показатель, определяемый как отношение шанса наличия воздействия в основной группе к шансу наличия воздействия в группе контроля. Значение ОШ вычисляли с помощью программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях случай-контроль [135]. В программу вводили значения A, B, C, D, где A – число лиц с наличием и B – с отсутствием данного генотипа среди больных пациентов, C и D – число лиц, соответственно, с наличием и отсутствием данного генотипа среди здоровых лиц. ОШ = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации; ОШ > 1 как положительную ассоциацию ("фактор риска/предрасположенности"), ОШ < 1 – как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием ("фактор защиты/устойчивости").

Проверка распределения частов генотипов в выборке согласно равновесию Харди-Вайнберга. Для выявления ассоциации между заболеванием и генотипом использовались общая, мультипликативная и аддитивная модели наследования.

Мультипликативная модель наследования позволяет выявить ассоциацию аллелей с заболеванием, как при выполнении условий Харди-Вайнберга, так и для выборок случай-контроль.

Общая и аддитивная модели наследования также позволяют оценить ассоциацию генотипов с заболеванием.

Математическая обработка материала проведена с использованием статистического пакета IBM SPSS 6.0, Microsoft Office Excel 7.0. Для статистической обработки результатов применялись методы описательной статистики в качестве основных характеристик использовались средняя арифметическая (M) при нормальном распределении, стандартное отклонение (SD), определение 95% доверительного интервала.

В случае распределения, отличающегося от нормального, или анализа порядковых переменных, использовался непараметрический критерий Манна – Уитни (U) для двух независимых выборок.

Для выявления корреляционной взаимосвязи двух признаков (силы и направления) применялся ранговый коэффициент корреляции Пирсона (r) и непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФАКТОРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ, СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ ДАННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ

3.1 Особенности неонатального периода и их влияние на развитие бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей

Все дети, включенные в исследование (n=200), были рождены преждевременно (до 37 недели гестации включительно). Основными критериями включения в исследование являлись респираторная поддержка в неонатальном периоде в связи с РДС недоношенных, гестационный возраст ребенка при рождении менее 37 недель, возраст ребенка на момент сбора данных не более 1 года.

В соответствии с задачами исследования дети были разделены на 2 группы:

1. Первую группу (основная группа) составили пациенты, сформировавшие БЛД к 28 дню жизни. В группу вошли 100 недоношенных детей с БЛД (мальчиков – 55, девочек – 45). Средний гестационный возраст детей при рождении в этой группе составил 28,6±0,6 недель, средняя масса тела при рождении – 1184,5±94,8 граммов.

2. Вторую группу (группа контроля) составили пациенты без кислородозависимости и клинико-рентгенологических признаков формирования БЛД к 28 дню жизни. В группу вошли 100 недоношенных детей без БЛД (мальчиков – 59, девочек – 41). Средний гестационный возраст детей при рождении в этой группе составил 31,9±0,5 недель, средняя масса тела при рождении - 1724,7±118,3 граммов.

Из исследования были исключены доношенные дети и недоношенные дети с верифицированными врожденными пороками бронхолегочной системы, муковисцидозом, врожденным стридором, синдромальными состояниями.

Показано, что в обеих группах преобладали мальчики. Однако, статистически значимых различий по гендерному признаку между детьми, сформировавшими и не сформировавшими БЛД, не выявлено (p>0,05) (рисунок 3.1.1).

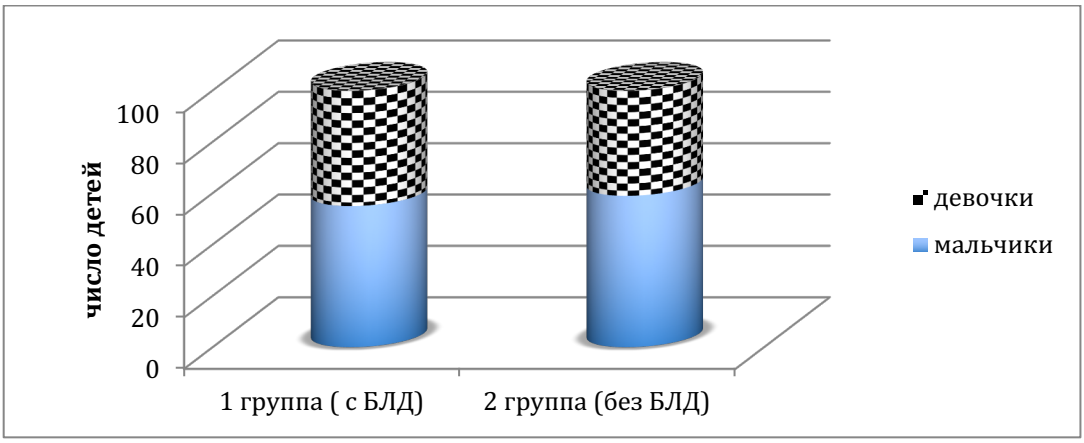


Рисунок 3.1.1. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по гендерному признаку

При статистической обработке данных была выявлена статистически значимая разница среднего гестационного возраста при рождении в двух группах (p<0,05). Данные представлены на рисунке 3.1.2.

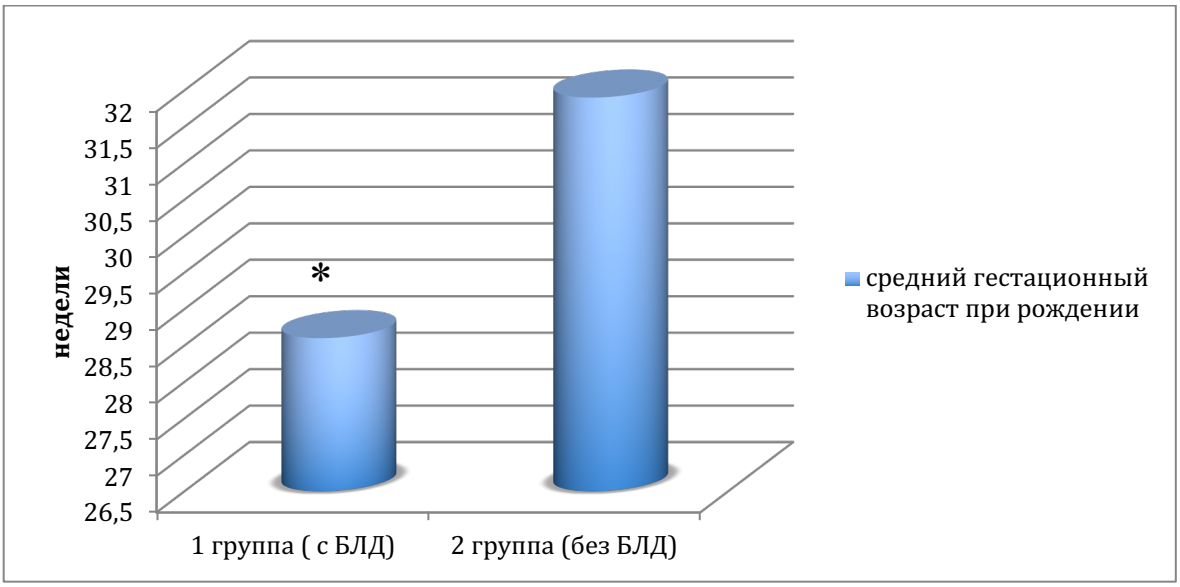


Рисунок 3.1.2. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по гестационному возрасту при рождении.

*Примечание: * p<0,05.*

Также в группе детей с БЛД верифицированы меньшие значения таких антропометрических показателей, как длина тела и масса тела при рождении, что напрямую связанно с меньшим средним гестационным возрастом недоношенных в этой группе. При статистической обработке данных были выявлены значимые достоверные различия между изучаемыми группами при оценке по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, при этом минимальные показатели отмечались в группе детей, сформировавших впоследствии БЛД ($p<0,05$). Данные представлены в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1 Характеристика групп недоношенных детей по гестационному возрасту, оценке по шкале APGAR, антропометрическим данным при рождении.

	Дети, сформировавшие БЛД		Дети, не сформировавшие БЛД		
	Среднее	Ошибка среднего	Среднее	Ошибка среднего	t-тест равенства средних
Масса тела при рождении, граммов.	1184,5	(1089,7; 1279,4)	1724,7	(1843,0; 1606,5)	$p<0,05$
Гестационный возраст при рождении, нед.	28,6	(28;29,2)	31,9	(32,4; 31,4)	$p<0,05$
Длина тела при рождении, см.	36,1	(35,0; 37,2)	41,1	(40,2; 42,1)	$p<0,05$
APGAR 1 мин.	4,75	(4,5; 5,1)	5,99	(5,73; 6,25)	$p<0,05$
APGAR 5 мин.	6,05	(5,80; 6,29)	7,08	(6,90; 7,26)	$p<0,05$

Полученные данные подтверждают тот факт, что развитие БЛД наиболее характерно для глубоко недоношенных детей. Одновременно с достоверно более низким уровнем средних показателей гестационного возраста детей первой группы,

у них же отмечаются достоверно более низкие показатели средней массы тела при рождении. При статистической обработке данных была выявлена значимая достоверная разница средней массы тела при рождении в двух группах. При этом дети 1 группы имели меньшую массу тела при рождении (1184,5±94,8 граммов) по сравнению с детьми 2 группы (1724,7±118,3 граммов) ($p<0,05$). В первой группе пациентов с БЛД наиболее часто встречались недоношенные с очень низкой массой тела (ОНМТ) (1000-1500 граммов) и с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) (менее 1000 граммов), в отличие от 2 группы, где в 50% случаев представлены дети с низкой массой тела (НМТ) (1500-2500 граммов) при рождении. Данные представлены на рисунке 3.1.3. Существует статистически значимая разница в долях детей с БЛД и без БЛД в группе детей с массой тела менее 1000 граммов и в группе детей с массой тела более 2000 граммов. Статистически достоверно, что дети с массой тела менее 1000 граммов формируют БЛД ($p<0,05$).

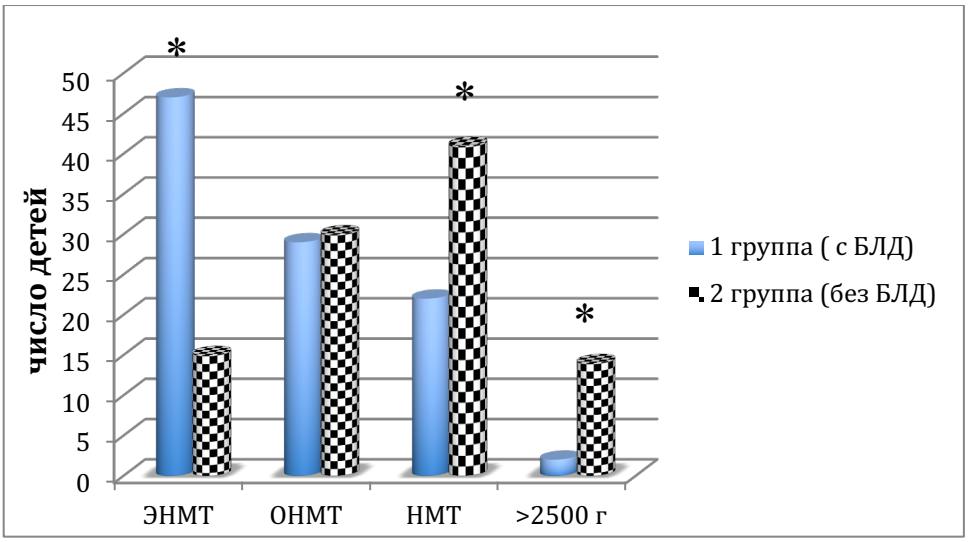


Рисунок 3.1.3. Распределение недоношенных детей по массе тела при рождении в исследуемых группах.

*Примечание: * $p<0,05$.*

Тяжелая гипоксия на 1 минуте после рождения была верифицирована у 10% детей, которые имели оценку по шкале APGAR от 1 до 3 баллов. Стоит отметить, что среди недоношенных детей с тяжелой гипоксией на 1 минуте после рождения (n=23) превалировали дети из 1 группы (78% от числа детей с тяжелой гипоксией). В общей когорте недоношенных (n=200), превалировали дети с умеренной степенью гипоксии (4 - 6 баллов), которая была верифицирована у 66% от общего числа недоношенных детей, преимущественно детей из 1 группы (60% от числа детей с умеренной степенью гипоксии). Оценка недоношенных детей по шкале APGAR на 1 минуте жизни в обеих группах представлена на рисунке 3.1.4.

К 5-й минуте после рождения только лишь 3% от общего числа недоношенных детей имели оценку по шкале APGAR 1-3 балла, а в 63% случаев от общего числа недоношенных было верифицировано 7 и более баллов. Данные представлены на рисунке 3.1.5.

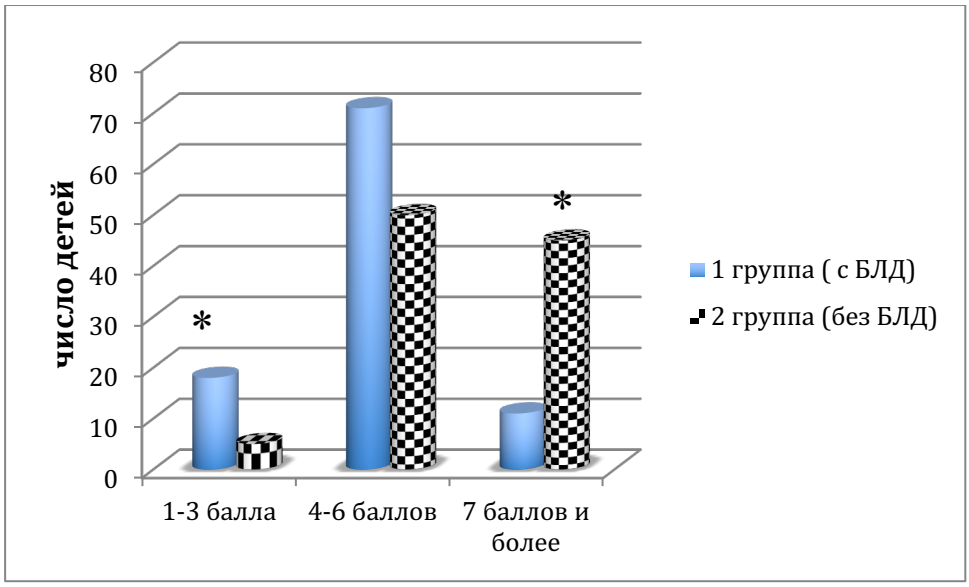


Рисунок 3.1.4. Оценка по шкале APGAR в группах недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, на 1 минуте жизни. *Примечание: * $p<0,05$.*

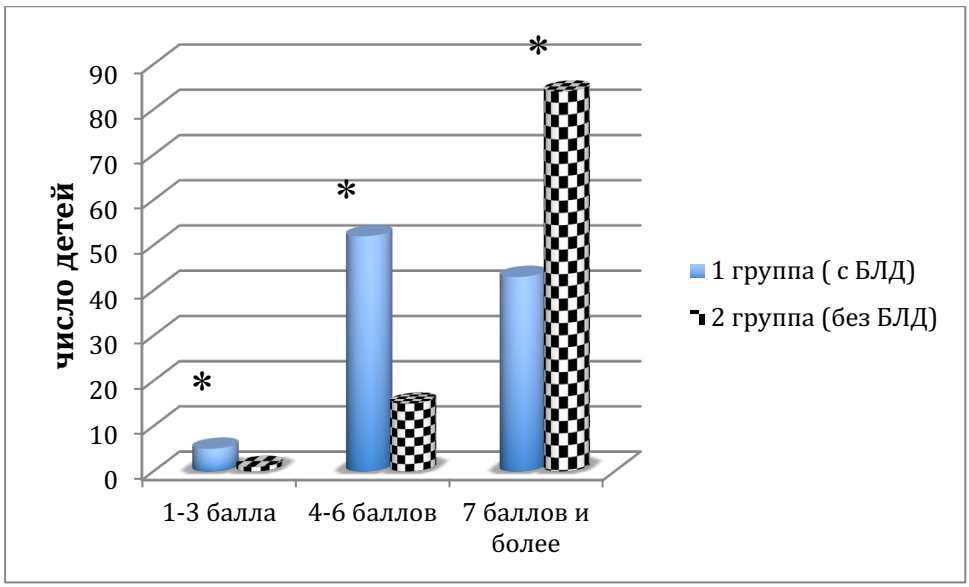


Рисунок 3.1.5. Оценка по шкале APGAR в группах недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, на 5 минуте жизни. *Примечание: * $p<0,05$.*

В респираторной поддержке нуждались все дети, вошедшие в исследование (n=200). Щадящая респираторная поддержка путем поддержания постоянного положительного давления в дыхательных путях методом CPAP была проведена 108 пациентам из общей когорты недоношенных детей (54%). Пациенты из группы детей, сформировавших БЛД, составили 44% из всех детей, получающих респираторную поддержку методом CPAP, в то время как 56% составили дети, не сформировавшие БЛД. Респираторная поддержка методом Biphasic была проведена только 28 недоношенным детям, не сформировавшим БЛД.

Респираторная поддержка методом традиционной ИВЛ была оказана 93 детям, сформировавшим БЛД (93% от общего числа детей, сформировавших заболевание) и 57 детям, не сформировавшим БЛД (57% от общего числа детей, не сформировавших заболевание). Длительность ИВЛ составила в среднем 29 суток жизни в первой группе пациентов и 4,4 суток жизни - во второй группе. Длительность традиционной ИВЛ от 1 до 14 суток жизни отмечалась у 38 детей первой группы (41% от числа детей, сформировавших БЛД, получивших респираторную поддержку методом традиционной ИВЛ) и у 57 детей второй группы

(100% от числа детей, не сформировавших БЛД, получивших респираторную поддержку методом традиционной ИВЛ). Данные представлены на рисунке 3.1.6.

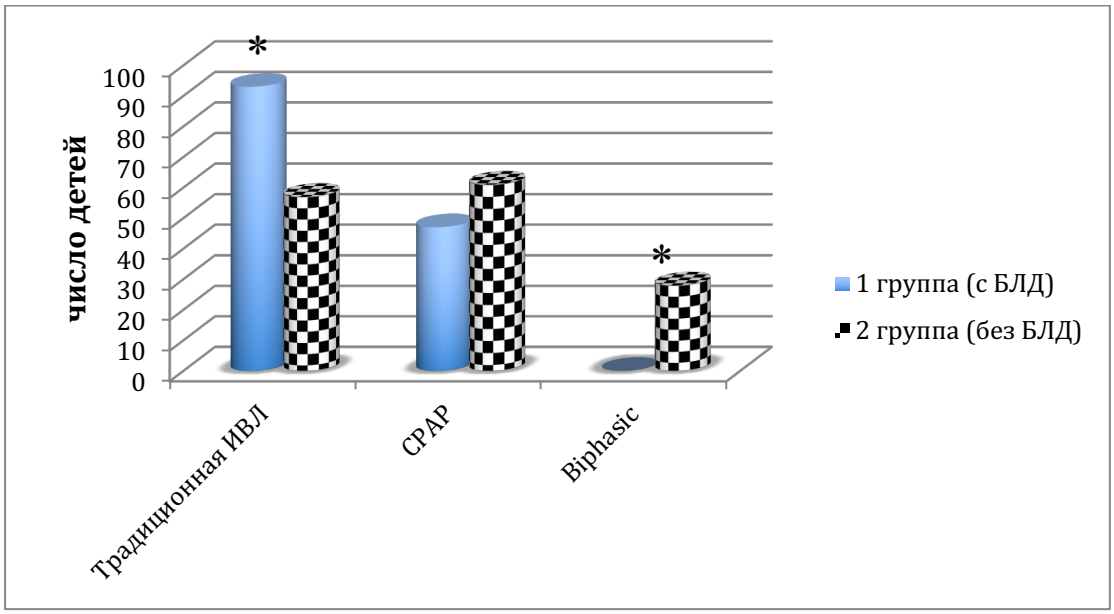


Рисунок 3.1.6. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по методам респираторной поддержки. *Примечание:* p<0,05*.

Из всех детей (n=200) дополнительную оксигенацию длительностью более 28 суток жизни получили дети, сформировавшие впоследствии БЛД (n=100). Среднее значение длительности кислородной поддержки достоверно ниже в группе пациентов, не сформировавших БЛД (11,47± 1,18 суток), по сравнению с аналогичным показателем в группе недоношенных детей, сформировавших БЛД (59,06±3,91 суток) (p<0,05).

При корреляционном анализе были выявлены взаимосвязи формирования БЛД у недоношенных детей с длительностью кислородозависимости, гестационным возрастом, массой и длиной тела при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. Данные представлены на рисунке 3.1.7.

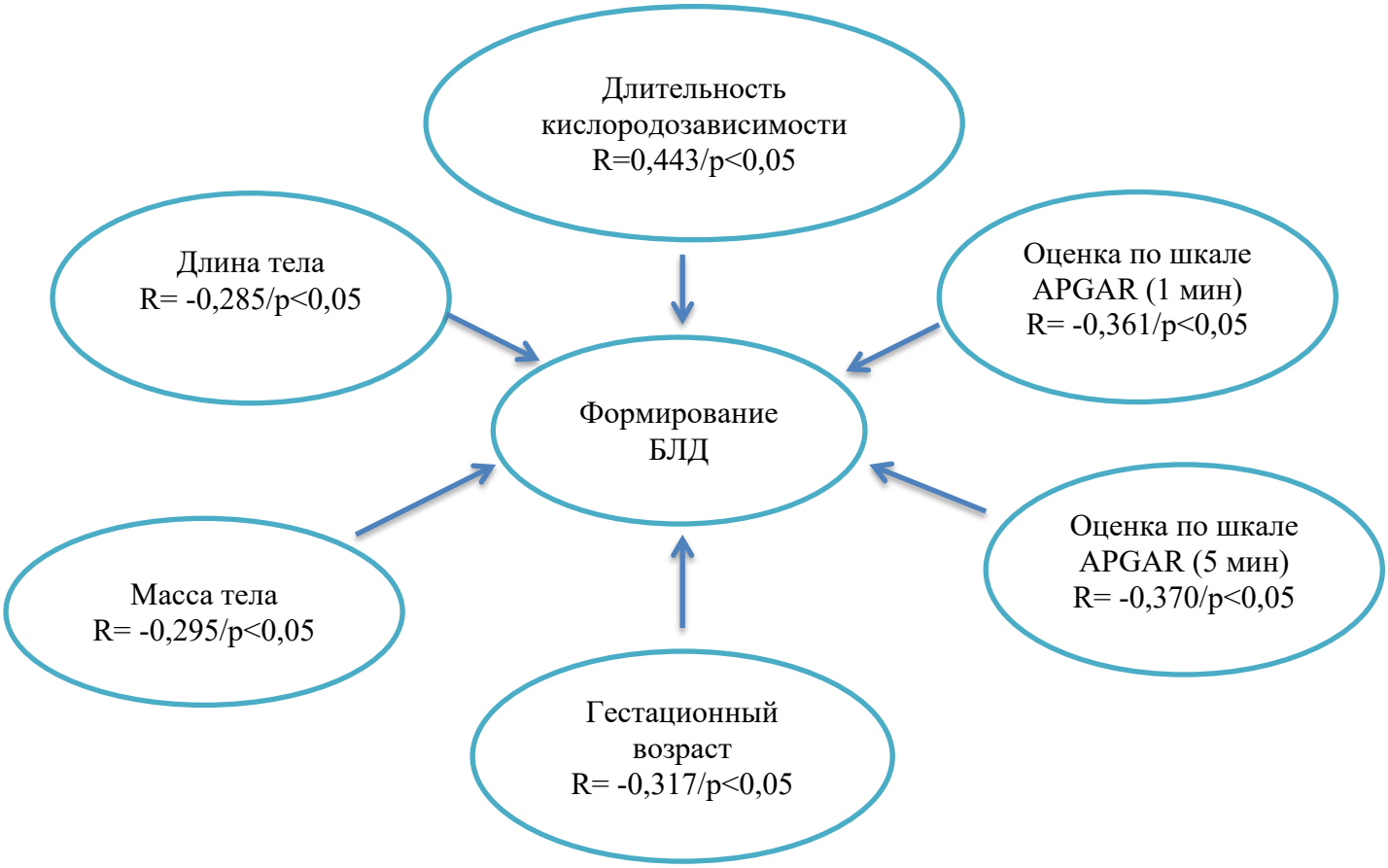


Рисунок 3.1.7. Взаимосвязь между формированием БЛД и массой, длиной тела и гестационным возрастом при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительностью кислородозависимости.

Отмечается обратная зависимость между массой, длиной тела и гестационным возрастом при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни и формированием заболевания. То есть, чем ниже у ребенка при рождении масса тела, длина тела и гестационный возраст, тем выше риск формирования БЛД. Также выявлена прямая корреляция между длительностью кислородозависимости и формированием БЛД у недоношенных детей. То есть, чем продолжительнее кислородозависимость у недоношенного ребенка, тем выше риск формирования БЛД.

Таким образом, подтверждено, что более высокий риск формирования БЛД имеют глубоко недоношенные дети с ОНМТ и ЭНМТ при рождении и длительной кислородозависимостью.

Согласно проведенному статистическому анализу с использованием критерия Манна-Уитни были выявлены достоверно большие средние показатели гестационного возраста, массы тела при рождении, оценки по APGAR на 1 и 5 минутах жизни, а также меньшая длительность кислородозависимости в группе детей, не сформировавших БЛД, по сравнению с пациентами, сформировавшими данную патологию ($p<0,05$).

3.2 Результаты инструментальных исследований у недоношенных детей, сформировавших БЛД

Всего методом МСКТ ОГК в нашем исследовании был обследован 51 недоношенный ребенок из группы сформировавших БЛД .

По данным КТ проводилась балльная оценка рентгенологических изменений с применением запатентованной в 2010 г. инновационной отечественной шкалы рентгенологической оценки степени тяжести БЛД (патент № 2401066), позволяющей дифференцировать детей, зависимых и независимых от кислорода в 36 недель ПКВ и предсказать рецидивирование респираторных симптомов в 6 месяцев корригированного возраста, где легкое течение БЛД соответствует 1-5, среднетяжелое 6-10, тяжелое 11-15 баллам. Средний балл КТ в группе детей с легким течением БЛД ($n = 15$) составил 3,6±1,2 баллов, в группе детей со среднетяжелым течением ($n = 29$) средний балл КТ составил 7,5±1,2 баллов, группе больных с тяжелым течением ($n = 7$) средний балл КТ составил 11,4±0,5 баллов.

Полученные данные подтверждают общепринятые представления о влиянии клинико-анамнестических факторов риска на развитие БЛД у недоношенных детей.

Однако, клинический опыт свидетельствует, что в ряде случаев при наличии одинаковых исходных показателей при рождении и проведении однотипной респираторной поддержки возможно как формирование БЛД, так и благоприятное разрешение РДС без формирования данного заболевания.

3.3. Клинические случаи

Ребенок О.Р., дата рождения 17.01.2014. Беременность 2-я у женщины 38 лет, протекала с токсикозом в 1 половине, угрозой прерывания. Роды 2-ые преждевременные путем кесарева сечения на 35 неделе гестации в связи с угрозой отслойки плаценты. Масса тела при рождении - 1700 граммов, длина - 48 см. Оценка по шкале APGAR 6/7 баллов. Аспирация околоплодных вод при рождении. Заместительная терапия препаратами сурфактанта не проводилась. В связи с выраженной дыхательной недостаточностью на фоне РДСН ребенок находился на респираторной поддержке методом традиционной ИВЛ в течение 10 суток жизни. Длительность кислородозависимости 37 суток. В 1,5 месяца жизни выставлен диагноз: Бронхолегочная дисплазия, классическая форма, среднетяжелое течение. Назначен пульмикорт 250 мк в сутки, длительность терапии составила 4,5 мес. На фоне ОРВИ перенес обострение БЛД в марте 2014 года. В возрасте 6 месяцев также перенес обострение заболевания на фоне коклюша. Получал терапию пульмикортом 250 мкг в сутки, бородуалом в течение 2 месяцев. В ноябре 2014 года проведена пассивная иммунизация против РСВИ Паливизумабом (Синагис). Для уточнения локализации и характера поражения легочной ткани ребенку была проведена МСКТ ОГК. Оценка степени тяжести по шкале МСКТ ОГК составила 10 баллов (повышение степени и неравномерность пневмотизации легочной ткани, обедненный, умеренно деформированный легочный рисунок, невыраженная распространенность пневмофиброза, умеренная легочная гипертензия), что

соответствует среднетяжелой степени тяжести БЛД. Данные представлены на рисунке 3.3.1.

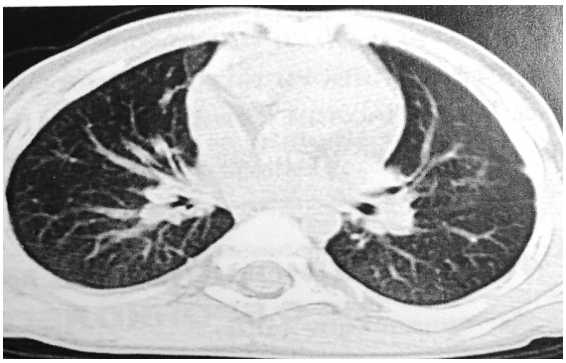


Рисунок 3.3.1. МСКТ ОГК со среднетяжелым течением бронхолегочной дисплазии

Ребенок З.В., дата рождения 19.04.2013. Беременность 3-я у женщины 35 лет, протекала с токсикозом в 1 половине, угрозой прерывания. Роды 3-и преждевременнех путем кесарева сечения на 35 неделе гестации в связи с угрозой отслойки плаценты. Масса тела при рождении - 1760 граммов, длина тела - 49 см. Оценка по шкале APGAR 6/7 баллов. При рождении развилась дыхательная недостаточность, ухудшение состояния за счет глубокого апноэ, врожденной пневмонии. Аспирация околоплодных вод при рождении. Заместительная терапия препаратами сурфактанта не проводилась. В связи с выраженной дыхательной недостаточностью на фоне РДС ребенок находился на респираторной поддержке методом традиционной ИВЛ в течение 11 суток жизни. Длительность кислородозависимости 19 суток. Бронхолегочную дисплазию не сформировал. С конца декабря 2013 года получал пульмикорт 250 мкг в сутки в связи с бронхообструктивным синдромом на фоне ОРВИ.

Таким образом, при схожих клинико-анамнестических и антропометрических данных возможно как формирование БЛД, так и благоприятный исход РДС, что указывает на существование ранее не изученных факторов риска развития БЛД у недоношенных детей.

В настоящее время в мировой практике проводятся исследования по выявлению генов-кандидатов при формировании БЛД, вызывающих нарушения на уровне протеолитических ферментов, антиоксидантной системы организма, функционирования сосудистой системы легких, системы продукции белков сурфактанта.

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ, СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ БЛД

В настоящее время в мировой практике проводятся исследования по выявлению полиморфных маркеров генов-кандидатов, вызывающих нарушения на уровне протеолитических ферментов, антиоксидантной и иммунной систем организма, функционирования сосудистой системы легких, системы продукции белков сурфактанта, участвующих в формировании БЛД [26,59,92,115].

В экспериментальной части исследования проводилось изучение ассоциации 30 однонуклеотидных вариантов 15 генов-кандидатов с развитием БЛД у недоношенных детей.

Для выполнения этой задачи был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов, кодирующих факторы роста фибробластов *FGFR4* (rs376618, rs1966265), *FGFR2* (rs2981579, rs1219648)), белки сурфактанта *SFTPA1* (rs4253527), *SFTPA2* (rs121917737, rs121917738), *SFTPB* (rs137853202), *SFTPC* (rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318, rs121917835, rs121917836, rs121918560)), металлопротеиназы *MMP2* (rs7201, rs17301608, rs243865), *MMP9* (rs20544, rs3918242, rs17576), *MMP12* (rs2276109, rs652438), *MMP16* (rs2664352), а также генов, кодирующих белки, влияющие на формирование воспалительного ответа *PTPN22* (rs2476601), *HLA-DRA* (rs9268645), *TAGAP* (rs1738074), *TYK2* (rs34536443, rs2304256), *LOC102823878* (rs 694739).

При проведении анализа распределения частот аллелей и генотипов варианта rs652438 гена *MMP12*, ответственного за процессы протеолиза легочной ткани и rs694739 гена *LOC102823878,* расположенного в области гена *PRDX5,* играющего важную роль в формировании воспалительного ответа, выявлены статистически значимые различия в группах недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

Ассоциации других исследованных полиморфных вариантов генов, кодирующих факторы роста фибробластов *FGFR4* (rs376618, rs1966265), *FGFR2* (rs2981579, rs1219648), белки сурфактанта *SFTPA1* (rs4253527), *SFTPA2* (rs121917737, rs121917738), *SFTPB* (rs137853202), *SFTPC* (rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318, rs121917835, rs121917836, rs121918560) и генов, кодирующих белки, влияющие на формирование воспалительного ответа *PTPN22* (rs2476601), *HLA-DRA* (rs9268645), *TAGAP* (rs1738074), *TYK2* (rs34536443, rs2304256), *LOC102823878* (rs 694739), с развитием БЛД в нашем исследовании обнаружено не было.

4.1 Оценка распределения частот аллелей и генотипов варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12*

Было показано, что статистически значимо чаще в группе недоношенных детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой контроля встречался аллель *C* (p=0,02, ОШ 1,78 (95% ДИ 1,09-2,90), генотипы *CC* (p=0,03, ОШ 3,20 (95% ДИ 0,84-12,18) и *TC* (p=0,03, ОШ 1,39 (95% ДИ 0,76-2,55) варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12.* Ассоциации генотипа *TT* с развитием БЛД выявлено не было. Данные представлены в таблицах 4.1.1-4.1.2. Ассоциации других исследованных вариантов генов, кодирующих металлопротеиназы, с развитием БЛД выявить не удалось.

При статистической обработке результатов исследования получены достоверные данные о взаимосвязи генотипов *TC* и *CC* варианта g.102736642T>C (rs652438), расположенного в гене *MMP12*, со следующими клинико-анамнестическими характеристиками недоношенных детей: длительность кислородозависимости, оценка по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. Данные представлены в таблице 4.1.3.

Таблица 4.1.1. Распределение частот аллелей *T* и *C* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* среди недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД (мультипликативная модель наследования)

Аллели	Дети, сформировавшие БЛД	Дети, не сформировавшие БЛД	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
	(N=100)	(N=100)				
Аллель *T*	0,740	0,835	5,39	0,02	0,56	0,34-0,92
Аллель *C*	0,260	0,165			1,78	1,09-2,90

Таблица 4.1.2. Распределение частот генотипов *CC*, *TC* и *TT* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* среди недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД (аддитивная модель наследования)

Генотипы	Дети, сформировавшие БЛД	Дети, не сформировавшие БЛД	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
	(N=100)	(N=100)				
Генотип *TT*	0,570	0,700	4,95	0,03	0,57	0,32-1,02
Генотип *TC*	0,340	0,270			1,39	0,76-2,55
Генотип *CC*	0,090	0,030			3,20	0,84-12,18

Таблица 4.1.3. Взаимосвязь генотипов *TT*, *TC* и *CC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12*, с клинико-анамнестическими данными детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

MMP12-rs652438 (T>C)				
Клинико-анамнестические параметры	Генотип	Среднее	Ошибка среднего	Тест равенства средних (p)
Длительность кислородозависимости, сут.	*TT*	29,9	(27,2; 32,5)	<0,05
	TC и *CC*	44,8	(39,1; 50,3)	
Масса тела при рождении, граммов.	*TT*	1516,0	(1408,9;	>0,05
	TC и *CC*	1397,4	(1227,4; 1505,58)	
Гестационный возраст при рождении, нед.	*TT*	30,5	(30,0; 31,1)	>0,05
	TC и *CC*	29,7	(29,0; 30,4)	
Длина тела при рождении, см.	*TT*	39,1	(38,0; 40,1)	>0,05
	TC и *CC*	37,8	(36,4; 39,2)	
Оценка по шкале APGAR на 1 мин., баллов	*TT*	5,5	(5,3; 5,8)	<0,05
	TC и *CC*	5,0	(4,6; 5,3)	
Оценка по шкале APGAR на 5 мин., баллов	*TT*	6,7	(6,5;6,9)	<0,05
	TC и *CC*	6,2	(5,9;6,5)	

Дети с клинико-анамнестическими факторами риска развития БЛД (гестационный возраст при рождении до 37 недель, масса тела при рождении до 2500 г., низкие оценки по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительная кислородная поддержка), имеющие генотипы *CC* и *TC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* имеют риск формирования БЛД в 3 раза выше, по сравнению с детьми, не имеющими генотипов *CC* и *TC*. Данные представлены в таблице 4.1.4.

Таблица 4.1.4. Распределение генотипов TT, TC и *CC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* среди недоношенных детей, имеющих клинико-анамнестические факторы риска формирования БЛД.

	Наличие клинико-анамнестических факторов риска у детей с генотипами *TC* и *CC*	Наличие клинико-анамнестических факторов риска у детей, не имеющих генотипов *TC* и *CC*	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
Дети, сформировавшие БЛД	0,430	0,570	11,215	<0,001	3,018	1,607 - 5,665
Дети, не сформировавшие БЛД	0,200	0,800				

В нашем исследовании показана статистически значимая степень влияния генотипов *TC* и *CC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* на возможность формирования БЛД у недоношенных детей. При рождении у детей с данными генетическими факторами риска формирования БЛД отмечаются более низкие баллы по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. В связи с внутриутробными нарушениями формирования легочной ткани, вызванными влиянием генотипов *TC* и *CC* g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12*, ранним сроком гестации при рождении у этих пациентов в раннем неонатальном периоде развивается РДС, что требует проведения кислородной поддержки. У новорожденных с генотипами *TC* и *CC*

g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12,* развивших РДС, отмечается длительная кислородозависимость, что в последующем может предопределять формирование БЛД.

4.2. Оценка распределения частот аллелей и генотипов варианта rs694739 гена *LOC102823878*

Было показано, что статистически значимо чаще в группе недоношенных детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой контроля встречался аллель *C* (p=0,004, ОШ 1,8 (95% ДИ 1,21-2,67), генотипы *TC* (p=0,0004, ОШ 1,05 (95% ДИ 0,57-1,96) и *CC* (p=0,0004, ОШ 3,02 (95% ДИ 1,32-6,91) варианта rs694739 гена *LOC102823878*. Ассоциации генотипа *TT* с развитием БЛД выявлено не было. Данные представлены в таблицах 4.2.1-4.2.2. Ассоциации других исследованных вариантов генов, кодирующих белки, влияющие на формирование воспалительного ответа, с развитием БЛД обнаружено не было.

Таблица 4.2.1. Распределение частот аллелей T и C варианта rs694739 гена *LOC102823878* среди недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД (мультипликативная модель наследования)

Аллели	Дети, сформировавшие БЛД (N=100)	Дети, не сформировавшие БЛД (N=100)	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
Аллель T	0,405	0,550	8,43	0,004	0,56	0,37-0,83
Аллель C	0,595	0,450			1,80	1,21-2,67

Таблица 4.2.2. Распределение частот генотипов *CC*, *TC* и *TT* варианта rs694739 гена *LOC102823878* среди недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД (общая модель наследования).

Генотипы	Дети, сформировавшие БЛД	Дети, не сформировавшие БЛД	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
	(N=100)	(N=100)				
Генотип TT	0,040	0,190	15,91	0,0004	0,18	0,06-0,54
Генотип TC	0,730	0,720			1,05	0,57-1,96
Генотип CC	0,230	0,090			3,02	1,32-6,91

При статистической обработке результатов исследования получены достоверные данные о взаимосвязи генотипов *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102823878*, со следующими клинико-анамнестическими характеристиками недоношенных детей: длительность кислородозависимости, гестационный возраст и масса тела при рождении, оценка по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. Данные представлены в таблице 4.2.3.

Дети с клинико-анамнестическими факторами риска развития БЛД (гестационный возраст при рождении до 37 недель, масса тела при рождении до 2500 г., низкие оценки по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительная кислородная поддержка), имеющие генотипы *CC* и *TC* варианта rs694739 гена *LOC102823878* имеют риск формирования БЛД в 6 раз выше, по сравнению с детьми, не имеющими генотипов *CC* и *TC*. Данные представлены в таблице 4.2.4.

Таблица 4.2.3. Взаимосвязь генотипов *TT* и *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102823878*, с клинико-анамнестическими данными детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

LOC102823878 (rs694739)				
Клинико-анамнестические параметры	Генотип	Сред-нее	Ошибка среднего	Тест равенства средних (p)
Длительность кислородозависимости, сут.	*TT*	17,13	(13,58; 20,67)	<0,05
	TC и *CC*	37,18	(30,56; 43,79)	
Масса тела при рождении, граммов.	*TT*	1632,58	(1496,34;1768,83)	<0,05
	TC и *CC*	1446,56	(1341,99;1551,14)	
Гестационный возраст при рождении, нед.	*TT*	31,50	(30,88; 32,12)	<0,05
	TC и *CC*	30,09	(29,53; 30,65)	
Длина тела при рождении, см.	*TT*	39,54	(38,38; 40,71)	>0,05
	TC и *CC*	38,57	(37,55; 39,58)	
Оценка по шкале APGAR на 1 мин., баллов	*TT*	5,75	(5,35; 6,15)	<0,05
	TC и *CC*	5,30	(5,03; 5,56)	
Оценка по шкале APGAR на 5 мин., баллов	*TT*	7,00	(6,67; 7,33)	<0,05
	TC и *CC*	6,49	(6,29; 6,70)	

В нашем исследовании показана возможность влияния генотипов *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102823878*, расположенного в области гена *PRDX5,* отвечающего за формирование воспалительного ответа, на развитие БЛД. В нашем исследовании определено, что у детей с данными генотипами повышен риск преждевременного рождения. При рождении у детей с данными генетическими факторами риска формирования БЛД отмечаются более низкие баллы по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. В связи с возможными нарушениями формирования воспалительного ответа, вызванными влиянием генотипов *TC* и *CC* rs694739 гена

LOC102823878, ранним сроком гестации и низкой массой тела при рождении у этих пациентов в раннем неонатальном периоде развивается РДС, что требует проведения кислородной поддержки. У новорожденных с генотипами *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102823878,* развивших РДС*,* отмечается увеличение длительности кислородозависимости, что предопределяет формирование БЛД.

Таблица 4.2.4. Распределение генотипов *TT*, *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102823878* среди недоношенных детей, имеющих клинико-анамнестические факторы риска формирования БЛД.

	Наличие клинико-анамнестических факторов риска у детей с генотипами *TC* и *CC*	Наличие клинико-анамнестических факторов риска у детей, не имеющих генотипов *TC* и *CC*	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
Дети, сформировавшие БЛД	0,960	0,040	10,653	0,002	6,0	1,970-18,275
Дети, не сформировавшие БЛД	0,800	0,200				

4.3. Оценка распределения генотипов варианта rs652438T гена *MMP12* и rs694739 гена *LOC102823878* у недоношенных детей в зависимости от степени тяжести бронхолегочной дисплазии (по данным МСКТ ОГК).

Были проанализированы данные МСКТ ОГК по запатентованной в 2010 г. инновационной отечественной шкале рентгенологической оценки степени тяжести БЛД (патент № 2401066) у 51 недоношенного ребенка, сформировавшего БЛД. При анализе результатов клинико-инструментального и генетического обследования

выявлено, что практически все недоношенные дети, сформировавшие БЛД (n=50), имели генотипы *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102823878* и выраженные рентгенологические изменения на МСКТ ОГК. Все дети с легкой степенью тяжести БЛД (1-5 баллов по шкале МСКТ ОГК) имели генотип *TC* и *CC* (n=15). Только 1 пациент со среднетяжелым течением БЛД (6-10 баллов по шкале МСКТ ОГК) имел генотип ТТ (n=1), остальные дети - генотипы *TC* и *CC* (n=28). Среди детей с тяжелым течением БЛД (11-15 баллов по шкале МСКТ ОГК) все дети имели генотипы *TC* и *CC* (n=7). Результаты представлены на рисунке 4.3.1.

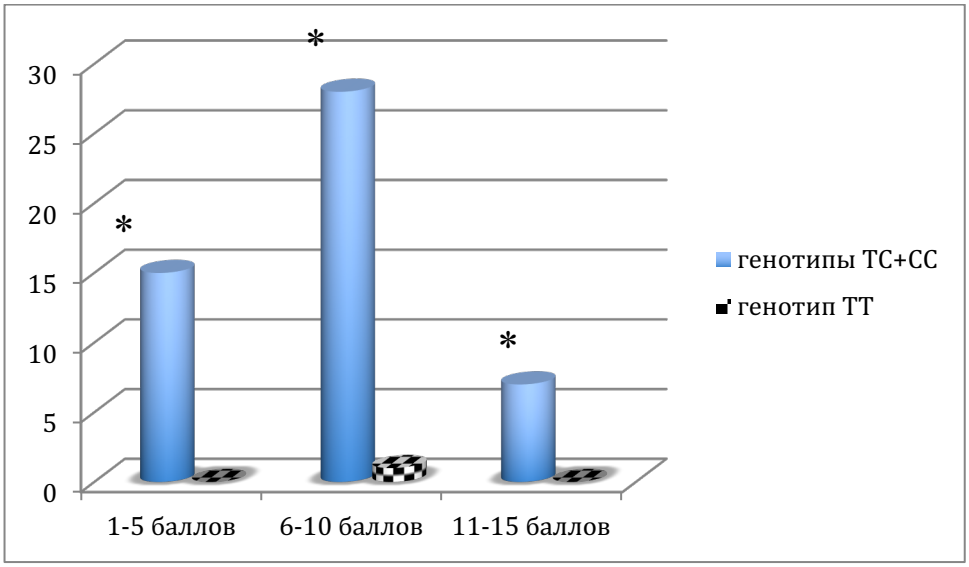


Рисунок 4.3.1. Распределение недоношенных детей с легким, средне-тяжелым и тяжелым течением БЛД по генотипам варианта rs694739 гена *LOC102823878. Примечание: * p<0,05.*

В группе детей с генотипами *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102823878* имеется тенденция к преобладанию пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением БЛД (n=35), по сравнению с пациентами с легким течением данного заболевания (n=15). Результаты представлены на рисунке 4.3.2.

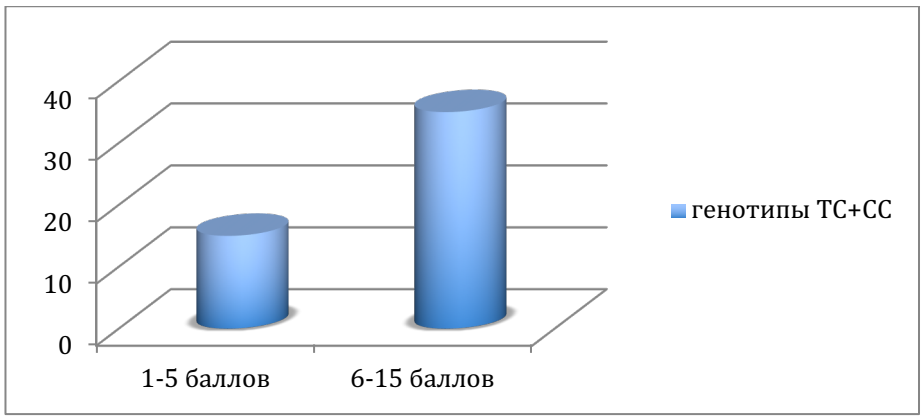


Рисунок 4.3.2. Распределение недоношенных детей, сформировавших БЛД, с генотипами *ТС* и *СС* варианта rs694739 гена *LOC102823878* по тяжести течения БЛД, на основании результатов МСКТ ОГК.

При анализе полученных данных не было выявлено достоверных данных о взаимосвязи генотипа *ТС* и *СС* варианта rs652438 гена *MMP12* у недоношенных детей, сформировавших БЛД, и рентгенологических изменений по результатам балльной оценки МСКТ ОГК.

4.4. Клинические примеры

Ребенок У.Д., дата рождения 09.07.2014. Беременность 4-я у женщины 35 лет, протекавшая с угрозой прерывания (1 беременность – роды, доношенная девочка, 2 и 3 беременность – самопроизвольный выкидыш на сроке 5 и 8 недель). Роды 2-ые преждевременные путем кесарева сечения на 28 неделе гестации в связи с угрозой отслойки плаценты. Масса тела при рождении - 1150 граммов, длина - 35 см. Оценка по шкале APGAR 5/6 баллов. Аспирация околоплодных вод при рождении. Состояние при рождении тяжелое за счет дыхательной недостаточности (врожденная пневмония, приступы апноэ), неврологических нарушений (синдром угнетения). Проводилась заместительная терапия препаратами сурфактанта (Куросурф). В связи с выраженной дыхательной недостаточностью на фоне РДС новорожденных ребенок находился на респираторной поддержке методом традиционной ИВЛ в течение 13 суток жизни. Длительность

кислородозависимости 28 суток. В возрасте 2 месяцев выписан домой с диагнозом: Бронхолегочная дисплазия, новая форма, среднетяжелое течение. Врожденная двусторонняя пневмония. Последствия гипоксически-ишемического поражения ЦНС. Ретинопатия недоношенных 1 ст. Анемия недоношенных. Недоношенность 28 недель. Оценка степени тяжести по шкале МСКТ ОГК у ребенка составила 12 баллов (резкое повышение степени и неравномерность пневмотизации, легочный рисунок резко обеднен на периферии, деформирован, бронхоэктазы, грубый фиброз с признаками объемного уменьшения сегментов, множественные транспульмональные тяжи, выраженная кардиомегалия, легочная гипертезия), что соответствует тяжелой степени тяжести БЛД. Данные представлены на рисунке 4.4.1. У ребенка ежемесячно отмечались обострения бронхообструктивного синдрома на фоне ОРВИ. Получал ингаляции будесонидом в дозе 500 мкг в сутки. Был проведен забор капиллярной крови на фильтровальную бумагу для дальнейшего выделения ДНК методом экстракции фенол-хлороформом и проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. По результатам генетического обследования у ребенка был выявлен генотип CC варианта rs694739 гена LOC102823878. В нашем исследовании данный генотип показал взаимосвязь с гестационным возрастом ребенка при рождении, длительностью кислородозависимости, оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни и дальнейшим формированием БЛД у недоношенных детей, а также с тяжестью течения БЛД по результатам МСКТ ОГК.

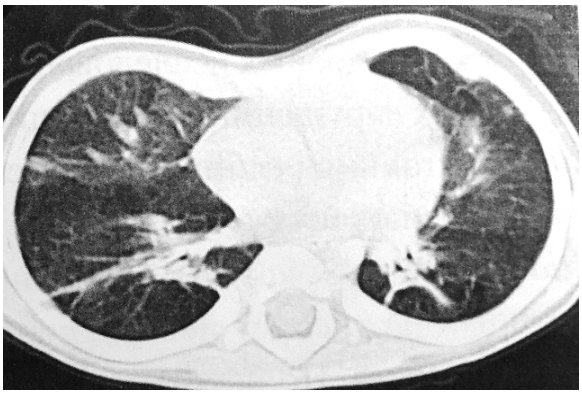


Рисунок 4.4.1. МСКТ ОГК с тяжелым течением бронхолегочной дисплазии

Ребенок Т.Д., дата рождения 24.12.2014. Беременность 4-я у женщины 30 лет, протекавшая с угрозой прерывания (1 беременность – самопроизвольный выкидыш, 2 беременность – роды, здоровый мальчик, 3 беременность – самопроизвольный выкидыш). Роды 2-ые преждевременные самопроизвольные путем на 29 неделе гестации в связи с угрозой отслойки плаценты. Масса тела при рождении - 1230 граммов, длина - 34 см. Оценка по шкале APGAR 5/6 баллов. Аспирация околоплодных вод при рождении. Состояние при рождении тяжелое за счет дыхательной недостаточности, неврологических нарушений. Заместительная терапия препаратами сурфактанта не проводилась. В связи с выраженной дыхательной недостаточностью на фоне РДС новорожденных ребенок находился на респираторной поддержке методом традиционной ИВЛ в течение 2 суток жизни, методом CPAP 10 суток. Длительность кислородозависимости 19 суток. В возрасте 3 месяцев выписан домой с диагнозом: Двусторонняя пневмония. Недоношенность 29 недель. Был проведен забор капиллярной крови на фильтровальную бумагу для дальнейшего выделения ДНК методом экстракции фенол-хлороформом и проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. По результатам генетического обследования были выявлены генотип TT варианта g.102736642T>C (rs652438), расположенного в гене MMP12 и генотип TT варианта rs694739 гена LOC102823878. В нашем исследовании показано, что данные генотипы не ассоциированы с дальнейшим формированием БЛД у недоношенных детей.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

БЛД – одно из наиболее тяжелых хронических заболеваний легких в раннем детском возрасте. С тех пор, как заболевание было впервые описано, эпидемиология, фундаментальные научные знания о патогенезе, а также тактика лечения заболевания претерпели существенные изменения [2]. Благодаря совершенствованию стратегий неонатальной реанимации на современном этапе ведения недоношенных детей, в том числе проведение профилактики гипотермии и терапии в концепции “защиты легких”, включающей профилактическое и терапевтическое применение препаратов сурфактанта, раннее проведение респираторной поддержки малоинвазивными методами, раннее медикаментозное или хирургическое закрытие гемодинамически значимого ОАП и другие стратегии с высоким уровнем доказательности эффективности их применения, снизилась смертность детей с ОНМТ и ЭНМТ и произошел патоморфоз БЛД с формированием более легких вариантов ее течения [23,91].

Однако, в поле зрения неонатологов, педиатров и пульмонологов остается достаточно большое количество недоношенных детей, формирующих БЛД в исходе РДС, несмотря на адекватную респираторную поддержку в неонатальном периоде [6]. Современная концепция этиопатогенеза БЛД, включающая в себя представление о многофакторности этой патологии, предполагает сложный характер взаимодействия как генетических, так и внешнесредовых факторов в процессе развития заболевания.

Наследственная предрасположенность является одним из факторов риска, наряду с незрелостью анатомических структур легкого, неполным функционированием системы сурфактанта и антиоксидантной системы у недоношенных детей, токсическим воздействием кислорода на легочную ткань, баротравмой легких в связи с применением ИВЛ, дыхательными расстройствами на

фоне РДС, внутриутробными инфекциями, отеком легких, легочной гипертензией, акушерско-гинекологическими материнскими факторами риска (хроническая фетоплацентарная недостаточность, хориамнионит, колпит, преэклампсия, ожирение, курение, гестационный диабет, многоплодная беременность, родоразрешение путем кесарева сечения, респираторные инфекции во время беременности, многоводие и др.) и неонатальными факторами риска (гестационный возраст, масса тела, длина и оценка по шкале APGAR при рождении, длительность и режимы ИВЛ, длительность кислородозависимости, сопутствующая патология) [3,5,6,11,14,94].

Многофакторность этиопатогенеза БЛД предопределяет широкий круг поиска генетически детерминированных механизмов, лежащих в основе повреждения легочной ткани при данном заболевании. В нашей стране и за рубежом внимание исследователей приковано к поиску ассоциации полиморфизмов генетических маркеров в генах системы сурфактантов, ферментов цитокинового каскада и антиоксидантной защиты, металлопротеиназ, факторов роста и др. с формированием БЛД [14,26,57,59,71,115].

Одним из самых важных звеньев в патогенезе БЛД является несовершенство сурфактантной системы новорожденного ребенка, связанное с недоношенностью, морфо-функциональной незрелостью или внутриутробным инфицированием. Гены, кодирующие сурфактантные белки и другие гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции, дифференциации, росте и альвеоляризации легочной ткани, могут оказывать влияние на развитие этой патологии. При этом точного механизма причинно-следственной связи между конкретным полиморфизмом и развитием РДС с дальнейшим формированием БЛД установить не удалось до сих пор [53,59,60,109,115,125,127].

Установлено, что ММП играют важную роль в ряде физиологических и патологических процессов, включая эмбриогенез, заживление ран, воспаление, сердечно-сосудистые болезни, болезни легких и рак [39]. Имеются данные об

активном участии ММП в развитии процессов деструкции внеклеточного матрикса, клеток альвеолярного эпителия и эндотелия капилляров с последующим развитием инициального септального фиброза [3].

Существует все больше доказательств того, что цитокин-опосредованное интерстициальное воспаление способствует развитию хронических заболеваний легких: с одной стороны, цитокины являются ключевым фактором в развитии воспалительной реакции, а с другой стороны, существует возможность того, что генетические факторы, связанные с цитокиновым каскадом, играют роль в восприимчивости к легочным заболеваниям [50,111]. Известно, что успешная защита от патогенов осуществляется за счёт распознавания микроорганизмов системой врожденного иммунитета [1]. Имеются данные о формировании воспалительного ответа через кислород-опосредованное повреждение митохондрий с участием определенных нуклеотидных вариантов гена *PRDX5* [86]. В мировой литературе описано, что ген LOC102823878, расположенный на хромосоме 11, в области гена PRDX5, может участвует в формировании воспалительного ответа при таких заболеваниях, как анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, псориаз, склерозирующий холангит [71,26]. Однако, достоверных ассоциаций полиморфизмов генов цитокинов и генов, кодирующих белки, отвечающие за формирование воспалительного ответа, с риском формирования БЛД, до настоящего времени не выявлено. Научный поиск в этом направлении продолжается.

Учитывая это, работы, направленные на выявление полиморфных генетических маркеров, задействованных в формировании БЛД, и их сопоставление с клинико-анамнестическими факторами риска, являются особенно актуальными, тем более, что на сегодняшний день клинически значимых результатов ассоциативных генетических исследований получено очень мало.

Целью нашего исследования являлось выявление генетических факторов предрасположенности к формированию бронхолегочной дисплазии у недоношенных

детей и сопоставление их с клинико-анамнестическими факторами риска развития данного заболевание.

В соответствии с целью и задачами в исследование были включены результаты ретроспективного анализа медицинской документации (история болезни, амбулаторные карты) 200 недоношенных детей с РДС в неонатальном периоде, сформировавших (n=100) и не сформировавших БЛД (n=100).

Все дети, включенные в исследование (n=200), рождены преждевременно (до 37 недели гестации включительно) и получали респираторную поддержку в неонатальном периоде в связи с РДС недоношенных.

В соответствии с задачами исследования дети были разделены на 2 группы:

- Критерием включения пациентов в первую группу (основная) являлось формирование БЛД к 28 дню жизни. В первую группу вошли 100 недоношенных детей с БЛД (мальчиков – 55, девочек – 45). Средний гестационный возраст детей при рождении в этой группе составил 28,6±0,6 недель, средняя масса тела при рождении – 1184,5±94,8 граммов.
- Критерием включения пациентов во вторую группу (группа контроля) являлось отсутствие кислородозависимости и клинико-рентгенологических признаков формирования БЛД к 28 дню жизни. Во вторую группу вошли 100 недоношенных детей без БЛД (мальчиков – 59, девочек – 41). Средний гестационный возраст детей при рождении в этой группе составил 31,9±0,5 недель, средняя масса тела при рождении - 1724,7±118,3 граммов.

Из исследования были исключены доношенные дети и недоношенные дети с верифицированными врожденными пороками бронхолегочной системы, муковисцидозом, врожденным стридором, генетически обусловленными синдромальными состояниями.

Отмечено, что в обеих группах преобладали мальчики. Однако, достоверных различий по гендерному признаку между детьми, сформировавшими и не сформировавшими БЛД, не выявлено (рис.3.1).

Новая форма БЛД верифицирована у - 80, классическая форма – у 20 недоношенных детей основной группы (n=100). По степени тяжести дети этой группы распределились таким образом: легкое течение – 22 ребенка; среднетяжелое течение – 60 детей; тяжелое течение – 18 детей.

У детей с БЛД верифицированы меньшие значения таких антропометрических показателей, как длина тела и масса тела при рождении, по сравнению с пациентами, не сформировавшими БЛД, что напрямую связанно с меньшим средним гестационным возрастом недоношенных в этой группе.

Развитие БЛД наиболее характерно для глубоко недоношенных детей. Одновременно с достоверно более низким уровнем средних показателей гестационного возраста детей первой группы, у них же отмечаются достоверно более низкие показатели средней массы тела при рождении. Дети с БЛД имели меньшую массу тела при рождении (1184,5±94,8 граммов) по сравнению с детьми без БЛД (1724,7±118,3 граммов). В группе пациентов с БЛД наиболее часто встречались недоношенные с очень низкой и экстремально низкой массой тела, в отличие от группы контроля, где в 50% случаев представлены дети с массой тела при рождении >1500 граммов.

Тяжелая гипоксия на 1 минуте после рождения была верифицирована у 10% детей, которые имели оценку по шкале APGAR от 1 до 3 баллов. Стоит отметить, что среди недоношенных детей с тяжелой гипоксией на 1 минуте после рождения (n=23) превалировали дети из 1 группы (78% от числа детей с тяжелой гипоксией). В общей когорте недоношенных (n=200), превалировали дети с умеренной степенью гипоксии (4 - 6 баллов), которая была верифицирована у 66% от общего числа недоношенных детей, преимущественно детей из 1 группы (60% от числа детей с умеренной степенью гипоксии). К 5-й минуте после рождения только лишь 16% от общего числа недоношенных детей имели оценку по шкале APGAR 5 баллов и ниже, а в 84% случаев от общего числа недоношенных было верифицировано 6 и более баллов.

В респираторной поддержке нуждались все дети, вошедшие в исследование (n=200). Щадящая респираторная поддержка путем поддержания постоянного положительного давления в дыхательных путях методом CPAP была проведена 108 пациентам из общей когорты недоношенных детей (54%). Пациенты из группы детей, сформировавших БЛД, составили 44% из всех детей, получающих респираторную поддержку методом CPAP. Респираторная поддержка методом Biphasic была проведена 28 недоношенным детям, не сформировавшим БЛД. Респираторная поддержка методом традиционной ИВЛ, относящаяся к факторам высокого риска повреждения легочной ткани, была оказана 93% детей, сформировавших БЛД и 57% детей, не сформировавших БЛД. Длительность ИВЛ составила в среднем 29 суток жизни в основной группе пациентов и 4,4 суток жизни - в контрольной группе. Длительность традиционной ИВЛ до 14 суток жизни отмечалась у 38 детей основной группы (41% от числа детей с БЛД, получивших респираторную поддержку методом традиционной ИВЛ) и у 57 детей контрольной группы (100% от числа детей без БЛД, получивших респираторную поддержку методом традиционной ИВЛ). Таким образом дети, сформировавшие БЛД, нуждались в более длительной респираторной поддержке, чем дети контрольной группы. Преимущественным методом являлась традиционная ИВЛ.

Все дети, сформировавшие БЛД (n=100), получили дополнительную оксигенацию длительностью более 28 суток жизни. В среднем, длительность дополнительной оксигенации в основной группе составила 59,06±3,91 суток. В группе пациентов, не сформировавших БЛД, среднее значение вышеуказанного показателя было достоверно ниже (11,47± 1,18 суток).

По результатам нашего исследования мы можем подтвердить показанные другими авторами данные, что риск формирования БЛД имеют дети с ОНМТ и ЭНМТ при рождении, с низкими баллами оценки по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни и длительной кислородозависимостью, превышающую 28 суток жизни.

Для уточнения локализации и характера поражения легких у детей с БЛД применялся современный метод визуализации - мультислайсовая компьютерная томография органов грудной клетки (МСКТ ОГК).

Всего методом МСКТ ОГК в нашем исследовании был обследован 51 недоношенный ребенок из группы сформировавших БЛД. По данным МСКТ ОГК проводилась балльная оценка рентгенологических изменений с применением запатентованной в 2010 г. инновационной отечественной шкалы рентгенологической оценки степени тяжести БЛД (патент № 2401066), где легкое течение БЛД соответствует 1-5, среднетяжелое 6-10, тяжелое 11-15 баллам. Средний балл МСКТ в группе детей с легким течением БЛД (n = 15) составил 3,9±1,2 баллов, в группе детей со среднетяжелым течением (n = 29) средний балл МСКТ составил 7,5±1,2 баллов, группе больных с тяжелым течением (n = 7) средний балл МСКТ составил 11,4±0,5 баллов. Таким образом, в исследуемой группе пациентов с БЛД преобладали дети со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания, что соответствует оценке 6-15 баллов по шкале и свидетельствует о выраженности пневмофиброза у данной категории больных.

Полученные клинико-анамнестические и инструментальные данные подтверждают общепринятые представления о формировании БЛД у недоношенных детей. Однако, наш клинический опыт и наблюдения коллег свидетельствуют о том, что при наличии одинаковых исходных показателей при рождении и проведении однотипной респираторной поддержки возможно как формирование БЛД, так и благоприятное разрешение РДС без формирования данного заболевания. Возможность генетической детерминации формирования БЛД является весьма актуальной для изучения данной проблемы на современном этапе.

Всем детям (n=200) был осуществлен забор капиллярной крови на фильтровальную бумагу Whatmann 903. Молекулярно-генетические исследования проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Геномная ДНК была выделена из образцов сухих пятен крови или буккального эпителия методом фенол-

хлороформной экстракции [56]. Качество и количество выделенной геномной ДНК оценивалось при помощи спектрофотомера NanoVue (GE Healthcare, США), а также флуориметрически с использованием флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen, США). Участки исследуемых генов амплифицировали с использованием метода ПЦР режиме реального времени. Последовательности олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов приведены в таблице 2.2.1. Обозначения полиморфных маркеров соответствуют общепринятым в базе данных dbSNP [147].

В настоящем исследовании был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов однонуклеотидных вариантов генов-кандидатов, кодирующих факторы роста фибробластов *FGFR4* (rs376618, rs1966265), *FGFR2* (rs2981579, rs1219648)), белки сурфактантов *SFTPA1* (rs4253527), *SFTPA2* (rs121917737, rs121917738), *SFTPB* (rs137853202), *SFTPC* (rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318, rs121917835, rs121917836, rs121918560)), металлопротеиназы *MMP2* (rs7201, rs17301608, rs243865), *MMP9* (rs20544, rs3918242, rs17576), *MMP12* (rs2276109, rs652438), *MMP16* (rs2664352), а также генов, кодирующих белки, влияющие на формирование воспалительного ответа *PTPN22* (rs2476601)*, HLA-DRA* (rs9268645)*, TAGAP* (rs1738074)*, TYK2* (rs34536443, rs2304256)*, LOC102823878* (rs 694739).

При проведении анализа распределения частот аллелей и генотипов варианта rs652438 гена *MMP12*, ответственного за процессы протеолиза легочной ткани и rs694739 гена *LOC102823878,* расположенного в области гена *PRDX5,* играющего важную роль в формировании воспалительного ответа*,* выявлены статистически значимые различия в группах недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

Ассоциации других исследованных вариантов генов, кодирующих факторы роста фибробластов *FGFR4* (rs376618, rs1966265), *FGFR2* (rs2981579, rs1219648), белки сурфактантов *SFTPA1* (rs4253527), *SFTPA2* (rs121917737, rs121917738), *SFTPB* (rs137853202), *SFTPC* (rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318,

rs121917835, rs121917836, rs121918560), а также генов, кодирующих белки, влияющие на формирование воспалительного ответа *PTPN22* (rs2476601)*, HLA-DRA* (rs9268645)*, TAGAP* (rs1738074)*, TYK2* (rs34536443, rs2304256) с развитием БЛД в нашем исследовании обнаружено не было.

В группе недоношенных детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой контроля, чаще встречался аллель *C* (p=0,02, ОШ 1,78 (95% ДИ 1,09-2,90), генотипы *CC* (p=0,03, ОШ 3,20 (95% ДИ 0,84-12,18) и *TC* (p=0,03, ОШ 1,39 (95% ДИ 0,76-2,55) варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP-12,* а также аллель *C* (p=0,004, ОШ 1,8 (95% ДИ 1,21-2,67), генотипы *CC* (p=0,0004, ОШ 3,02 (95% ДИ 1,32-6,91) и *TC* (p=0,0004, ОШ 1,05 (95% ДИ 0,57-1,96) варианта rs694739 гена *LOC102723878*.

Нами показано, что дети с клинико-анамнестическими факторами риска развития БЛД, имевшие генотипы *CC* и *TC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена MMP12 имели риск формирования БЛД в 3 раза выше (p<0,001, ОШ 3,018 (ДИ 1,607-5,665)), по сравнению с детьми, не имевшими генотипов *CC* и *TC*, а дети с клинико-анамнестическими факторами риска развития БЛД, имевшие генотипы *CC* и *TC* варианта rs694739 гена *LOC102723878* обладали риском формирования БЛД в 6 раз выше (p=0,002, ОШ 6,0 (ДИ 1,970-18,275)), по сравнению с детьми, не имевшими этих генотипов.

В нашем исследовании показана возможность влияния генотипов *TC* и *CC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* и варианта rs694739 гена *LOC102723878* на формирование БЛД у недоношенных детей. Получены данные о взаимосвязи генотипов *TC* и *CC* варианта g.102736642T>C (rs652438), расположенного в гене *MMP12*, со следующими клинико-анамнестическими характеристиками недоношенных детей: длительность кислородозависимости, оценка по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. Выявлена взаимосвязь генотипов *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102723878*, со следующими клинико-анамнестическими характеристиками недоношенных детей: длительность

кислородозависимости, гестационный возраст и масса тела при рождении, оценка по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни.

Дети, сформировавшие БЛД, имеют более низкие показатели массы тела и гестационного возраста при рождении, что может быть обусловлено влиянием варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* и варианта rs694739 гена *LOC102723878*. В нашем исследовании определено, что у детей с данными генотипами повышен риск преждевременного рождения. В последующем у детей с данными генетическими факторами риска формирования БЛД отмечаются более низкие баллы по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни. В связи с внутриутробными нарушениями формирования легочной ткани, вызванными влиянием генотипов *TC* и *CC* g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* и нарушениями формирования воспалительного ответа, которые могут быть обусловлены влиянием генотипов *TC* и *CC* rs694739 гена *LOC102723878,* ранним сроком гестации при рождении у этих пациентов в раннем неонатальном периоде развивается РДС, что требует проведения кислородной поддержи. У новорожденных с генотипами *TC* и *CC* g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* и варианта rs694739 гена *LOC102723878,* развивших РДС*,* отмечается увеличение длительности кислородозависимости, что в последующем может предопределять формирование БЛД.

БЛД у недоношенных детей имеет сложные патогенетические механизмы. В нашем исследовании было показано, что помимо влияния таких клинико-анамнестических факторов риска формирования БЛД у недоношенных детей, как масса тела, длина тела и гестационный возраст при рождении, оценка по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительность кислородозависимости, в патогенезе заболевания определяющую роль может играть генетическая детерминация, предрасполагающая к развитию данного заболевания.

Мы установили, что существует ассоциация генотипов *CC* и *TC* варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP-12* и варианта rs694739 гена *LOC102723878* с формированием БЛД у недоношенных детей.

Вероятно, что однонуклеотидные варианты гена *MMP-12* приводят к длительной деструкции внеклеточного матрикса и процессам фиброзирования легочной ткани, нарушают альвеоляризацию легких и способствуют формированию БЛД у недоношенных детей с клинико-анамнестическими факторами риска развития данного заболевания.

Механизм влияния гена *LOC102723878*, расположенного на хромосоме 11, в области гена, кодирующего PRDX5, участвующего в формировании воспалительного ответа, через кислород-опосредованное повреждение митохондрий и ингибирование апоптоза, на формирование БЛД у недоношенных детей не так очевиден. В мировой литературе описано, что ген *LOC102823878* может участвовать в формировании таких воспалительных заболеваний, как анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, псориаз, склерозирующий холангит [71,26], множественная эндокринная неоплазия, атаксии-телеангиэктазии, туберозный склероз, ассоциирован с некоторыми формами бронхиальной астмы и ринита, метастазированием в лимфатические узлы во время эволюции опухоли [109], течением серповидно-клеточной анемии [104]. Данная тема нуждается в дальнейшем изучении.

В исследовании показана возможность влияния генетических факторов на формирование БЛД у недоношенных детей с клинико-анамнестическими факторами риска развития данного заболевания. Для недоношенных детей, имеющих высокий риск развития БЛД, при выявлении генетической детерминации формирования бронхолегочной дисплазии необходима разработка новых подходов к профилактике данного заболевания или для уменьшения тяжести его течения. Определенные в нашем исследовании генетические предикторы формирования БЛД могут позволить использовать алгоритм клинико-генетической диагностики для прогноза развития БЛД в возрасте 3-4 суток у недоношенных детей с целью выделения группы риска и своевременного назначения медикаментозной профилактики формирования данной патологии.

ВЫВОДЫ

1. Клинико-анамнестическими факторами высокого риска формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей являются гестационный возраст менее 37 недель, очень низкая и экстремально низкая масса тела при рождении, длительная респираторная поддержка в неонатальном периоде, низкая оценка по шкале APGAR 1 и 5 минутах жизни, кислородозависимость более 28 суток жизни.

2. Анализ распределения частот аллелей и генотипов однонуклеотидных вариантов генов, ответственных за процессы протеолиза легочной ткани и воспалительного ответа, выявил ассоциацию с формированием бронхолегочной дисплазии у детей, обладающих аллелем *C* (p=0,02, ОШ 1,78 (95% ДИ 1,09-2,90) генотипами *CC* (p=0,03, ОШ 3,20 (95% ДИ 0,84-12,18) и *TC* (p=0,03, ОШ 1,39 (95% ДИ 0,76-2,55) варианта rs652438 гена *MMP-12* и аллелем *C* (p=0,004, ОШ 1,8 (95% ДИ 1,21-2,67), генотипами *CC* (p=0,0004, ОШ 3,02 (95% ДИ 1,32-6,91) и *TC* (p=0,0004, ОШ 1,05 (95% ДИ 0,57-1,96) варианта rs694739 гена *LOC102723878.*

3. Недоношенные дети, имеющие клинико-анамнестические факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии, обладающие генотипами *TC* и *CC* (p<0,01, ОШ 3,01 (95% ДИ 1,60-5,66) варианта rs652438 гена *MMP-12* и генотипами *TC* и *CC* (p=0,002, ОШ 6,0 (95% ДИ 1,97-18,27) варианта rs694739 гена *LOC102723878,* обладают повышенным риском формирования бронхолегочной дисплазии в 3 и в 6 раз соответственно.

4. Среди недоношенных детей с генотипами *TC* и *CC* варианта rs694739 гена *LOC102723878,* сформировавших бронхолегочную дисплазию, преобладают пациенты со средне-тяжелым и тяжелым течением заболевания с оценкой по шкале мультислайсовой компьютерной томографии органов грудной клетки более 5 баллов.

5. В проведенном исследовании не было выявлено ассоциаций полиморфных маркёров rs376618, rs1966265 гена *FGFR4* , rs2981579, rs1219648 гена *FGFR2* ,

rs4253527 гена *SFTPA1*, rs121917737, rs121917738 гена *SFTPA2*, rs137853202 гена *SFTPB*, rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318, rs121917835, rs121917836, rs121918560 гена *SFTPC*, rs7201, rs17301608, rs243865 гена *MMP2*, rs20544, rs3918242, rs17576 гена *MMP9*, rs2276109, rs2664352 гена *MMP16*, rs2476601 гена *PTPN22*, rs9268645 гена *HLA-DRA*, rs1738074 гена *TAGAP*, rs34536443, rs2304256 гена *TYK2*, с формированием бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей.

6. Выявленные клинико-анамнестические факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии и ассоциации полиморфных маркеров гена *MMP-12* и гена LOC10272387 обосновывают необходимость персонифицированного подхода к ведению больных с риском формирования бронхолегочной дисплазии согласно предложенному алгоритму.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

I. Клинико-анамнестические и молекулярно-генетические факторы риска формирования БЛД могут быть использованы при проведении клинико-генетической диагностики для прогноза развития БЛД в раннем неонатальном периоде у недоношенных детей с целью выделения группы риска и проведения своевременной индивидуальной медикаментозной профилактики формирования данной патологии.

II. Предложенный алгоритм клинико-генетической диагностики БЛД у недоношенных детей с РДС в раннем неонатальном периоде рекомендуется для использования в перинатальных центрах и других учреждениях родовспоможения с целью выработки индивидуальной тактики ведения пациентов, относящихся к группе высокого риска формирования БЛД.

Приложение 1. Алгоритм ведения недоношенных детей на основании данных клинико-генетического обследования.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противоинфекционный. *Практическая медицина*. 2008; 255 .

2. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Давыдова И.В. Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии. *ПедиатрЪ*. 2013; 18-31.

3. Басаргина М.А. Значение матриксных металлопротеиназ в формировании и течении бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей: Автореф. дисс. …канд. мед. наук. М. 2009; 3-23.

4. Беляева И.А., Давыдова И.В. Роль генетических факторов в формировании бронхолегочной дисплазии у детей. *Вопросы диагностики в педиатрии*. 2012; 4(5):5-9.

5. Беляшова М.А., Овсянников Д.Ю., Огородова Л.М. Молекулярно-генетические механизмы развития бронхолегочной дисплазии. *Неонатология: новости, мнения, обучение.* 2015; 3: 50-68.

6. Давыдова И.В. Формирование, течение и исходы бронхолегочной дисплазии у детей: Автореф. дисс. …канд. мед. наук. М. 2010; 48с.

7. Давыдова И.В., Аникин А.В., Кустова О.В., Сиденко А.В., Басаргина Е.Ю., Павлюкова Е.В., Пожарищенская В.К. Бронхолегочная дисплазия в постсурфактантную эру: результаты объективной оценки течения заболевания. *Вопросы современной педиатрии*. 2015; 14(4): 514-518.

8. Давыдова И.В., Яцык Г.В., Бершова Т.В., Басаргина М. А. , Баканов М.И. Матриксные металлопротеиназы как маркеры формирования бронхолегочной дисплазии у детей. *Пульмонология*. 2009; 4: 80-84.

9. Дементьева Г.М. Болезни бронхолегочной системы у новорожденных: Лекция. *Росс. вестник перинатологии и педиатрии. Приложение*. 2004; 60-75.

10. Дементьева Г.М. Пульмонологические проблемы в неонатологии. *Пульмонология.* 2002; 1: 6-12.

11. Межинский С.С. Полиморфизм генов системы детоксикации и главного комплекса гистосовместимости HLA II класса у глубоконедоношенных новорожденных с бронхолегочной дисплазией. Автореф. дисс…канд.мед.наук. И. – 2019; 24с.

12. Овсянников Д.Ю. Легочная гипертензия и легочное сердце – осложнения бронхолегочной дисплазии. Вопросы диагностики в педиатрии. 2013; 5(4): 5-13.

13. Овсянников Д.Ю. Бронхолегочная дисплазия: от Норсвея до наших дней. Монография. Москва. РУДН. 2016. 384с.

14. Павлинова Е.Б. Анализ полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы у недоношенных новорожденных из группы риска по формированию бронхолегочной дисплазии. *Вопросы диагностики в педиатрии*. 2011; 3 (5): 14-19.

15. Павлинова Е.Б. Обоснование системы этапной профилактики , диагностики и прогнозирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей. Автореф. дисс … докт. мед. наук. М. 2012; 47с.

16. Панов П.В. Перинатальные и иммуногенетические факторы риска бронхолегочной дисплазии. Автореф. дисс … канд. мед. наук. М. 2015; 22с.

17. Панченко А.С. Патогенетическая характеристика и прогнозирование формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей. Автореф. дисс … докт. мед. наук. Иркутск. 2015; 43с.

18. Союз педиатров России. Российская ассоциация специалистов перинатальной медицины. Федеральные клинические рекомендации по ведению детей с бронхолегочной дисплазией. 2014; 1-29.

19. Хиггинс Р.Д и соавт. Бронхолегочная дисплазия: сводное резюме семинара. *Неонатология.* 2019; 7: 71-82.

20. Шаповалова В. В.. Значения спиральной компьютерной томографии в определении степени тяжести бронхолегочной дисплазии у детей раннего возраста. *Scientific Journal «ScienceRise».* 2015; 3(11): 100-105.

21. Яцык Г.В., Давыдова И.В., Кустова О.В. Способ оценки степени тяжести бронхолегочной дисплазии: пат. 2401066 Рос. Федерация. № 2008152138/14; заявл. 29.12.2008; опубл. 10.10.2010.

22. Abbasi F., Soltani S. et al. PTPN22 Single-Nucleotide Polymorphisms in Iranian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Immunol Invest.* 2017; 46(4): 409-418.

23. Abman S., Jobe A.H., Chernick V. et al Strategic plan for pediatric respiratory diseases research: an NHLBI working group report. *NHLBI working group report. Pediatr Pulmonol.* 2009; 155: 149-155.

24. Adam G., Lawrence M. Candidate Gene Analysis of the Surfactant Protein D Gene in Pediatric Diffuse Lung Disease. *The journal of pediatrics*. 2013; 163:1778-1780.

25. Aflatounian M., Rezaei A., Sadr M. et al. Association of PTPN22 Single Nucleotide Polymorphisms with Celiac Disease. *Fetak Pediatr Pathol*. 2017; 36(3): 195-202.

26. Allinghaus D., Ellinghaus E., Nair R. Et al. Combined Analysis of Genome-wide Association Studies for Crohn Disease and Psoriasis Identifies Seven Shared Susceptibility Loci. *Am J Hum Genet.* 2012; 90(4): 636–647.

27. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 241–269.

28. Amr Hosny Malash, Aliaa Adel Ali, Rania Mohamed Samy, Radwa Ahmed Shamma. Association of TLR polymorphisms with bronchopulmonary dysplasia. *Gene*. 2016; 592(1): 23-28.

29. Bao-huan Cai, Li-wen Chang, Wen-bin Li, Wei Liu, Xi-juan Wang, Lu-xia Mo, Ling-xia Zhao, Hong-tao Xu, Hui Yang. Association of Surfactant Protein B Gene Polymorphisms (C/A-18, C/T1580, Intron 4 and A/G9306) and Haplotypes with Bronchopulmonary Dysplasia in Chinese Han Population. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2013; 33(3): 323-328.

30. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kemppinen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013; 45: 1353–1360.

31. Beena Mailaparambil, Marcus Krueger, Ulrike Heizmann, Katharina Schlegel, Jessica Heinze and Andrea Heinzmann. Genetic and epidemiological risk factors in the development of bronchopulmonary dysplasia. *Disease Markers*. 2010; 29: 1–9.

32. Bhandari V. et al. Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics.* 2006; 117(6): 1901-1906.

33. Boggaram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung. *Clin Sci (Lond).* 2009; 116: 27-35.

34. Bokodi G. et al. Association of interferon gamma T+874A and interleukin 12 p40 promoter CTCTAA/GC polymorphism with the need for respiratory support and perinatal complications in low birthweight neonates. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 2007; 92(1): 25-29.

35. Brasch F, Schimanski S, Muhlfeld C, Barlage S, Langmann T, As- lanidis C, et al. Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174: 571-80.

36. Bullard JE, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, Nogee LM. ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172: 1026-31.

37. Cameron HS, Somaschini M, Carrera P, Hamvas A, Whitsett JA, Wert SE, et al. A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease. *J Pediatr. 2005*; 146: 370-5.

38. Capasso M., Avvisati R., Piscopo C., Laforgia N., Raimondi F. Cytokine Gene Polymorphisms in Italian Preterm Infants: Association Between Interleukin-10 –1082 G/A Polymorphism and Respiratory Distress Syndrome. *Pediatric Research*. 2007; 61: 313–317.

39. Chakraborti S. et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell Biochem.* 2003; 253: 269-285.

40. Cole F. S. Genetic disorders of neonatal respiratory function. *Pediatr. Res.* 2001; 50: 157-162.

41. Condò V., Cipriani S., Colnaghi M., Bellù R., Zanini R., Bulfoni C., Parazzini F., Mosca F. Neonatal respiratory distress syndrome: are risk factors the same in preterm and term infants? *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2016; 1-18.

42. Connelly TM, Sehgal R., Berg AS. Et al. Mutation in TAGAP is protective of anal sepsis in ileocolic Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 2012; 55(11): 1145-52.

43. Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, Leo P, Cremin K, Pryce K, Harris J, Lee S, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet*. 2013; 45: 730–738.

44. Cunningham L. A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*. 2005; 50: 329-339.

45. Dionne CA, Crumley G, Bellot F, et al. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO Journal.* 1990; 9(9): 2685–2692.

46. Dizdar E. et al. Total antioxidant capacity and total oxidant status after surfactant treatment in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Ann Clin Biochem*. 2011; 48(5): 462-467.

47. Doan ML, Guillerman RP, Dishop MK, Nogee LM, Langston C, Mallory GB, et al. Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children. *Thorax*. 2008; 63: 366-73.

48. Elhawary N.A, Tayeb M.T, Abdel-Ghafar S, Rashad M, Alkhotani AA. TNF-238 polymorphism may predict bronchopulmonary dysplasia among preterm infants in the Egyptian population. *Pediatr Pulmonol*. 2013; 48(7): 699-706.

49. Erik A. Jensen, Barbara Schmidt. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Clinical and molecular teratology*. 2014; 3: 145-157.

50. Ferreira PJ, Bunch TJ, Albertine KH, Carlton DP. Circulating neutrophil concentration and respiratory distress in premature infants. *J Pediatr*. 2000; 136: 466–472.

51. Floros J, Fan R, Matthews A, DiAngelo S, Luo J, Nielsen H, et al. Family-based transmission disequilibrium test (TDT) and case-control association studies reveal surfactant protein A (SP-A) susceptibility alleles for respiratory distress syndrome (RDS) and possible race differences. *Clin Genet*. 2001; 60: 178-87.

52. Floros J, Londono D, Gordon D, Silveyra P, Diangelo SL, Viscardi RM, Worthen GS, Shenberger J, Wang G, Lin Z, et al. IL-18R1 and IL-18RAP SNPs may be associated with bronchopulmonary dysplasia in African-American infants. *Pediatr Res.* 2012; 71: 107–114.

53. Floros J. Surfactant protein (SP) B associations and interactions with SP-A in white and black subjects with respiratory distress syndrome. *Pediatr. Int*. 2001; 43: 567-576.

54. Garmany TH, Wambach JA, Heins HB, Watkins-Torry JM, Wegner DJ, Bennet K, et al. Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency. *Pediatr Res*. 2008; 63: 645-9.

55. Gary M. Shaw and Hugh M. O'Brodovich. Progress in understanding the genetics of Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinatol*. 2013; 37(2): 85–93.

56. Green R And Sambrook J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring HarbProtoc*. 2017.

57. Greenlee K. J. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol. Rev*. 2007; 87: 69-98.

58. Haataja R, Ramet M, Marttila R, Hallman M. Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 2751-60.

59. Hadchouel A, Decobert F, Franco-Montoya M et al.. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia: identification of MMP16 as a new player in lung development. *PLoS ONE*. 2008; 3(9): 3188.

60. Hallman M., Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin. Neonatol.* 2003; 8(1): 19-27.

61. Hamvas A, Cole FS, Nogee LM. Genetic disorders of surfactant proteins. *Neonatology.* 2007; 91: 311-7.

62. Hamvas A, Trusgnich M, Brice H, Baumgartner J, Hong Y, Nogee LM, et al. Population-based screening for rare mutations: high- throughput DNA extraction and molecular amplification from Guthrie cards. *Pediatr Res*. 2001; 50: 666-668.

63. Hamvas A, Wegner DJ, Carlson CS, Bergmann KR, Trusgnich MA, Fulton L, et al. Comprehensive genetic variant discovery in the surfactant protein B gene. *Pediatr Res*. 2007; 62: 170-5.

64. Hamvas A. Current technology in the diagnosis of developmentally related lung disorders. *Neonatology*. 2012; 101: 353-9.

65. Harijith A, Choo-Wing R, Cataltepeetal S. A role for matrix metalloproteinase 9 in IFNγ-mediated injury in developing lungs: relevance to bronchopulmonary dysplasia. *The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2011; 44(5): 621–630.

66. Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A. et al.. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001; 410(6832): 1099-1103.

67. Hemmi H. A., Takeushi O., Kawai T. et al. Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 410(6813): 740-745.

68. Heui Seung Jo. Genetic risk factors associated with respiratory distress syndrome. *Korean Journal of Pediatrics*. 2014; 57(4): 157-163.

69. Hu LY, Cheng Z, Zhang B et al. Associations between PTPN22 and TLR9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a comprehensive meta-analysis. *Arch Dermatol Res.* 2017; 309 (6): 461-477.

70. Huusko JM, Karjalainen MK, Mahlman M, Haataja R, Kari MA, Andersson S, Toldi G, Tammela O, Rämet M, Lavoie PM, Hallman M; Gen-BPD Study Group. A study of genes encoding cytokines (IL6, IL10, TNF), cytokine receptors (IL6R, IL6ST), and

glucocorticoid receptor (NR3C1) and susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *BMC Med Genet.* 2014; 1(15): 120.

71. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham A., Patsopoulos N. et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2013; 45(11): 1353-1360.

72. Jazaeri A., Vallian S. Association of rs1738074 polymorphism of TAGAP gene with susceptibility to multiple sclerosis in the Iranian population. *Neurosci Lett*. 2017; 1(648): 66-69.

73. Jo HS, Cho SI, Chang YH, Kim BI, Choi JH. Surfactant protein A associated with respiratory distress syndrome in Korean preterm infants: evidence of ethnic difference. *Neonatology*. 2013; 103: 44-7.

74. Jobe AH. Blood cytokines and BPD. Describes cytokines that are important in the pathogenesis of BPD. *J Pediatr*. 2009; 154(1): 2.

75. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012; 491: 119–124.

76. Karagianni P, Rallis D, Fidani L, Porpodi M, Kalinderi K, Tsakalidis C, Nikolaidis N. Glutathion-S-Transferase P1 polymorphisms association with broncopulmonary dysplasia in preterm infants. *HIPPOKRATIA*. 2013; 17(4): 363-367.

77. Kazzi S.N. et al. Polymorphism of tumor necrosis factor and risk and severity of bronchopulmonary dysplasia among very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2004; 114(2): 243-248.

78. Kazzi S.N., Tromp G., Quasney M.W. and Buhimschi I.A., Haplotypes of tumor necrosis factor gene and tracheal aspirate fluid levels of tumor necrosis factor-alpha in preterm infants. *Pediatr Res*. 2008; 64: 165–170.

79. Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991; 88(4): 1095–1099.

80. Kheradmand F, Rishi K, and Werb Z. Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *Journal of Cell Science*. 2002; 115(4): 839–848.

81. Kim JH, Park BL et al. HLA-DRA polymorphisms associated with risk of nasal polyposis in asthmatic patients. *Am J Rhinol Allergy*. 2012; 26(1): 7-12.

82. Kim NC, Yoon HC, Suk JS, Ko JH, Yoo OJ, Lee IK, et al. Allele distribution and frequency of human surfactant protein-A2 in Korean neonates. *J Korean Pediatr Soc*. 2003; 46: 340-4.

83. Kinnula V. L. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. Am. J. Respir. Crit. *Care Med*. 2003; 167: 1600-1619.

84. Koide S. et al. Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2003. Vol. 41. N 4. P. 539-545.

85. Kramer BW. Antenatal inflammation and lung injury: prenatal origin of neonatal disease. *J Perinatol*. 2008; 28: 21–27.

86. Kreft K., Nierop G., Scherbeijn S., Janssen M., Verjans G., Hintzen R. Elevated EBNA-1 IgG in MS is is associated with genetic MS risk variants. *Neurol Neuroimmunal Neuroinflamm*. 2017; 1-8

87. Kropski JA, Lawson WE, Young LR, Blackwell TS. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis Model Mech*. 2013; 6: 9-17.

88. Krueger M, Heinzmann A, Mailaparambil B, Hartel C, Gopel W. Polymorphisms of interleukin 18 in the genetics of preterm birth and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2011; 96: 299–300.

89. Lahti M, Marttila R, Hallman M. Surfactant protein C gene variation in the Finnish population - association with perinatal respiratory disease. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12:

312-20.

90. Lavoie PM, Ladd M, Hirschfeld AF, Huusko J, Mahlman M, Speert DP, Hallman M, Lacaze-Masmonteil T, Turvey SE. Influence of common non-synonymous Toll-like receptor 4 polymorphisms on bronchopulmonary dysplasia and prematurity in human infants. *PLoS One.* 2012; 7: 313-351.

91. Lee KS, Kim YH, Suk JS, Ko JH, Yoo OJ, Lee IK, et al. Allele distri- bution and frequency of human surfactant protein-A1 in Korean neonates. *J Korean Pediatr Soc*. 2002; 45: 1497-502.

92. Lin H., Tsai F., Tsai C., Hsieh Y., Hsu C. Cytokine polymorphisms and chronic lung disease in small preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005; 90: 93-94.

93. Lin H., Su B., Chang J., Hsu C., Tsai C., Tsai F. Nonassociation of interleukin 4 intron 3 and 590 promoter polymorphisms with bronchopulmonary dysplasia for ventilated preterm infants. *Biol Neonate*. 2005; 87(3): 181-186.

94. Lindsey A. Morrow, Brandie D. Wagner et al. Antenatal Determinants of Bronchopulmonary Dysplasia and Late Respiratory Disease in Preterm Infants. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 196(3): 364–374.

95. Liu Z., Yu Y. et al. Genetic Alleles Associated with SLE Susceptibility and Clinical Manifestations in Hispanic Patients from the Dominican Republic. *Curr Mol Med*. 2019; 19(3): 164-171.

96. Lu Miao. Clair regulation of superoxide dismutase genes: implications in diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 47(4): 344-356.

97. Mäkelä TP, Eerola E, et al. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO Journal.* 1991; 10(6): 1347–1354.

98. Manar M. et al. Association of glutathione-S-transferase-P1 (GST-P1) polymorphisms with bronchopulmonary dysplasia. *J. Perinatol*. 2004; 24(1): 30-35.

99. Martis PC, Whitsett JA, Xu Y, Perl AK, Wan H, Ikegami M. C/ EBPalpha is required for lung maturation at birth. *Development*. 2006. 133: 1155-1164.

100. Marttila R, Haataja R, Guttentag S, Hallman M. Surfactant protein A and B genetic

variants in respiratory distress syndrome in singletons and twins. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168: 1216-22.

101. Marttila R, Haataja R, Ramet M, Lofgren J, Hallman M. Surfactant protein B polymorphism and respiratory distress syndrome in premature twins. *Hum Genet*. 2003; 112: 18-23.

102. Marttila R, Haataja R, Ramet M, Pokela ML, Tammela O, Hallman M. Surfactant protein A gene locus and respiratory distress syndrome in Finnish premature twin pairs. *Ann Med*. 2003; 35: 344-352.

103. McGowan E., Kostadinov S., McLean K., Gotsch F., Venturini D., Romero R., Laptook R. Placental IL-10 dysregulation and association with bronchopulmonary dysplasia risk. *Pediatr Res*. 2009; 66(4): 455–460.

104. Moumni I., Ben Mustapha M et al. Haplotype map of sickle cell anemia in Tunisia. *Dis Markers.* 2014; 1-7.

105. Nakamura S. et al. Polymorphism in glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function. *Circulation.* 2003; 108(12): 1425-1427.

106. Nassi et al. Anti-oxidant enzymes and related elements in term and preterm newborns. *Pediatr. Int.* 2009; 51(2): 183-187.

107. Nelson K. K. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37(6): 768-784.

108. Nogee L.M. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med*. 2001; 344: 573-579.

109. Nogee L.M. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest*. 2002; 121(3): 20-21.

110. Northway W.H., Rosan R.C., Porter D.Y. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane discase. *N. Engl. J. Med.* 1967; 276: 357–368.

111. Nupponen I, Pesonen E, Andersson S, Makela A, Turnen R, Kautiainen H. Neutrophil activation in preterm infants who have respiratory distress syndrome. *Pediatrics.* 2002; 110: 36–41.

112. Paananen R, Husa AK, Vuolteenaho R, et al. Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr.* 2009; 154(1): 39–43.

113. Powell PP, Wang C, Horinouchi H, et al. Differential expression of fibroblast growth factor receptors 1 to 4 and ligand genes in late fetal and early postnatal rat lung. *The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1998; 19(4): 563–572.

114. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7549–7558.

115. Rämet M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M. Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory-distress syndrome in the Finnish population. *Am J Hum Genet*. 2000; 66: 1569-1579.

116. Rova M. et al. Data mining and multiparameter analysis of lung surfactant protein genes in bronchopulmonary dysplasia. *Hum. Mol. Genet*. 2004; 13(11): 1095-1104.

117. Saitoh W, Sakamoto T, Hegab AE, Nomura A, Ishii Y, et al. MMP14 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Mol Med*. 2006; 17: 621–626.

118. Sampath V, Garland JS, Le M, Patel AL, Konduri GG, Cohen JD, Simpson PM, Hines RN. A TLR5 (g.1174C > T) variant that encodes a stop codon (R392X) is associated with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*. 2012; 47: 460–468.

119. Shi-Qi Huang, Na Zhang et al. Association of LPP and TAGAP Polymorphisms with Celiac Disease Risk: A Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; 14(2): 171.

120. Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med*. 2004; 350:

1296-303.

121. Siedlinski M. et al. Lung function loss, smoking, vitamin C intake, and polymorphisms of the glutamate – cysteine ligase genes. *Am. J. Respir. Critical Care Med.* 2008; 178(1); 13-19.

122. Silveyra P, Floros J. Genetic variant associations of human SP- A and SP-D with acute and chronic lung injury. *Front Biosci (Land- mark Ed).* 2012; 17: 407-429.

123. Somaschini M. et al. Genetic predisposing factors to bronchopulmonary dysplasia: preliminary data from a multicentre study. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med*. 2012; 25(4): 127-130.

124. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11: 354–362.

125. Strassberg S.S., Cristea I.A., Qian D. and Parton L.A., Single nucleotide polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and the susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol.* 2007; 42: 29–36.

126. Tai AS, Peng CH et al. Decomposing the subclonal structure of tumors with two-way mixture models on copy number aberrations. *PLoS One*. 2018; 13(12): 1-25.

127. Thomas A.Q. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one large kindred. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2002; 165: 1322-1328.

128. Thomas NJ, Fan R, Diangelo S, Hess JC, Floros J. Haplotypes of the surfactant protein genes A and D as susceptibility factors for the development of respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr*. 2007; 96: 985-989.

129. Tian W, Chen X, Qin H, Wei Q, Zhang S, Tang S, Liao L, Zhang Y, Chen Y. The Haplotype TGGAG in the ABCA3 Gene Increases the Risk of Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants in Southern China. *Pediatr Neonatol*. 2016; 57(3): 188-94.

130. Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, Capon F, Ding J, Li Y, Tejasvi T, Gudjonsson JE, Kang HM, et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet*. 2012; 44: 1341–1348.

131. Usuda T., Kobayashi T., Sakakibara S., Kobayashi A., Kaneko T., Wada M., Onozuka J., Numata O., Torigoe K., Yamazaki H., Sato T., Nagayama Y., Uchiyama M. Interleukin-6 polymorphism and bronchopulmonary dysplasia risk in very low-birthweight infants. *Pediatr Int.* 2012; 54(4):471-475.

132. Voynow JA "New" bronchopulmonary dysplasia and chronic lung disease. *Pediatr Respir Rev.* 2017; 24: 17-18.

133. Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, et al. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics.* 2008; 97: 210–215.

134. Wawrusiewicz-Kurylonek N., Koper-Lenkiewicz OM. Et al. Association of PTPN22 polymorphism and its correlation with Graves' disease susceptibility in Polish adult population-A preliminary study. *Mol Genet Genomic Med*. 2019; 1-6.

135. Whitsett JA, Wert SE, Trapnell BC. Genetic disorders influencing lung formation and function at birth. *Hum Mol Genet*. 2004; 2: 207-15.

136. Xiaojuan Yin, Fanping Meng, Yan wang, Lu Xie, Xiangyong Kong, Zhichun Feng. Surfactant protein B deficiency and gene mutations for neonatal respiratory distress syndrome in China Han ethnic population. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2013; 6(2): 267-272.

137. XijuanWang, Wenbin Li, Wei Liu, Baohuan Cai, Tingting Cheng, Chunfang Gao, Luxia Mo, Hui Yang, Liwen Chang. GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms as major risk factors for bronchopulmonary dysplasia in a Chinese Han population. *Gene 533*. 2014: 48–51.

138. http://test.tapotili.ru/calculator_or.php

139. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/