

*На правах рукописи*

**Бондарь Валерия Александровна**

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

14.01.08 – Педиатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук

**Давыдова Ирина Владимировна**

**Научный консультант:**

Доктор биологических наук

**Савостьянов Кирилл Викторович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, заведующий кафедрой педиатрии медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

**Овсянников Дмитрий Юрьевич**

доктор медицинских наук, профессор кафедры педиатрии и неонатологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Брыксина Евгения Юрьевна**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» «\_\_\_\_\_» 2022 года в «\_\_\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 001.023.01 при ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по адресу: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2 стр.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по адресу: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2 стр.1 и на сайте <http://www.nczd.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» «\_\_\_\_\_» 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор РАН

**Винярская Ирина Валериевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) — это хроническое интерстициальное заболевание легких, развивающееся у недоношенных детей в исходе респираторного дистресс-синдрома новорожденных, диагностируемое на основании кислородозависимости в возрасте 28 суток жизни и/или 36 недель постконцептуального возраста. БЛД является причиной многих осложнений: острой и хронической дыхательной недостаточности, белково-энергетической недостаточности, легочной гипертензии и легочного сердца. По мере роста ребёнка характерен регресс клинических проявлений заболевания, несмотря на продолжающуюся персистенцию морфологических изменений лёгочной ткани и нарушений дыхательной функции (Овсянников Д.Ю. и др., 2020). За последние 25 лет внедрение современных методов интенсивной терапии недоношенных детей и таких методов лечения, как пренатальная стероидная терапия и интратрахеальное введение препаратов сурфактанта, значительно снизило заболеваемость и смертность от респираторного дистресс-синдрома новорожденных (РДСН), и, как следствие, увеличилась частота развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей (Bancalari et al., 2012). Оптимизация протоколов неонатальной реанимации, антенатальная стероидная поддержка беременных, позволили сохранять жизнь глубоко недоношенным детям. Как следствие, постепенно менялся и патогенез БЛД. Требовались новые подходы к диагностике и лечению таких пациентов, поэтому в 2011 году Alan H Jobe ввел понятие «новая» бронхолегочная дисплазия (Jobe et al., 2011).

Новая форма данной патологии является результатом незавершенного альвеологенеза и ангиогенеза сосудов малого круга кровообращения (Principi et al., 2018; Coalson et al., 2003). Факторами, нарушающими рост и развитие альвеол, являются высокие концентрации кислорода во вдыхаемой смеси (приводящие к повреждению реснитчатого эпителия дыхательных путей, воспалительному процессу слизистой оболочки, нарушению дренажной функции); волюмо- и баротравма; инфекционные заболевания, запускающие воспалительный ответ; недостаточная нутритивная поддержка и др. (Овсянников Д.Ю. и др., 2020).

Новая форма бронхолегочной дисплазии является многофакторной патологией. В развитии БЛД оказывают влияние эндогенные и экзогенные, модифицируемые и немодифицируемые факторы риска. Генетическая предрасположенность относится к эндогенным немодифицируемым факторам (Клинические рекомендации «Бронхолегочная дисплазия», Союз Педиатров России, 2016). С точки зрения молекулярной генетики, бронхолегочная дисплазия относится к заболеваниям, в патогенезе которых определяется сложное взаимодействие, как генетических факторов, так и факторов внешней среды. Наследственные основы формирования БЛД активно изучаются с 90-х годов XX века, однако полученные результаты в настоящее время не позволяют однозначно выделить ведущую роль какого-либо из исследованных генов в развитии патологии (Беляшова М. А. и др., 2015).

Поиск генов-кандидатов развития бронхолегочной дисплазии ведется на протяжении последних десятилетий. Технология секвенирования нового поколения (next generation sequencing (NGS)) используется относительно недавно, и результаты проведенных исследований зачастую не имеют достаточной статистической мощности в связи с небольшим размером выборки (Carrera et al., 2015).

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

### **Степень разработанности темы**

Количество исследований на тему прогнозирования формирования бронхолегочной дисплазии, представленных в отечественной и зарубежной литературе, возрастает по мере увеличения количества недоношенных новорожденных и, соответственно, заболеваемости БЛД. Несмотря на то, что клиника и терапевтические подходы тщательно изучены, генетическая основа остается в значительной степени неясна (Hadchouel et al., 2020; Li et al., 2015; Shaw et al., 2013).

Полигенная природа заболевания доказана относительно недавно, а исследования, основанные на массовом параллельном секвенировании полного экзона, единичны. В настоящий момент выявлено более 258 генов-кандидатов бронхолегочной дисплазии. Согласно нескольким исследованиям, большинство обнаруженных генов ответственны за организацию фибрилл коллагена (Li et al., 2015; Sweet et al., 2001). Помимо этого, выявленные гены-кандидаты были связаны с морфогенезом эмбрионального эпителия, регуляцией сигнального пути Wnt, организацией внеклеточного матрикса и др. (Li et al., 2015).

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

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

1. Проанализировать динамику соотношения больных с классической и новой формами бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей за 10-летний период по данным ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.
2. Провести клинико-anamnestическую оценку групп недоношенных детей с диагностированным ранее респираторным дистресс-синдромом новорожденных, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию, и создать современную клиническую модель пациента с новой формой бронхолегочной дисплазии.
3. Провести секвенирование полного экзона с последующим выявлением диагностически значимых генетических вариантов у пациентов с новой формой бронхолегочной дисплазии.
4. Проанализировать зависимость развития новой формы бронхолегочной дисплазии от выявленных генетических вариантов.
5. Создать шкалу балльной оценки прогнозирования развития бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей.

### **Научная новизна**

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

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

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

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

### **Теоретическая и практическая значимость**

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

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

### **Внедрение результатов работы в практику**

Результаты работы и рекомендации внедрены в клиническую практику отделения патологии новорожденных детей ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и отделения патологии новорожденных ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского».

### **Методология и методы исследования**

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

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

Накопление данных, их корректировка и систематизация с последующей визуализацией полученных результатов формировалась с использованием программ Microsoft Excel 2019 и STATISTICA 10 (разработчик - StatSoft.Inc). Для проверки характера распределения использовали непараметрический тест Колмогорова-Смирнова. Анализ статистической значимости различий количественных признаков для двух независимых групп применялся U-критерий Манна-Уиттни, критерии рангов Вилкоксона. Для выявления силы и направления корреляционной взаимосвязи двух признаков применялся непараметрический коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ). В исследованиях случай-контроль относительный риск развития заболевания оценивался с помощью показателя отношения шансов (ОШ).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. За прошедший 10-летний период (с 2012 по 2021 гг.) отмечается увеличение частоты развития новой формы бронхолегочной дисплазии по сравнению с классической формой. С 2020 по 2021 гг. у всех пациентов, госпитализированных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, диагностирована новая форма заболевания.
2. Современная модель пациента с новой формой бронхолегочной дисплазии представляет собой недоношенного ребенка с респираторным дистресс-синдромом новорожденных, с гестационным возрастом до 28 недель и экстремально низкой массой тела при рождении, оцененного по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах от 4 до 6 баллов, нуждающегося во введении препаратов сурфактанта и длительной респираторной поддержке с применением традиционной ИВЛ, СРАР (Biphasic) и дополнительной оксигенацией в постнеонатальном периоде.

3. Наличие генетического варианта rs12489516 в гене *CPAZ* позволяет предположить, что недоношенный ребёнок не будет кислородозависим в возрасте после 28 суток жизни и/или 36 недель постконцептуального возраста.

4. Наличие генетического варианта rs45488997 в гене *CTGF* является фактором, предрасполагающим к развитию новой формы БЛД у недоношенных детей в неонатальном периоде.

### **Степень достоверности результатов исследования**

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

### **Апробация результатов**

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

### **Публикации**

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

### **Личный вклад автора**

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

Также автором выполнена статистическая обработка полученных данных и анализ результатов, на основании которого были сформулированы основные положения исследования, выводы, практические рекомендации и подготовлены публикации.

### **Объем и структура диссертации**

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

### **Этическая экспертиза**

Исследование было одобрено на совместном заседании ученого совета и этического комитета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, протокол №12 от 16.10.2020 г.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

### Объем, методы и дизайн исследования

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

На втором этапе проанализировано 259 историй болезни пациентов с новой формой БЛД, и проведено проспективное наблюдение за 100 недоношенными детьми первого полугодия жизни, которые вошли в исследование. В группу сравнения вошли 70 пациентов с РДСН в анамнезе, не сформировавших БЛД. Всего проанализировано 929 историй болезни пациентов с РДСН в анамнезе за 10-летний период (2012-2021 гг.).

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

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

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

На пятом этапе мы сопоставили клиничко-анамнестические и молекулярно-генетические предикторы развития новой формы БЛД и разработали шкалу прогнозирования развития заболевания у недоношенных детей. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

### Критерии включения в исследование:

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

### Критерии исключения из исследования:

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



Рисунок 1. Дизайн исследования



**Для решения поставленных в работе задач были использованы следующие методы:**

1. Анализ динамики соотношения больных с классической и новой формами бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей за 10-летний период по данным отделения патологии новорожденных детей ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России
2. Клинико-лабораторное обследование детей согласно протоколу ведения пациентов с БЛД
3. Сбор и анализ анамнестических и клинических данных пациентов
4. Выделение ДНК с помощью экстракции фенол-хлороформом из клеток буккального эпителия и из пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге
5. Массовое параллельное секвенирование полного экзона
6. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
7. Статистический анализ полученных данных

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

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

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

Выделение ДНК было проведено методом экстракции фенол-хлороформом из образцов буккального соскоба или сухих пятен крови. Для этого к образцу материала, добавляли 300 мкл буферного раствора (10 мМ TrisHCl (pH = 8,0), 0,32 М сахароза, 10 мМ ЭДТА, 0,1М NaCl, 0,1%-ный тритон X-100), добавляли ДТТ, ДСН и фермент протеиназу-К в конечной концентрации 0,2%. Затем инкубировали либо при 37°C в течение ночи, либо 2 ч при температуре 60°C. Экстракцию ДНК проводили путём последовательной обработки фенолом, затем смесью фенол/хлороформ (1:1) и хлороформом (дважды на каждой стадии). Перенесённые образцы промыли двумя объёмами охлаждённого 96%-го этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия с последующей инкубацией при температуре -70°C. Полученный осадок ДНК промывали 80%-м этанолом, высушить на воздухе до полного испарения спирта, и растворяли в 30 или 50 мкл бидистиллированной воды. Препараты ДНК хранили при -70°C. 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).

#### **Массовое параллельное секвенирование полного экзона**

Для поиска редких нуклеотидных вариантов всем пациентам было проведено массовое параллельное секвенирование полного экзона с последующим биоинформатическим анализом. Для этого дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) из клеток буккального эпителия была выделена с помощью фенол-хлороформной экстракции. Для создания библиотек и обогащения целевыми

регионами (экзом) использовали набор реактивов Ion AmpliSeq Library Kit и панель Ion AmpliSeq Exome. При помощи пакета программ Torrent Suite, полученные прочтения триммировали, картировали на геном (hg19), проводили поиск генетических вариантов и их аннотацию.

Поиск новых генов, потенциально вовлеченных в патогенез БЛД, проводился по следующему алгоритму: все генетические варианты фильтровали по качеству и глубине чтения ( $QD > 3$ ), частоте минорного аллеля в популяции ( $MAF < 0.01$  по GnomAd (Genome Aggregation Database) 2.1), эффекту на белок (Moderate или High по SnpEff (Cicha et al., 2008) и Deleterious по PolyPhen (Adzhubei et al., 2010) или Sift (Ng et al., 2003)). Затем выбирали те гены, в которых было как минимум 2 подобных варианта, которые встречались более чем в 2-х аллелях среди всей основной выборки. Полученный список генов использовался как test list в программе Toprgene (Chen et al., 2009) – алгоритме предсказания возможных связей между генами, основанному на анализе их функций. В качестве обучающего списка генов были использованы гены, связь которых с БЛД была показана ранее (Басаргина М.А. и др., 2021; Беляшова М.А. и др., 2015; Пожарищенская В.К. и др., 2019; Atiakshin et al., 2022; De Paepe et al., 2008; Malash et al., 2016; McEvoy et al., 2014; Mohamed et al., 2011; Sampath et al., 2012; Thébaud et al., 2019).

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

#### **Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени**

Аmplификацию участков исследуемых генов проводили с использованием метода ПЦР в режиме реального времени на термоциклере “ABI StepOnePlus” («Applied 47 Biosystems», США) в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ буфер Трис-НСl, рН 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 ДНКполимеразы («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. Используемые флуоресцентные красители в зондах – FAM (карбоксифлуоресцеин) и HEX (гексахлорофлуоресцеин), а также тушитель флуоресценции – BHQ-1. Обозначения полиморфных маркеров соответствуют принятым в базе данных dbSNP. Последовательности праймеров и Taqman зондов, которые были применены для проведения ПЦР в режиме реального времени образцов пациентов, включенных в исследование.

#### **Методы статистической обработки результатов исследования**

С целью накопления информации, ее дальнейшей корректировки и систематизации использовались программы Microsoft Excel 2019 и STATISTICA 10 (StatSoft.Inc). При статистической обработке все переменные имели отличное от нормального распределение, в связи с чем вычислялись медиана и интерквартильный размах (25-й и 75-й перцентили). Исходные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Для проверки характера распределения использовали непараметрический тест Колмогорова-Смирнова. Анализ статистической значимости различий количественных признаков для двух независимых групп применялся U-критерий Манна-Уитни, критерии рангов Вилкоксона. Для выявления силы и

направления корреляционной взаимосвязи двух признаков применялся непараметрический коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ). Сила связи интерпретировалась при  $r < 0,25$  как слабая, при  $0,25 < r < 0,75$  как умеренная и при  $r > 0,75$  – сильная. Относительный риск развития заболевания оценивался с помощью показателя отношения шансов. ОШ = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации; ОШ > 1 как положительную ассоциацию, ОШ < 1 – как отрицательную ассоциацию генетического варианта с заболеванием. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

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

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

2) срок беременности менее 22 недель или масса тела ребенка при рождении менее 500 г, или в случае, если масса тела ребенка при рождении неизвестна, длина тела ребенка при рождении менее 25 см - при продолжительности жизни более 168 часов после рождения (7 суток) (Антонов А.Г. и др., 2011).

Переход Российской Федерации на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ, а также совершенствование методов неонатальной реанимации способствовало превалированию новой формы БЛД над классической в 2014 году – 65% (57 детей) и 35% (31 ребенок) соответственно. С 2015 по 2017 гг. сохранялось превалирование новой формы над классической (2015 год – 60% и 40%, 2016 год – 57% и 43%, 2017 год – 58,1% и 41,9%).

С 2018 по 2019 гг. отмечался значительный рост количества пациентов с новой формой БЛД – 75% (75 детей из 100 обследованных) и 80% (80 детей из 100 обследованных) соответственно. Количество пациентов с классической формой постепенно уменьшалось, и 2020 год стал первым годом, когда у всех госпитализированных пациентов с БЛД (109 детей) была верифицирована новая форма. Аналогичная картина наблюдалась и в 2021 году (150 детей). Результаты представлены на рисунке 2.

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

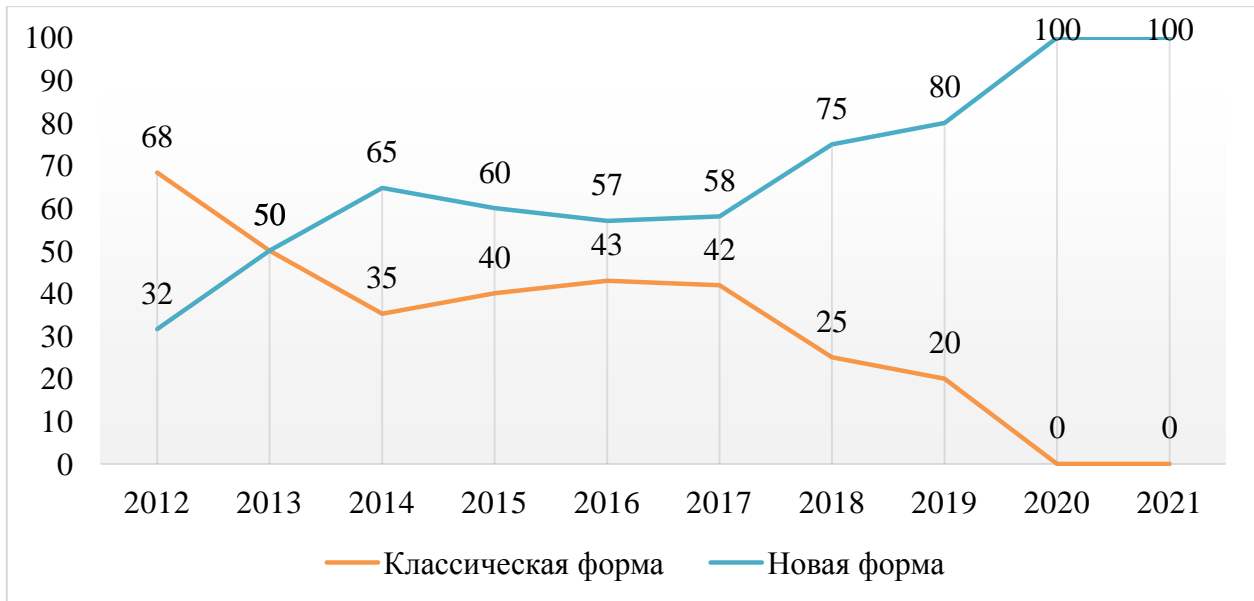


Рисунок 2. Динамика соотношения больных с классической и новой формами бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей за 10-летний период.

### Сравнительная оценка клинико-anamнестических характеристик исследуемых групп

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

Проведена сравнительная гендерная характеристика, обнаружившая незначительное преобладание мальчиков, как в основной (52%), так и в контрольной группах (51%), однако статистически значимых различий между детьми обеих групп выявлено не было, в отличие от гендерных различий с преобладанием пациентов мужского пола среди сформировавших классическую форму БЛД (Ambalavanan et al., 2008; Costeloe et al., 2012; Jensen et al., 2014).

Следующие показатели были проанализированы в исследовании:

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

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

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

Связь перечисленных факторов с развитием РДСН и дальнейшим формированием БЛД была изучена в многоцентровом исследовании Barbara J. Stoll и соавт. Из 8515 детей, выживших в течение 12 часов после рождения с гестационным возрастом 22-28 недель, массой тела 401г-1500г, у 93% пациентов был диагностирован респираторный дистресс-синдром новорожденных. Из этой группы только 7023 ребенка дожили до 36 недели постконцептуального возраста, и сформировали БЛД – 68%. Частота развития новой формы БЛД также имела обратную связь с гестационным возрастом и массо-ростовыми показателями.

Оценка состояния ребенка при рождении всегда была актуальной для неонатологов, анестезиологов-реаниматологов, педиатров. Оценка по шкале APGAR дает возможность получить представление о состоянии ребенка после рождения и о его реакции на реанимационные мероприятия. Этот показатель является полезным инструментом для принятия решений в родильном зале во время оказания помощи новорожденному, но не используется для краткосрочного и долгосрочного прогноза состояния здоровья. В исследовании Barbara J. Stoll и соавт. также были проанализированы результаты оценки по шкале APGAR, но учитывались только показатели ниже или равные 3 баллам. Из 9575 детей, включенных в исследование, 42% и 16% были оценены  $\leq 3$  баллов на 1-й и 5-й минутах после рождения соответственно (Stoll et al., 2010). В нашем исследовании все дети были разделены на 3 группы: оцененные в 1-3 балла, 4-6 баллов и 7 баллов и более. В основной группе более 80% детей имели оценку 4-6 баллов на 1-й минуте и более 70% пациентов были оценены так же на 5-й минуте после рождения. В группе пациентов, не сформировавших БЛД на 1-й минуте после рождения превалировала оценка от 4 до 6 баллов, но к 5-й минуте оценка увеличилась до 7 баллов и выше в более, чем в 80% случаев.

С учетом степени тяжести дыхательной недостаточности все дети, включенные в исследование, получали респираторную поддержку и дополнительную оксигенацию. Анализ статистических данных свидетельствует о том, что новорожденные, не сформировавшие БЛД, получали наиболее кратковременную и щадящую вентиляционную поддержку по сравнению с пациентами, развившими БЛД. Среди 100 пациентов, сформировавших заболевание, 95 потребовалась ИВЛ, далее поэтапно Biphasic (50 детям), СРАР (50 детям), канюли с подачей увлажненного кислорода (67 детям). У пациентов контрольной группы наиболее часто применялась респираторная поддержка методом СРАР (65%). Также было выявлено достоверное различие ( $p < 0,001$ ) общей продолжительности кислородозависимости у детей в 2-х группах (в основной – 49 [37;67] дней, в контрольной – 9 [4;19] дней).

Взаимосвязь применения различных методов респираторной поддержки и гестационного возраста ребенка при рождении также была описана в исследовании Barbara J. Stoll и соавт. Все дети, включенные в это исследование ( $n = 9575$ ), были разделены на 7 групп в зависимости от гестационного возраста (22-28 недель). Частота интубации и назначение терапии препаратом сурфактанта была ниже у детей, родившихся на 28 неделе гестации. Частота использования СРАР после рождения была выше у пациентов с гестационным возрастом 24 недели и выше. Частота применения ИВЛ была выше у пациентов, родившихся на 22-й неделе гестации (96% детей) и снизилась до 40% в группе пациентов с гестационным возрастом 28 недель и более. Процентное соотношение детей, у которых был применен СРАР, наоборот, возрастало с увеличением гестационного возраста при рождении (с 0% до 38%) (Stoll et al., 2010).

В ходе настоящего исследования оценивали связь осложнений и сопутствующей патологии с тяжестью течения БЛД. Анализировали следующие состояния: легочная гипертензия, внутрижелудочковое кровоизлияние, пневмония. У пациентов основной группы наиболее часто было диагностировано внутрижелудочковое кровоизлияние (83% пациентов), у пациентов

контрольной группы – врожденная пневмония в анамнезе (69% пациентов). Легочная гипертензия была диагностирована на втором месяце жизни лишь у 7% детей, сформировавших БЛД. Как правило, эти пациенты требуют коллегиального ведения с привлечением профильных специалистов в связи с сочетанными последствиями перинатальной патологии.

Ранее считалось, что материнские факторы вносят значительный вклад в формирование БЛД (Суспицын Е.Н. и др., 2016; Backes et al., 2011; Hansen et al., 2010; Thekkevedu et al., 2017). В нашем исследовании при анализе 6 факторов, связанных с неблагоприятным течением беременности (хронические бронхолегочные заболевания матери, маловодие, многоводие, хориоамнионит, фетоплацентарная недостаточность, преждевременная отслойка плаценты), было выявлено отсутствие статистически значимых различий между этими признаками у женщин, дети которых сформировали и не сформировали заболевание.

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

Таким образом, согласно проведенному клинко-анамнестическому исследованию можно утверждать, что современной клинической моделью пациента с новой формой БЛД является недоношенный ребенок с гестационным возрастом менее 28 недель и ЭНМТ при рождении, оценками по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах после рождения 6 и менее баллов, с длительными сроками респираторной поддержки с применением традиционной ИВЛ (рисунок 3).



Рисунок 3. Взаимосвязи между формированием БЛД, массой, длиной тела и гестационным возрастом при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительностью кислородозависимости ( $p < 0,05$ )

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

### **Результаты проведения полноэкзомного секвенирования у пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию**

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

Подавляющее большинство мутаций, имеющих медицинскую значимость, локализуется в экзонах, то есть участках ДНК, кодирующих белки. Суммарная протяженность этих участков составляет всего 1% генома. С целью выявления дефектов в интересующих нас известных генах в обычной практике применяется методика создания диагностических панелей, что сужает зону поиска значимых генетических вариантов. Полноэкзомное секвенирование лишено данного ограничения, так как оно позволяет найти мутации не только в известных генах, но и дает возможность открытия новых генетических вариантов, способствующих формированию заболевания (Ng et al., 2010).

Данная методика применялась и ранее для поиска предикторов формирования бронхолегочной дисплазии, однако не во всех проведенных исследованиях поиск генетических вариантов, способствующих формированию БЛД, увенчался успехом. Например, в исследование Alice Hadchouel и соавт. в 2020 году, было включено 14 детей, 6 из которых сформировали БЛД тяжелой степени, 8 пациентов были в группе контроля. У выбранных недоношенных детей с тяжелой бронхолегочной дисплазией и в контрольной группе ученым не удалось найти ни одного генетического варианта, характерного для нескольких детей с тяжелой степенью БЛД. Однако их результаты не согласуются с результатами других исследований, а отрицательный результат объясняется малой выборкой и полигенной предрасположенностью к данному заболеванию (Carrera et al., 2015; Hadchouel et al., 2020; Lal et al., 2015; Li et al., 2015).

Carrera и соавт. выполнили полноэкзомное секвенирование 26 итальянских младенцев европеоидной расы с тяжелой формой БЛД, отобранных из большей проспективной когорты (366 недоношенных детей из 12 отделений интенсивной терапии). Всего было идентифицировано 745 потенциально участвующих в развитии БЛД генов. Чтобы сузить список, анализ данных был сосредоточен на генах, ранее ассоциированных с развитием БЛД, и на новых генах-кандидатах, кодирующих белки, участвующих в известных патогенетических механизмах развития заболевания. Генами-кандидатами, выявленными в этом исследовании, стали *NOS2*, *MMP1*, *CRP*, *LBP* и семейство *TLR* (Carrera et al., 2015).

В данной научной работе мы провели полноэкзомное секвенирование 100 пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию. На первом этапе исследования в результате проведения полноэкзомного секвенирования и приоритизации генов, исходя из статистической значимости были выбраны 17 генов, которые потенциально могут участвовать в патогенезе БЛД: *AMH*, *AQP7*, *ARHGEF11*, *AUP1*, *GALR2*, *HTRA2*, *HYAL3*, *MAPK8IP3*, *TTN*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9*, *UGT1A10*.

Среди генов, описанных ранее в исследованиях, посвящённых бронхолегочной дисплазии, и найденных в рамках данного исследования, нами было отобрано 8 генетических вариантов, частота представленности которых у пациентов с БЛД значимо отличалась от контрольной

выборки: rs12489516 (*CPA3*), rs2476601 (*PTPN22*), rs1042703 (*MMP14*), rs5744174 (*TLR5*), COSV53739696 (*COL8A1*), rs45488997 (*CTGF*), rs1059046 (*SFTPA2*), rs62542745 (*AQP7*).

Фильтрация генетических вариантов осуществлялась на основании данных о популяционных частотах, встречаемости в исследуемой и контрольной выборках, а также патогенетической роли в формировании БЛД.

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

Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Генетические варианты, отобранные в результате проведения массового параллельного секвенирования ДНК пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию

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



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

Для определения различий в частотах аллелей между основной контрольной группами была проведена ПЦР в режиме реального времени. Из 8 генетических вариантов, отобранных в результате проведения полноэкзомного секвенирования, генетические варианты rs12489516 в гене *CPA3* (98,5% в основной группе; 93,5% в контрольной группе) и rs45488997 в гене *CTGF* (4% в основной группе; 0,1% в контрольной группе) показали статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) частот аллелей в основной группе по сравнению с контрольной.

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

Результаты данного исследования совпадают с рядом ранее проведенных работ. Фактор роста соединительной ткани (CTGF) представляет собой многофункциональный белок, который координирует сложные биологические процессы во время развития и ремоделирования тканей. Ранее в исследовании Shaoyi Chen и соавт. было показано, что сверхэкспрессия CTGF в эпителии дыхательных путей приводит к БЛД-подобной легочной картине у новорожденных мышей. Также сверхэкспрессия CTGF вызывала выраженную макрофагальную и нейтрофильную инфильтрацию в альвеолярных воздушных пространствах и периваскулярных областях, и значительно снижала темпы альвеоляризации и ангиогенеза. Более того, сверхэкспрессия CTGF индуцировала ремоделирование легочных сосудов и легочную гипертензию (Chen et al., 2011). Задержка альвеолярного и сосудистого развития у недоношенных детей представляет собой серьезную проблему в ведении пациентов с БЛД. В период неонатального развития такие пациенты подвержены стрессовым влияниям в виде гипоксии, гипероксии и жестких режимов вентиляции, что приводит к окислительному и воспалительному стрессу, который вызывает дальнейшее повреждение альвеол легких и сосудистой сети (Mathew et al., 2020). Исследование, проведенное в 2019 году, показало, что ингибирование CTGF моноклональным антителом CTGF улучшало альвеоляризацию и развитие сосудов, а также уменьшало ремоделирование легочных сосудов и легочную гипертензию у пациентов с БЛД. Таким образом, CTGF может быть новой мишенью для терапии бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей (Wang et al., 2018).

Карбоксипептидаза А3, кодируемая геном *CPA3*, принимает участие в регуляции состояния специфического тканевого микроокружения, затрагивая реализацию врожденного иммунитета, механизмы ангиогенеза, процессы ремоделирования межклеточного матрикса и др. (Atiakshin et al., 2022). Многочисленные биологические эффекты CPA3, включая участие в регуляции состояния легочной паренхимы и системного кровотока, определяют важность исследований ассоциации этого гена в качестве защитного фактора, предотвращающего развитие бронхолегочной дисплазии. На сегодняшний день экспрессия гена *CPA3* обнаружена только в тучных клетках. Известно, что ранее генетические варианты в этом гене ассоциировались только с формированием ХОБЛ, бронхиальной астмы и аллергического ринита. В настоящее время предполагается, что белок, кодируемый этим геном, может играть ключевую роль и в развитии бронхолегочной дисплазии, так как карбоксипептидаза А3 ограничивает действие эндотелина 1 (Hültner et al., 2005; Maurer et al., 2004; Sánchez-Ovando et al., 2020; Wang et al., 2016; Winter et al.,

2021; Yan et al., 2020). Кроме того, было показано, что СРАЗ тучных клеток опосредованно обладает вазодилаторными и бронходилаторными эффектами благодаря способности к трансформации лейкотриена С4 в лейкотриен F4, тем самым снижая вероятность образования лейкотриенов D4 и E4 с более мощными бронхо- и сосудосуживающим эффектами (Reddanna et al., 2003). Генетический вариант rs12489516 в гене *СРАЗ*, выявленный в нашем исследовании, по сути является новым, перспективным прогностическим фактором, связанным с предотвращением формирования бронхолегочной дисплазии.

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

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

- представленность генетического варианта rs45488997 в гене *CTGF* превалировала у пациентов, сформировавших БЛД. Данный нуклеотидный вариант можно отнести к факторам, способствующим формированию заболевания. Шансы развития бронхолегочной дисплазии у пациентов с выявленным генетическим вариантом выше в 1,5 раза (ОШ = 1,5, (ДИ95%[1.075; 5.184])).
- представленность генетического варианта rs12489516 в гене *СРАЗ* превалировала у пациентов из контрольной группы, в связи с чем данный нуклеотидный вариант можно отнести к защитным факторам, предотвращающим формирование заболевания. Шансы сформировать БЛД у пациентов с данным генетическим вариантом ниже в 4,5 раза (ОШ = 0,22; (ДИ95%[0.048; 0.901])).

Полученные результаты генетического исследования могут указывать на участие фактора роста соединительной ткани в развитии бронхолегочной дисплазии, следовательно, и терапия моноклональным антителом *CTGF*, которое ингибирует выработку этого фактора, может иметь положительные результаты у пациентов с высоким риском формирования заболевания (Wang et al., 2019).

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

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

### **Шкала прогнозирования развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей**

На основании клиничко-anamнестических и молекулярно-генетических предикторов развития новой формы бронхолегочной дисплазии, была разработана шкала прогнозирования заболевания у недоношенных детей.

Семь показателей, включенных в шкалу, включая генетические предикторы, позволяют оценить вероятность развития новой формы БЛД уже в первые дни жизни пациента с РДСН и провести индивидуальную профилактику формирования данного заболевания (таблица 2).

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

Таблица 2. Шкала прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей

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

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

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

### **ВЫВОДЫ**

1. Ретроспективная оценка медицинской документации показала преобладание новой формы бронхолегочной дисплазии по сравнению с классической формой у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в период с 2013 по 2021 гг., после окончательного перехода Российской Федерации на критерии живорождения и мертворождения ВОЗ в 2012 году. В 2021 году у всех включенных в исследование пациентов с БЛД была диагностирована новая форма заболевания, что связано с увеличением выживаемости глубоко недоношенных детей за счет совершенствования методов неонатальной реанимации.
2. Клинико-anamnestическими факторами высокого риска развития новой формы бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных являются гестационный возраст менее 28 недель, экстремально низкая и очень низкая масса тела при рождении, оценки по шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах жизни менее 6 баллов, длительная респираторная поддержка в неонатальном периоде с применением традиционной ИВЛ.

3. В результате полноэкзомного секвенирования и биоинформатического анализа было обнаружено 8 генетических вариантов, относительные частоты которых у пациентов с бронхолегочной дисплазией значительно отличались от референсного популяционного значения: rs12489516 (*CPA3*), rs2476601 (*PTPN22*), rs1042703 (*MMP14*), rs5744174 (*TLR5*), COSV53739696 (*COL8A1*), rs45488997 (*CTGF*), rs1059046 (*SFTPA2*), rs62542745 (*AQP7*). Найденные генетические варианты могут потенциально влиять на функционирование следующих систем: сурфактантную; иммунновоспалительного ответа; организации внеклеточного матрикса и его деградации; ангиогенеза; трансмембранного транспорта.

4. Анализ изменения частот аллелей в основной группе по сравнению с контрольной показал статистически значимый результат для генетического варианта rs45488997 в гене *CTGF*. Представленность данного нуклеотидного варианта превалировала у пациентов, сформировавших БЛД, что позволяет отнести его к факторам, предрасполагающим к формированию заболевания. Шансы развития бронхолегочной дисплазии у пациентов с выявленным генетическим вариантом выше в 1,5 раза. Представленность генетического варианта rs12489516 в гене *CPA3* превалировала у пациентов контрольной группы, в связи с чем данный нуклеотидный вариант можно отнести к защитным факторам, предотвращающим формирование заболевания. Шансы сформировать БЛД у пациентов с данным генетическим вариантом ниже в 4,5 раза.

5. Из 8 генетических вариантов, относительные частоты которых значительно отличались от референсного популяционного значения, 6 генетических вариантов: rs2476601 гена *PTPN22*, кодирующего лимфоидспецифическую тирозинфосфатазу, rs1042703 гена *MMP14*, кодирующего тканевую коллагеназу, rs5744174 гена *TLR5*, кодирующего мембранный белок, входящий в семейство толл-подобных рецепторов, COSV53739696 гена *COL8A1*, кодирующего одну из двух альфа-цепей коллагена VIII типа, rs1059046 гена *SFTPA2*, кодирующего сурфактантный белок А, rs62542745 гена *AQP7*, кодирующего белок группы аквапоринов - не показали различий в их представленности в группах детей, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию.

6. Выявленные клинико-anamnestические факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии и генетические варианты, обладающие повышенным и пониженным риском развития заболевания (rs45488997 в гене *CTGF* и rs12489516 в гене *CPA3* соответственно), дают возможность прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных с помощью разработанной нами шкалы балльной оценки.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Бондарь В.А., Давыдова И.В., Басаргина М.А., Фисенко А.П., Пушков А.А., Жанин И.С., Борисов И.В., Савостьянов К.В. Роль генетических предикторов в доклинической диагностике бронхолегочной дисплазии. *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* 2022; 1: 5-9.
2. Давыдова И.В., Фисенко А.П., Пожарищенская В.К., Казакова К.А., Басаргина Е.Ю., Бондарь В.А. Новая форма бронхолегочной дисплазии: реалии сегодняшнего дня. *Доктор.Ру.* 2020; 19(10): 6–9.
3. Басаргина М.А., Фисенко А.П., Давыдова И.В., Бондарь В.А. Ранняя диагностика бронхолегочной дисплазии: актуальный вектор научных исследований. *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* 2021; 1: 90-99.
4. Скворцова В.А., Давыдова И.В., Фисенко А.П., Пинаева-Слыш Е.Л., Боровик Т.Э., Басаргина М.А., Казюкова Т.В., Бондарь В.А., Казакова К.А., Грызунова А.С. Особенности нутритивного статуса недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией в первом полугодии жизни. *Педиатрия им. Г.Н. Сперанского.* 2021; 100 (4): 161-170.
5. Басаргина М.А., Фисенко А.П., Давыдова И.В., Кондратьев М.В., Петрова А.С., Жарова О.П., Харитоновна Н.А., Ялтиков В.Ю., Бондарь В.А. Клинико-функциональные особенности малого круга кровообращения у детей с новой формой бронхолегочной дисплазии. *Российский педиатрический журнал.* 2021; 24(5): 292–299.
6. Бондарь В.А., Давыдова И.В. Настоящее и будущее новой формы бронхолегочной дисплазии. Тезисы VII Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от преграavidарной подготовки к здоровому материнству и детству», название 18-20 февраля 2021, 67-68.
7. Bondar V.A., Davydova I.V., Basargina M.A. Modern view of a patient with bronchopulmonary dysplasia. *Archives of Disease in Childhood* 106 (Suppl 2), 176-177.2021.
8. Bondar V.A., Davydova I.V., Basargina M.A., Savostyanov K.V., Pushkov A.A., Zhanin I.S., Nikitin A.G. Genetic predictors of a new form of bronchopulmonary dysplasia. *Archives of Disease in Childhood* 106 (Suppl 2), 176-177. 2021.
9. Бондарь В.А., Давыдова И.В., Савостьянов К.В., Басаргина М.А., Пушков, А.А., Жанин И.С. Клинико-генетические характеристики пациентов с новой формой БЛД. XXIX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» 4-7 апреля 2022 Г. Сборник тезисов. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2022; 21(2S): 45-46

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БЛД – бронхолегочная дисплазия  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
 ИВЛ – искусственная вентиляция легких  
 ММП – матриксные металлопротеиназы  
 ОНМТ – очень низкая масса тела  
 НМТ – низкая масса тела  
 ОШ – отношение шансов  
 ПКВ – постконцептуальный возраст  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 РДСН – респираторный дистресс-синдром новорожденных  
 ЭНМТ – экстремально низкая масса тела

Biphasic (Biphasic Positive Airway Pressure) – вентиляция с двухфазным положительным давлением  
CPAP (continuous positive airway pressure) — постоянное положительное давление в дыхательных путях

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

NGS (next generation sequencing) – секвенирование нового поколения