

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.24110/0031-403X-2019-98-6-78-85
<https://doi.org/10.24110/0031-403X-2019-98-6-78-85>

В.К. Пожарищенская, И.В. Давыдова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков

КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» МЗ РФ, г. Москва, РФ



Наряду с такими общеизвестными факторами риска формирования бронхолегочной дисплазии (БЛД), как низкая масса тела при рождении, недоношенность, респираторный дистресс-синдром в неонатальном периоде, длительная кислородозависимость, существенную роль в развитии данного заболевания у детей играют генетические факторы. В частности, генетическая детерминация формирования БЛД возможна при наличии полиморфизмов генов протеолитических ферментов, цитокинового каскада, сурфактантов, антиоксидантов и др. Целью нашего исследования являлись выявление генетических факторов предрасположенности к формированию БЛД у недоношенных детей в РФ и сопоставление их с клинико-анамнестическими факторами риска формирования данного заболевания. Материалы и методы исследования: в исследование включены 200 недоношенных детей, рожденных до 37-й недели гестационного возраста. В основную группу вошли дети, сформировавшие БЛД (n=100), в группу контроля – не сформировавшие БЛД (n=100). Геномная ДНК была выделена из образцов сухих пятен крови методом фенол-хлороформной экстракции. Дальнейшее генотипирование проведено с использованием метода ПЦР в режиме реального времени на термоциклере «ABI StepOnePlus» («Applied Biosystems», США). Выявлены возможные ассоциации между частотами аллелей и генотипов вариантов генов *FGFR1* (rs376618, rs1966265), *FGFR2* (rs2981579, rs1219648), *SFTPA1* (rs4253527), *SFTPA2* (rs121917737, rs121917738), *SFTPB* (rs137853202), *SFTPC* (rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318, rs121917835, rs121917836, rs121918560), *MMP2* (rs7201, rs17301608, rs243865), *MMP9* (rs20544, rs3918242, rs17576), *MMP12* (rs2276109, rs652438), *MMP16* (rs2664352), *PTPN22* (rs2476601), *HLA-DRA* (rs9268645), *TAGAP* (rs1738074), *TYK2* (rs34536443, rs2304256), *LOC102823878* (rs 694739) и формированием БЛД. Результаты: варианты rs652438 и rs694739 были ассоциированы с формированием БЛД у недоношенных детей. Достоверно чаще в группе недоношенных детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой контроля встречался аллель С (p=0,02, ОШ 1,78 (95% ДИ 1,09–2,9)), генотипы СС (p=0,03, ОШ 3,2 (95% ДИ 0,84–12,18)) и ТС (p=0,03, ОШ 1,39 (95% ДИ 0,76–2,55)) варианта g.102736642T>C (rs652438) гена *MMP12* и аллель С (p=0,004, ОШ 1,8 (95% ДИ 1,21–2,67)), генотипы ТС (p=0,0004, ОШ 1,05 (95% ДИ 0,57–1,96)) и СС (p=0,0004, ОШ 3,02 (95% ДИ 1,32–6,91)) варианта rs 694739 гена *LOC102823878*. Заключение: в эру персонализированной терапии обнаружение полиморфизмов генов, ассоциированных с формированием БЛД, может помочь в развитии новых стратегий профилактики и лечения данного заболевания. Дальнейшие исследования вариантов генов необходимы для выявления генетической детерминации формирования БЛД у недоношенных детей.

Ключевые слова: бронхолегочная дисплазия, респираторный дистресс-синдром, недоношенные дети, генотипирование, полимеразная цепная реакция, полиморфизм генов-кандидатов.

Контактная информация:

Пожарищенская Валерия Константиновна – аспирант ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» МЗ РФ
Адрес: Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, 2, стр. 1
Тел.: (925) 855-34-56, E-mail: le16ra@mail.ru
Статья поступила 2.04.19, принята к печати 20.11.19.

Contact Information:

Pozharischenskaya Valeria Konstantinovna – post-graduate student of the National Medical Research Center of Children's Health
Address: Russia, 119991, Moscow, Lomonosovskiy prospect, 2/1
Tel.: (925) 855-34-56, E-mail: le16ra@mail.ru
Received on Apr. 2, 2019, submitted for publication on Nov. 20, 2019

V.K. Pozharishchenckaya, I.V. Davydova, K.V. Savostyanov, A.A. Pushkov

CLINICAL ANAMNESTIC AND MOLECULAR GENETIC RISK FACTORS FOR THE FORMATION OF BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA IN PREMATURE INFANTS

National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russia

Along with such well-known risk factors for the formation of bronchopulmonary dysplasia (BPD), such as low birth weight, prematurity, respiratory distress syndrome in the neonatal period, prolonged oxygen dependence, genetic factors play a significant role in the development of this disease in children. In particular, genetic determination of BPD formation is possible in the presence of polymorphisms of proteolytic enzyme genes, cytokine cascade, surfactants, antioxidants, etc. Objective of the research: to identify genetic factors predisposing to BPD formation in premature infants in the Russian Federation and to compare them with clinical and anamnestic risk factors for the formation of this disease. Materials and methods: the study included 200 premature infants born before the 37th week of gestational age. The main group included children with BPD (n=100), the control group – without BPD (n=100). Genomic DNA was extracted from dried blood samples by phenol-chloroform extraction. Further genotyping was performed using real-time PCR on ABI StepOnePlus thermal cycler (Applied Biosystems, USA). The study identified possible associations between frequencies of alleles and genotypes of gene variants *FGFR4* (rs376618, rs1966265), *FGFR2* (rs2981579, rs1219648), *SFTPA1* (rs4253527), *SFTPA2* (rs121917737, rs121917738), *SFTPB* (rs137853202), *SFTPC* (rs121918559, rs121918560, rs121917834, rs34957318, rs121917835, rs121917836, rs121918560), *MMP2* (rs7201, rs17301608, rs243865), *MMP9* (rs20544, rs3918242, rs17576), *MMP12* (rs2276109, rs652438,), *MMP16* (rs2664352), *PTPN22* (rs2476601), *HLA-DRA* (rs9268645), *TAGAP* (rs1738074), *TYK2* (rs34536443, rs2304256), *LOC102823878* (rs 694739) and BPD formation. Results: rs652438 and rs694739 variants were associated with BPD formation in premature infants. Significantly more often in the group of premature infants with BPD, compared with the control group, the C allele (p=0,02, OR 1,78 (95% CI 1,09–2,9)), CC genotypes (p=0,03, OR 3,2 (95% CI 0,84–12,18)) and TC (p=0,03, OR 1,39 (95% CI 0,76–2,55)) variant g.102736642T>C (rs652438) of the *MMP12* gene and the C allele (p=0,004, OR 1,8 (95% CI 1,21–2,67)), TC genotypes (p=0,0004, OR 1,05 (95% CI 0,57–1,96)) and CC (p=0,0004, OR 3,02 (95% CI 1,32–6,91)) of the rs 694739 variant of the *LOC102823878* gene. Conclusion: in the era of personified therapy, the detection of gene polymorphisms associated with BPD formation can help develop new strategies for the prevention and treatment of this disease. Further studies of gene variants are necessary to identify the genetic determination of BPD formation in premature infants.

Keywords: bronchopulmonary dysplasia, respiratory distress syndrome, premature infants, genotyping, polymerase chain reaction, candidate gene polymorphism.

Quote: V.K. Pozharishchenckaya, I.V. Davydova, K.V. Savostyanov, A.A. Pushkov. Clinical anamnestic and molecular genetic risk factors for the formation of bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *Pediatr.* 2019; 98 (6): 78–85.

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 [1, 2].

Однако не все недоношенные дети, имеющие факторы риска развития БЛД, формируют данное заболевание. Известно, что важным моментом в профилактике развития БЛД является грамотная стратегия респираторной поддержки недоношенного ребенка с РДС в неонатальном периоде, позволяющая предотвратить развитие данного заболевания. Тем не менее наличие значимой доли недоношенных детей с диагнозом БЛД в исходе РДС, даже при условии проведения им адекватной респираторной поддержки в пер-

вые недели жизни, свидетельствует о наличии иных факторов, определяющих возможность хронизации бронхолегочного процесса у данной категории больных. Вопрос существования определенной генетической предрасположенности детей к тяжелому течению РДС с последующим формированием БЛД в последнее время изучается во всем мире [3–7]. В отечественной литературе доступны результаты единичных исследований по изучению ассоциации генов-кандидатов с развитием БЛД у недоношенных детей [4, 5].

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. Целью нашего исследования явились выявление генетических факторов предрасположенности к формированию БЛД у недоношенных детей и сопоставление их с клинико-анамнестическими факторами риска развития данного заболевания.

В мировой научной литературе последних лет достаточно много работ посвящено выявлению генетических предикторов формирования БЛД. Активно исследуется ассоциация генов-кандидатов, которые могут быть вовлечены в развитие БЛД на уровне различных систем организма – иммунной, антиоксидантной, сосудистой системы легких, протеолитических ферментов, а также системы продукции белков сурфактанта [6, 7].

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 лечения таких больных. Учитывая это, работы, направленные на выявление полиморфно-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.

Важную роль в патогенезе БЛД играет оксидативный стресс, характеризующийся предварительной экскрецией окислительных и антиокислительных протеаз. Установлено, что матриксные металлопротеиназы (ММП) играют ключевую роль в ряде физиологических и патологических процессов, включая эмбриогенез, заживление ран, воспаление, сердечно-сосудистые болезни, болезни легких и рак [8, 22]. ММП способны денатурировать фибриллярные коллагены и активировать развитие фиброза.

Активность ММП контролируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ [9]. Имеются данные об активном участии ММП в развитии процессов деструкции внеклеточного матрикса, клеток альвеолярного эпителия и эндотелия капилляров, развития инициального септального фиброза [10]. В мировой литературе существуют данные об ассоциациях однонуклеотидных вариантов генов, кодирующих различные ММП, с развитием РДС у недоношенных детей [11]. ММП являются цинк-зависимыми протеолитическими ферментами, расщепляющими все формы компонентов внеклеточного матрикса [11]. 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 [12], ММП-9 [13] и ММП-16 [14]. Альвеоляризация требует координации ремоделирования внеклеточного матрикса с морфогенезом эпителия и ростом капилляров под контролем ММП [11]. ММП-14 играет главную роль в альвеоляризации. 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 [13]. 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 ММП-16 в трахее и предотвращают формирование БЛД [13]. 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* (с.-1306 С/Т) модулирует активность промотора *MMP-2* и имеет функциональное значение [15]. Кроме того, было показано, что гаплотип четырех однонуклеотидных вариантов гена *MMP-14* (с.-130Т/ с.256Т/с.6762С/с.7131С) был связан с хронической обструктивной болезнью легких [16]. Выявлено, что генотип ТТ однонуклеотидного варианта rs2664352С>Т и генотип GG однонуклеотидного варианта rs2664349А>G в гене *MMP-16* ассоциированы со значительно более низким риском развития БЛД [13]. Частота аллеля Т однонуклеотидного варианта rs2664352С>Т была выше у детей, не сформировавших БЛД, по сравнению с группой детей, сформировавших БЛД ($p=0,01$). Аналогично, частота аллеля G однонуклеотидного варианта rs2664349А>G была значительно выше у детей, не сформировавших БЛД, чем у детей, сформировавших данное заболевание ($p<0,03$) [13].

Одним из важных звеньев в патогенезе БЛД является несовершенство сурфактантной систе-

мы новорожденного ребенка, связанное с недоношенностью, морфофункциональной незрелостью или внутриутробным инфицированием. Особая роль в реализации РДС у недоношенных новорожденных принадлежит сурфактантам, основной функцией которых являются снижение поверхностного натяжения альвеолярной стенки и препятствие спадению альвеол на выдохе, что обеспечивает нормальный газообмен. В настоящее время особое внимание уделяется изучению генетических аспектов синтеза различных типов сурфактантов (А, В, С, D), а также их транспортных белков [17, 22].

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 [18]. Известно, что успешная защита от патогенов осуществляется за счет распознавания микроорганизмов системой врожденного иммунитета [19]. Однако достоверных ассоциаций полиморфизмов генов цитокинов и компонентов врожденного иммунитета с риском формирования БЛД до настоящего времени выявлено не было. Научный поиск в этом направлении продолжается.

Целью настоящей работы являлось выявление генетических факторов предрасположенности к формированию БЛД у недоношенных детей и сопоставление их с клинико-anamnestическими факторами риска формирования данного заболевания.

Материалы и методы исследования

Нами проведен анализ анамнестических и клинических данных наблюдаемых больных и ретроспективный анализ медицинской документации (историй болезни). Проведены сбор и анализ демографических данных (пол, возраст), анамнеза ребенка (гестационный возраст, масса тела, длина и оценка по шкале APGAR при рождении, длительность и режимы искусственной вентиляции легких (ИВЛ), длительность кислородозависимости, сопутствующая патология, семейный анамнез; анамнез настоящей болезни).

Выборка репрезентативна, соответствует признакам генеральной совокупности. Исследование одномоментное (поперечное), случай-контроль. Размер выборки предварительно не рассчитывали.

Настоящее исследование проводили в течение 2014–2019 гг. на базе ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» МЗ РФ (Москва) в отделении восстановительного лечения детей раннего возраста с перинатальной патологией и лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики. Для

решения поставленной задачи было проведено исследование, одобренное этическим комитетом ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» МЗ РФ.

Все дети, включенные в исследование (n=200), рождены преждевременно (до 37-й недели гестации включительно) и получали респираторную поддержку в неонатальном периоде в связи с РДС новорожденных. Дети были разделены на 2 группы:

- критерием включения пациентов в 1-ю группу (основная группа – дети, сформировавшие БЛД) являлось формирование БЛД к 28-му дню жизни;

- критерием включения пациентов во 2-ю группу (группа контроля – дети, не сформировавшие БЛД) являлось отсутствие кислородозависимости и клинико-рентгенологических признаков формирования БЛД к 28-му дню жизни.

Критерии включения в исследование:

- 1) гестационный возраст при рождении менее 37 недель;

- 2) возраст ребенка на момент сбора данных не более 1 года;

- 3) недоношенные дети, получавшие респираторную поддержку в неонатальном периоде, сформировавшие и не сформировавшие БЛД.

Критерии исключения из исследования:

- 1) доношенные дети;

- 2) синдромальные состояния;

- 3) дети с врожденными пороками легких, муковисцидозом, врожденным стридором.

Всем детям (n=200) был осуществлен забор капиллярной крови на фильтровальную бумагу Whatmann 903. Молекулярно-генетические исследования проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Геномная ДНК была выделена из образцов сухих пятен крови или буккального эпителия методом фенол-хлороформной экстракции [20].

Качество и количество выделенной геномной ДНК оценивали при помощи спектрофотомера NanoVue (GE Healthcare), а также флуориметрически с использованием флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen).

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. Таq 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. В зондах использовали флуоресцентные красители – FAM (карбоксивлуоресцеин) и HEX (гексахлорофлуоресцеин), а также тушитель флуоресценции – BHQ-1. Обозначения полиморфных маркеров соответствуют принятым в базе данных dbSNP [17].

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

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

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

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

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

Анализ полученных генетических данных выполнен с помощью критерия Пирсона хи-квадрат с использованием он-лайн калькулятора (http://genexp.ru/calculator_or.php). Для анализа статистических данных применяли пакет StatSoft STATISTICA, версия 6.0. распределение частот генотипов всех исследуемых вариантов в обеих группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Результаты и их обсуждение

Показано, что в обеих группах преобладали мальчики (55 в 1-й группе и 59 во 2-й). Однако достоверных различий по гендерному признаку между детьми, сформировавшимися (мальчиков – 55, девочек – 45) и не сформировавшимися БЛД (мальчиков – 59, девочек – 41), не выявлено.

При статистической обработке данных была выявлена значимая разница среднего гестационного возраста при рождении в двух группах (28,6±0,6 нед в группе детей с БЛД, 31,9±0,5 нед в группе детей без БЛД, $p<0,05$), с преобладанием глубоко недоношенных детей в группе пациентов, сформировавших БЛД.

Также в группе детей с БЛД верифицированы меньшие значения таких антропометрических показателей, как длина тела (36,1±1,1 см в 1-й группе и 41,1±1 см во 2-й, $p<0,05$) и масса тела при рождении (1184,5±94,8 г в 1-й группе

и 1724,7±118,3 г во 2-й группе, $p<0,05$), что напрямую связано с меньшим средним гестационным возрастом недоношенных в этой группе. Существует статистически значимое различие средних значений оценки по шкале APGAR на 1-й (4,75±0,35 баллов в 1-й группе и 5,99±0,26 баллов во 2-й, $p<0,05$) и на 5-й (6,05±0,24 баллов в 1-й группе и 7,08±0,18 баллов во 2-й группе, $p<0,05$) минутах жизни для групп детей с БЛД и без БЛД. Тяжелая гипоксия на 1-й 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-й минуте после рождения ($n=23$) преобладали дети 1-й группы (78% от числа детей с тяжелой гипоксией). В общей когорте недоношенных ($n=200$) преобладали дети с умеренной степенью гипоксии (4–6 баллов), которая была верифицирована у 66% от общего числа недоношенных детей, преимущественно детей 1-й группы (77% от числа детей с умеренной степенью гипоксии). К 5-й минуте после рождения лишь 16% от общего числа недоношенных детей имели оценку по шкале APGAR 5 баллов и ниже, а в 84% случаев от общего числа недоношенных данная оценка составила 6 баллов и более.

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

В респираторной поддержке нуждались все дети, вошедшие в исследование ($n=200$) (рис. 2). Щадящая респираторная поддержка путем поддержания постоянного положительного давления в дыхательных путях методом СРАР 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 СРАР. Респираторная поддержка методом Biphasic была проведена 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 1-й группе пациентов и 4,4 суток жизни – во 2-й группе. Длительность традиционной ИВЛ от 1 до 14 суток жизни отмечалась у 38 детей 1-й группы (41% от числа детей, сформировавших БЛД, получивших респираторную поддержку методом традиционной ИВЛ) и у 57 детей 2-й группы (100% от числа детей, не сформировавших БЛД, получавших респираторную поддержку методом традиционной ИВЛ).

Из всех детей ($n=200$) дополнительную оксигенацию длительностью более 28 суток жизни получили дети, сформировавшие впоследствии БЛД ($n=100$). Среднее значение вышеуказанного показателя достоверно ниже в группе пациентов, не сформировавших БЛД (11,8 суток), по сравнению с аналогичным показателем в группе недоношенных детей, сформировавших БЛД (50,3 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-й и 5-й минутах жизни. Данные представлены на рис. 3.

Отмечается обратная зависимость между массой, длиной тела и гестационным возрастом детей при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах жизни и формированием заболевания. Также выявлена прямая корреляция между длительностью кислородозависимости и формированием БЛД у недоношенных детей.

Проведенный статистический анализ с использованием критерия Манна–Уитни также выявил достоверно большие средние показатели гестационного возраста, массы тела при рождении, оценки по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах жизни и меньшую длительность кислородозависимости в группе детей, не сформировавших БЛД, по сравнению с пациентами, сформировавшими данную патологию ($p<0,05$).

БЛД у недоношенных детей имеет сложные патогенетические механизмы. В нашем исследовании было подтверждено влияние 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

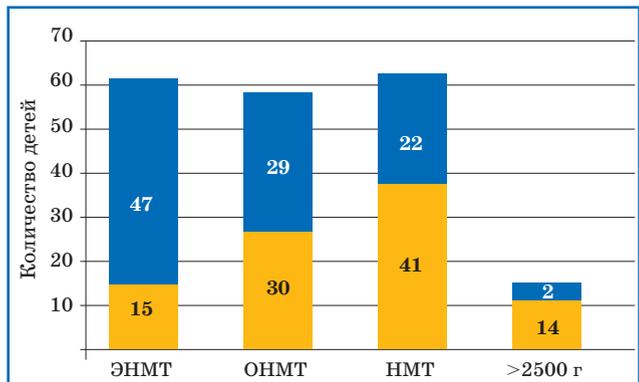


Рис. 1. Распределение недоношенных детей по массе тела при рождении в исследуемых группах. Здесь и на рис. 2: ■ – 1-я группа (с БЛД), ■ – 2-я группа (без БЛД).

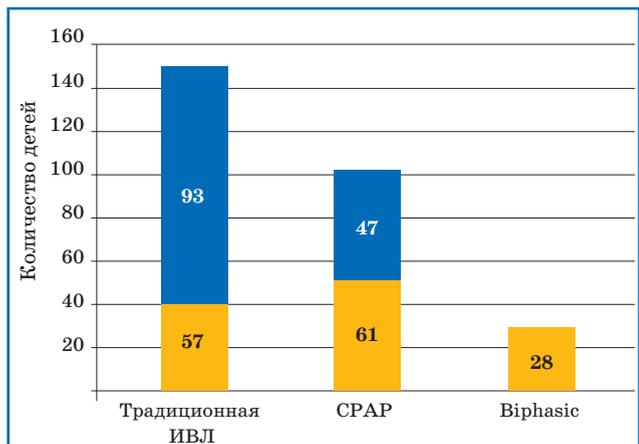


Рис. 2. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по методам респираторной поддержки.

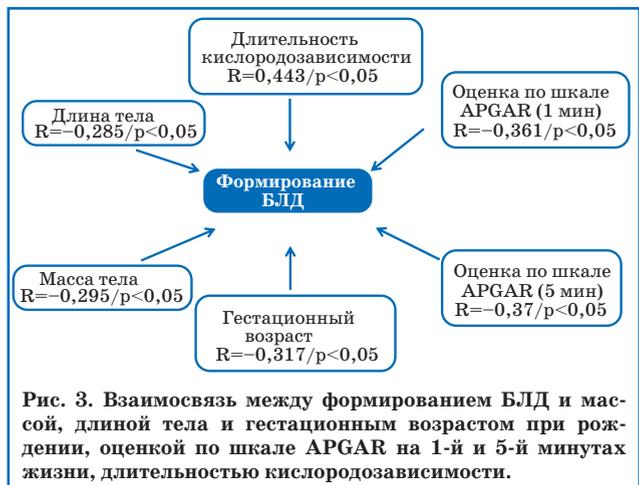


Рис. 3. Взаимосвязь между формированием БЛД и массой, длиной тела и гестационным возрастом при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах жизни, длительностью кислородозависимости.

возможно как формирование БЛД, так и благоприятное разрешение РДС без формирования данного заболевания. Изучение возможности генетической детерминации формирования БЛД является актуальным на современном этапе исследования проблемы.

В нашем исследовании было показано, что в группе недоношенных детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой контроля встречался аллель С ($p=0,02$, ОШ 1,78 (95% ДИ 1,09–2,9), генотипы СС ($p=0,03$, ОШ 3,20 (95%

Распределение генотипов СС+ТС и ТТ варианта *g.102736642Т>С (rs652438)* гена *MMP12* среди недоношенных детей, имеющих клиничко-анамнестические факторы риска формирования БЛД

Группы пациентов	Число детей с наличием клиничко-анамнестических факторов риска и генотипов ТС+СС	Число детей с наличием клиничко-анамнестических факторов риска без генотипов ТС+СС	χ^2	р	OR	
					значение	95% CI
1-я	43	57	11,215	<0,001	3,018	1,607–5,665
2-я	20	80				

Таблица 2

Распределение генотипов СС+ТС и ТТ варианта *rs694739* гена *LOC102823878* среди недоношенных детей, имеющих клиничко-анамнестические факторы риска формирования БЛД

Группы пациентов	Число детей с наличием клиничко-анамнестических факторов риска и генотипов ТС+СС	Число детей с наличием клиничко-анамнестических факторов риска без генотипов ТС+СС	χ^2	р	OR	
					значение	95% CI
1-я	96	4	10,653	0,002	6,0	1,970–18,275
2-я	80	20				

ДИ 0,84–12,18) и ТС ($p=0,03$, ОШ 1,39 (95% ДИ 0,76–2,55) варианта *g.102736642Т>С (rs652438)* гена *MMP-12* и аллель С ($p=0,004$, ОШ 1,8 (95% ДИ 1,21–2,67), генотипы СС ($p=0,0004$, ОШ 3,02 (95% ДИ 1,32–6,91) и ТС ($p=0,0004$, ОШ 1,05 (95% ДИ 0,57–1,96) варианта *rs 694739* гена *LOC102723878*).

Дети с клиничко-анамнестическими факторами риска развития БЛД (гестационный возраст при рождении до 36 недель, масса тела при рождении до 2500 г, низкие оценки по шкале АРГАР на 1-й и 5-й минутах жизни, длительная кислородная поддержка), имеющие генотипы СС и ТС варианта *g.102736642Т>С (rs652438)* гена *MMP12* и генотипы СС и ТС варианта *rs 694739* гена *LOC102723878*, чаще формируют данное заболевание, в сравнении с детьми, имеющими только клиничко-анамнестические факторы риска. Данные представлены в табл. 1 и 2.

В нашем исследовании показана возможность влияния генотипов ТС+СС варианта *g.102736642Т>С (rs652438)* гена *MMP12* и варианта *rs 694739* гена *LOC102723878* на возможность формирования БЛД недоношенных детей. Получены данные о взаимосвязи генотипов ТС+СС варианта *g.102736642Т>С (rs652438)*, расположенного в гене *MMP12*, со следующими клиничко-анамнестическими характеристиками недоношенных детей: длительность кислородозависимости, оценка по шкале АРГАР на 1-й и 5-й минутах жизни. Выявлена взаимосвязь генотипов ТС+СС варианта *rs 694739* гена *LOC102723878* со следующими клиничко-анамнестическими характеристиками недоношенных детей: длительность кислородозависимости, гестационный возраст и масса тела при рождении, оценка по шкале АРГАР на 1-й и 5-й минутах жизни.

Дети из группы сформировавшихся БЛД имеют более низкие показатели массы тела и гестационного возраста при рождении, что может быть обусловлено влиянием варианта *g.102736642Т>С (rs652438)* гена *MMP12* и варианта *rs 694739* гена *LOC102723878*. Нами показано, 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 АРГАР на 1-й и 5-й минутах жизни. В связи с внутриутробными нарушениями формирования легочной ткани, вызванными влиянием генотипов ТС+СС *g.102736642Т>С (rs652438)* гена *MMP12*, и нарушениями формирования иммунного ответа, вызванными влиянием генотипов ТС+СС *rs 694739* гена *LOC102723878*, ранним сроком гестации при рождении у этих пациентов в раннем неонатальном периоде развивается РДС, что требует проведения кислородной поддержки. У новорожденных с генотипами ТС+СС *g.102736642Т>С (rs652438)* гена *MMP12* и варианта *rs 694739* гена *LOC102723878*, развивших РДС, отмечается увеличение длительности кислородозависимости, что в последующем может предопределять формирование 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)*, и генов, кодирующих белки, влияющие на формирование иммунного ответа *PTPN22 (rs2476601)*, *HLA-DRA (rs9268645)*, *TAGAP (rs1738074)*, *TYK2 (rs34536443)*,

rs2304256) с развитием БЛД в нашем исследовании обнаружено не было.

Заключение

БЛД у недоношенных детей имеет сложный патогенез. В исследовании показана возможность влияния генетических факторов на возможность формирования 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 БЛД 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.

Источник финансирования: не указан.

Конфликт интересов: авторы статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования и конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

Pozharishchenskaya V.K.  0000-0002-1237-5104

Davydova I.V.  0000-0002-7780-6737

Savostyanov K.V.  0000-0003-4885-4171

Pushkov A.A.  0000-0001-6648-2063

Литература

1. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Давыдова И.В. Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии. Руководство для практических врачей. М.: ПедиатрЪ, 2013: 18–31.
2. Овсянников Д.Ю., Давыдова И.В. Бронхолегочная дисплазия: вопросы терминологии и классификации. Российский педиатрический журнал. 2018; 2: 18–22.
3. Беляева И.А., Давыдова И.В. Роль генетических факторов в формировании бронхолегочной дисплазии у детей. Вопросы диагностики в педиатрии. 2012; 4 (5): 5–9.
4. Павлинова Е.Б. Обоснование системы этапной профилактики и прогнозирования БЛД у недоношенных детей: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М., 2012: 29.
5. Панченко А.С. Патогенетическая характеристика и прогнозирование формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Иркутск, 2015: 24.
6. Bhandari V, Gruen JR, Jang KL, Göpel W, Hallman M, Lavoie PM. Genetics of bronchopulmonary dysplasia: When things do not match up, it is only the beginning. J. Pediatr. 2019 May; 208: 298–299.
7. Kun-Hsing Yu, Jingting Li, Michael Snuder, Gary M Shaw, Hugh MO Brodovich. The genetic predisposition to bronchopulmonary dysplasia. Curr. Opin. Pediatr. 2016; 28 (3): 318–323.
8. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol. Cell Biochem. 2003; 253: 269–285.
9. Давыдова И.В. Формирование, течение и исходы бронхолегочной дисплазии у детей: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2010: 48.
10. Басаргина М.А. Значение матриксных металлопротеиназ в формировании и течении бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2009: 23.
11. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. Physiological Reviews. 2007; 87 (1): 69–98.
12. Kheradmand F, Rishi K, 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.
13. Harijith A, Choo-Wing R, Cataltepeetal S. A role for matrix metalloproteinase 9 in IFN γ -mediated injury in developing lungs: relevance to bronchopulmonary dysplasia. The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2011; 44 (5): 621–630.
14. Hadchouel A, Decobert F, Franco-Montoya M, Halphen I, Pierre-Henri J, Boucherat O, Martin E, Benachi A, Amselem S, Bourbon J, Danan C, Delacourt C. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia: identification of MMP16 as a new player in lung development. PLoS ONE. 2008; 3 (9): 3188.
15. 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.
16. Saitoh W, Sakamoto T, Hegab AE, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Kai S, Iisuka T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. MMP14 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. Int. J. Mol. Med. 2006; 17: 621–626.
17. 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.
18. Lin HC, Tsai FJ, Tsai CH, Hsieh YY, Hsu CM. Cytokine polymorphisms and chronic lung disease in small preterm infants. Arch. Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2005; 90: 93–94.
19. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противои инфекционный. М.: Практическая медицина, 2008: 255.
20. Green R, Sambrook J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. Cold Spring Harb Protoc, 2017.
21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (дата обращения 20.08.2019)
22. Беляшова М.А., Овсянников Д.Ю., Огородова Л.М. Молекулярно-генетические механизмы развития бронхолегочной дисплазии. Неонатология: новости, мнения, обучение. 2015; 3: 50–68.