

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

На правах рукописи

СЕЛИВЕРСТОВА АЛИНА АНАТОЛЬЕВНА

**РОЛЬ ФАКТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА В ФОРМИРОВАНИИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ
ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ**

3.1.21. «Педиатрия»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

Давыдова Ирина Владимировна

Москва – 2023

Оглавление

Список сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ АНГИОГЕНЕЗА И МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У ДЕТЕЙ С БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ.....	18
1.1. Историческая справка.....	18
1.2. Патогенез БЛД с позиций нарушения ангиогенеза	20
1.3. Биологическая роль наиболее изученных факторов ангиогенеза.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1. Дизайн исследования.....	41
2.2. Критерии включения пациентов в исследование и исключения пациентов из исследования	41
2.3. Клинико-anamнестическая характеристика обследованных детей.....	43
2.4. Методы исследования.....	46
2.5. Методы статистической обработки результатов исследования.....	46
ГЛАВА 3. КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС- СИНДРОМОМ НОВОРОЖДЕННЫХ И ПАЦИЕНТОВ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ, СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ БРОНХОЛЕГОЧНУЮ ДИСПЛАЗИЮ	48
3.1. Сравнительная оценка клинико-anamнестических характеристик исследуемых групп пациентов	48
3.2. Результаты корреляционного анализа клинико-anamнестических данных пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД.	57
3.3. Сопутствующие заболевания и осложнения у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.	59
ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ	

НОВОРОЖДЕННЫХ С РДСН И ПАЦИЕНТОВ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ,
СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ БЛД 62

- 3.1. Сравнительная оценка содержания проангиогенных факторов в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД. 62
- 3.1.1. Оценка концентрации фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД.....62
- 4.1.2. Оценка концентрации фактора роста сосудистого эндотелия D (VEGF-D) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД.....64
- 4.1.3. Оценка концентрации тромбоцитарного фактора роста ВВ (PDGF-ВВ) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД.....66
- 4.1.4. Оценка концентрации молекулы клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1 (PЕСАМ-1) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД. 67
- 4.1.5. Оценка концентрации ангиопоэтина-1 (ANGPT-1) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД. 69
- 4.2. Сравнительная оценка содержания антиангиогенных факторов в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД. 71
- 4.2.1. Оценка концентрации ангиопоэтина-2 (ANGPT-2) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД. 71
- 4.2.2. Уровень СТGF в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл. 73

4.3. Корреляционный анализ содержания факторов ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД.	75
4.4. Результаты ROC- анализа проангиогенных и антиангиогенных факторов в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД.....	77
4.4.1. Результаты ROC - анализа для проангиогенных факторов.	77
4.4.2. Результаты ROC - анализа для антиангиогенного фактора.	78
4.5. Шкала прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей.....	80
4.6. Клинические примеры	82
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	87
ВЫВОДЫ.....	101
Практические рекомендации	103
Список литературы	104

Список сокращений

БЛД – бронхолегочная дисплазия

ВЖК – внутрижелудочковое кровоизлияние

ГПЖ – гипертрофия правого желудочка

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ЛГ – легочная гипертензия

НМТ – низкая масса тела

ОНМТ – очень низкая масса тела

ОРИТН– отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных

ПКВ – постконцептуальный возраст

РДСН – респираторный дистресс-синдром новорожденных

ХА – хориамнионит

ЭНМТ – экстремально низкая масса тела

ANGPT-1 (angiotensin-1) – ангиопоэтин-1

ANGPT-2 (angiotensin-2) – ангиопоэтин-2

CPAP (continuous positive airway pressure) – респираторная поддержка с постоянным положительным давлением в дыхательных путях

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

eNO (endothelial nitric oxide) – эндотелиальный оксид азота

FGF (fibroblast growth factor) – фактор роста фибробластов

IL8 (interleukin-8) – интерлейкин-8

PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule) – молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1

PDGF-BB (platelet-derived growth factor BB) – тромбоцитарный фактор роста BB

PDGFR (receptor platelet-derived growth factor) – рецепторы тромбоцитарного фактора роста

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

sPECAM-1 (Soluble Platelet endothelial cell adhesion molecule) – растворимая молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Успехи современной перинатологии и совершенствование методов неонатальной реанимации обеспечили возможность эффективного выхаживания глубоко недоношенных детей, имеющих при рождении очень низкую массу тела (ОНМТ) и экстремально низкую массу тела (ЭНМТ) [110]. На этом фоне возросла актуальность изучения респираторных нарушений, связанных с морфофункциональной незрелостью легких у таких пациентов. Наиболее значимой патологией респираторной системы недоношенных детей является бронхолегочная дисплазия (БЛД) [54]. Данное заболевание формируется в исходе респираторного дистресс-синдрома новорожденных (РДСН). Согласно клиническим рекомендациям, принятым в Российской Федерации по ведению недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных, данная патология характеризуется расстройством дыхания у детей в первые дни жизни, обусловленным первичным дефицитом сурфактанта и незрелостью легких. Диагностируется на основании клинической картины дыхательных нарушений, которая проводится по шкале Сильверман (Silverman) у недоношенных детей и специфической рентгенологической картины легких. Изменения на рентгенограмме зависят от степени тяжести заболевания - от небольшого уменьшения пневматизации до картины «белых легких». К характерным рентгенологическим признакам относятся: диффузное снижение прозрачности легочных полей, ретикулогранулярный рисунок и полосы просветлений в области корня легкого (воздушная бронхограмма). Лечение проводится с помощью адекватной респираторной поддержки [6].

За 55-летнюю историю исследования патогенеза БЛД клинические и анамнестические факторы риска развития данного заболевания, включая материнские факторы, изучены достаточно подробно. В то время как пренатальные механизмы формирования бронхолегочной дисплазии в

экспериментах на животных только начинают исследоваться. Существующие в настоящее время представления о патогенезе БЛД подтверждают гипотезу о наличии предпосылок к формированию данной патологии уже на внутриутробном этапе развития, а также о повышенном риске развития данного заболевания при неблагоприятном течении антенатального периода [1; 2; 79].

Интерес к данной патологии объясняется еще и тем, что она является социально значимой в связи с высоким риском инвалидизации, а в тяжелых случаях и смертности среди недоношенных детей.

Несмотря на значительные достижения в совершенствовании методов респираторной поддержки новорожденных, включая щадящие методы инвазивной механической вентиляции легких, все более широкое использование неинвазивной вентиляции легких, сурфактантную заместительную терапию и т.д., частота формирования БЛД у недоношенных детей все еще достаточно высока. Это несомненно связано с увеличением выживаемости глубоко недоношенных детей, рожденных с гестационным возрастом <28 недель и экстремально низкой массой тела [110].

Патогенез БЛД, несмотря на достижения современной медицины, результаты многочисленных исследований в данной области, высокую клиническую и социальную значимость, остается не до конца изученным.

В последние годы было доказано, что к факторам риска формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных новорожденных относятся: искусственная вентиляция легких, токсическое действие кислорода на незрелую легочную ткань, внутриутробное инфицирование плода и другие факторы, приводящие к сниженной альвеоляризации и васкуляризации легочной ткани [8]. Патогенетически развитие заболевания характеризуется воспалением, ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса и апоптозом, тесно связанными с нарушением регуляции передачи сигналов факторов роста, что приводит к остановке альвеоляризации, аномальному росту сосудов малого круга и интерстициальному фиброзу [74]. При тяжелом течении БЛД,

осложненной легочной гипертензией, помимо ремоделирования легочных сосудов отмечается гипертрофия правого желудочка (ГПЖ), что существенно повышает вероятность летального исхода у этих пациентов [10; 14].

При изучении БЛД, в последнее время особое внимание уделяется передаче сигналов в клетке, влияющих на регуляцию ангиогенеза. В зарубежной статье, опубликованной в 2021 году, а также в отечественных статьях 2021, 2022 года приведены наиболее значимые биомаркеры, влияющие на ангиогенез сосудов лёгких. К ним относятся: фактор роста эндотелия сосудов А, D (VEGF-A, D), интерлейкин-8 (IL-8), трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор роста фибробластов 10 (FGF-10), фактор роста соединительной ткани (CTGF), тромбоспондин-1 (TSP-1), ангиопоэтины-1,2 (ANGPT-1, ANGPT-2), тромбоцитарный фактор роста BB (PDGF-BB), молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1 (PECAM-1) [10; 11; 90].

Таким образом, на современном этапе актуальным становится изучение взаимодействия факторов роста, регулирующих нормальное развитие паренхимы и микрососудистого русла легких, а также их роли в патогенезе БЛД.

Степень разработанности темы

На фоне совершенствования акушерских и перинатальных технологий, количество рожденных недоношенных детей возрастает с каждым годом. Соответственно, увеличивается и количество научных работ на тему прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей в отечественной и зарубежной литературе. Достаточно хорошо изучены факторы риска, клиника и методы лечения данного заболевания. Кроме того, доказана генетическая предрасположенность БЛД, изучаются конкретные генетические факторы, способствующие формированию данного заболевания [4].

Ранее в исследованиях патогенеза БЛД традиционно изучали влияние послеродовых факторов риска, таких, как длительная гипероксия, различные

стратегии искусственной вентиляции легких (ИВЛ), СРАР (Constant Positive Airway Pressure) и др., и только несколько исследований для изучения пренатальных механизмов было проведено с использованием экспериментальных моделей на животных [49; 92]. Накопленные клинические данные подтверждают гипотезу о том, что БЛД, вероятно, начинает формироваться еще внутриутробно и что антенатальные события являются мощными детерминантами высокого риска развития данного заболевания [72; 92].

Несмотря на значительные достижения науки в данной области, роль факторов ангиогенеза микрососудистой сети легких в формировании БЛД, остается не до конца понятной. На сегодняшний день не достигнут и существенный прогресс в профилактике развития легочной гипертензии (ЛГ), развивающейся у недоношенных детей на фоне бронхолегочной дисплазии [3].

Для правильного формирования микрососудистого русла легких на всех этапах необходим баланс между проангиогенными и антиангиогенными биомаркерами ангиогенеза.

Но в настоящее время механизмы изменения данного баланса, происходящие при развитии БЛД, остаются до конца не ясными. Нельзя исключить, что эти нарушения происходят в легких недоношенных младенцев еще до формирования клинически и рентгенологически диагностируемой бронхолегочной дисплазии. На основании существующих в настоящее время диагностических возможностей не удастся выявить всех пациентов с респираторными нарушениями, связанными с незрелостью легких и их повреждением. Учитывая вышесказанное, на данный момент перспективным направлением является изучение роли медиаторов и ингибиторов ангиогенеза, незаменимых для развития микрососудистой сети легких, а также играющих ключевую роль при формировании БЛД.

Изучение данной проблемы может привести к разработке новых методов лечения, направленных на стимулирование правильного альвеоло- и

ангиогенеза, а также на профилактику развития ЛГ у недоношенных младенцев.

Цель исследования

Определить роль факторов ангиогенеза в формировании и течении бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей для совершенствования прогнозирования, ранней диагностики заболевания и тактики ведения данной категории больных.

Задачи исследования:

1. Определить значимые клиничко-анамнестические факторы формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных.

2. Определить патогенетически значимые биомаркеры нарушений ангиогенеза в крови недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в анамнезе, сформировавших и не сформировавших бронхолегочную дисплазию.

3. Установить влияние дисбаланса содержания проангиогенных и антиангиогенных факторов в сыворотке крови на развитие бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных.

4. Определить взаимосвязь между клиничко-анамнестическими факторами риска развития бронхолегочной дисплазии и уровнем биомаркеров ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в анамнезе.

5. Разработать шкалу прогнозирования развития бронхолегочной дисплазии на основе анализа клиничко-анамнестических факторов и содержания биомаркеров ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных.

Научная новизна

Впервые определен широкий комплекс биомаркеров ангиогенеза микрососудистой сети легких в сыворотке крови недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных на этапах формирования и течения БЛД, а именно доказана прогностически значимая проангиогенная роль тромбоцитарного фактора роста ВВ (PDGF-BB) и антиангиогенная роль ангиопоэтина-2 (ANGPT-2).

Впервые изучен баланс между проангиогенными и антиангиогенными факторами, играющими ключевую роль в ангиогенезе и ремоделировании сосудов микрососудистой сети легких на этапах формирования и течения БЛД у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в остром периоде и в анамнезе.

Впервые сопоставлены клиничко-анамнестические факторы риска формирования БЛД и уровень биомаркеров ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в остром периоде и в анамнезе.

Впервые создана шкала прогнозирования формирования БЛД у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в неонатальном периоде.

Теоретическая и практическая значимость

Проведение иммуноферментного анализа у недоношенных пациентов, сформировавших бронхолегочную дисплазию и не сформировавших данное заболевание, позволило определить значимые биомаркеры ангиогенеза в сыворотке крови, которые могут быть использованы с целью раннего выявления пациентов с РДСН, угрожаемых по развитию бронхолегочной дисплазии.

Определенные клиничко-анамнестические предикторы формирования БЛД и дисбаланс некоторых биомаркеров ангиогенеза дают возможность

прогнозирования развития данного заболевания у недоношенных детей с РДСН с помощью разработанной шкалы балльной оценки, в целях профилактики развития БЛД.

Методология и методы исследования

При выполнении работы был проведен анализ результатов современных научных работ, посвященных выявлению клинических и анамнестических факторов риска формирования бронхолегочной дисплазии. Особое было внимание уделено определению биомаркеров ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных младенцев с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в анамнезе. Исследование носило проспективный характер. В процессе работы проведена оценка анамнестических и клинических данных 164 недоношенных пациентов с РДСН в остром периоде, а также недоношенных пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД, с РДСН в анамнезе.

Биомаркеры ангиогенеза в сыворотке крови были исследованы методом иммуноферментного анализа с применением тест – систем RayBio® Human ELISA Kit для определения ANGPT-1, ANGPT-2, VEGF-A, VEGF-D, PDGF-BB, PECAM-1 и CTGF.

Далее были сопоставлены клиничко-анамнестические данные и уровень биохимических маркеров в сыворотке крови младенцев и определены предикторы формирования БЛД у недоношенных детей.

При статистической обработке использовался аппарат математико-статистического системного анализа с применением пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и процессора электронных таблиц Microsoft® Excel-2019 (Microsoft, США). Корреляцию показателей оценивали с помощью ранговой корреляции Спирмена (r). Сила связи интерпретировалась как слабая при значении r от 0 до 0,3; умеренная — от 0,3 до 0,69; сильная — от 0,7 до 1; Сравнение количественных показателей в несвязанных выборках для трех групп выполнялось с помощью

непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, с последующим попарным сравнением. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов, перенесших РДСН в анамнезе, родившихся с экстремально низкими и очень низкими показателями массы тела, гестационного возраста (преимущественно менее 28 недель), оценок на шкале APGAR (на 1-й и 5-й минутах от 4 до 6 баллов и менее), нуждавшихся в длительной респираторной терапии и сформировавших в дальнейшем бронхолегочную дисплазию, в сыворотке крови отмечаются более низкие уровни проангиогенных биомаркеров ангиогенеза и более высокие уровни антиангиогенных факторов по сравнению с пациентами, не сформировавшими бронхолегочную дисплазию, также перенесшими РДСН в анамнезе.

2. По данным проведенного исследования уровней биомаркеров нарушения ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных детей было выявлено статистически значимое снижение следующих проангиогенных факторов:

- фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A в группе детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой детей, не сформировавших БЛД (Me=82 пг/мл против 122 пг/мл, $p=0,03$).

- фактора роста эндотелия сосудов VEGF-D в группе детей на этапе РДСН по сравнению с детьми, с перенесенным РДСН, не сформировавшими впоследствии БЛД (Me=1,8 нг/мл против 2,3 нг/мл, $p=0,05$).

- тромбоцитарного фактора роста PDGF-BB в группе детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой детей, не сформировавших БЛД (5720 пг/мл против 9326 пг/мл, $p=0,02$)

- молекулы клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию PECAM-1 в группе детей, перенесших РДСН в анамнезе, сформировавших впоследствии

БЛД, по сравнению с группой детей на этапе РДСН (Me=3918 пг/мл против 5872 пг/мл, $p=0,016$).

3. По данным проведенного исследования уровней биомаркеров нарушения ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных детей было выявлено значимое повышение антиангиогенного фактора – ангиопоэтина-2 (ANGPT-2) в группе детей на этапе РДСН по сравнению с детьми, перенесшими РДСН и не сформировавшими БЛД (Me=7656 пг/мл против 5837 пг/мл, $p=0,039$).

Внедрение результатов исследования в практическое здравоохранение

Результаты работы рекомендованы и внедрены в клиническую практику отделения патологии новорожденных и детей раннего детского возраста федерального государственного автономного учреждения «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Московский областной перинатальный центр» г. Балашиха.

Степень достоверности результатов исследования

Работа основана на актуальных представлениях о клинико-анамнестических факторах риска формирования бронхолегочной дисплазии, ее патогенезе, клинических проявлениях и методах лечения, существующих в отечественной и зарубежной литературе. Достоверность полученных результатов работы подтверждается большим количеством наблюдений, современным методом лабораторной диагностики. Проведенный статистический анализ и интерпретация полученных данных основываются на современных методах статистической обработки.

Апробация материалов исследования

Полученные в ходе исследования результаты и их интерпретация были представлены и обсуждены на Всероссийской конференции «5П детская медицина» 27-28 января 2023г., IV и V Всероссийских научно-практических конференциях «Осенние Филатовские чтения» 8-9 сентября 2022г., 14-15 сентября 2023г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них статей в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации – 4.

Личный вклад автора

Все данные исследования получены при непосредственном активном участии автора на всех этапах его проведения: на этапе анализа современной отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации; на этапе подготовки обзора литературы; при постановке цели и задач работы; при формировании базы данных; на этапе клинического наблюдения недоношенных детей в остром периоде РДСН, а также пациентов в постнеонатальном периоде, сформировавших и не сформировавших БЛД; при взятии биологического материала у недоношенных детей (сыворотка крови), при проведении иммуноферментного анализа. Автором была выполнена статистическая обработка и анализ полученных данных, на основании которых были подготовлены публикации, а также сформулированы основные положения, выводы и практические рекомендации выполненной работы.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и

методов исследования, двух глав с описанием собственных результатов, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка, включающего 115 источников литературы, в том числе 11 отечественных и 104 иностранных. Диссертация иллюстрирована 20 рисунками и 13 таблицами.

ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ АНГИОГЕНЕЗА И МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У ДЕТЕЙ С БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ

1.1. Историческая справка

На современном этапе развития неонатологии с целью профилактики РДСН у глубоко недоношенных детей в практику внедрены: антенатальная терапия стероидами, заместительная терапия препаратами экзогенного сурфактанта, а также различные, в том числе щадящие режимы респираторной поддержки. В связи с этим оказываемая реанимационная помощь глубоко недоношенным детям, рожденным с экстремально низкой массой тела, стала более эффективной, что привело к увеличению выживаемости данной категории больных. Однако возможность сохранения жизни детям с глубокой недоношенностью сопряжено с высоким риском развития хронического заболевания легких, развивающегося в исходе перенесенного РДСН и известного как бронхолегочная дисплазия. Данная патология продолжает оставаться одним из наиболее распространенных долгосрочных осложнений у недоношенных детей, нуждающихся в проведении длительной респираторной поддержки. Заболеваемость БЛД среди недоношенных детей, рожденных с очень низкой массой тела варьирует от 15 до 50% [18]. Более полувека прошло с тех пор, как W. Northway в 1967 г. впервые описал данную патологию и ввел во врачебную практику термин *bronchopulmonary dysplasia* [82]. Эпидемиология, факторы риска развития, клиническая картина, патогенез и осложнения данного заболевания по прошествии этого времени претерпели существенные изменения. Современные исследования по изучению бронхолегочной дисплазии позволяют более глубоко осмыслить эти процессы и обеспечивают новые возможности для разработки методов профилактики данной патологии.

Классическая форма БЛД, описана W. Northway и соавторами как хронический легочный процесс у выживших недоношенных детей, родившихся с массой тела более 1500 г, каждому из которых проводили длительную искусственную вентиляцию легких с высоким давлением в дыхательных путях и высокой концентрацией кислорода во вдыхаемой газовой смеси по поводу респираторного дистресс-синдрома новорожденных. Возникающие при этом изменения в легочной ткани были связаны с многочисленными повреждениями незрелых легких. Они сопровождались прогрессированием клинических и рентгенографических признаков и имели четыре стадии. Кульминацией данного процесса являлась тяжелая дыхательная недостаточность с гипоксемией и гиперкапнией, зачастую с формированием легочного сердца. При проведении рентгенологического исследования органов грудной клетки на полученных рентгенограммах отмечались участки повышенной плотности, возникающие вследствие фиброза легочной ткани и обширные зоны эмфиземы легких на фоне участков ателектазов [82].

В отличие от описанных W. Northway детей с классической формой БЛД, которые нуждались в многодневной ИВЛ с высокой концентрацией кислорода во вдыхаемой газовой смеси, современным детям с новой формой заболевания зачастую проводится щадящая респираторная поддержка СРАР, с минимальной дополнительной оксигенацией или без нее. Эти пациенты с гестационным возрастом при рождении менее 32 недель согласно современным протоколам выхаживания получают препараты экзогенного сурфактанта в раннем неонатальном периоде [6].

Рентгенографические признаки современной БЛД, развивающейся у глубоко недоношенных детей с крайней незрелостью легочных структур, также значительно отличаются от ранее описанных W. Northway. Вместо выраженных повреждений легочной ткани в результате пневмофиброза и эмфиземы рентгенографические признаки в настоящее время представлены различными изменениями - от диффузного затемнения до зон гиперинфляции,

от неоднородности легочной ткани вплоть до уплотнений различной степени выраженности (нежных или грубых), простирающихся до периферии легких [50]. Патоморфоз клинико-рентгенографических признаков БЛД свидетельствует о том, что на современном этапе мы имеем дело с новым вариантом течения заболевания. Впервые термин так называемая «новая форма» БЛД был предложен в 2011 году [55]. В настоящее время эта форма заболевания является преобладающей.

Вследствие повреждения легких дети с БЛД на протяжении нескольких недель или даже месяцев нуждаются в проведении ИВЛ/СРАР и дополнительной подаче кислорода. Положительная динамика их клинического состояния происходит достаточно медленно, с постепенным улучшением и функции легких, и рентгенографических признаков заболевания, что сопровождается поэтапной отменой респираторной поддержки.

1.2. Патогенез БЛД с позиций нарушения ангиогенеза

Патогенез БЛД зависит от множества факторов. Четыре характерных патогенетических фактора БЛД были описаны еще W. Northway. К ним относятся:

- респираторный дистресс-синдром или дыхательная недостаточность;
- недоношенность;
- оксигенотерапия;
- ИВЛ с постоянным положительным давлением [82].

Перечисленные факторы по сей день продолжают играть значимую роль в патогенезе БЛД. Однако на современном этапе на первый план выходят другие патогенетические механизмы формирования бронхолегочной дисплазии, характерные для новой формы заболевания. Продолжаются исследования роли генетических предикторов формирования БЛД, а также

влияния воспалительных факторов в системе мать-плод на возможность развития данного заболевания [31; 85].

Учитывая глубокую недоношенность и выраженную морфофункциональную незрелость легочной системы на момент рождения детей, формирующих впоследствии бронхолегочную дисплазию, внимание исследователей в настоящее время все чаще фокусируется на нарушениях альвеологенеза и ангиогенеза микрососудистого русла легких. За последнее десятилетие накопилось все больше данных, свидетельствующих о том, что нарушение легочного ангиогенеза способствует развитию БЛД. Более того, в дополнение к нарушенному росту сосудов у пациентов с БЛД также часто наблюдаются изменения в ремоделировании и тонусе легочных сосудов, повышающие риск стойкой гипоксемии и развития ЛГ.

Кровеносные сосуды в легких активно способствуют нормальному развитию альвеол [12; 52] и обеспечивают поддержание альвеолярных структур на протяжении всей жизни [57]. Следовательно, модуляция ангиогенных факторов роста и клеток-предшественников сосудов может обладать терапевтическим потенциалом при заболеваниях легких, характеризующихся повреждением альвеол.

Основным постулатом «сосудистой гипотезы» формирования БЛД является тот факт, что экспериментальное нарушение ангиогенеза у новорожденных животных ухудшает рост альвеол и приводит к ЛГ, тем самым демонстрируя, что раннее повреждение развивающейся сосудистой сети может способствовать устойчивым нарушениям структуры и функции легких [103].

Морфогенез ветвления бронхиол и альвеологенез функционально бесполезны при отсутствии надлежащего формирования сосудистой сети, в тандеме с которой он должен функционировать. Две эти системы должны развиваться слаженно - так, чтобы формирующаяся дыхательная поверхность была неразрывно связана с капиллярной сетью, в непосредственной близости к поверхности газообмена [57; 103].

Развитие легких традиционно подразделяется на пять последовательных стадий [38], представленных в таблице 1.1.

Таблица 1.1. Стадии развития легких.

Стадия	Срок гестации
Эмбриональная	3-7 недель
Псевдоглангулярная	5-17 недель
Каналикулярная	16-26 недель
Саккулярная	24-38 недель
Альвеолярная	36 неделя гестации – 3 года

Однако недавно альвеолярная стадия была разделена на две, и новой (шестой) стадии дали название «период созревания микрососудов». Эти стадии идут последовательно, частично перекрывая друг друга. Период созревания микрососудов легких происходит преимущественно после рождения человека и продолжается до 3 лет внеутробной жизни, тогда как основные этапы альвеоляризации заканчиваются ориентировочно к 2 годам [38; 86].

Каждая стадия развития легких имеет характерные признаки, и каждой стадии необходим уникальный набор факторов развития для достижения конечной цели.

Согласно Eldridge L. и др. (2019г.), на эмбриональной стадии формирования легких человека происходит образование их зачатков, а также зачатка трахеи, бронхов первого порядка и дыхательных путей крупного калибра, которые выстланы недифференцированным цилиндрическим эпителием. Псевдоглангулярная стадия развития легких начинается у человека на 6-й неделе гестации, она характеризуется продолжением образования проводящих дыхательных путей, из которых в дальнейшем формируется бронхиальное дерево вплоть до терминальных бронхов. Однако

ключевым моментом в ходе развития легких, отличающим эту стадию их роста от эмбриональной стадии, является процесс клеточной дифференцировки [38].

На 16-й неделе жизни эмбриона человека отмечается быстрое развитие легких, когда легочная система плода вступает в каналикулярную стадию. Главными результатами этой фазы развития легких являются рост респираторного эпителия и образование респираторных бронхиол, а также будущих легочных ацинусов. Кроме того, в результате этой фазы развития существенно расширяется капиллярное русло в дистальных отделах легкого [7].

Согласно мнению Caldeira I. и соавт. (2021г.), если ребенок рождается преждевременно, в конце каналикулярной стадии, он способен выжить, потому что имеет респираторный эпителий и сопутствующее ему сосудистое русло, которое необходимо для поддержания минимального уровня газообмена, достаточного для внеутробного существования [23]. В основном ветвление дыхательных путей на этом этапе завершено, и развитие легких фокусируется на формировании элементов, необходимых для облегчения газообмена. На этом этапе происходит довольно быстрое формирование легочного сосудистого русла, обусловленное образованием капилляров в первичном интерстиции легких. Также, именно на этом этапе кубический эпителий II типа дифференцируется в сквамозные клетки I типа. Данная дифференцировка является необходимым этапом, так как клетки II типа понадобятся для выработки и секреции сурфактанта, который является необходимым для предотвращения спадения альвеол при дыхании, в то время как клетки, относящиеся к I типу, сформируют тонкий слой, необходимый в будущем для процесса газообмена. К 24 неделям гестации легкие выглядят под микроскопом как альвеолярная структура, т.к. периферические воздушные пути расширяются. Одновременно с этим процессом уменьшается окружающая мезенхима, что означает начало саккулярной (терминальной) стадии развития легких [7; 86]. Необходимая для дальнейшего развития легких

клеточная дифференцировка происходит в эпителии дыхательных путей и мезенхиме (проксимальной и дистальной). Это видно по увеличению количества реснитчатых клеток, нереснитчатых клеток Клара, базальных и нейроэндокринных клеток в проксимальном эпителии и по созреванию клеток I и II типа в дистальном эпителии. В этот период начинает формироваться структурная опора легких в виде эластических волокон [23].

Еще в 1999 году Perl A.K. и соавторами было показано, что альвеоляризация является очень длительным процессом, продолжающимся в развитии легких человека в течение нескольких лет и происходит одновременно с созреванием микрососудов легких [86]. При этом, важно отметить, что ранние процессы альвеоляризации начинаются еще внутриутробно, при этом поздняя фаза развития легких, во время которой происходит завершение альвеоляризации, а также созревание микрососудов, проходит после рождения человека, в среде, где необходимо дышать воздухом. Обычно она заканчивается в течение первых 2-3 лет жизни, но может продолжаться и более длительно [7; 104].

Когда процесс формирования альвеол в какой-либо области легких завершается, начинается переход в фазу созревания микрососудистого русла легких, которое является завершающим этапом создания этой комплексной структуры. Данный этап необходим, поскольку происходит создание поверхности, без которой процесс эффективного газообмена невозможен.

Недоношенные дети, подверженные наибольшему риску формирования БЛД, рождаются на 24-28 неделях гестации, во время поздней каналикулярной или же саккулярной стадии формирования легких, как раз в тот момент, когда дыхательные пути примыкают к легочным сосудам. Хотя применяемая в настоящее время заместительная терапия экзогенными сурфактантами устраняет биохимические и функциональные аспекты недоношенного легкого, она не устраняет лежащую в его основе структурную незрелость [29; 104].

Легкие отличаются от большинства других органов тем, что имеют двойную сосудистую систему: бронхиальную, оксигенирующую нереспираторные части легкого, и легочную, которая доставляет кровь к легким для оксигенации и возвращает ее назад к сердцу. Однако большая часть исследований, направленных на изучение легких, до сих пор была сосредоточена главным образом на ветвлении дыхательных путей, а не на развитии сосудов.

Формирование сосудистой сети легких состоит включает в себя три самостоятельных процесса:

- 1) формирование проксимального сосудистого русла в процессе ангиогенеза;
- 2) формирование дистального (микроциркуляторного) сосудистого русла в процессе васкулогенеза;
- 3) объединение перечисленных двух русел путем слияния проксимальных и дистальных сосудов.

Следует отметить, что ангиогенез - это процесс образования новых кровеносных сосудов из уже существующих, т.е. их деление, в то время как васкулогенез – это образование новых сосудов из эндотелиальных клеток-предшественников.

DeMello D.E. и соавт. (1997г.) считают, что две существующие группы легочных сосудов, а именно проксимальные и дистальные, развиваются совершенно независимо друг от друга, но в дальнейшем, во время псевдогландулярной стадии формирования легких эти две независимые сосудистые сети сливаются в единую сосудистую сеть [35]. Это предположение подтверждают данные, полученные другими исследователями [34; 62; 69], но совсем недавно были выдвинуты еще две теории развития легочных сосудов. В соответствии с первой, проксимальная сосудистая сеть формируется путем васкулогенеза, а дистальная сосудистая сеть образуется путем непосредственной дифференцировки мезенхимы в ангиобласты [45; 46]. Эту теорию поддержали Schachtner и соавт., которые обнаружили

эндотелиальные клетки-предшественники формирующейся легочной сосудистой сети еще до образования просвета сосудов. Эта находка подтверждает теорию формирования кровеносных сосудов с помощью васкулогенеза, а не ангиогенеза. Более того, проксимальные и дистальные артерии неразрывно связаны друг с другом уже на ранних этапах развития легких [95].

Parera M.C., van Dooren M. и др. (2005г.) приводят убедительные доказательства, оспаривающие другие теории, и предлагают свое объяснение механизма, управляемого дистального ангиогенеза при развитии сосудов легких. Было продемонстрировано, что даже самые первые образующиеся кровеносные сосуды развивающегося легкого уже включены в эмбриональное кровообращение. Сосудистая сеть легких начинает формироваться у эмбриона мыши в течение первых нескольких дней после начала развития легких, быстро расширяется и подвергается ремоделированию по мере развития дыхательных путей [84].

Эпителиально-эндотелиальные взаимодействия между капиллярными сплетениями и эпителиальным зачатком легких контролируют ангиогенез, обеспечивая расширение сосудистой сети, скоординированное с развитием дыхательных путей [35]. В этом помогают сигнальные пути фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Еще в 1996 году были проведены работы двумя группами авторов (Carmeliet P., Ferreira V. и др. и Ferrara N., Carver-Moore K. и др.), в которых удаление у мыши даже одного аллеля *Vegf* приводит к формированию летального фенотипа, что свидетельствует о важности дозозависимой регуляции VEGF [25; 39].

При преждевременных родах нарушается нормальная последовательность развития легких, что приводит к гистологической картине упрощения альвеол и нарушенному или «дисморфному» росту сосудов. Различные модели БЛД на животных и аутопсийные исследования детей с данной патологией демонстрировали уменьшение количества мелких артерий и аномальное распределение сосудов в дистальном отделе легкого [66;

67; 80; 105]. Согласно исследованию Bhatt A.J. и соавт. (2001г.), сравнение образцов аутопсии, взятых у младенцев, умерших от БЛД, с образцами младенцев, умерших без заболевания легких в аналогичном возрасте после зачатия, показало, что в легких младенцев с БЛД наблюдалось общее снижение иммуноокрашивания эндотелиального специфического маркера CD31, что свидетельствует о снижении плотности легочных микрососудов. Более того, легочные капилляры, когда они присутствовали, казались аномально расширенными и часто располагались внутри утолщенных альвеолярных перегородок, а не непосредственно примыкали к альвеолярному эпителию [21].

В своем первоначальном описании БЛД W. Northway отметил, что у некоторых пациентов наблюдались признаки медиальной гипертрофии легочных артерий, что указывает на развитие такого тяжелого осложнения БЛД, как легочная гипертензия [82]. Этот гистологический вывод был подтвержден клиническими исследованиями, демонстрирующими повышение давления в легочной артерии и сопротивления в легочных сосудах при катетеризации сердца или эхокардиографии у выживших пациентов с БЛД. В одном из таких исследований J.C. Fouron и соавт. было обнаружено, что у большинства пациентов с БЛД в «острой фазе» наблюдались эхокардиографические признаки ЛГ и что легочное давление оставалось высоким у тех младенцев, которые в конечном итоге умерли, но нормализовалось у младенцев, которые выздоровели [42].

Несмотря на внедрение в протоколы респираторной поддержки введения экзогенного сурфактанта пациентам с РДСН, развитие ЛГ остается важной особенностью заболевания для пациентов, формирующих БЛД, и существенно влияет на долгосрочный прогноз. В проспективном исследовании Mourani P.M. и соавт. (2015г.) с использованием расширенного определения ЛГ на основе эхокардиограммы ранние признаки легочной гипертензии были обнаружены более чем у 40% недоношенных младенцев в возрасте 7 дней, а поздние признаки - почти у 15% младенцев после 30 дней

жизни [81]. У пациентов, формирующих тяжелую БЛД, частота поздней ЛГ, по-видимому, составляет от 30 до 50%. Более того, наличие ЛГ у пациентов с БЛД независимо связано с большим увеличением шансов смерти [60; 81; 96;], причем в исследовании Khemani E. и соавт. (2007г.) показатель выживаемости младенцев с ЛГ в первые 6 месяцев составил всего $65\pm 8\%$. [58]. Следует отметить, что риск смерти, по-видимому, наиболее высок в первые 6 месяцев после постановки диагноза ЛГ, и большинство младенцев с БЛД и ЛГ, которые доживают в среднем до 10-месячного возраста, демонстрируют уменьшение тяжести ЛГ [58].

Многочисленные факторы риска связаны с повышенной частотой ЛГ у пациентов, страдающих бронхолегочной дисплазией. К ним относятся следующие: маловодие, низкие оценки по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, неонатальный сепсис, задержка внутриутробного развития плода, а также длительное использование режимов вентиляции легких с положительным давлением [9; 58; 60; 64]. Следует отметить, что, хотя риск развития ЛГ значительно выше у пациентов с тяжелым течением БЛД [9; 60], у небольшого процента младенцев без БЛД и с БЛД легкой или умеренной степени тяжести также может развиться поздняя ЛГ. Это говорит о том, что риск развития поздней ЛГ не определяется в первую очередь тяжестью бронхолегочной дисплазии [81]. Кроме того, в своем исследовании 2014 года Mirza H. и соавт. продемонстрировали, что ранняя ЛГ, по-видимому, является предиктором формирования БЛД [78], что еще раз подчеркивает связь между аномалиями легочного кровообращения и нарушениями развития дистальных отделов легких. Также отмечено, что частота встречаемости ЛГ у пациентов с тяжелой БЛД снижается с ростом недоношенного младенца – к 40 неделям ПКВ [9]. Хотя полное понимание механизмов, приводящих к развитию ЛГ у данных пациентов, отсутствует, результаты современных исследований свидетельствуют о том, что у пациентов с БЛД и ЛГ наблюдаются нарушения, как в гладкой мускулатуре сосудистой стенки, так и в ее тоне [9; 64; 78]. Раннее выявление ЛГ и назначение соответствующей терапии способно

значительно улучшить качество жизни этой когорты пациентов, а также снизить частоту летальных исходов у пациентов с тяжелой формой БЛД, осложненной ЛГ [9].

Недавнее посмертное исследование новорожденных, умерших после проведения механической вентиляции легких различной продолжительности, подтвердило уменьшение количества сосудистых разветвлений артерий, но, что интересно, содержание молекул адгезии эндотелиальных клеток к тромбоцитам-1 (PECAM-1) было снижено у младенцев, умерших после кратковременной вентиляции легких, но было увеличено после продолжительной вентиляции легких [33]. Эти данные свидетельствуют о временном снижении эндотелиальной пролиферации с последующим быстрым пролиферативным ответом, несмотря на уменьшение количества сосудов. Это наблюдение предполагает, что дисморфический рост сосудов легких при БЛД не обязательно может быть результатом простого уменьшения количества эндотелиальных клеток, что указывает на необходимость дифференцировать различные механизмы, регулирующие выживание эндотелиальных клеток: пролиферацию, миграцию, формирование сосудов и созревание, особенно в ответ на повреждение. В дополнение к дисморфному росту легочная сосудистая сеть при БЛД подвергается гипертензивному структурному ремоделированию, которое включает медиальную гипертрофию и дистальную мускуляризацию мелких периферических артерий [106]. Патологическая вазореактивность, снижение количества артерий и структурные аномалии сосудистой стенки могут способствовать развитию легочной гипертензии при БЛД, приводя к значительной заболеваемости и смертности [17]. Интересно, что недавние исследования на животных продемонстрировали, что гипертония сама по себе может ингибировать рост сосудов и нарушать альвеоляризацию в развивающемся легком, предполагая, что гемодинамический стресс может быть дополнительным механизмом формирования аномальной структуры легких при БЛД [43].

1.3. Биологическая роль наиболее изученных факторов ангиогенеза

Достижения современной перинатальной медицины позволили расширить наши представления о формировании классической и новой форм БЛД, однако не все звенья патогенеза этого заболевания изучены достаточно подробно. Существенный интерес представляют не только нарушения формирования альвеол, но и нарушения формирования микрососудистого русла малого круга кровообращения, сопровождающиеся ремоделированием ткани легких у преждевременно рожденных детей. В частности, особое внимание в изучении контролируемого ангиогенеза уделяется балансу между проангиогенными и антиангиогенными молекулярными сигнальными путями при развитии БЛД. Тем более, что изменения, происходящие на молекулярном, а также клеточном уровнях выявить современными методами диагностики пока не представляется возможным, особенно на доклиническом этапе развития патологического процесса.

В настоящее время преобладание новой формы БЛД, обусловленное достижениями неонатальной реанимации, диктует необходимость разработки дополнительных диагностических подходов для выявления всех пациентов с респираторными нарушениями, возникшими в результате незрелости легких и их повреждения, уже в неонатальном периоде, на этапе формирования БЛД. Это подчеркивает перспективность изучения предикторов нарушения ангиогенеза, играющих существенную роль в патогенезе развития данной патологии. Наряду с исследованиями повреждений респираторной системы недоношенного ребенка, связанных с оксидативным стрессом, фетоплацентарной недостаточностью, сигнальной системой факторов роста, ремоделированием внеклеточного матрикса и микроРНК (малые некодируемые молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов), изучаются и генетические предикторы формирования БЛД [68; 90]. Особый интерес для понимания патогенеза новой формы БЛД представляет гистопатологический анализ нарушений альвеоляризации легочной ткани и васкуляризации

альвеолярной стенки (обеспечение ее кровеносными сосудами), а также патологической неоваскуляризации (патологический рост микрососудов). Согласно «сосудистой» гипотезе формирования БЛД, в основе патологических изменений лежит дисбаланс между про- и антиангиогенными молекулярными сигнальными путями. Предполагается, что внутриклеточные нарушения процессов происходят в легких до момента постановки диагноза БЛД, возможно еще во внутриутробном периоде.

В настоящее время к проангиогенным факторам относят: ангиопэтин-1 (ANGPT-1), ангиопэтин-2 (ANGPT-2), факторы роста эндотелия сосудов А и D (VEGF-A, VEGF-D), тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB), молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1 (PECAM-1) [10; 90]. Фактор роста соединительной ткани (CTGF) считается антиангиогенным фактором [114]. Кроме того, ангиопэтин-2 может приобретать антиангиогенную активность при угнетении проангиогенных сигнальных путей, что приводит к регрессу микрососудистого русла [13; 20]. Помимо перечисленных факторов, значимую роль в ангиогенезе играют следующие: трансформирующий фактор роста β (TGF- β), тромбоспондин-1 (TSP-1), фактор роста фибробластов-10 (FGF-10), интерлейкин-8 (IL-8) [10].

Агрессивное воздействие неонатальной реанимации, в особенности «жесткие» режимы вентиляции и гипероксия при проведении необходимой респираторной поддержки, могут приводить к оксидативному стрессу, усугубляющему повреждение легочной ткани и микрососудистого русла с развитием такого грозного осложнения, как легочная гипертензия у детей с БЛД, что существенно уменьшает шансы на благоприятный исход заболевания [47; 48]. Профилактика развития ЛГ при бронхолегочной дисплазии в настоящее время является актуальной проблемой неонатологии, требующей проведения дополнительных исследований. В частности, особый интерес представляют данные об изменении содержания факторов роста в сыворотке крови пациента, формирующего БЛД. Эксперименты на животных

доказали нарушение регуляции многих сигнальных факторов у пациентов с БЛД, осложненной легочной гипертензией [30; 99; 113].

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) относится к одним из самых значимых для ангиогенеза факторов [40]. Он имеет большое количество подтипов, таких как VEGF-A, VEGF-D и др., выполняющих схожую функцию. Ключевая биологическая роль этого специфичного для клеток эндотелия биомаркера заключается в ремоделировании сосудистого русла. Экспериментальные данные ряда зарубежных исследований свидетельствуют о катастрофических последствиях инактивации аллелей VEGF и блокировке рецепторов VEGF (VEGFR-1 и VEGFR-2) [25; 39], приводившей к летальным фенотипам, характеризующимся недостаточной организацией эндотелиальных клеток. Таким образом, была показана абсолютная необходимость VEGF для развития эмбриональной сосудистой сети у мышей.

Известно, что фето-плацентарная недостаточность приводит к снижению содержания VEGF и к повышению содержания растворимой fms-подобной тирозинкиназы 1 (sFlt-1) в крови системы мать-плод. Доказано, что высокая концентрация данного биомаркера ассоциирована с задержкой внутриутробного развития плода, а также с нарушением формирования микрососудистого русла легких и альвеол. Данные нарушения непосредственно связаны с высоким риском развития бронхолегочной дисплазии и легочной гипертензии у недоношенных младенцев постнеонатальном периоде [77]. Дисбаланс содержания VEGF и sFlt-1 в трахеальных аспиратах глубоко недоношенных детей тесно связан с риском формирования БЛД на фоне раннего нарушения ангиогенеза в легких. Нарушение альвеоляризации и васкуляризации также связано со снижением экспрессии VEGF и активацией рецептора 2 VEGF (VEGFR2) [26; 111].

Недоношенность и высокий риск формирования БЛД зачастую связаны с хориоамнионитом (ХА) у беременной женщины [65; 97]. Моделирование хориоамнионита в экспериментах на лабораторных животных показало, что

воздействие эндотоксина на этапе внутриутробного развития может приводить к пневмониям и повреждать микрососудистое русло легочной ткани у овец [113]. Доказано, что хориоамнионит у беременных женщин приводит к повышению уровня белка sFlt-1 на фоне нарастания концентраций медиаторов воспаления в сыворотке крови, что может способствовать нарушению ангиогенеза на фоне изменений экспрессии VEGF [65]. Кроме того, в зарубежном исследовании 2010 года было выявлено снижение экспрессии VEGF у глубоко недоношенных детей в раннем постнатальном периоде, что приводило к нарушению альвеоло- и ангиогенеза. Результаты данного исследования продемонстрировали существенное снижение содержания фактора роста эндотелия сосудов в аспиратах у недоношенных младенцев с гестационным возрастом 28-29 недель в момент рождения, а также на 3 сутки жизни. В постнеонатальном периоде у данных пациентов сформировалась БЛД, что еще раз продемонстрировало участие VEGF в развитии данного заболевания [19].

В 2017 году Dumas de la Roque E. и соавторами в эксперименте на животных было показано, что нарушение нормального развития микрососудистой сети легких связано с изменением передачи сигналов между развивающимся эпителием и эндотелием сосудов легочной ткани. Функционирование этих сигнальных путей также обеспечивается молекулами VEGF и эндотелиального оксида азота (eNO). Их концентрация существенно увеличивается в процессе ангиогенеза в легочной ткани, особенно на поздних сроках гестации [36].

В исследовании Melincović S.S. и соавторов (2018г.) было подтверждено угнетение роста сосудов легких, сопровождающееся патологической вазодилатацией на фоне фармакологического ингибирования рецепторов VEGF [76]. Нарастающее на этом фоне общее сосудистое сопротивление приводит к выраженной вазоконстрикции, поддерживающей гемодинамическую нестабильность и способствующей развитию ЛГ.

Ангиопоэтины синтезируются в тесной связи с VEGF и являются ключевыми факторами ангиогенеза [102]. Ангиопоэтины 1-го и 2-го типов (ANGPT-1, ANGPT-2) являются ведущими регуляторами физиологической и патологической неоваскуляризации. В проведенном зарубежном исследовании 2011 года было продемонстрировано, что комбинированная генная терапия VEGF и ANGPT-1, примененная у новорожденных крысят, стимулировала развитие и васкуляризацию легочной ткани с гораздо большим эффектом, чем однокомпонентное введение VEGF [94].

В зарубежном исследовании 2014 года у пациентов с тяжелым течением БЛД и ЛГ было определено соотношение уровней эндостатина и ангиопоэтина-1. Значительное повышение этого соотношения на первой неделе жизни у данной категории больных по сравнению с недоношенными детьми, у которых БЛД не была осложнена легочной гипертензией, свидетельствует о том, что этот показатель может служить биомаркером формирования ЛГ при тяжелом течении БЛД [59]. В эксперименте на мышах было показано ангиопротективное действие ANGPT-1 при внутриутробных нарушениях альвеоло- и ангиогенеза за счет инфекционных эндотоксинов [93].

Ангиопоэтин-2 (ANGPT-2) также является важным фактором нарушений ангиогенеза при БЛД. С одной стороны, данный фактор может взаимодействовать с другим ключевым проангиогенным фактором – VEGF, совместно стимулируя процессы ангиогенеза в условиях воздействия гипоксии. С другой стороны, он может играть совершенно противоположную роль – при выраженном недостатке проангиогенных сигналов, ANGPT-2 может способствовать гибели клеток эндотелия, приводя к регрессу формирующегося микрососудистого русла [13; 20].

Тромбоспондин-1 в структурном плане относится к гликопротеинам внеклеточного матрикса, в функциональном плане является фактором антиангиогенной направленности. В зарубежной работе 2010 года было продемонстрировано, что уровень данного фактора в полученных при аутопсии

образцах ткани легких глубоко недоношенных детей (24-27 недель гестации при рождении), которым проводилась традиционная искусственная вентиляция легких, был значимо повышен по сравнению с его уровнем у младенцев аналогичного гестационного возраста, которым проведение традиционной ИВЛ не требовалось [32].

Семейство тромбоцитарных факторов роста включает PDGF-AA и PDGF-BB. Они играют существенную роль в патогенезе БЛД, обеспечивая нормальную септацию и альвеоляризацию легочной ткани. У недоношенных новорожденных, формирующих БЛД, отмечено снижение экспрессии PDGF в мезенхимальных стромальных клетках легких [83]. В исследовании 2020 года было обнаружено, что уровни PDGF-AA и PDGF-BB в сыворотке крови новорожденных на седьмые сутки жизни снижены в группе детей с легочно-сосудистым заболеванием по сравнению с младенцами без данных заболеваний [16].

PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1) является гликопротеином клеточной мембраны. PECAM-1 жестко регулируется в сосудистой сети. Появляется все больше фактов, указывающих на то, что PECAM-1 способствует поддержанию целостности сосудов в покоящихся клетках, а также играет роль в восстановлении целостности сосудов после разрушения сосудистого барьера [87]. PECAM-1 может отщепляться от эндотелиальных клеток, что приводит к секретируемой, выделяемой форме белка (sPECAM-1), которая является растворимой и может высвободиться в кровоток, оказывая провоспалительное действие [22; 41]. Активированные воспалительные клетки могут подвергаться отделению внеклеточного домена PECAM-1, что приводит к потере межклеточной адгезии и способствует увеличению циркулирующего sPECAM-1 [41]. Таким образом, циркулирующие уровни sPECAM-1 могут рассматриваться в качестве биомаркера для выявления и мониторинга развития РДСН и повреждения легких, вызванного искусственной вентиляцией легких, а стабильно высокие уровни sPECAM-1

могут указывать на продолжающееся повреждение. Используя клинически значимую экспериментальную модель РДСН и ИВЛ у животных с сепсисом или без него, Villar et al показали, что экспрессия PECAM-1 в легких модулируется механической вентиляцией легких. Их данные убедительно свидетельствуют о том, что потеря PECAM-1 способствует повышению проницаемости сосудистого барьера с последующим образованием отека, лейкоцитарной инфильтрацией и тяжелой гипоксемией [108].

Фактор роста фибробластов (FGF) обозначает комплекс белковых структур, активно участвующих в регуляции ангиогенеза. В настоящее время семейство FGF включает 19 различных белков. Одним из наиболее важных биомаркеров, влияющих на развитие легочной ткани, является FGF-10. Результаты проведенных научных исследований на экспериментальных моделях животных указывают на значимую роль FGF-10 в протекции и регенерации ткани легких при воздействии различных механизмов повреждения: воспалении, пневмофиброзе и др. [37]. В настоящее время доказано, что FGF-10 играет определяющую роль в морфогенезе ветвления и формировании микрососудистого русла легочной ткани на антенатальном этапе развития. Кроме того, мыши, обладающие гипоморфным аллелем для FGF-10, имеют сниженную экспрессию VEGF-A и PECAM-1, что приводит к аномальному развитию и ветвлению сосудов легких [27; 28].

Уникальным биомаркером нарушений альвеоло- и ангиогенеза является фактор роста соединительной ткани (CTGF) – белок клеточной матрицы, играющий немаловажную роль в патогенезе пневмофиброза и сосудистых нарушений у взрослых [112]. Эксперименты на животных показали, что гипероксия повышает экспрессию CTGF в легких новорожденных крысят [30]. Результаты американского исследования продемонстрировали, что повышенная экспрессия CTGF в эпителии респираторного тракта и альвеолоцитах II типа у новорожденных мышей приводит к выраженному нарушению альвеоляризации и формирования микрососудистого русла легких, а также к развитию таких осложнений, как ЛГ и ГПЖ, выявляемых при

проведении ЭХО-КГ [114]. Очевидно, что изменения экспрессии *CTGF* в клетках бронхолегочной системы являются значимым фактором патогенеза БЛД.

CTGF является своеобразным организующим звеном в процессах фиброобразования, поскольку его универсальная молекулярная структура позволяет ему легко связываться с другими ключевыми факторами ангиогенеза, такими как $TGF-\beta$, *VEGF* и др. [89].

В отечественном исследовании клинико-генетических особенностей развития новой формы БЛД у недоношенных детей путем полноэкзомного секвенирования ДНК, выделенной из клеток буккальных соскобов ста пациентов с данным заболеванием, было определено 8 генетических вариантов, частота представленности которых у детей с бронхолегочной дисплазией значимо отличалась от контрольной группы. В том числе, для генетического варианта *CTGF* были получены достоверные различия для пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД [4].

Гетеродимерный комплекс интегрин на поверхности клетки является основным рецептором *CTGF*, а ключевым медиатором передачи сигналов для взаимодействия с цитоплазматической областью β -интегринов является интегрин-связанная киназа, активация которой приводит к запуску целого ряда клеточных процессов [75]. Связь *CTGF* с липопротеинами низкой плотности через рецептор–связанный белок 5/6 модулирует передачу сигналов *Wnt*/ β -катенина (*wingless/Int*), что необходимо для морфогенеза легких. Дисрегуляция этой передачи лежит в основе патогенеза ряда бронхолегочных заболеваний, в том числе пневмофиброза и повреждения легких у новорожденных на фоне гипероксии [61; 107].

Изучение экспрессии *CTGF* проводилось на аутопсийном биоматериале легких у пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД. Кроме того, в ряде исследований были использованы экспериментальные модели БЛД у животных. В частности, было оценено влияние *CTGF*-нейтрализующего моноклонального антитела на

предотвращение повреждения легких новорожденных крысят, вызванного гипероксией. В исследованиях американских ученых было показано, что экспрессия CTGF нарастает в легочной ткани крысят, формирующих БЛД. В эксперименте под воздействием 90% кислорода в течение 14 дней происходила активация передачи сигналов β -катенина, что угнетало процесс альвеоляризации и ангиогенез, с последующим развитием легочной гипертензии. Введение CTGF-нейтрализующего моноклонального антитела купировало передачу сигналов β -катенина с последующей нормализацией формирования альвеол и микрососудистого русла легких, что, в свою очередь уменьшало степень ЛГ [14; 15].

Известно несколько факторов, активирующих экспрессию CTGF с последующим ремоделированием легочной ткани. Наиболее хорошо изученными являются трансформирующий фактор роста β (TGF- β), участвующий в регуляции роста клеток, их дифференцировке и миграции, а также в биосинтезе белков экстрацеллюлярного матрикса и регуляции васкуляризации [24; 115]. Причем, взаимодействие CTGF с TGF- β лишь усиливает его связь с рецепторами, приводя к облегчению передачи сигналов в клетку. Но при взаимодействии CTGF с VEGF возникает совершенно иная ситуация - происходит выраженное снижение доступности VEGF для его рецепторов, в следствии чего отмечается ингибирование процессов ангиогенеза, которые индуцирует VEGF [51].

При индуцированной сверхэкспрессии CTGF у новорожденных крысят происходит ремоделирование периферических легочных сосудов с утолщением их медиальной стенки [114].

В настоящее время привлекает к себе пристальное внимание тезис о том, что сверхэкспрессия CTGF приводит к усилению воспалительной реакции в легких в неонатальном периоде, причем инфильтрация воспалительными клетками усиливается как в периальвеолярных, так и в периваскулярных областях [58]. Speer С.Р. считает, что пневмонический процесс, возникший как в пренатальном, так и в постнатальном периоде, является ключевым

медиатором повреждения легочной ткани и микрососудистого русла на этапе формирования БЛД [98].

Ранее считалось, что CTGF может являться как про-, так и антиангиогенным фактором. В эксперименте было показано, что в организме мышей даже в случае инактивации CTGF может осуществляться нормальный ангиогенез, что позволяло считать эндогенный CTGF несущественным фактором для развития микрососудистого русла легких [63]. В то же время современные исследования доказывают, что CTGF проявляет антиангиогенную активность при взаимодействии с VEGF, являющимся фактором выживания эндотелиальных клеток, к которым относятся и альвеолоциты II типа. CTGF в комплексе с VEGF ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGFR2 в экстрацеллюлярном матриксе эндотелия аорты, таким образом ингибируя ангиогенез [44; 63].

Соответственно, в настоящее время считается, что эпителиальная сверхэкспрессия CTGF может ингибировать альвеоло- и ангиогенез через VEGF-зависимый механизм [51]. Увеличение экспрессии CTGF в альвеолоцитах II типа у новорожденных может приводить к формированию БЛД [30].

Таким образом, изучение взаимодействия факторов роста, факторов транскрипции и воспалительных процессов, регулирующих нормальное развитие легочной паренхимы и микрососудистого русла, является актуальным направлением научного поиска на современном этапе, так как нарушения этого взаимодействия в неонатальном периоде жизни ребенка могут приводить к формированию БЛД. Изучение роли приведенных выше биомаркеров (TGF- β , CTGF, FGF-10, VEGF, ангиопоэтины и др.) может помочь в профилактике развития БЛД на этапе РДСН и ранней диагностике заболевания у недоношенных детей.

Многофакторность формирования БЛД определяет сложность оценки патогенетических механизмов формирования данного заболевания. Одним из наиболее важных звеньев патогенеза данного заболевания является нарушение

ангиогенеза микрососудистой системы легких, приводящее к дисморфозу альвеолярно-капиллярной системы, который в свою очередь определяет тяжесть течения заболевания и развитие такого грозного осложнения, как легочная гипертензия. Основными факторами риска, вызывающими нарушение альвеоло- и ангиогенеза, являются гипоксия, гипероксия и последствия искусственной вентиляции легких, приводящие к оксидативному стрессу и воспалительным реакциям.

Для разработки профилактических подходов, регулирующих нормальное развитие паренхимы и микрососудистого русла легких, необходим анализ процессов взаимодействия факторов роста, транскрипции и провоспалительных факторов.

Сосудистая гипотеза формирования БЛД предполагает дальнейшее изучение значимых для этого процесса биомаркеров с целью улучшения ранней диагностики и профилактики развития этого заболевания и его осложнений. Результаты международных научных исследований свидетельствуют о необходимости понимания особенностей микрососудистой системы легких в норме и при патологии с целью разработки новых методов лечения, направленных на стимулирование правильного альвеоло- и ангиогенеза, а также на профилактику развития легочной гипертензии у недоношенных детей, сформировавших БЛД.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, Фисенко Андрей Петрович) в 2022-2023 годах. Набор пациентов производился в отделении патологии новорождённых и детей раннего детского возраста (заведующая отделением – кандидат медицинских наук Басаргина Милана Александровна). Лабораторная часть выполнялась в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии (заведующая лабораторией – кандидат медицинских наук Алябьева Наталья Михайловна, руководитель лабораторного отдела – доктор медицинских наук Семикина Елена Леонидовна).

В исследование было включено 164 недоношенных ребенка, находящихся на госпитализации в отделении патологии новорожденных и детей раннего детского возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», в том числе 25 детей, обследованных в неонатальном периоде в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных ГБУЗ МО «МОПЦ» г. Балашиха.

2.1. Дизайн исследования

Для решения поставленных задач нами был разработан дизайн исследования (рисунок 2.1).

2.2. Критерии включения пациентов в исследование и исключения пациентов из исследования

Критерии включения в исследование:

- недоношенные дети с респираторным дистресс-синдромом новорожденных до 28 суток жизни

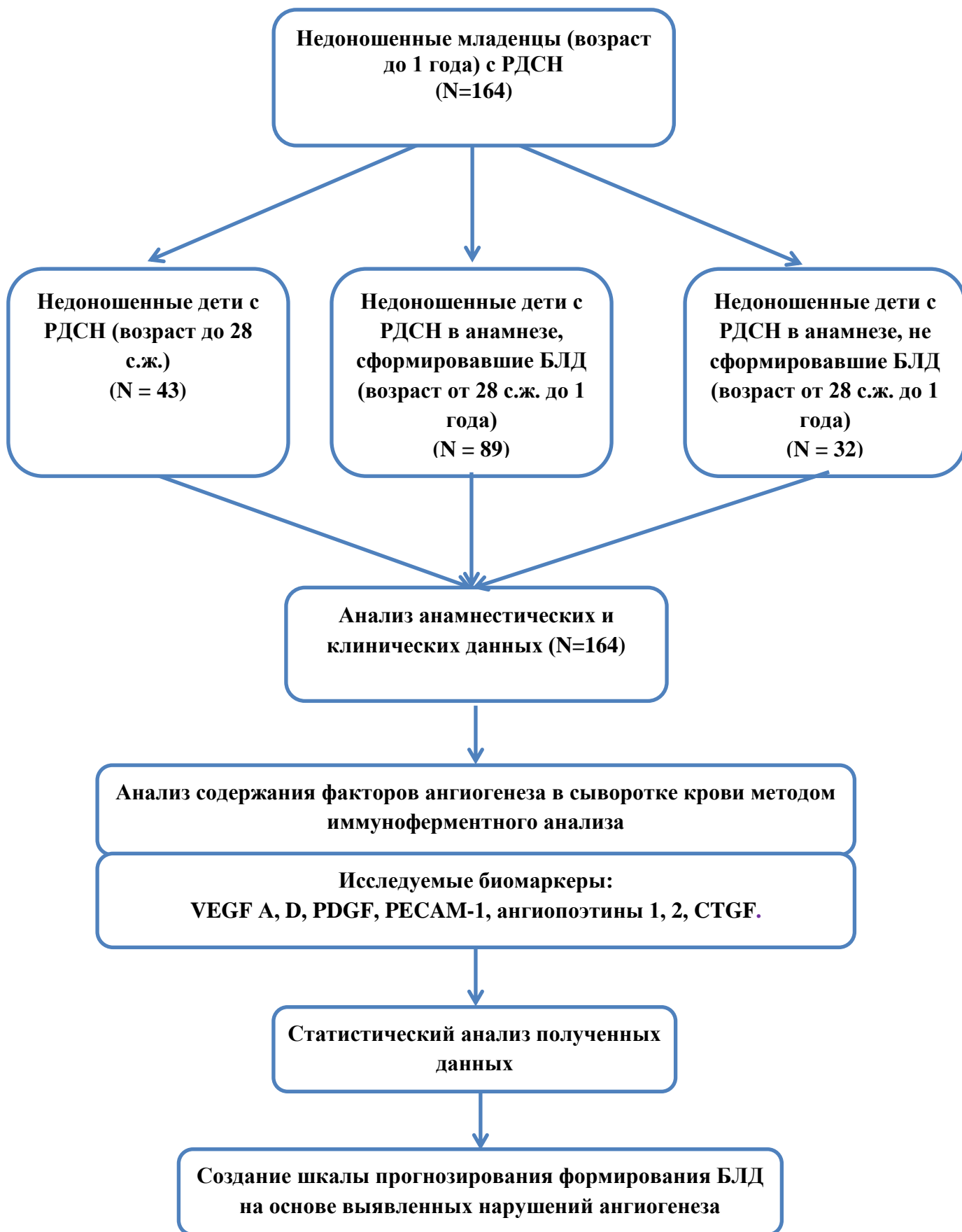


Рисунок. 2.1. Дизайн исследования.

- недоношенные дети в возрасте от 28 суток до 12 месяцев жизни, сформировавшие и не сформировавшие бронхолегочную дисплазию с РДСН в анамнезе
- подписанное добровольное информированное согласие родителей/законных представителей на проведение исследования у их ребенка

Критерии исключения из исследования:

- возраст ребенка на момент обследования более 12 месяцев
- дети с врожденным стридором, врожденными пороками респираторной и/или сердечно-сосудистой систем, муковисцидозом
- доношенные дети
- отказ родителей/законных представителей от участия их ребенка в исследовании

2.3. Клинико-anamnestическая характеристика обследованных детей

В начале исследования была проведена оценка клинико-anamnestических данных (наличие/отсутствие хориоамнионита и проведения профилактики РДСН кортикостероидами у беременной женщины; гендерная принадлежность, срок гестации и показатель массы тела недоношенных новорожденных при рождении, кратность введения препаратов экзогенного сурфактанта, оценки по шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни, методы и длительность проводимой искусственной вентиляции лёгких, оценка наличия легочной гипертензии по данным ЭХО-КГ, а также возраст пациентов на момент обследования).

У матерей 11 пациентов из 164 (6,7%) было зафиксировано течение инфекционного процесса – хориоамнионита. Профилактика РДСН кортикостероидами проводилась 54 беременным женщинам (33%).

Практически всем детям при рождении были введены препараты экзогенного сурфактанта – 128 детям из 164 (78%). Повторное введение потребовали 22 пациента, включенных в исследование (13%).

Возраст пациентов составил от 1 дня до 1 года. Ме=36 дней [26; 70].

По половому признаку пациенты разделились примерно поровну. Из 164 обследованных пациентов мальчики составили 52% (85 пациентов), девочки – 48% (79 пациентов). Значимых различий по данному признаку в группах пациентов выявлено не было, однако отмечена тенденция к преобладанию мальчиков (55%) среди пациентов, сформировавших БЛД.

Гестационный возраст при рождении у включенных в исследование пациентов составил от 23 до 36 недель. Ме=29 [27; 31]. Из них 56 детей (34%) были рождены с гестационным возрастом от 23 до 27,6 недель (глубоко недоношенными), 77 детей (47%) родились на сроке гестации от 28 до 31,6 недель, 31 ребенок (19%) родился на сроке гестации от 32 до 36,6 недель.

Показатель массы тела при рождении у пациентов исследуемой группы составил от 480 граммов до 2860 граммов. Ме=1048 [850; 1570]. Большинство обследованных детей имели экстремально низкую массу тела при рождении (менее 1000 граммов) - 87 пациентов (53%); очень низкую массу (1000-1499 граммов) - 35 пациентов (21%); низкую массу (1500 – 2499 граммов) - 29 пациентов (18%) и массу 2500 граммов и более имели 13 пациентов (8%), при этом 4 пациента родились с массой тела менее 500 граммов.

Оценка по шкале APGAR на 1 минуте составила 5,00 баллов [4,00; 6,00]. На пятой минуте - 6,50 баллов [6,00; 7,00].

По данным неоднократно проводимых всем пациентам эхокардиографических исследований (ЭХО-КГ) было выявлено 7 пациентов, у которых течение бронхолегочной дисплазии осложнилось легочной гипертензией (8%).

В общей группе обследованных детей (n=164) медиана длительности инвазивной ИВЛ составила 9,5 дней [5; 24]. При этом медиана длительности

проводимой ИВЛ, включая неинвазивную (CPAP) составила 15 дней [5; 35]. Медиана общей кислородозависимости составила 44,5 дня [15; 66].

Все пациенты по срокам взятия крови на исследование были поделены на 3 группы (таблица 2.1):

1 – недоношенные дети на этапе респираторного дистресс-синдрома новорожденных (до 28 суток жизни).

2 – недоношенные дети, сформировавшие бронхолегочную дисплазию (после 28 суток жизни). В данной группе легкое течение заболевания было зарегистрировано у 22 пациентов (25%), среднетяжелое - у 43 пациентов (48%) и тяжелое - у 24 пациентов (27%).

3 – недоношенные дети, не сформировавшие бронхолегочную дисплазию, имевшие РДСН в анамнезе).

Таблица 2.1 Количественное распределение пациентов по группам.

группа	1	2	3
количество	43	89	32

Диагноз бронхолегочная дисплазия выставлялся детям старше 28 суток жизни, при сохраняющейся потребности в дотации кислорода, а также наличии специфической рентгенологической картины легких.

Взятие крови для исследования проводилось в строго ограниченном количестве (не более 1 мл) после стабилизации состояния, учитывая массу тела ребенка, из периферических вен, после получения информированного согласия родителей/законных представителей.

На лабораторном этапе у всех детей методом иммуноферментного анализа (ИФА) были исследованы следующие биохимические маркеры в венозной крови:

Ангиопоэтин-1, ангиопоэтин-2, фактор роста эндотелия сосудов А, фактор роста эндотелия сосудов D, тромбоцитарный фактор роста ВВ,

молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1, фактор роста соединительной ткани.

2.4. Методы исследования

Исследование проводилось посредством следующих наборов для ИФА: RayBio® Human ELISA Kit для определения ANGPT-1, ANGPT-2, VEGF-A, VEGF-D, PDGF-BB, PECAM-1 и CTGF. Наборы предназначены для количественного измерения вышеперечисленных биомаркеров в сыворотке крови и плазме. В этом анализе используются антитела, специфичные к соответствующим факторам роста, нанесенные на 96-луночный планшет.

Проведение иммуноферментного анализа проводилось по стандартизированной методике. Интерпретация результатов проводилась с помощью определения средней оптической плотности для каждого набора дублирующих стандартов контролей и образцов, далее вычиталась средняя нулевая стандартная оптическая плотность, затем проводилось построение стандартной кривой со стандартной концентрацией по оси x и поглощением по оси y. Проведена прямая линия через стандартные точки.

По окончании лабораторных исследований был произведен статистический анализ полученных данных.

На этом этапе мы сопоставили клинико-anamнестические данные и уровень биохимических маркеров в сыворотке крови младенцев и определили предикторы формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей. На основании полученных данных была разработана и верифицирована шкала прогнозирования развития бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей на этапе РДСН.

2.5. Методы статистической обработки результатов исследования

При проведении статистической обработки полученных данных было выявлено, что переменные имеют распределение, отличное от нормального.

В связи с чем проведено вычисление медиан и интерквартильных размахов (25-й и 75-й перцентили). С целью анализа распределения использовался непараметрический тест Колмогорова-Смирнова. Данные описывались с указанием абсолютных и десятичных значений, а также процентных долей. В работе использовался аппарат математико-статистического системного анализа с применением пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и процессора электронных таблиц Microsoft® Excel-2019 (Microsoft, США). Корреляцию показателей оценивали с помощью ранговой корреляции Спирмена (r). Сила связи интерпретировалась как слабая при значении r от 0 до 0,3; умеренная — от 0,3 до 0,69; сильная — от 0,7 до 1; Сравнение количественных показателей в несвязанных выборках для трех групп выполнялось с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, с последующим попарным сравнением. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ НОВОРОЖДЕННЫХ И ПАЦИЕНТОВ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ, СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ БРОНХОЛЕГОЧНУЮ ДИСПЛАЗИЮ

3.1. Сравнительная оценка клинико-анамнестических характеристик исследуемых групп пациентов

В исследование было включено 164 недоношенных ребенка. На момент обследования возраст детей был менее 1 года. Всем недоношенным детям в неонатальном периоде был выставлен диагноз респираторный дистресс-синдром новорожденных. В соответствии с задачами исследования все обследуемые пациенты были разделены на 3 группы: дети с респираторным дистресс-синдромом новорожденных до 28 дней жизни включительно (первая группа, n=43); дети, сформировавшие бронхолегочную дисплазию к 29 дню жизни и/или к 36 неделе постконцептуального возраста (ПКВ) (вторая группа, n=89); дети, не сформировавшие бронхолегочную дисплазию (третья группа, n=32). В третью группу вошли дети, которые не нуждались в проведении респираторной терапии и дополнительной оксигенации после указанных сроков. Из исследования были исключены дети с врожденным стридором, врожденными пороками респираторной и/или сердечно-сосудистой систем, муковисцидозом, доношенные дети.

В первую группу вошли 43 ребенка (мальчиков – 19 (44%), девочек – 24 (56%)). Во вторую группу было включено 89 детей, причем среди пациентов, сформировавших БЛД, преобладали мальчики (49 из 89 – 55%). В третьей группе было 32 пациента, из них мальчиков – 17 (53%), девочек – 15 (47%).

На рисунке 3.1.1. представлено распределение пациентов по гендерному признаку. Значимых различий по данному признаку в группах пациентов не выявлено. Отмечается тенденция к преобладанию мальчиков (55%) среди пациентов, сформировавших БЛД.

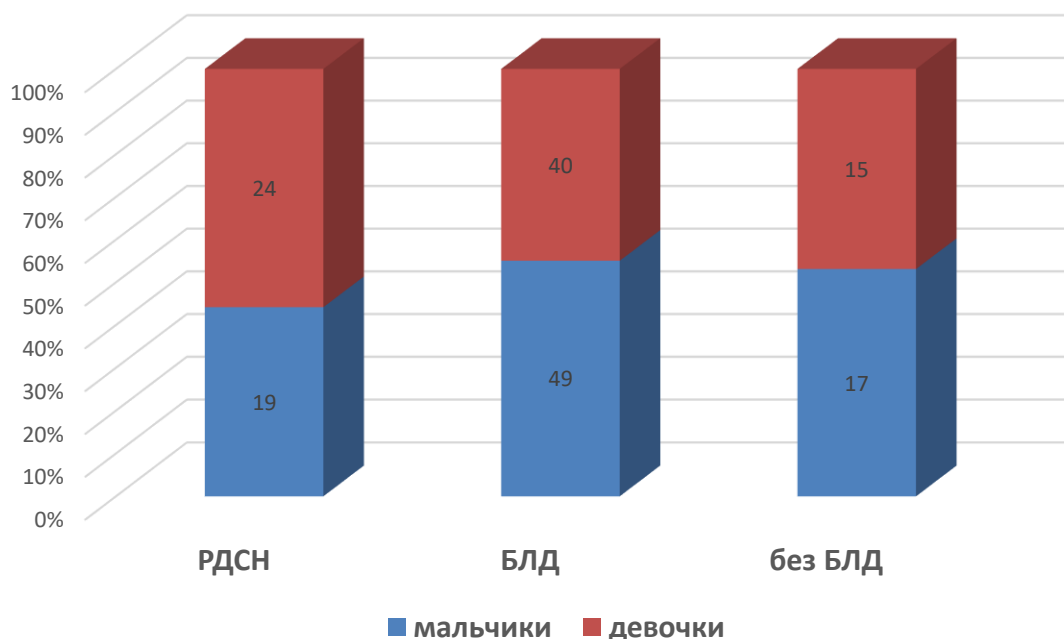


Рисунок 3.1.1. Распределение недоношенных детей с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, по гендерному признаку.

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

- от 23 недель до 27 недель 6 дней – 13 (30%)
- от 28 недель до 31 недели 6 дней – 19 (44%)
- от 32 недель до 36 недели 6 дней – 11 (26%).

Медиана гестационного возраста при рождении у детей с РДСН – 29,6 [27,3; 31,6] недель.

Во второй группе распределение недоношенных детей в соответствии с гестационным возрастом отличалось от показателей первой группы, что связано с преимущественным преобладанием глубоко недоношенных детей среди пациентов, сформировавших БЛД:

- от 23 недель до 27 недель 6 дней – 43 (48%)
- от 28 недель до 31 недели 6 дней – 45 (51%)
- от 32 недель до 36 недели 6 дней – 1 (1%)

Медиана гестационного возраста при рождении у детей, сформировавших БЛД, – 28 [26,0; 29,0] недель. Обращает на себя внимание то, что 99% детей этой группы рождены до 32-ой недели гестационного возраста.

В третьей группе пациентов распределение в соответствии с гестационным возрастом также отличалось от показателей в первой и второй группах и соответствовало общепризнанным представлениям о влиянии срока гестации при рождении на вероятность формирования БЛД:

- от 23 недель до 27 недель 6 дней – 0
- от 28 недель до 31 недели 6 дней – 13 (41%)
- от 32 недель до 36 недели 6 дней – 19 (59%)

Медиана гестационного возраста при рождении у пациентов, не сформировавших бронхолегочную дисплазию составила 33,6 [30,0; 36,0] недель.

Медиана гестационного возраста пациентов, сформировавших БЛД (вторая группа), статистически значимо отличается от аналогичного показателя в третьей группе ($p < 0,001$), что объясняется преимущественным развитием данного заболевания именно у глубоко недоношенных детей (рис. 3.1.2).

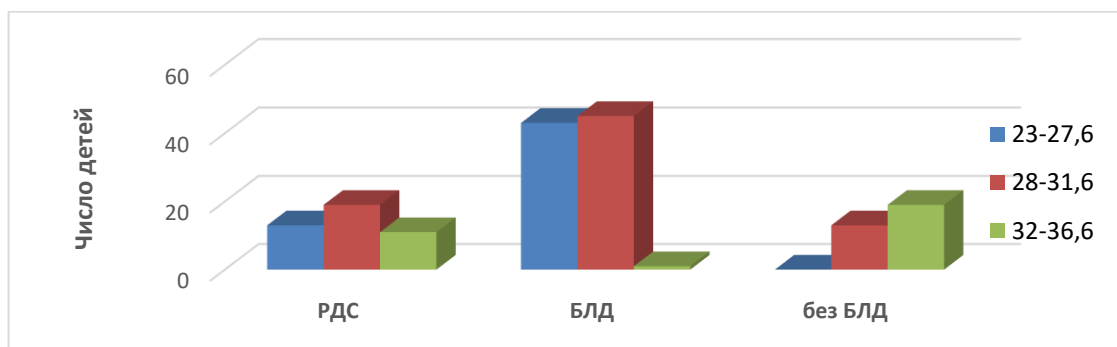


Рисунок 3.1.2. Распределение недоношенных детей с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, по гестационному возрасту при рождении.

При проведении анализа массы тела при рождении в трех исследуемых группах пациентов было выявлено, что дети, сформировавшие бронхолегочную дисплазию, на момент рождения имели более низкие

показатели массы тела. Медиана данного показателя при рождении в группе детей с РДСН– 1100 [935; 1625] г, что относится к категории ОНМТ (1000г - 1499г). Большинство детей (67 пациентов; 75,5%), сформировавших бронхолегочную дисплазию, имели ЭНМТ (менее 1000г) при рождении, 18 детей (20%) родились с ОНМТ (1000г - 1499г). При этом, в группе детей, не сформировавших БЛД, преобладали дети с массой тела 1500г и выше (71,9%), и только 28,1% детей имели очень низкую массу тела при рождении. Пациентов с ЭНМТ в этой группе не было. Данные представлены на рис. 3.1.3.

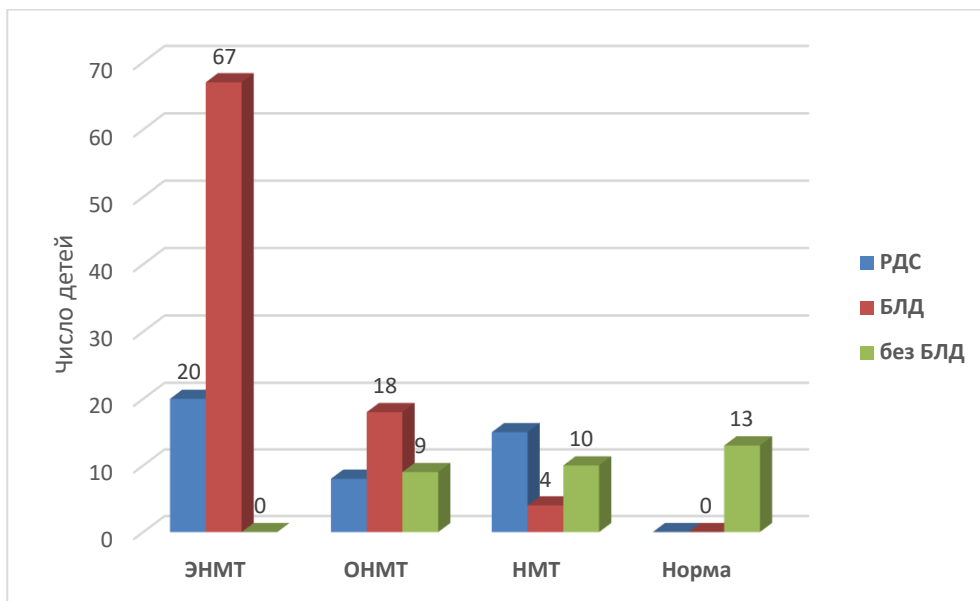


Рисунок 3.1.3. Распределение недоношенных детей на этапе РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, по массе тела при рождении.

При проведении статистической оценки полученных данных было выявлено значимое различие показателя массы тела при рождении между исследуемыми группами ($p < 0,001$), что подтверждает связь формирования БЛД с глубокой недоношенностью и, следовательно, с низкими показателями массы тела при рождении.

Все дети, сформировавшие БЛД ($n=89$), с целью снижения проявлений РДСН, нуждались в эндотрахеальном введении препаратов экзогенного сурфактанта после рождения. В группе пациентов с БЛД в 19% случаев (17 детей) потребовалось повторное введение препаратов сурфактанта. В группе

детей без бронхолегочной дисплазии введение препаратов сурфактанта в раннем неонатальном периоде потребовалось лишь 7 детям (22%), что указывает на достаточную зрелость системы сурфактантов у пациентов данной группы.

Оценка по шкале APGAR у детей с РДСН в среднем составила 5 баллов на первой минуте жизни [5,0; 6,0] и 7 баллов на пятой минуте жизни [6,0; 7,0]. При этом, на 1-ой минуте жизни очень низкую оценку (1-3 балла) имели 2 пациента (4,6%), низкую оценку (4-5 баллов) – 20 пациентов (46,5%), максимальная для этой группы оценка в 6-7 баллов отмечена у 21 ребенка (48,9%). Сумму 8-10 баллов не набрал ни один пациент с РДСН. На 5 минуте жизни показатели пациентов по оценочной шкале APGAR несколько улучшились. Очень низкая сумма баллов (1-3) сохранялась только у 1 пациента (2,3%), существенно уменьшилось число детей с оценкой в 4-5 баллов (5 пациентов, 11,6%). Преобладающей оценкой по шкале APGAR у детей с РДСН на 5-ой минуте жизни стала сумма баллов 6-7 (32 ребенка, 74,5%). 5 пациентов из этой группы набрали суммарную оценку в 8 баллов по шкале APGAR на пятой минуте жизни (11,6%).

У недоношенных младенцев, которые сформировали БЛД, медиана оценки по шкале APGAR на первой минуте жизни также составила 5 баллов [4,0; 5,0], но к 5-й минуте после рождения увеличилась только на 1 балл и составила 6 баллов [6,0; 7,0]. Распределение пациентов с БЛД, по балльной оценке, по шкале APGAR значительно отличалось от такового в общей группе детей с РДСН ($p=0,02$). Так, на 1-ой минуте жизни 14 пациентов (16%) имели оценку в 1-3 балла. Кроме того, большинство детей, сформировавших впоследствии БЛД, на 1-ой минуте жизни были оценены в 4-5 баллов – 57 (64%), 6-7 баллов набрали только 18 детей (20%) (Рис 3.1.4). На 5-й минуте жизни ситуация улучшилась: до 4,5 % (4 ребенка) уменьшается доля пациентов с признаками тяжелой асфиксии, оцененных в 1-3 балла; доля пациентов с оценкой в 6-7 баллов нарастает до 78% (69 пациентов) (Рис 3.1.5).

Напротив, в обследованной группе пациентов, которые не сформировали БЛД, отмечена иная ситуация: оценки новорожденных детей по шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни достоверно выше, чем в группе детей, которые в дальнейшем сформировали бронхолегочную дисплазию ($p < 0,001$). Так, в этой группе 81,2% пациентов (26 детей) были оценены выше 6 баллов на первой минуте после рождения, причем 10 из них (31,2%) – в 8 и более баллов. А к пятой минуте жизни в данной группе оценка по шкале APGAR улучшилась до 8 баллов и более (19 детей - 59,4%). Данные представлены на рисунках 3.1.4. и 3.1.5.

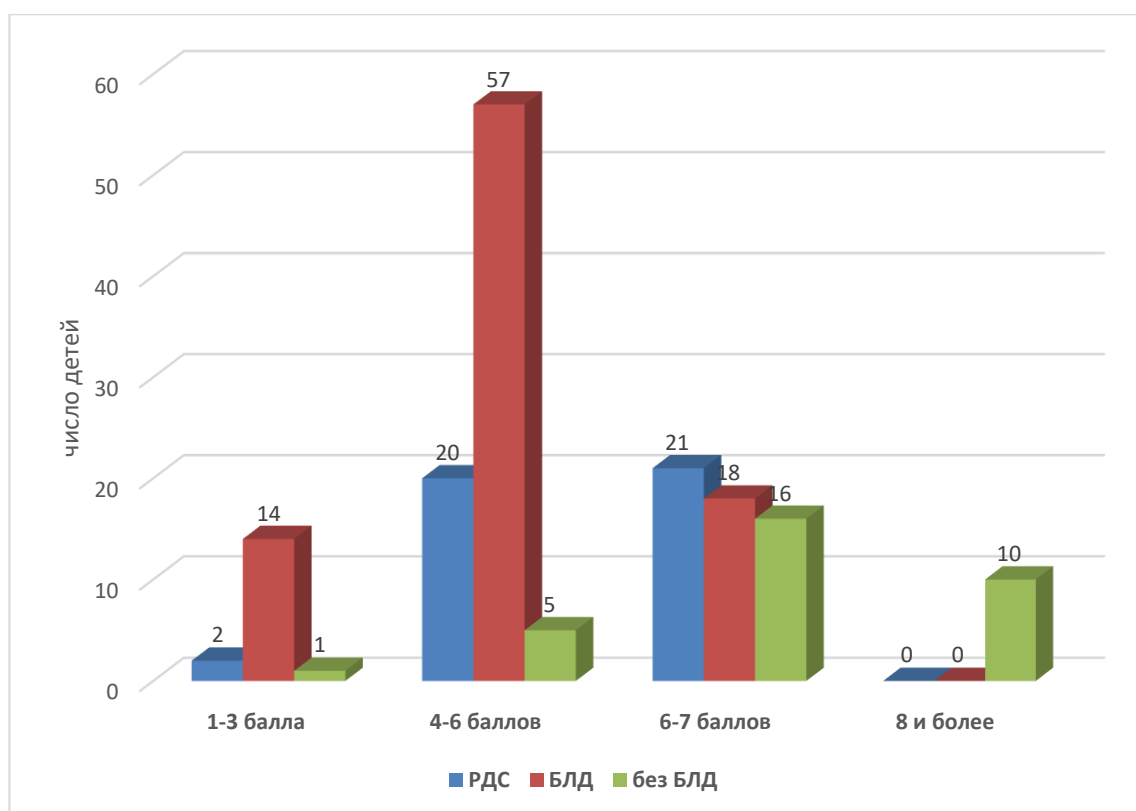


Рисунок 3.1.4. Оценка по шкале APGAR в группах недоношенных детей на этапе РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, на 1 минуте жизни.

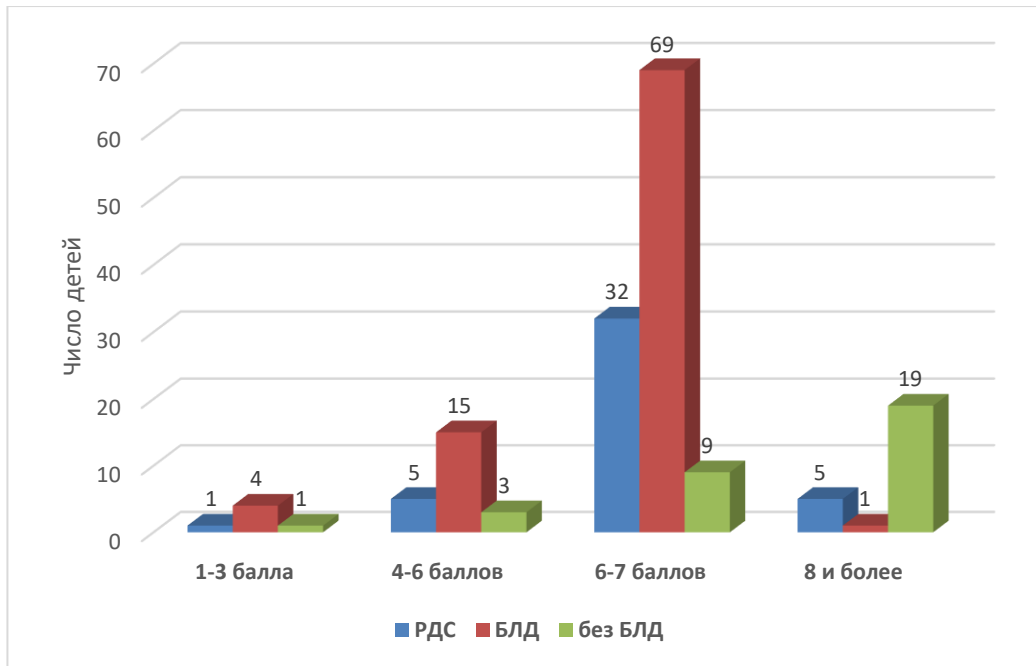


Рисунок 3.1.5. Оценка по шкале APGAR в группах недоношенных детей на этапе РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, на 5 минуте жизни.

На этапе РДСН проведение респираторной поддержки различными методами потребовалось всем обследованным детям, как сформировавшим, так и не сформировавшим БЛД. Но в исследуемых группах значительно отличался вид проводимой респираторной терапии и ее продолжительность. Нередко, одному и тому же пациенту требовалось проведение различных методов респираторной поддержки. Традиционная ИВЛ была проведена 32 (74,4%) детям с РДСН, медиана продолжительности составила – 5 [1; 8,5] дней, высокочастотная ИВЛ – 10 детям (23%), медиана продолжительности – 3 [1,25; 5] дня. Большинство детей с РДСН потребовали перехода на СРАР после прекращения ИВЛ – 31 пациент (72%), медиана продолжительности – 3,5 [2; 14,25] дней. 10 пациентов с РДСН (24%) не потребовали проведения инвазивной вентиляции легких, они находились только на респираторной поддержке методом СРАР. У 34-х (79%) затем проводилась дополнительная оксигенация через маску или назальные канюли. При катамнестическом наблюдении у 21 пациента (49%) кислородозависимость купировалась до окончания неонатального периода, 22 пациента (51%) нуждались в

дополнительной оксигенации более 28 суток жизни. Впоследствии именно эта группа пациентов сформировала БЛД. Медиана продолжительности общей кислородозависимости в данной группе составила - 33 [14,5; 57] дней.

В группе детей, сформировавших БЛД, практически все пациенты получали традиционную ИВЛ – 88 детей (99%), медиана продолжительности – 18 [8; 33] дней. Практически половина из них нуждалась в высокочастотной ИВЛ – 39 детям (44%), медиана продолжительности – 5 [2; 13,5] дней, с последующим переходом на респираторную поддержку методом СРАР – 62 ребенка (70%) и дополнительную оксигенацию через маску или назальные канюли – 89 детей (100%). Медиана продолжительности общей кислородозависимости в данной группе составила - 64 [52; 83] дня (рис. 3.1.6).

В то время как в группе детей, которые не сформировали бронхолегочную дисплазию, лишь у 11 пациентов (34,3%) была необходимость в проведении инвазивной респираторной поддержки с применением традиционной ИВЛ и высокочастотной ИВЛ, медиана продолжительности – 3 [1; 6,5] дней. В проведении респираторной терапии с помощью СРАР нуждались 27 детей из этой группы (84%), медиана продолжительности – 2 [2; 5] дней. Из видов дополнительной оксигенации в этой группе можно выделить подачу увлажненного кислорода через лицевую маску, а также назальные канюли (n=20, 63%), медиана продолжительности – 9 [5; 15,2] дней. Медиана продолжительности общей кислородозависимости в данной группе составила – 8,5 [5; 14,8] дней. Данные длительности общей кислородозависимости в группах пациентов, которые сформировали и не сформировали бронхолегочную дисплазию, представлены на рисунке 3.1.6.

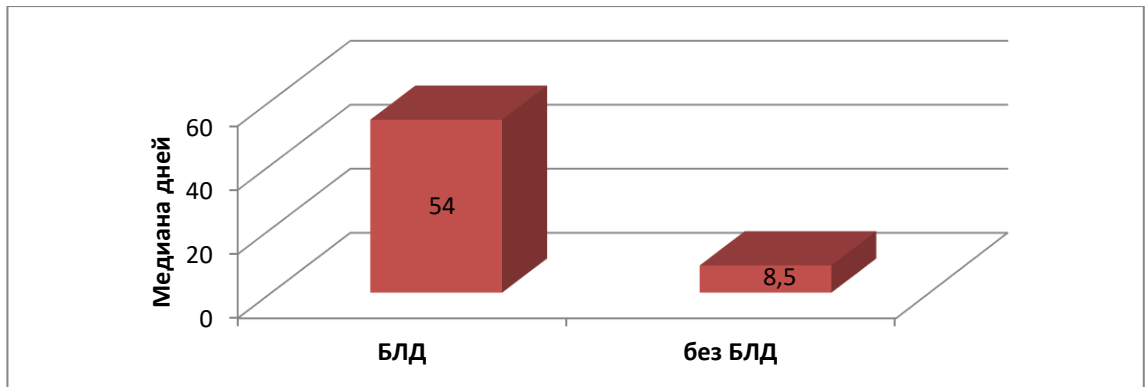


Рисунок 3.1.6. Распределение недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД, по длительности кислородозависимости.

В неонатальном периоде все обследованные дети получали респираторную поддержку в связи с РДСН. Однако методы респираторных протоколов и их длительность существенно отличались у пациентов 2 и 3 групп. Данные, представленные на рисунке 3.1.7, демонстрируют, что младенцы, не сформировавшие БЛД, чаще обходились применением более щадящих методов респираторной поддержки. Длительность проведения респираторной поддержки в данной группе также, как и длительность дополнительной оксигенации, была значительно меньше. Выявлено достоверное различие между значениями этих показателей в двух группах пациентов (сформировавших и не сформировавших БЛД) ($p < 0,001$).

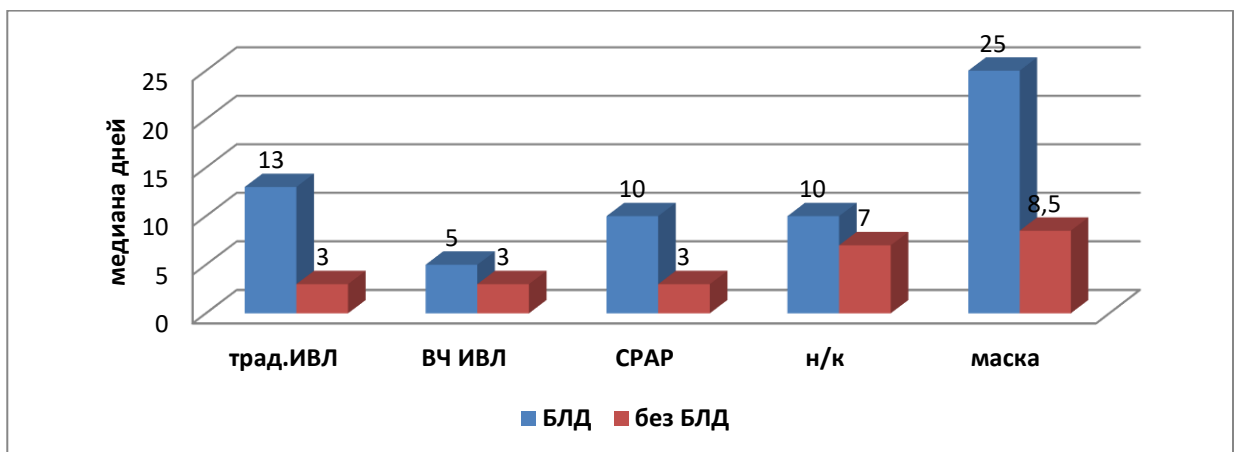


Рисунок 3.1.7. Распределение недоношенных детей первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, по методам респираторной поддержки.

Таким образом, сопоставление клинико-anamнестических характеристик пациентов на этапе РДСН и пациентов с РДСН в анамнезе, сформировавших и не сформировавших БЛД, продемонстрировало значимые различия в исследуемых группах по основным параметрам, соответствующим критериям формирования БЛД. Существенные различия в группах пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД, были получены по гестационному возрасту и антропометрическому показателю (массе тела на момент рождения), а также оценке по шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни, продолжительности и методах респираторной поддержки.

3.2. Результаты корреляционного анализа клинико-anamнестических данных пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД

Анализ клинико-anamнестических характеристик включенных в исследование пациентов, сформировавших БЛД, показал, что эти характеристики полностью соответствуют современной модели пациента, страдающего БЛД: недоношенный ребенок с перенесенным РДСН, рожденный с экстремально низкой массой тела на сроке гестации менее 28 недель (на каникулярной или саккулярной стадии развития легких), оцененный по шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни менее, чем в 5-6 баллов, а также нуждающийся во введении препаратов экзогенного сурфактанта и проведении длительной респираторной терапии с применением традиционной ИВЛ, а далее СРАР с дополнительной оксигенацией более 28 суток жизни [5]. Таким образом, отбор пациентов во вторую группу исследования может быть признан корректным.

При корреляционном анализе результатов проведенного нами исследования, в подтверждение выше сказанному, была выявлена обратная корреляционная зависимость умеренной силы между следующими исследованными клинико-anamнестическими факторами: масса тела, срок гестации при рождении, оценки по шкале APGAR на первой и пятой минутах

жизни и длительностью проводимой ИВЛ. Иными словами, глубоко недоношенным детям с низкими оценками по шкале APGAR требовалось более длительное проведение традиционной вентиляции легких, что повышало риск формирования БЛД (рис. 3.2.1).

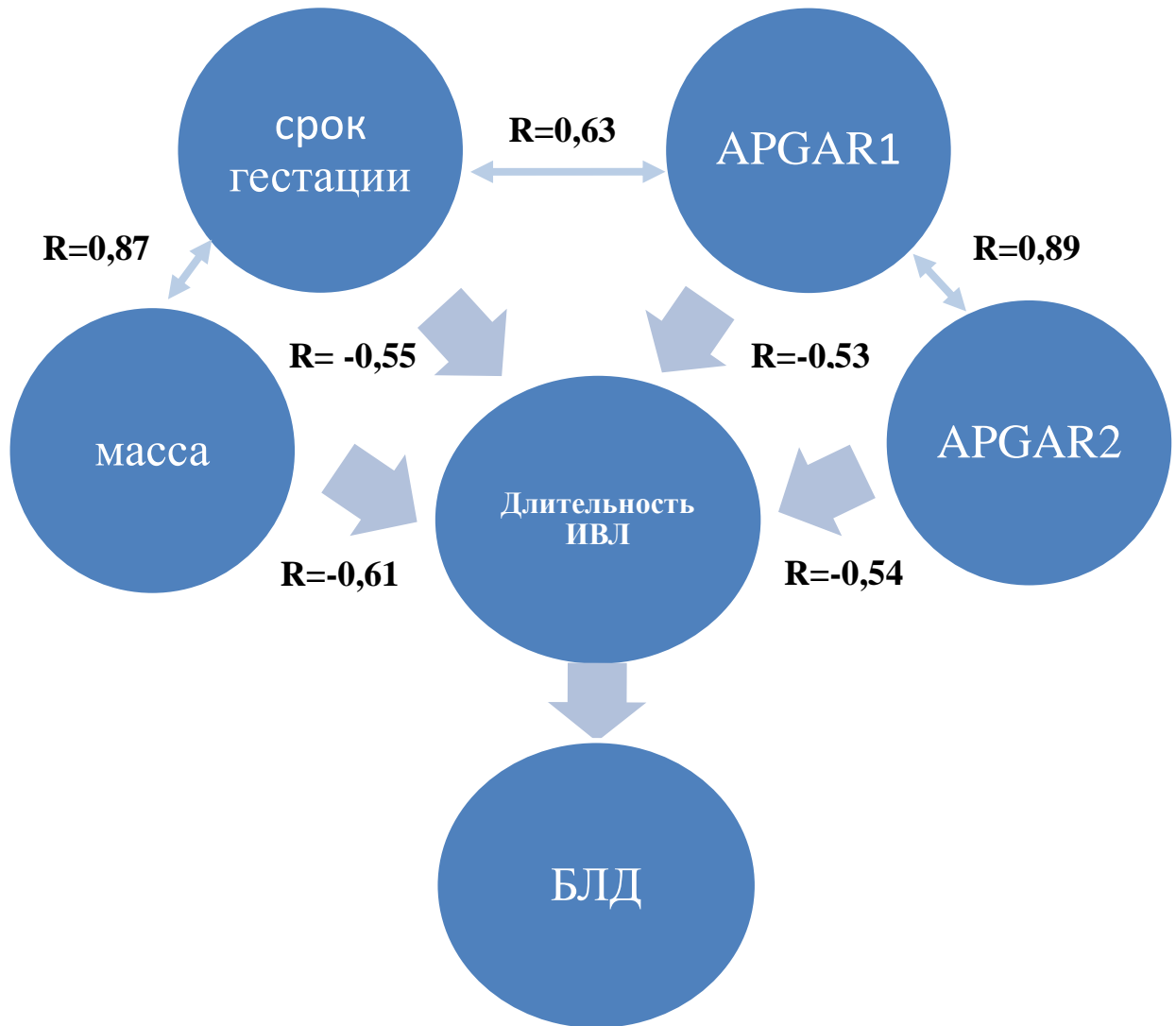


Рисунок 3.2.1. Взаимосвязи между массой тела, гестационным возрастом при рождении, оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 минутах жизни, длительностью традиционной ИВЛ и формированием БЛД.

3.3. Сопутствующие заболевания и осложнения у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД

У пациентов, которые сформировали бронхолегочную дисплазию (2 группа), в качестве коморбидной патологии чаще всего встречались врожденная пневмония, внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) и ретинопатия недоношенных.

Из 89 пациентов 2 группы врожденная пневмония была зарегистрирована у 29 пациентов (33%). В группе детей без БЛД (3 группа) врожденная пневмония отмечалась лишь у 7 из 32 пациентов (22%).

Внутрижелудочковые кровоизлияния различной степени были зарегистрированы у 39 пациентов, сформировавших БЛД (44%). В группе детей без БЛД коморбидность ВЖК была отмечена в 2 раза реже (7 пациентов, 22%), что может быть связано с меньшей степенью недоношенности и менее выраженными постгипоксическими проявлениями.

Ретинопатия недоношенных отмечалась у 56 пациентов (63%) с БЛД. Из них 11 пациентов потребовали проведения оперативного лечения в виде введения ингибитора сосудистого эндотелиального фактора роста. У пациентов без БЛД ретинопатия встречалась в три раза реже (6 пациентов, 19%). Лишь одному пациенту в данной группе потребовалось проведение оперативного лечения. Частота сопутствующих заболеваний представлена на рисунке 3.3.1.

Такое грозное осложнение бронхолегочной дисплазии, как легочная гипертензия по данным ЭХО-КГ было зарегистрировано у 7 пациентов (8%), сформировавших БЛД, у этих пациентов отмечалось тяжелое течение заболевания.

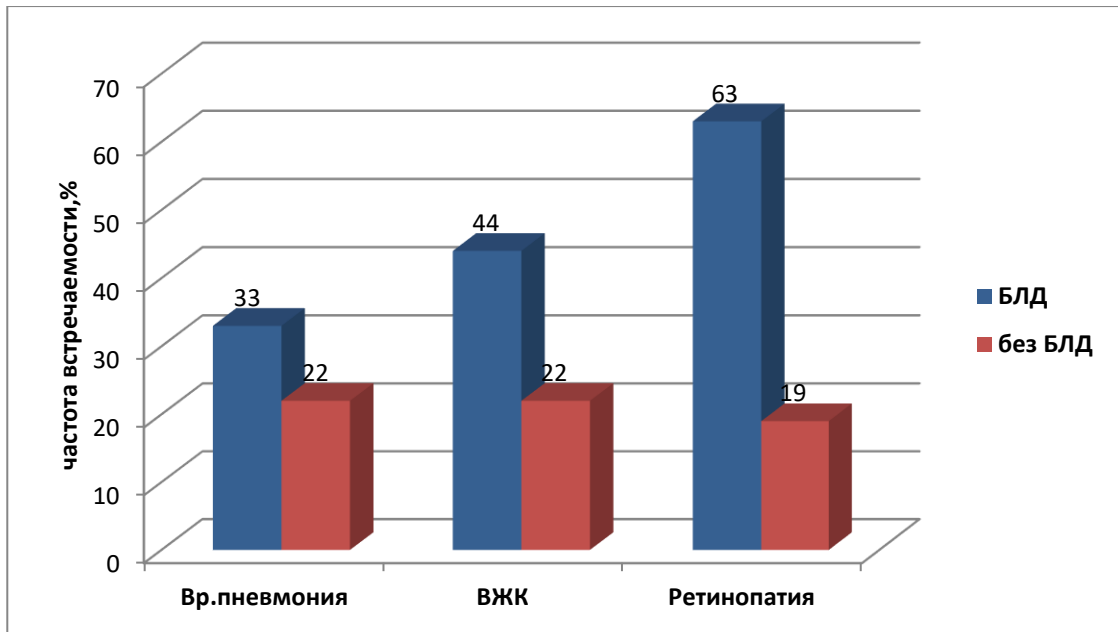


Рисунок 3.3.1. Распределение частоты сопутствующих заболеваний у недоношенных детей, сформировавших и не сформировавших БЛД.

Согласно проведенной статистической обработке исходных данных с использованием метода Краскела - Уоллиса были получены значимые различия проанализированных медиан срока гестации и массы тела при рождении, а также оценок по балльной шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни, длительности проводимой традиционной вентиляции легких и общей кислородозависимости при сравнении групп пациентов, сформировавших и не сформировавших БЛД ($p < 0,001$).

В нашем исследовании были проанализированы такие клинические и анамнестические параметры, как гендерная принадлежность, срок гестации и показатель массы тела при рождении, оценки по шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни недоношенных новорожденных на этапе РДСН и на первом году жизни у пациентов с РДСН в анамнезе, а также длительность различных методов респираторной поддержки и коморидные состояния. Помимо этого, был проведен корреляционный анализ перечисленных параметров. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о том, что БЛД чаще формируют глубоко недоношенные дети с ЭНМТ (менее 1000г)

при рождении, имеющие низкие оценки по шкале APGAR (менее 5 и 6 баллов на первой и пятой минутах жизни соответственно), требующие длительную респираторную поддержку с применением традиционной ИВЛ. Данные факторы риска формирования БЛД являются взаимосвязанными и в основном обусловлены глубокой недоношенностью пациентов. В группе детей, у которых бронхолегочная дисплазия не сформировалась, значения указанных показателей статистически значимо выше, а длительность проводимой ИВЛ ниже ($p < 0,001$) по сравнению с пациентами с бронхолегочной дисплазией. Кроме того, в группе детей с БЛД чаще встречаются такие сопутствующие заболевания, как ВЖК, врожденная пневмония и ретинопатия недоношенных, нередко требующая оперативного вмешательства. Перечисленные критерии соответствуют современной клинической модели пациента, страдающего БЛД [5].

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С РДСН И ПАЦИЕНТОВ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ, СФОРМИРОВАВШИХ И НЕ СФОРМИРОВАВШИХ БЛД

Исследования проблемы взаимодействия биомаркеров, отвечающих за формирование легочной ткани и микрососудистого русла легких, в настоящее время находится в центре внимания специалистов по неонатальной пульмонологии, поскольку нарушение этого взаимодействия в пре- и постнеонатальном периодах жизни ребенка может приводить к формированию у него бронхолегочной дисплазии. Все факторы, влияющие на процесс ангиогенеза, принято разделять на проангиогенные, то есть способствующие нормальному развитию микрососудистого русла, и антиангиогенные, то есть препятствующие этому развитию.

3.1. Сравнительная оценка содержания проангиогенных факторов в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

К проангиогенным факторам, изученным в нашем исследовании, относятся фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), фактор роста эндотелия сосудов D (VEGF-D), тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB), молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1 (PECAM-1), ангиопоэтин-1 (ANGPT-1).

3.1.1. Оценка концентрации фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

На данный момент установлено, что фактор роста эндотелия сосудов А играет ключевую роль в ангиогенезе. Как проангиогенный фактор, он необходим для правильного ангиогенеза легочной ткани, идущего наряду с

альвеологенезом [19]. Статистические данные о показателях детей обследованных групп приведены в таблице 4.1.1.

Таблица 4.1.1. Уровень VEGF-A в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Me [LQ; UQ]			Критерии достоверности*			
РДСН (N=43)	БЛД (N=89)	Без БЛД (N=32)	P1	P2	P3	P4
113,8 [50,7; 200]	82 [47,3;131,2]	122,5 [66,7; 269,1]	0,02	0,2	0,03	0,5

*Критерии достоверности: P1 - Критерий Краскелла-Уоллиса (множественное сравнение). P2 - РДС – БЛД. P3 - БЛД – без БЛД. P4 - РДС – без БЛД

При оценке уровня фактора роста эндотелия сосудов А выявлены статистически достоверные различия при проведении множественного сравнения, а также при сравнении группы недоношенных детей с БЛД (Me=82 пг/мл) с группой детей, которые БЛД не сформировали (Me=122,5 пг/мл), $p=0,03$.

Изменения концентрации VEGF-A представлены на рисунке 4.1.1.

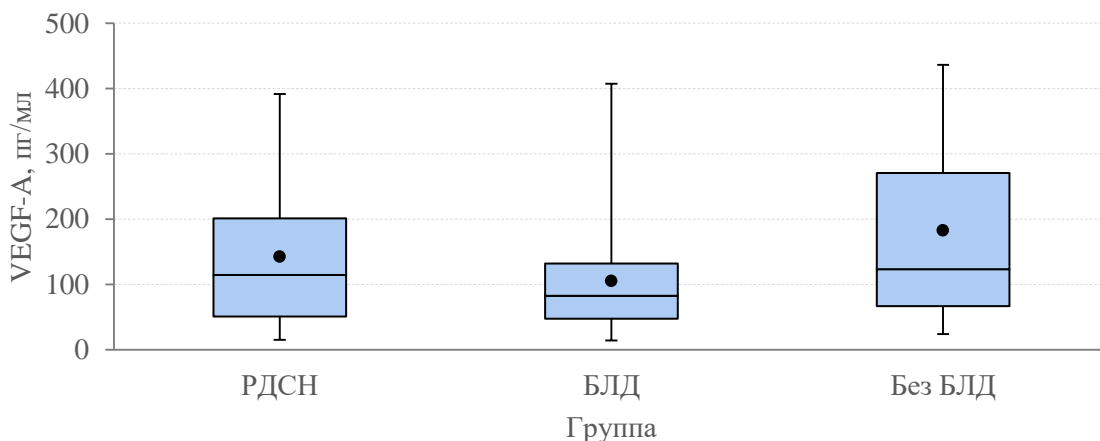


Рисунок 4.1.1. Уровень VEGF-A в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

В нашем исследовании самый высокий уровень данного фактора оказался в группе детей без БЛД и самый низкий у детей, сформировавших данное заболевание, что подтверждает проангиогенную роль VEGF-A и указывает на его явный дефицит у пациентов, формирующих БЛД. Дети, обследованные на этапе РДСН, имели промежуточный уровень VEGF-A, без статистически значимой разницы с детьми без БЛД.

4.1.2. Оценка концентрации фактора роста сосудистого эндотелия D (VEGF-D) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

Наряду с фактором роста эндотелия сосудов А, фактор роста эндотелия сосудов D играет ключевую проангиогенную роль, регулируя и развитие кровеносных сосудов из клеток – предшественниц, и деление уже имеющихся кровеносных сосудов [73]. Данные о содержании VEGF-D в сыворотке крови детей обследованных групп приведены в таблице 4.1.2.

Таблица 4.1.2. Уровень VEGF-D в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, нг/мл.

Me [LQ; UQ]			Критерии достоверности*			
РДСН (N=43)	БЛД (N=89)	Без БЛД (N=32)	P1	P2	P3	P4
1,8 [1,4; 2,4]	2,2 [1,7; 2,5]	2,3 [1,8; 2,7]	0,04	0,2	0,5	0,05

*Критерии достоверности: P1 - Критерий Краскелла-Уоллиса (множественное сравнение). P2 - РДСН – БЛД. P3 - БЛД – без БЛД. P4 - РДСН – без БЛД

При оценке уровня сосудистого эндотелиального фактора D в исследуемых группах выявлена статистически достоверная разница при проведении множественного сравнения по трем группам, разница пограничной значимости была выявлена при сравнении уровня VEGF-D у пациентов с РДСН (Me = 1,8 нг/мл) и пациентов без БЛД (Me = 2,3 нг/мл), $p=0,05$.

Самый низкий уровень VEGF-D был обнаружен у пациентов на этапе РДСН, что может свидетельствовать о наиболее выраженных нарушениях ангиогенеза сосудов легких именно в этот период развития заболевания. У детей в постнеонатальном периоде отмечен рост уровня данного фактора в крови. Изменения концентрации VEGF-D иллюстрирует график на рисунке 4.1.2.

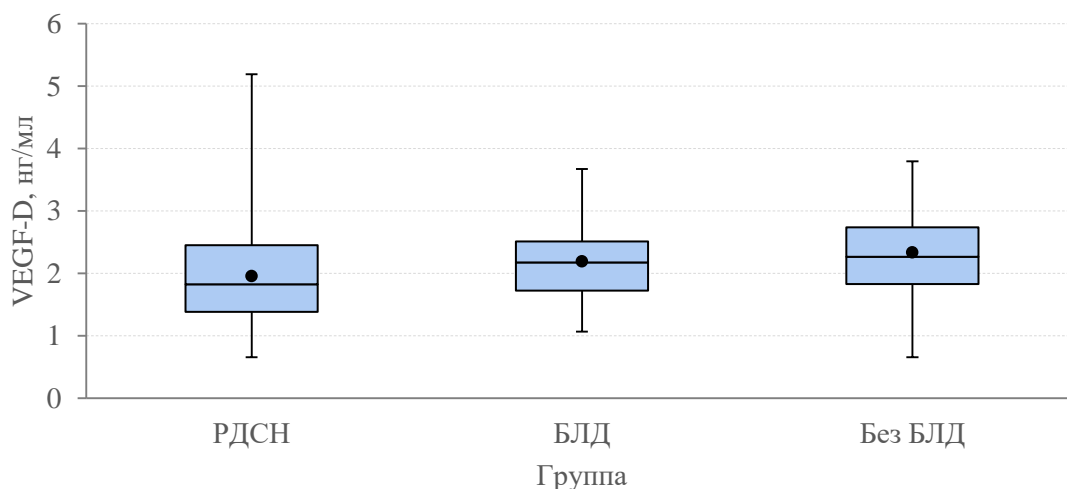


Рисунок 4.1.2. Уровень VEGF-D в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Наиболее высокий уровень VEGF-D в сыворотке крови отмечен у детей, не сформировавших БЛД, что делает возможным считать показатель этой группы отправной точкой для оценки изменений. Несмотря на отсутствие достоверных различий при попарном сравнении групп, мы считаем важной выявленную динамику. Тенденция к повышению уровня у детей с БЛД, с нашей точки зрения, может быть признаком текущих процессов

восстановления поврежденной легочной ткани и микрососудистого русла легких.

4.1.3. Оценка концентрации тромбоцитарного фактора роста ВВ (PDGF-BB) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

Тромбоцитарный фактор роста ВВ, наряду с другими проангиогенными факторами, является важным стимулятором восстановления тканей. Играет существенную роль в процессах ангиогенеза, септации и альвеоляризации при формировании структуры легких [83]. Данные о содержании PDGF-BB в сыворотке крови детей обследованных групп приведены в таблице 4.1.3.

Таблица 4.1.3. Уровень PDGF-BB в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Me [LQ; UQ]			Критерии достоверности*			
РДСН (N=43)	БЛД (N=89)	Без БЛД (N=32)	P1	P2	P3	P4
6388 [3 614,1; 8 624,5]	5719,5 [3 969,5; 8 144,4]	9326,3 [4 700,8; 13 780]	0,02	0,9	0,02	0,1

*Критерии достоверности: P1 - Критерий Краскелла-Уоллиса (множественное сравнение). P2 - РДСН – БЛД. P3 - БЛД – без БЛД. P4 - РДСН – без БЛД

При оценке уровня тромбоцитарного фактора роста ВВ методом множественного сравнения по трем группам была выявлена достоверная разница показателей. Аналогичная ситуация отмечена при сравнении концентрации в сыворотке крови PDGF-BB в группе детей, которые

сформировали БЛД (Me=5719,5 пг/мл) с группой детей, которые данное заболевание не сформировали (9326,3 пг/мл), $p=0,02$.

Самая низкая концентрация данного фактора роста отмечена в группе детей, сформировавших БЛД. Уровень в сыворотке крови у недоношенных детей на этапе РДСН несколько выше, чем у детей с БЛД, однако показатели в обеих группах все равно существенно ниже, чем у детей, которые бронхолегочную дисплазию не сформировали. Явный дефицит PDGF-BB у детей, сформировавших БЛД, может свидетельствовать о характерных изменениях в легочной ткани при формировании БЛД. Изменения концентрации PDGF-BB иллюстрирует график на рисунке 4.1.3.

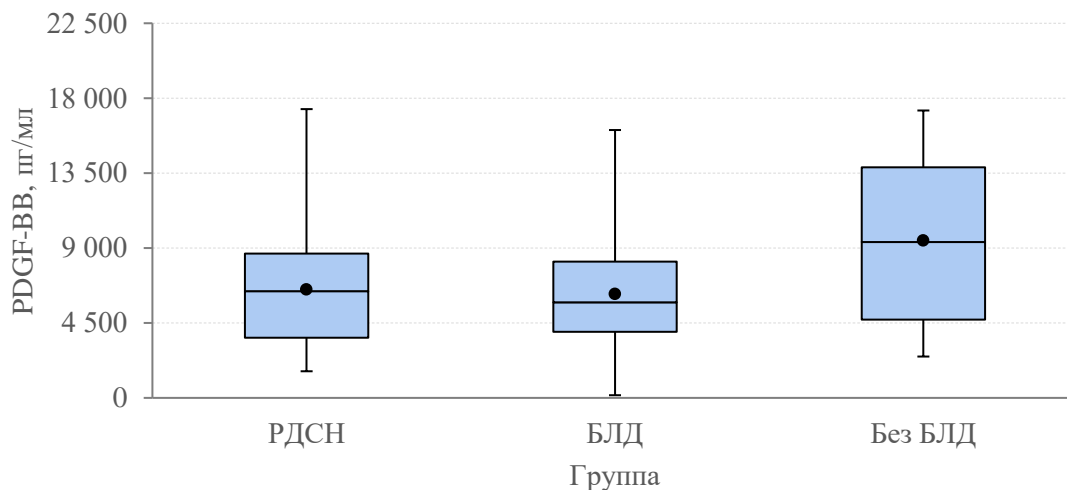


Рисунок 4.1.3. Уровень PDGF-BB в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

4.1.4. Оценка концентрации молекулы клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1 (PECAM-1) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

Молекула PECAM-1 относится к проангиогенным факторам и является ключевой для формирования надежного контакта клеток эндотелия. Известно,

что при повреждении легочной ткани на фоне гипоксии, а особенно при механическом воздействии на ткань легких в условиях «жесткой» искусственной вентиляции, нарушение межклеточных контактов приводит к попаданию молекул PECAM-1 в кровоток [109]. Данные о содержании PECAM-1 в сыворотке крови детей обследованных групп приведены в таблице 4.1.4.

Таблица 4.1.4. Уровень PECAM-1 в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Me [LQ; UQ]			Критерии достоверности*			
РДСН (N=43)	БЛД (N=89)	Без БЛД (N=32)	P1	P2	P3	P4
5872 [3801; 7343]	3918 [1713; 5201]	4978 [2535; 7230]	0,19	0,0016	0,2	0,3

*Критерии достоверности: P1 - Критерий Краскелла-Уоллиса (множественное сравнение). P2 - РДСН – БЛД. P3 - БЛД – без БЛД. P4 - РДСН – без БЛД

При оценке уровня PECAM-1 статистически достоверная разница была выявлена при сравнении показателей в группе недоношенных детей на этапе РДСН (Me=5872 пг/мл) с показателями в группе пациентов, которые сформировали бронхолегочную дисплазию (Me=3918 пг/мл), $p=0,0016$. Самые высокие концентрации данного биомаркера отмечаются в группе детей на этапе РДСН, а самые низкие концентрации - в группе детей, которые сформировали БЛД. Изменения концентрации PECAM-1 иллюстрирует график на рисунке 4.1.4.

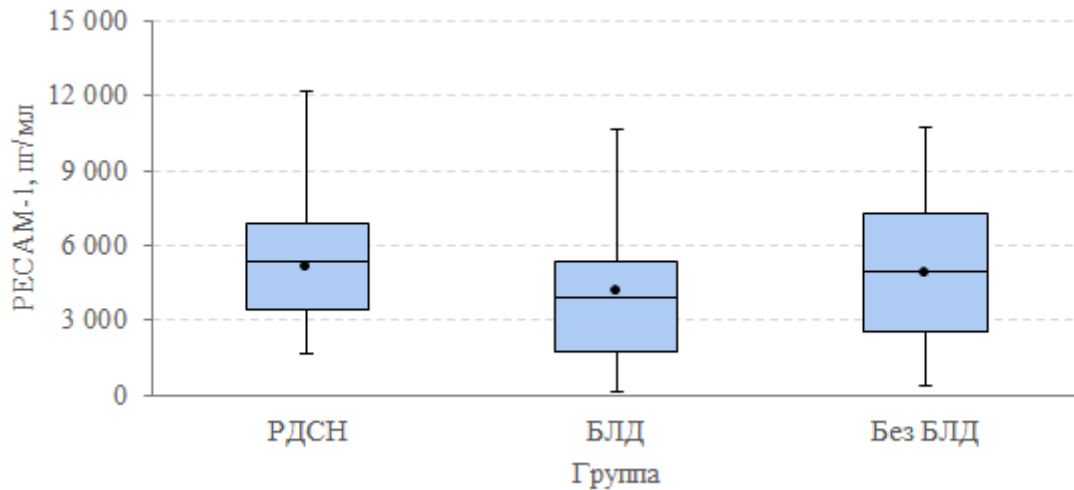


Рисунок 4.1.4. Уровень РЕСАМ-1 в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Полученные нами данные совпадают с результатами проведенных ранее исследований, где было выявлено достоверное снижение уровня РЕСАМ-1 у детей с БЛД [109]. Однако, с нашей точки зрения наибольший интерес вызывает полученная динамика изменений содержания РЕСАМ-1 в сыворотке крови недоношенных детей. Вероятно, что высокая концентрация данного биомаркера в сыворотке крови пациентов с РДСН характеризует активно текущий процесс повреждения эндотелия. Снижение уровня РЕСАМ-1 у детей на этапе БЛД может говорить о том, что процессы повреждения эндотелия легких к этому времени в основном завершены.

4.1.5. Оценка концентрации ангиопоэтина-1 (ANGPT-1) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

Ангиопоэтин-1 также относится к проангиогенным факторам и является ведущим регулятором физиологической неоваскуляризации. Он играет ключевую роль в поддержании целостности сосудистой стенки [71]. Роль ангиопоэтина-1 в развитии бронхолегочной дисплазии неоднократно

доказывалась во многих исследованиях [59; 93; 94]. Данные о содержании ANGPT-1 в сыворотке крови детей обследованных групп приведены в таблице 4.1.5.

Таблица 4.1.5. Уровень ANGPT-1 в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Me [LQ; UQ]			Критерии достоверности*			
РДСН (N=43)	БЛД (N=89)	Без БЛД (N=32)	P1	P2	P3	P4
13299 [10373; 16667]	11698 [8433; 15748]	14438 [11901; 15382]	0,2	0,5	0,3	0,9

*Критерии достоверности: P1 - Критерий Краскелла-Уоллиса (множественное сравнение). P2 - РДСН – БЛД. P3 - БЛД – без БЛД. P4 - РДСН – без БЛД

При оценке уровня ангиопоэтина-1 статистически достоверной разницы между группами выявлено не было. Во всех группах отмечена значительная вариабельность полученных показателей. Изменения концентрации ANGPT-1 иллюстрирует график на рисунке 4.1.5.

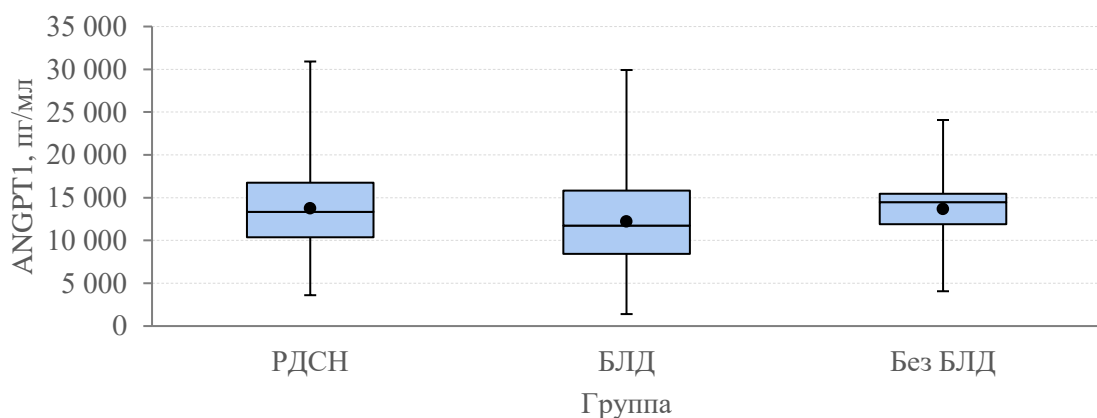


Рисунок 4.1.5. Уровень ANGPT-1 в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Несмотря на то, что в нашем исследовании мы не обнаружили достоверно значимых различий содержания данного фактора в сыворотке крови пациентов в исследуемых группах, считаем возможным охарактеризовать выявленную тенденцию, свидетельствующую о том, что уровень ангиопоэтина-1 относительно выше в группе детей без БЛД, и ниже всего в группе детей с БЛД. В группе детей на этапе РДСН он занимает промежуточное значение. Мы полагаем, что такая картина может косвенно свидетельствует о проангиогенной роли данного фактора.

4.2. Сравнительная оценка содержания антиангиогенных факторов в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

К антиангиогенным факторам, изученным в нашем исследовании, относятся ангиопоэтин-2 (ANGPT-2), а также фактор роста соединительной ткани (CTGF).

4.2.1. Оценка концентрации ангиопоэтина-2 (ANGPT-2) в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

Известно, что в определенных условиях, например, на фоне гипоксии, а также при взаимодействии с другими биомаркерами ангиогенеза (например, VEGF) ангиопоэтин-2 может выполнять как проангиогенную, так и ангиангиогенную функцию. При снижении проангиогенных сигналов, ангиопоэтин-2 способствует гибели эндотелиальных клеток, тем самым останавливая процессы ангиогенеза [13; 20]. Данные о содержании ANGPT-2 в сыворотке крови детей обследованных групп приведены в таблице 4.2.1.

Таблица 4.2.1. Уровень ANGPT-2 в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Me [LQ; UQ]			Критерии достоверности*			
РДСН (N=43)	БЛД (N=89)	Без БЛД (N=32)	P1	P2	P3	P4
7656 [6290; 9688,2]	7019 [5291; 8561]	5837 [3929;6543]	0,038	0,2	0,1	0,039

*Критерии достоверности: P1 - Критерий Краскелла-Уоллиса (множественное сравнение). P2 - РДСН – БЛД. P3 - БЛД – без БЛД. P4 - РДСН – без БЛД

Наиболее высокий уровень ангиопоэтина-2 определен в группе детей с РДСН, в группе детей с БЛД он оказался несколько ниже, однако разница статистически недостоверна. Самый низкий уровень отмечен в группе детей без бронхолегочной дисплазии. При сравнении трех исследованных групп статистически достоверные различия выявлены при проведении множественного сравнения; при дальнейшем проведении попарных сравнений выявлена достоверно значимая разница между группой детей с РДСН (Me=7656 пг/мл) с группой детей без БЛД (Me=5837 пг/мл), $p=0,039$. Изменения концентрации ANGPT-2 иллюстрирует график на рисунке 4.2.1.

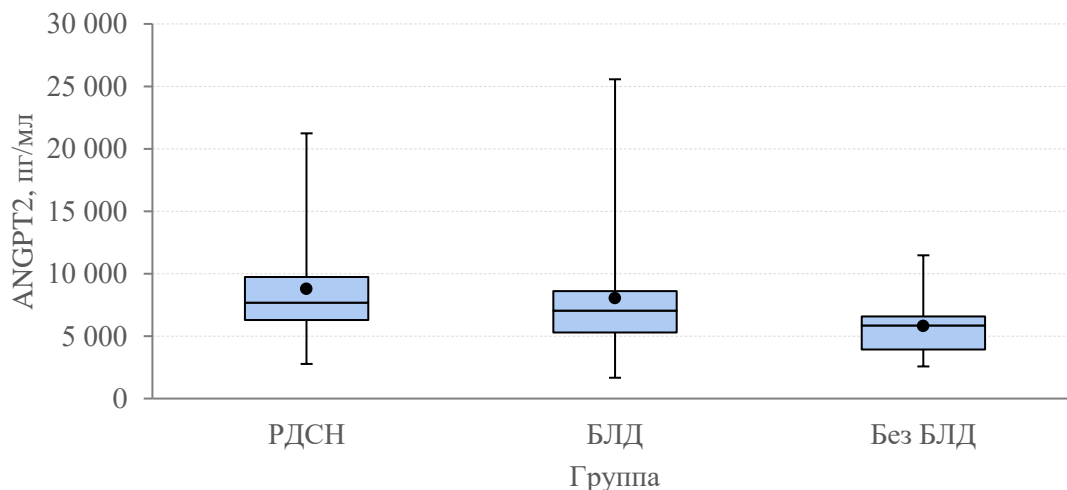


Рисунок 4.2.1. Уровень ANGPT-2 в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Концентрация ANGPT-2 оказалась близкой в группах детей с РДСН (многие из которых в дальнейшем формируют БЛД) и детей со сформированной БЛД. С нашей точки зрения, полученные результаты свидетельствуют об антиангиогенной роли данного фактора в условиях гипоксии.

4.2.2. Уровень СТGF в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл

СТGF относится к антиангиогенным факторам. В ранее проведенных исследованиях было показано, что СТGF играет важную роль при формировании бронхолегочной дисплазии, особенно это касается тяжелых форм данного заболевания [89; 112; 114]. При повышении концентрации СТGF в сыворотке крови недоношенных детей, значительно снижаются темпы альвеоляризации и ангиогенеза, происходит ремоделирование легочных сосудов, зачастую ведущее к развитию легочной гипертензии [30]. Данные о содержании СТGF в сыворотке крови детей обследованных групп приведены в таблице 4.2.2.1.

Таблица 4.2.2.1 Уровень СТGF в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Me [LQ; UQ]			Критерии достоверности*			
РДСН (N=43)	БЛД (N=89)	Без БЛД (N=32)	P1	P2	P3	P4
8 [6; 22,5]	11 [6; 107]	26 [6; 103]	0,3	0,4	0,9	0,4

*Критерии достоверности: P1 - Критерий Краскелла-Уоллиса (множественное сравнение). P2 - РДСН – БЛД. P3 - БЛД – без БЛД. P4 - РДСН – без БЛД

При оценке уровня СТGF в сыворотке крови пациентов обследованных групп статистически достоверной разницы между группами выявлено не было. В значительной степени это связано с большим разбросом индивидуальных показателей (что иллюстрирует график на рисунке 4.2.2).

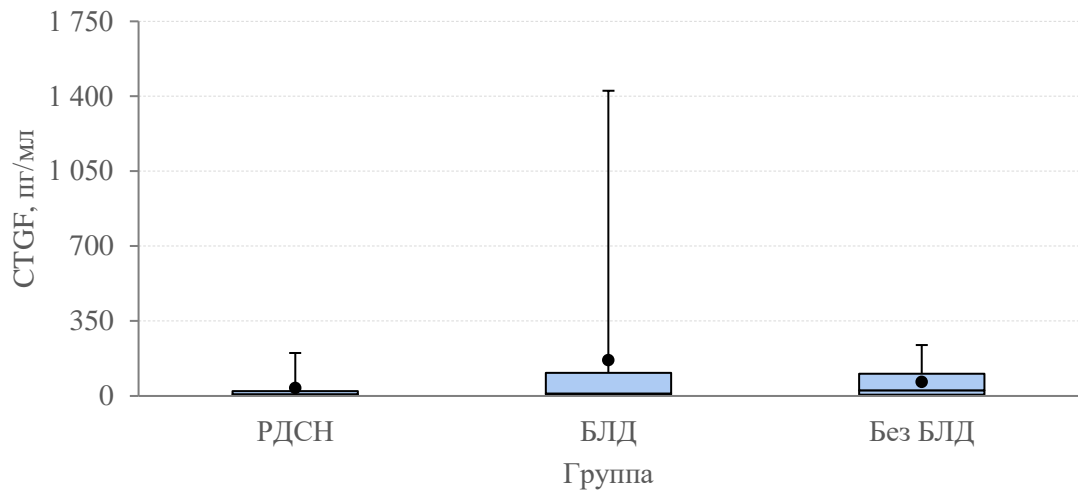


Рисунок 4.2.2. Уровень СТGF в сыворотке крови в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД, пг/мл.

Учитывая длительную гипероксию на фоне механической вентиляции легких у пациентов с тяжелой бронхолегочной дисплазией, а также доказанную роль СТGF в процессах фиброобразования легочной ткани, составляющего значимое звено патогенеза при формировании БЛД [112], нами были проанализированы показатели данного антиангиогенного фактора в сыворотке крови пациентов с различной степенью тяжести заболевания.

При разделении пациентов, страдающих бронхолегочной дисплазией, на 3 группы по степени тяжести течения заболевания (легкая, среднетяжелая и тяжелая) в соответствии рекомендациями, предложенными Jobe А.Н, Bancalari Е. В 2001 году [56], были получены следующие результаты (таблица 4.2.2.2):

Таблица 4.2.2.2 Уровень СТGF в сыворотке крови в подгруппах пациентов первого года жизни, страдающих БЛД, пг/мл.

Me [LQ; UQ]		
Легкое течение (N=22)	Среднетяжелое течение (N=43)	Тяжелое течение (N=24)
7 [6; 58]	11 [5; 57]	33 [7; 157]

При сравнении содержания в сыворотке крови СТGF в подгруппах пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением БЛД было отмечено статистически значимое повышение данного показателя у детей с тяжелым течением БЛД ($p=0,04$), сопровождающимся выраженным пневмофиброзом и нарушением ангиогенеза, что связано, вероятно, с длительной гипероксией. Полученные данные подтверждают антиангиогенную роль СТGF, выявленную в ряде научных исследований [30; 89; 114].

4.3. Корреляционный анализ содержания факторов ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

При проведении корреляционного анализа методом Спирмена между следующими проангиогенными факторами ангиогенеза были выявлены корреляционные зависимости умеренной силы:

1. Между уровнем тромбоцитарного фактора роста ВВ и PECAM-1, ангиопоэтином-1, а также фактором роста эндотелия сосудов А выявлены положительные связи умеренной силы ($R=0,39$, $R=0,61$, $R=0,32$ соответственно).
2. Между уровнем ангиопоэтина 1 и PECAM-1 выявлена положительная связь умеренной силы ($R=0,43$).

Выявленные корреляционные зависимости представлены на рисунке 4.3.1.

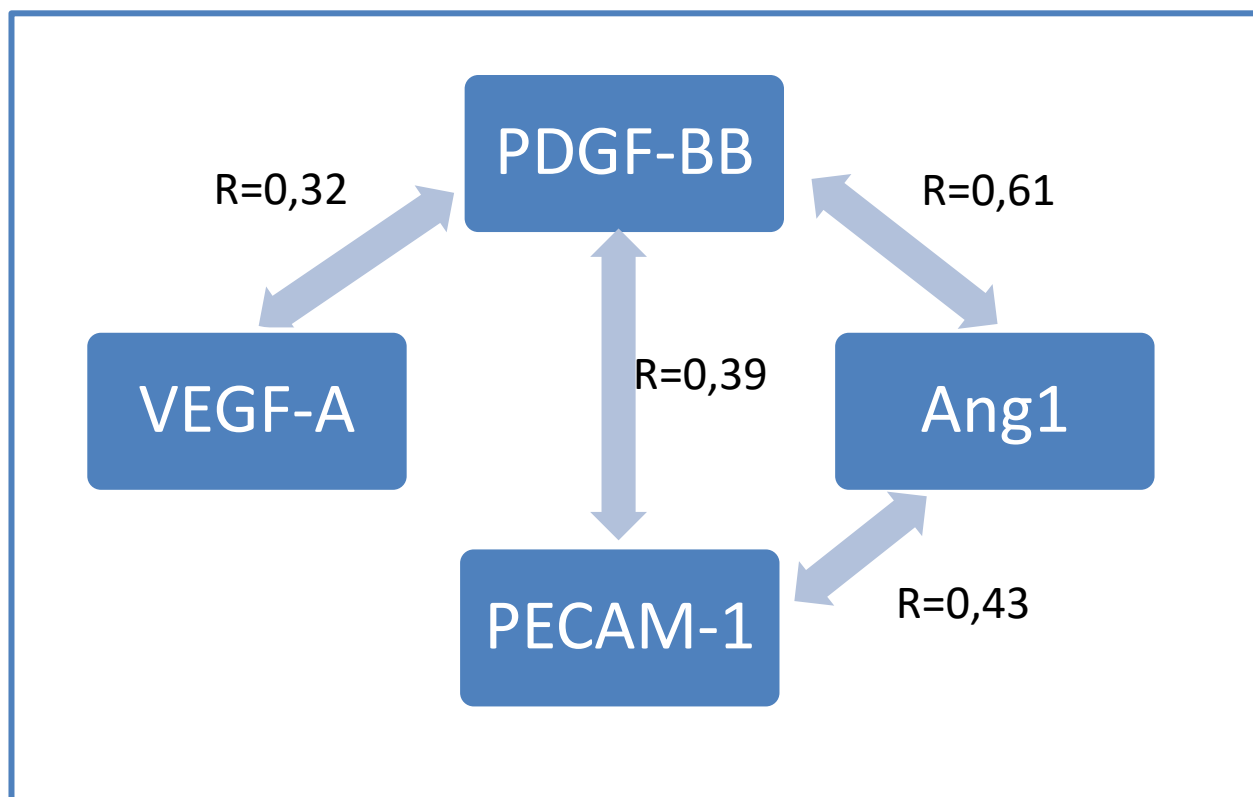


Рисунок 4.3.1. Корреляционные зависимости между проангиогенными факторами в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что для ангиогенеза важна не столько концентрация отдельно взятых проангиогенных факторов в сыворотке крови, сколько баланс между ними, необходимый для формирования правильного микрососудистого русла легких. Ряд факторов ангиогенеза могут изменять свою проангиогенную направленность на антиангиогенную при сочетании воздействиям с другими маркерами ангиогенеза или агрессивными факторами внешней среды [83; 90; 91].

4.4. Результаты ROC- анализа проангиогенных и антиангиогенных факторов в сыворотке крови недоношенных новорожденных с РДСН и пациентов первого года жизни, сформировавших и не сформировавших БЛД

Для определения возможного прогностического значения концентрации изученных факторов ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных новорожденных был проведен ROC-анализ для следующих факторов ангиогенеза: фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), фактор роста эндотелия сосудов D (VEGF-D), тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB), молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию-1 (PECAM-1), ангиопоэтин-1 (ANGPT-1), ангиопоэтин-2 (ANGPT-2), фактор роста соединительной ткани (CTGF).

4.4.1. Результаты ROC - анализа для проангиогенных факторов

При оценке значимости проангиогенных факторов ангиогенеза для прогнозирования формирования БЛД у пациентов с РДСН наилучший результат был получен для трех проангиогенных факторов: фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), фактор роста эндотелия сосудов D (VEGF-D), тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB). Основные статистические показатели приведены в таблице 4.4.1, ROC-кривые продемонстрированы на рисунке 4.4.1.

Таблица 4.4.1. Статистические результаты ROC-анализа для проангиогенных факторов.

Test Variable(s)	Result	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PDGF-BB, пг/мл		,709	,072	,002	,568	,850
VEGF-A, пг/мл		,673	,064	,011	,547	,799
VEGF-D, нг/мл		,612	,066	,099	,482	,741

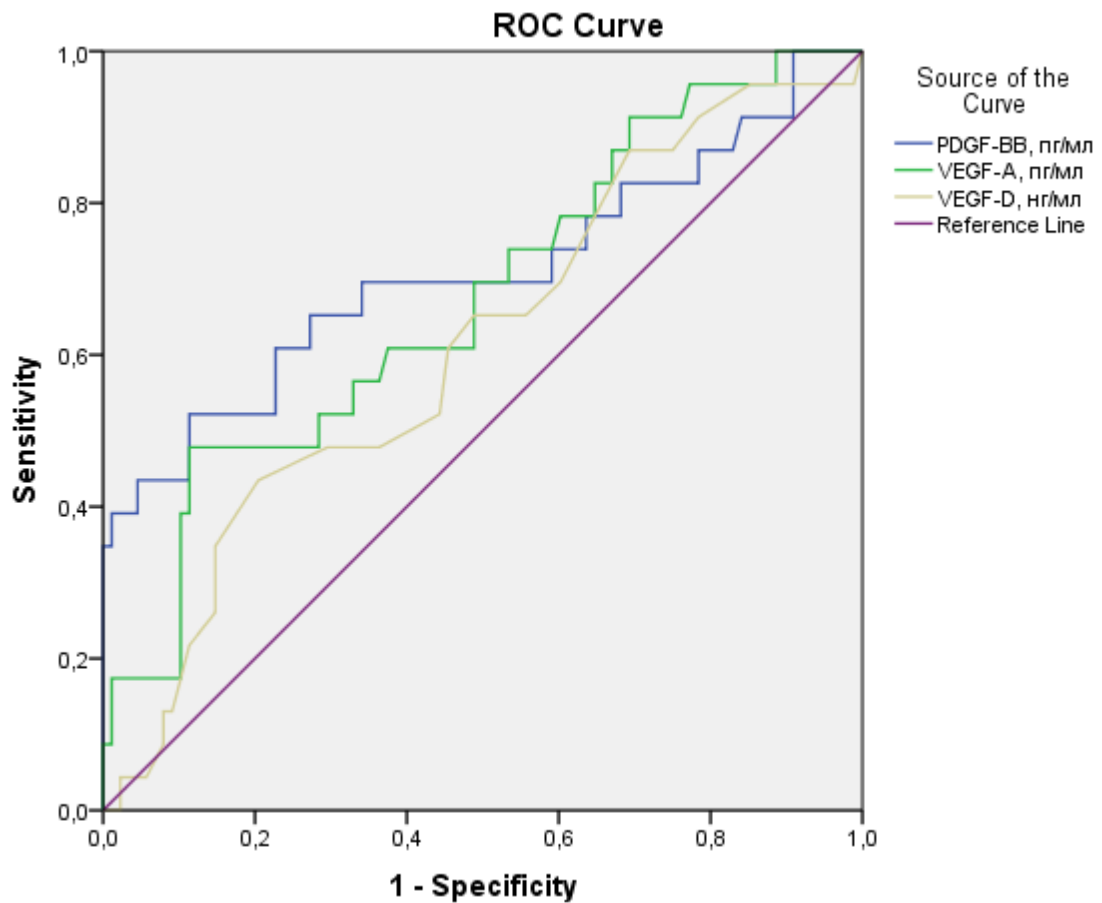


Рисунок 4.4.1. Сопоставление концентрации проангиогенных факторов ангиогенеза у детей с РДСН и БЛД, ROC-кривые.

Для концентрации PDGF-BB (AUC более 0,700) проведено определение оптимального разделяющего значения (cut-off), оно составило 10135 пг/мл с чувствительностью 52% и специфичностью 88,6%. Концентрация более 10800 пг/мл обеспечивает специфичность более 90% для подтверждения диагноза БЛД.

4.4.2. Результаты ROC - анализа для антиангиогенного фактора

При оценке значимости ангиангиогенных факторов ангиогенеза для прогнозирования формирования БЛД у пациентов с РДСН наилучший результат был получен для ангиопоэтина-2 (ANGPT-2). Для диагностики наличия или отсутствия БЛД, площадь под кривой составила 0,693, основные

статистические показатели приведены в таблице 4.4.2, ROC-кривая продемонстрирована на рисунке 4.4.2.

Таблица 4.4.2. Статистические результаты ROC- анализа для ANGPT-2.

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
ANGPT2, пг/мл	,693	,063	,006	,570	,817

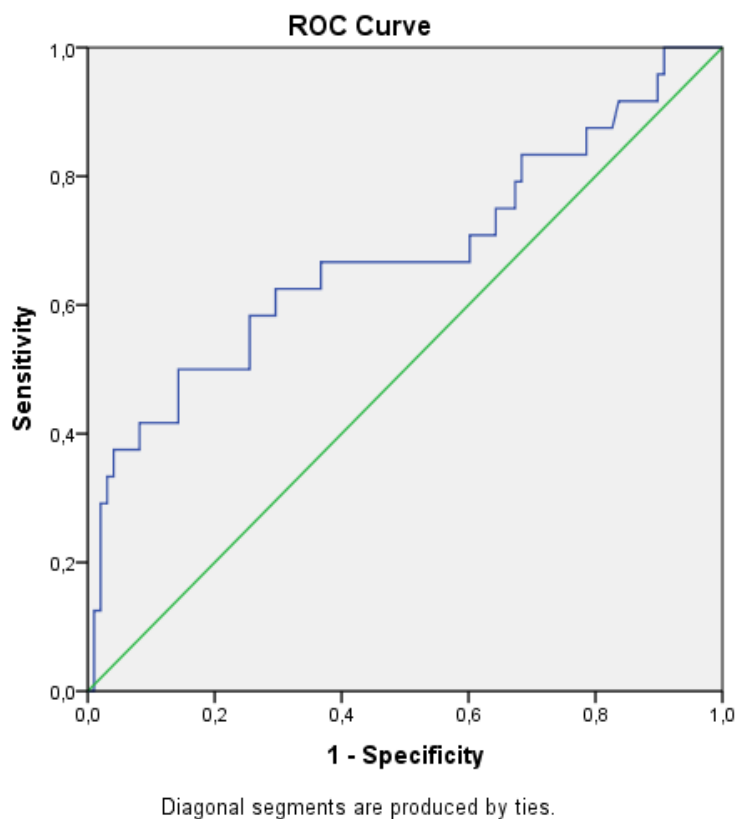


Рисунок 4.4.2. ROC- кривая для концентрации ANGPT-2.

Оптимальное разделяющее значение (cut-off) для прогнозирования наличия или отсутствия БЛД для ANGPT-2 составило 6800 пг/мл с чувствительностью 58% и специфичностью 80%. Концентрация ANGPT2 более 8200) пг/мл позволяет прогнозировать формирование БЛД со специфичностью 91%.

4.5. Шкала прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей

Определенные по результатам работы клинические и анамнестические факторы риска развития бронхолегочной дисплазии и дисбаланс биомаркеров ангиогенеза дают возможность прогнозирования развития данного заболевания у глубоко недоношенных детей с РДСН с помощью разработанной шкалы балльной оценки (таблица 4.5.1).

В исследовании проведена верификация данной прогностической шкалы развития БЛД, включающей 7 параметров. В шкалу включены следующие клиничко-анамнестические данные: гестационный возраст, показатель массы тела при рождении, оценки по шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни, а также длительность проводимой ИВЛ; следующие лабораторные данные: уровень ANGPT2 и PDGF-BB в сыворотке крови недоношенных детей.

Каждый показатель был оценен в 0 или 1 балл. Гестационный возраст при рождении >28 недель соответствует 0 баллов, ≤ 28 недель – 1 баллу; масса тела при рождении >985 граммов соответствует 0 баллов, ≤ 985 граммов – 1 баллу; оценка по шкале APGAR на первой минуте жизни >5 баллов соответствует 0 баллов, ≤ 5 баллов – 1 баллу; оценка по шкале APGAR на пятой минуте жизни > 6 баллов соответствует 0 баллов, ≤ 5 баллов – 1 баллу; длительность проводимой ИВЛ <10 дней соответствует 0 баллов, ≥ 10 дней – 1 баллу. Содержание биомаркеров ангиогенеза: концентрация ANGPT-2 в сыворотке крови <8200 пг/мл соответствует 0 баллов, ≥ 8200 пг/мл – 1 баллу; концентрация PDGF-BB в сыворотке крови >10800 пг/мл соответствует 0 баллов, ≤ 10800 пг/мл – 1 баллу.

Таблица 4.5.1. Шкала прогнозирования БЛД у недоношенных детей.

<i>Критерий</i>	<i>0 баллов</i>	<i>1 балл</i>
Гестационный возраст при рождении	>28 недель	≤28 недель
Масса тела при рождении	>985 граммов	≤985 граммов
Оценка по шкале APGAR на 1 минуте	>5 баллов	≤5 баллов
Оценка по шкале APGAR на 5 минуте	>6 баллов	≤6 баллов
Длительность ИВЛ	<10 дней	≥10 дней
Концентрация ANGPT-2 в сыворотке крови	<8200 пг/мл	≥8200 пг/мл
Концентрация PDGF-BB в сыворотке крови	>10800 пг/мл	≤10800 пг/мл

Параметры, отображенные в данную прогностическую шкалу подобраны согласно статистическим критериям, а также результатам проведенного ROC-анализа. Риск формирования БЛД у пациентов на этапе РДСН оценивается исходя из суммы баллов по 7 клинико-лабораторным критериям, указанным в таблице 4.5.1. Набранная сумма до 3 баллов включительно соответствует низкому риску формирования БЛД, тогда как набранная сумма от 4 до 7 баллов соответствует высокому риску формирования БЛД.

Рекомендуемый временной интервал оценки суммы баллов с использованием предложенной нами шкалы для прогнозирования развития БЛД у пациента соответствует 10 – 20 дню жизни пациента, после завершения

раннего неонатального периода. Чувствительность данной шкалы соответствует 80%, специфичность - 86%.

4.6. Клинические примеры

Результаты оценки риска формирования БЛД представлены в клинических примерах.

Клинический пример №1.

Ребенок Ф., 15 дней. Родился у женщины 25 лет; соматический анамнез без особенностей; от 2 беременности, 1 родов (1 беременность – самопроизвольный выкидыш на ранних сроках, без осложнений). Течение беременности: 1 триместр – отеки, артериальная гипертензия; 2 триместр – фето-плацентарная недостаточность, кольпит. Течение родов: 1 преждевременные оперативные роды на сроке гестации 30 недель, 5 дней в связи с декомпенсацией фето - плацентарной недостаточности, синдромом задержки развития плода. Масса тела при рождении составила 970 граммов. Оценка по шкале APGAR 6/7 баллов. Состояние недоношенного ребенка после рождения было расценено как тяжелое. Тяжесть состояния была обусловлена дыхательной недостаточностью, неврологической симптоматикой, проявляющейся синдромом угнетения ЦНС. В родильном зале проведена интубация трахеи, начата ИВЛ. На 8-ой минуте жизни с целью профилактики развития РДСН эндотрахеально был введён препарат экзогенного сурфактанта. После стабилизации состояния пациент был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии новорождённых для дальнейшего обследования и лечения, продолжена ИВЛ. 3 дня проводилась ИВЛ, далее переведен на СРАР (проводилась 7 дней), на фоне регресса дыхательных нарушений переведен на подачу увлажненного кислорода через назальные канюли со скоростью потока 2 л/мин (проводилась 2 дня), далее переведен на подачу кислорода через лицевую маску со скоростью потока 1-2 л/мин. По данным лабораторного обследования отмечались положительные

маркеры воспаления, по данным рентгенографии органов грудной клетки - течение врожденной пневмонии, проводилась антибактериальная терапия с положительным эффектом. На 14 сутки жизни с массой тела 1030 граммов переведен в отделение патологии новорожденных, где получал лечение в течение месяца. В возрасте 28 суток жизни, учитывая сохраняющуюся зависимость от дополнительной оксигенации был выставлен диагноз Бронхолегочная дисплазия, возникшая в перинатальном периоде. С 1 месяца 6 дней в дотации увлажненного кислорода не нуждался.

По данным УЗИ головного мозга: УЗ-картина постгипоксических изменений, незрелости структур головного мозга. Проведена консультация офтальмолога – ретинопатия, 1 стадия, активная фаза.

В возрасте 1 месяца 16 дней был выписан домой с диагнозом: Другие случаи недоношенности 30,5 недель. Постконцептуальный возраст 37 недель. Бронхолегочная дисплазия, возникшая в перинатальном периоде. Ретинопатия недоношенных 1 стадия, активная фаза. Врожденная пневмония, неуточненная, реконвалесцент. Малый размер плода для гестационного возраста. Умеренная белково-энергетическая недостаточность.

У данного пациента методом иммуноферментного анализа был определен уровень факторов ангиогенеза в сыворотке крови на этапе РДСН в возрасте 15 дней. По результатам проведенного обследования получены следующие результаты: уровень проангиогенного PDGF-BB составил 8910 пг/мл (<10800 пг/мл), уровень антиангиогенного ANGPT-2 составил 9163 пг/мл (>8200 пг/мл). В соответствии с проведенным ROC-анализом концентрация данных факторов позволяет прогнозировать развитие БЛД у данного пациента. При оценке по разработанной нами шкале этот пациент набрал 4 балла из 7 (гестационный возраст >28 недель (0 баллов); масса тела при рождении <985 граммов (1 балл), оценка по шкале APGAR на первой минуте жизни 6 баллов (0 баллов); оценка по шкале APGAR на пятой минуте жизни 7 баллов (0 баллов); длительность ИВЛ = 10 дней (1 балл); концентрация PDGF-BB в сыворотке крови <10800 пг/мл (1 балл);

концентрация ANGPT-2 в сыворотке крови >8200 пг/мл (1 балл)). Полученное количество баллов соответствует высокому риску развития БЛД.

Клинический пример №2.

Ребенок О., 10 дней. Родился у женщины 36 лет; соматический анамнез без особенностей; от 3 беременности, 3 родов (1,2 беременности – своевременные роды, без осложнений). Течение беременности: 1 триместр – без особенностей; 2,3 триместр: умеренная преэклампсия, фето-плацентарная недостаточность. Течение родов: 3 преждевременные оперативные роды на сроке гестации 29 недель, 6 дней в связи с развитием преэклампсии у матери, плацентарных нарушений. Масса тела при рождении – 1100 граммов, оценка по шкале APGAR 5/6 баллов. Состояние недоношенного ребенка после рождения расценивалось как тяжелое. Тяжесть состояния была обусловлена дыхательной недостаточностью, неврологической симптоматикой, проявляющейся в виде синдрома угнетения ЦНС. В родильном зале налажена неинвазивная искусственная вентиляция легких методом СРАР. Препараты экзогенного сурфактанта не вводились. После стабилизации состояния пациент для обследования и лечения был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии новорождённых, где была продолжена респираторная терапия методом СРАР (проводилась 8 дней), далее на фоне регресса дыхательных нарушений переведен на подачу увлажненного кислорода через лицевую маску со скоростью потока 2 л/мин (проводилась 15 дней). С возраста 23 дней в дотации кислорода не нуждался. По данным лабораторного обследования отмечались положительные маркеры воспаления, по данным рентгенографии органов грудной клетки отмечалось течение врожденной пневмонии, проводилась антибактериальная терапия с положительным эффектом. На 12 сутки жизни с массой тела 1360 граммов переведен в отделение патологии новорожденных, где получал лечение в течение месяца.

По данным УЗИ головного мозга: ЭХО-признаки гипоксически-ишемических изменений, незрелость. Проведена консультация офтальмолога – сетчатка в стадии созревания.

В возрасте 1 месяца 15 дней был выписан домой с диагнозом: Другие случаи недоношенности 29,6 недель. Постконцептуальный возраст 36 недель. Анемия недоношенных. Неонатальная желтуха, связанная с преждевременным родоразрешением, купирована. Врожденная пневмония неуточненная, реконвалесцент.

У данного пациента методом иммуноферментного анализа был определен уровень факторов ангиогенеза в сыворотке крови на этапе РДСН в возрасте 10 дней. По результатам проведенного обследования получены следующие результаты: уровень проангиогенного PDGF-BB составил 11200 пг/мл (>10800 пг/мл), уровень антиангиогенного ANGPT-2 составил 6179 пг/мл (<8200 пг/мл). В соответствии с проведенным ROC-анализом концентрация данных факторов позволяет прогнозировать отсутствие развитие БЛД у данного пациента. При оценке по разработанной нами шкале, пациент имеет 2 балла из 7 (гестационный возраст >28 недель (0 баллов); масса тела при рождении >985 граммов (0 баллов), оценка по шкале APGAR на первой минуте жизни 5 баллов (1 балл); оценка по шкале APGAR на пятой минуте жизни 6 баллов (1 балл); длительность ИВЛ <10 дней (0 баллов); концентрация PDGF-BB в сыворотке крови >10800 пг/мл (0 баллов); концентрация ANGPT-2 в сыворотке крови <8200 пг/мл (0 баллов). Полученное количество баллов соответствует низкому риску развития БЛД.

Данные клинические примеры показывают актуальность и необходимость определения факторов ангиогенеза в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа у недоношенных детей на этапе РДСН с целью прогнозирования развития бронхолегочной дисплазии уже в неонатальном периоде. Несмотря на сопоставимые антропометрические данные и гестационный возраст при рождении у пациентов в обоих клинических примерах, первый пациент сформировал бронхолегочную дисплазию, в то

время как во втором случае – нет. Определение факторов ангиогенеза в сыворотке крови в предложенные декретированные сроки могло бы уже в неонатальном периоде дать возможность выявить наличие или отсутствие высокого риска формирования БЛД, что позволило бы скорректировать план терапии для профилактики развития данного заболевания.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

На современном этапе бронхолегочная дисплазия является наиболее распространенным хроническим заболеванием легких грудных детей [49; 70]. Внимание к данному заболеванию объясняется еще и тем, что БЛД является социально значимой патологией в связи с высоким риском инвалидизации пациентов, а в тяжелых случаях и смертности среди недоношенных младенцев на первом году жизни.

Успехи неонатальной реанимации привели к увеличению выживаемости глубоко недоношенных детей с низкими антропометрическими показателями при рождении и предопределили повышение частоты формирования БЛД у данной категории пациентов. Исследования последнего десятилетия убедительно демонстрируют, что уровень заболеваемости БЛД растет на фоне применения современных реанимационных стратегий при выхаживании рожденных преждевременно детей [18; 101].

Основные факторы риска развития БЛД у недоношенных детей (искусственная вентиляция легких, токсическое действие кислорода на незрелую легочную ткань, внутриутробное инфицирование плода и др.) подробно изучены в многочисленных научных исследованиях последних десятилетий [9; 74; 90]. В настоящее время внимание исследователей привлекают другие факторы риска развития БЛД, приводящие к сниженной альвеоляризации и васкуляризации легочной ткани. На современном этапе изучения бронхолегочной дисплазии несомненный интерес представляют такие патогенетические механизмы развития заболевания, как воспаление, ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса и апоптоз, тесно связанные с нарушением регуляции передачи сигналов факторов роста, что вызывает нарушение альвеоляризации, аномальный рост микрососудов легких и пневмофиброз [74]. Выраженные нарушения ангиогенеза сосудов легких могут приводит к тяжелому течению БЛД, осложненному легочной

гипертензией и гипертрофией правого желудочка сердца, что существенно повышает вероятность летального исхода у этих пациентов [14; 58].

В частности, было показано, что у пациентов, получавших длительную вентиляцию легких, капиллярная сеть упрощается, уменьшается ее разветвление и сохраняется двойной капиллярный рисунок, характерный для сакулярной стадии развития легких. Эти особенности снижают эффективность газообмена в легких [33]. Результаты данного исследования предполагают, что при БЛД могут наблюдаться различные аномалии в легочных капиллярах с подавленным ростом сосудов на одних стадиях заболевания и чрезмерным дисморфным ростом на других стадиях, что, возможно, представляет собой неадаптивную компенсаторную реакцию.

Результаты анализа данных отечественных и международных научных источников продемонстрировали, что наибольший интерес для изучения роли нарушений ангиогенеза сосудов лёгких в патогенезе БЛД представляют следующие факторы: факторы роста эндотелия сосудов (VEGF A и VEGF D), трансформирующий фактор роста β (TGF- β), тромбоцитарный фактор роста-BB (PDGF-BB), фактор роста соединительной ткани (CTGF), ангиопоэтины-1,2 (ANGPT-1, ANGPT-2), молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию (PECAM-1), фактор роста фибробластов 10 (FGF-10), тромбоспондин-1 (TSP-1) [10; 11; 90]. Однако в современных литературных источниках содержится недостаточное количество данных о состоянии баланса этих факторов при формировании бронхолегочной дисплазии у глубоко недоношенных детей.

Таким образом, в настоящее время изучение взаимодействия факторов роста, регулирующих нормальное развитие паренхимы и микрососудистого русла легких, и их роли в патогенезе БЛД является актуальной научной задачей, призванной определить баланс между проангиогенными и антиангиогенными молекулярными сигнальными путями для правильного ангиогенеза и ремоделирования микрососудистой сети легких.

Цель исследования

Определить роль факторов ангиогенеза в формировании и течении бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей для совершенствования прогнозирования, ранней диагностики заболевания и тактики ведения данной категории больных.

В исследование было включено 164 недоношенных ребенка, находящихся на госпитализации в отделении патологии новорожденных и детей раннего детского возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», в том числе 25 детей, обследованных в неонатальном периоде в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных ГБУЗ МО «МОПЦ» г. Балашиха.

Согласно критериям включения в исследование вошли следующие группы пациентов:

- недоношенные дети с респираторным дистресс-синдромом новорожденных до 28 суток жизни (n=43).
- недоношенные дети в возрасте от 28 суток до 12 месяцев жизни, сформировавшие (n=89) и не сформировавшие (n=32) бронхолегочную дисплазию с респираторным дистресс-синдромом новорожденных в анамнезе.

Обязательным условием включения пациента в изучаемую группу являлось подписанное информированное согласие родителей/законных представителей на проведение исследования у их ребенка.

Из исследования исключены пациенты старше 12 месяцев; дети с врожденным стридором, врожденными пороками респираторной и/или сердечно-сосудистой систем, муковисцидозом; доношенные дети; пациенты, родители/законные представители которых отказались от участия их ребенка в данном исследовании.

Все пациенты были поделены на 3 группы:

1 – недоношенные дети на этапе респираторного дистресс-синдрома новорожденных (до 28 суток жизни) (n=43)

2 – недоношенные дети с РДСН в анамнезе, сформировавшие бронхолегочную дисплазию (после 28 суток жизни) (n=89)

3 – недоношенные дети, не сформировавшие бронхолегочную дисплазию, имевшие РДСН в анамнезе (n=32)

Проведенный анализ клинических и анамнестических данных пациентов, включенных в исследование, показал, что у матерей 11 пациентов из 164 (6,7%) было зафиксировано течение инфекционного процесса – хориоамнионита. Профилактика РДСН кортикостероидами проводилась 54 из 164 беременных женщин (33%).

подавляющему большинству пациентов в первые часы после рождения с целью уменьшения проявлений РДСН были введены препараты экзогенного сурфактанта - 128 детям из 164 (78%). Повторное введение потребовали 22 пациента, включенных в исследование (13%). Возраст включенных в исследование пациентов составил от 1 дня до 1 года. Ме = 36 дней [26; 70]; гестационный возраст при рождении - от 23 до 36 недель. Ме = 29 недель [27; 31]. Из 164 пациентов 56 (34%) родились на сроке гестации от 23 до 27,6 недель (глубоко недоношенными), 77 (47%) родились на сроке гестации от 28 до 31,6 недель, 31 ребенок (19%) родился на сроке гестации от 32 до 36,6 недель. Большинство обследованных детей родились с гестационным возрастом менее 32 недель (133 пациента, 81%). Медиана гестационного возраста детей, которые сформировали бронхолегочную дисплазию, статистически значимо отличается от аналогичного показателя группы детей без БЛД ($p < 0,001$). Несомненно, выявленные различия связаны с преимущественным формированием данной патологии у глубоко недоношенных детей. Согласно результатам мета-анализа 2021 года, именно эти дети чаще формируют БЛД [88]. Статистически достоверных различий по гендерному признаку в группах пациентов выявлено не было, однако отмечена тенденция к преобладанию мальчиков (55%) среди пациентов, сформировавших БЛД.

Масса тела при рождении у пациентов, включенных в исследование, составила от 480 до 2860 граммов. Ме = 1048 г [850; 1570]. Большинство обследованных детей имели экстремально низкую массу тела при рождении

(менее 1000 граммов) - 87 пациентов (53%); пятая часть детей - очень низкую массу (1000-1499 граммов) - 35 пациентов (21%); низкую массу тела при рождении (1500 – 2499 граммов) - 29 пациентов (18%) и массу тела 2500 граммов и более имели только 13 пациентов (8%), при этом 4 пациента при рождении имели массу менее 500 граммов. Три четверти обследованных пациентов (122 ребенка) родились с очень низкой массой тела (менее 1500 граммов). При чем, большинство из них вошли в группу младенцев, сформировавших бронхолегочную дисплазию. При проведении статистической обработки данных выявлено достоверное различие значений показателя массы тела на момент рождения в исследуемых группах ($p < 0,001$), что также подтверждает связь формирования БЛД с глубокой недоношенностью и, следовательно, с низкими показателями массы тела при рождении.

Оценка по шкале APGAR у обследованных пациентов, составила на первой минуте жизни 5,00 баллов [4,0; 6,0]. На пятой минуте жизни - 6,5 баллов [6,0; 7,0]. При сравнении данного показателя между исследуемыми группами, оценка по шкале APGAR на первой и пятой минутах оказалась достоверно значимо выше в группе детей, которые БЛД не сформировали, чем в группе детей, сформировавших впоследствии данную патологию ($p < 0,001$).

В общей группе обследованных детей ($n=164$) медиана длительности традиционной ИВЛ составила 9,5 дней [5; 24]. При этом медиана общей длительности проводимой ИВЛ, включая неинвазивную (CPAP), составила 15 дней [5; 35]. Медиана общей длительности кислородозависимости составила 44,5 дня [15; 66]. Такая длительная необходимость в дополнительной дотации увлажненного кислорода указывает на тяжесть состояния обследованных пациентов в неонатальном и постнеонатальном периодах. Половина обследованных пациентов ($n=89$) в постнеонатальном периоде сформировали бронхолегочную дисплазию. В группе детей, которые бронхолегочную дисплазию впоследствии не сформировали, отмечено более частое применение щадящих режимов респираторной поддержки, длительность

дополнительной оксигенации была существенно меньше. Выявлено достоверное различие между значениями этих показателей в двух группах пациентов (сформировавших и не сформировавших БЛД) ($p < 0,001$).

При разделении пациентов, страдающих бронхолегочной дисплазией ($n=89$), на 3 подгруппы в соответствии со степенью тяжести течения заболевания согласно рекомендациями, предложенными Jobe A.H, Bancalari E. В 2001 году [104], были получены следующие результаты: легкому течению соответствовали 22 пациента (25%), среднетяжелому - 43 пациента (48%), тяжелому – 24 пациента (27%). В подгруппе пациентов с тяжелым течением БЛД оказалось 7 пациентов (29%), у которых по данным эхокардиографического исследования была выявлена легочная гипертензия, что сопоставимо с данными мировой литературы [17; 47]. Проведенный в 2018 году мета-анализ 25 публикаций по результатам обследования недоношенных детей со средним гестационным возрастом <30 недель показал, что распространенность ЛГ составляет 39% у младенцев с тяжелым течением БЛД [17]. В подгруппах пациентов с легким и среднетяжелым течением данного осложнения выявлено не было.

При оценке частоты встречаемости коморбидной патологии в исследуемых группах было выявлено, что у пациентов, сформировавших БЛД (2 группа), в качестве сопутствующих заболеваний чаще всего встречались врожденная пневмония, внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) и ретинопатия недоношенных, что соответствует литературным данным [88].

В нашем исследовании были проанализированы следующие клинические и анамнестические показатели: гендерная принадлежность, гестационный возраст и масса тела при рождении, оценки по шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни недоношенных новорожденных на этапе РДСН и на первом году жизни у пациентов с РДСН в анамнезе, а также длительность различных методов респираторной поддержки. При проведении корреляционного анализа результатов проведенного нами исследования, была выявлена обратная зависимость умеренной силы между изученными клиничко-

анамнестическими факторами и длительностью проводимой ИВЛ. Иными словами, глубоко недоношенным детям с низкими оценками по шкале APGAR требовалось более длительное проведение традиционной вентиляции легких, что повышало риск формирования БЛД.

Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о том, что БЛД чаще формируют глубоко недоношенные дети с массой тела при рождении менее 1000 граммов, которые были рождены во время каникулярной или саккулярной стадий внутриутробного формирования легких (до 28 недели гестации), перенесшие РДНС в анамнезе, с низкими оценками по шкале APGAR (менее 5 и 6 баллов на первой и пятой минутах жизни соответственно), нуждающийся во введении препаратов экзогенного сурфактанта и требующие длительную респираторную поддержку с применением традиционной ИВЛ с последующим переходом на СРАР и дополнительной оксигенацией более 28 суток жизни. Данные характеристики полностью соответствуют современной модели пациента с БЛД [5]. Данная когорта пациентов чаще страдает такой сопутствующей патологией, как врожденная пневмония, ВЖК и ретинопатия недоношенных, что соответствует данным мировой литературы [53; 88; 100]. Невысокий процент пациентов с тяжелым течением БЛД (8% - 7 детей из 89, сформировавших БЛД), у которых была зарегистрирована ЛГ, свидетельствует о возможной недооценке гемодинамических нарушений в малом круге кровообращения в неонатальном периоде и необходимости регулярного тщательного эхокардиографического контроля за давлением в правых отделах сердца с использованием расширенного протокола обследования и/или инвазивного измерения этих показателей.

В соответствии с поставленными в исследовании задачами методом иммуноферментного анализа определен уровень проангиогенных и антиангиогенных факторов ангиогенеза в сыворотке крови во всех трех исследуемых группах.

К проангиогенным факторам, изученным в нашем исследовании, относятся фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), фактор роста

эндотелия сосудов D (VEGF-D), тромбоцитарный фактор роста BB (PDGF-BB), молекула адгезии эндотелиальных клеток тромбоцитов-1 (PECAM-1), ангиопоэтин-1 (ANGPT-1).

VEGF-A играет ключевую роль в ангиогенезе. Без него невозможен нормальный ангиогенез, идущий наряду с альвеологенезом. К настоящему времени появилась информация о том, что глубоко недоношенные дети, подверженные наибольшему риску развития БЛД, имеют в сыворотке крови сниженный уровень данного биомаркера [19, 100]. В нашем исследовании также выявлено статистически значимое снижение VEGF-A в сыворотке крови в группе пациентов, у которых бронхолегочная дисплазия развилась, по сравнению с пациентами, у которых данная патология не развилась ($p=0,03$). Данные изменения концентрации исследуемого фактора могут свидетельствовать о том, что исходный уровень VEGF-A как проангиогенного фактора у новорожденных детей на этапе РДСН еще относительно высок, абсолютное его снижение происходит при формировании БЛД. В то время как у пациентов, не сформировавших БЛД, не происходит его критического снижения в сыворотке крови, что подтверждает ранее доказанную проангиогенную роль VEGF-A и указывает на его явный дефицит у глубоко недоношенных пациентов, формирующих БЛД.

VEGF-D наряду с VEGF-A играет значимую проангиогенную роль. При его снижении нарушаются процессы регуляции и формирования кровеносных сосудов из клеток – предшественниц, а также деление уже имеющихся кровеносных сосудов [73]. В нашем исследовании выявлена разница пограничной значимости при сравнении уровня VEGF-D в сыворотке крови пациентов с РДСН и пациентов без БЛД ($p=0,05$). Данные изменения концентрации VEGF-D могут свидетельствовать о наиболее выраженных нарушениях ангиогенеза сосудов легких именно на этапе РДСН, когда новорожденный недоношенный ребенок подвергается максимальному стрессу, а также нуждается в проведении интенсивной терапии. В дальнейшем отмечается постепенный рост данного фактора в сыворотке крови, что может

быть признаком текущих процессов восстановления поврежденной легочной ткани и микрососудистого русла легких.

PDGF-BB наряду с другими проангиогенными факторами, является важным стимулятором восстановления тканей. Его роль заключается не только в участии в формировании микрососудистого русла легких, но также и в процессах септации и альвеоляризации при формировании структуры легочной ткани [83]. В недавнем крупном зарубежном исследовании 2020 года была определена связь низкого уровня PDGF-BB в сыворотке крови с повышенным риском развития БЛД у недоношенных младенцев [16]. В нашем исследовании была также выявлена достоверная разница между уровнями данного фактора в группе детей с БЛД по сравнению с группой детей без БЛД ($p=0,02$). Явный дефицит PDGF-BB у детей, сформировавших БЛД, свидетельствует о нарушении передачи сигналов, необходимых для нормального ангиогенеза, а также о характерных изменениях в легочной ткани, происходящих при формировании БЛД [83].

Молекула PECAM-1 также относится к проангиогенным факторам и является ключевой для формирования надежного контакта между клетками эндотелия. В исследовании Villar J., Zhang H. и др. было доказано, что повреждение незрелой ткани легкого, индуцированное гипоксией, либо механическим воздействием на легочную ткань при использовании «жестких» параметров ИВЛ у недоношенных детей (особенно на этапе РДСН), влечет за собой нарушение межклеточных контактов, приводя к проникновению молекул PECAM-1 в кровоток. [109].

В проведенном исследовании была выявлена статистически достоверная разница между уровнем данного фактора в группе детей с РДСН и уровнем у пациентов, сформировавших БЛД ($p=0,0016$). Самый высокий уровень PECAM-1 выявлен в сыворотке крови детей, находящихся в «остром периоде» РДСН (в тот самый момент, когда недоношенный, только родившийся младенец испытывает максимальный стресс, гипоксию и зачастую нуждается в проведении ИВЛ с применением «жестких» параметров), а самый низкий

уровень - в группе детей со сформированной БЛД. Полученные в нашей работе данные совпадают с результатами проведенного ранее зарубежного исследования, в котором также отмечалось снижение концентрации PECAM-1 в сыворотке крови у детей, страдающих бронхолегочной дисплазией [109]. Таким образом, очевидно, что высокая концентрация этого фактора на этапе РДСН характеризует активно текущий процесс повреждения эндотелия. Снижение уровня у детей на этапе БЛД может говорить о том, что процессы повреждения эндотелия легких к этому времени в основном завершены.

Ангиопоэтин-1 также является одним из значимых проангиогенных факторов и регулирует физиологическую неоваскуляризацию. Он играет ключевую роль в поддержании целостности сосудистой стенки [71]. Роль ангиопоэтина-1 в развитии бронхолегочной дисплазии неоднократно доказывалась во многих исследованиях [59; 93; 94]. Однако в нашем исследовании, при оценке уровня ангиопоэтина-1 статистически достоверной разницы между группами выявлено не было. Во всех группах отмечена значительная вариабельность полученных показателей. Несмотря на отсутствие достоверных различий содержания данного фактора в сыворотке крови пациентов исследуемых групп, нами была выявлена тенденция, свидетельствующая о его проангиогенной роли: уровень ангиопоэтина-1 оказался относительно выше в группе детей без БЛД, и ниже всего в группе детей с БЛД. В группе детей на этапе РДСН он занимает промежуточное значение. В связи с выявленной тенденцией мы считаем возможным говорить о том, что изменения концентрации ангиопоэтина-1 у детей обследованной нами когорты отражают нарушения процессов ангиогенеза, но, по-видимому, этот фактор не играет ведущую роль.

Результаты исследования концентрации ангиопоэтина-2 (ANGPT-2) и фактора роста соединительной ткани (CTGF) в сыворотке крови пациентов исследуемых групп позволили нам расценить роль этих факторов при формировании БЛД как антиангиогенную.

Ранее было показано, что ANGPT-2 может быть отнесен как к проангиогенным, так и к антиангиогенным факторам, так как в определенных условиях, например, на фоне гипоксии, а также взаимодействуя с другими биомаркерами ангиогенеза, данный фактор может кардинально изменять выполняемую функцию в формировании сосудистого русла легких. Так, при снижении проангиогенных сигналов, ANGPT-2 способен провоцировать дестабилизацию эндотелия, приводящую к нарушению ангиогенеза [13; 20]. В исследовании Bhandari V., Choo-Wing R. et al. был продемонстрирован его более высокий уровень в трахеальном аспирате у детей с БЛД по сравнению с пациентами без данного заболевания [20]. А в зарубежном исследовании 2020 года была подтверждена антиангиогенная роль данного фактора - были продемонстрированы более высокие его уровни в сыворотке крови у младенцев со сформированной БЛД [91]. В исследовании была выявлена достоверно значимая разница между группой пациентов на этапе РДСН и группой обследованных пациентов, не развивших БЛД по окончании постнеонатального периода ($p=0,039$). Наиболее высокий уровень ангиопоэтина-2 определен в группе детей с РДСН, в группе детей с БЛД он оказался несколько ниже, а самый низкий уровень отмечен в группе детей без бронхолегочной дисплазии. С нашей точки зрения, полученные результаты свидетельствуют об антиангиогенной роли данного фактора при формировании БЛД в условиях гипоксии.

Антиангиогенная роль фактора роста соединительной ткани (CTGF) в развитии БЛД у недоношенных младенцев неоднократно была показана во многих исследованиях, особенно это касается тяжелых форм данного заболевания [89; 112; 114]. В зарубежном исследовании Chen S., Rong M. и соавт., выполненного в 2011 году было продемонстрировано, что при сверхэкспрессии данного биомаркера в эпителиальных клетках альвеолярного типа II значительно нарушался ангиогенез, развивалось воспаление и отмечалось выраженное ремоделирование сосудов. Эти изменения приводили к значительному увеличению как давления в легочной артерии, так и

гипертрофии правого желудочка. Чрезмерное ремоделирование легочных сосудов способствовало высокому легочному сосудистому сопротивлению посредством сужения диаметра сосуда и уменьшения эластичности сосудистой стенки [30].

При оценке уровня CTGF в сыворотке крови пациентов обследованных групп в нашем исследовании статистически достоверной разницы между группами выявлено не было, что в основном связано с большим разбросом индивидуальных показателей. Учитывая известную роль данного фактора в процессах фиброзировании при тяжелых формах БЛД [89; 112], нами были проанализированы показатели данного антиангиогенного фактора в сыворотке крови пациентов с различной степенью тяжести заболевания. При сравнении содержания в сыворотке крови CTGF в подгруппах пациентов, у которых отмечалось среднетяжелое и тяжелое течение бронхолегочной дисплазии было отмечено статистически значимое повышение данного показателя у детей с БЛД тяжелого течения ($p=0,04$), что подтверждает развитие пневмофиброза и нарушение ангиогенеза у пациентов данной подгруппы, связанных, вероятно, с длительной гипероксией. С нашей точки зрения, полученные данные подтверждают антиангиогенную роль CTGF, выявленную в ряде научных исследований [30; 89; 112].

При проведении корреляционного анализа методом Спирмена были выявлены корреляционные зависимости умеренной силы между некоторыми проангиогенными факторами, в частности:

- положительные связи умеренной силы ($R=0,39$, $R=0,61$, $R=0,32$ соответственно) между уровнем тромбоцитарного фактора роста ВВ и PECAM-1, ангиопоэтином-1, а также фактором роста эндотелия сосудов А;
- положительная связь умеренной силы ($R=0,43$) между уровнем ангиопоэтина-1 и PECAM-1.

Полученные данные подтверждают, для правильного формирования микрососудистого русла легких необходимо комплексное сбалансированное действие целого ряда факторов ангиогенеза [83; 90].

Для определения возможного прогностического значения концентрации изученных факторов ангиогенеза в сыворотке крови недоношенных новорожденных был проведен ROC-анализ. Наилучший результат был получен для трех проангиогенных факторов: фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), фактор роста эндотелия сосудов D (VEGF-D), тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB). Для концентрации PDGF-BB (AUC более 0,700) было проведено определение оптимального разделяющего значения (cut-off), оно составило 10135 пг/мл с чувствительностью 52% и специфичностью 88,6%. Концентрация более 10800 пг/мл обеспечивает специфичность более 90% для подтверждения диагноза БЛД.

Из антиангиогенных факторов ангиогенеза для прогнозирования формирования БЛД у пациентов с РДСН наилучший результат был получен для ангиопоэтина-2 (ANGPT-2). Для диагностики наличия или отсутствия БЛД, площадь под кривой составила 0,693. Оптимальное разделяющее значение (cut-off) для прогнозирования наличия или отсутствия БЛД для ANGPT-2 составило 6800 пг/мл с чувствительностью 58% и специфичностью 80%. Концентрация ANGPT2 более 8200 пг/мл позволяет прогнозировать формирование БЛД со специфичностью 91%.

На основании определенных в исследовании анамнестических и клинических предикторов развития БЛД и дисбаланса биомаркеров ангиогенеза была разработана балльная шкала прогнозирования развития данного заболевания у глубоко недоношенных детей с РДСН. Параметры, отобранные в данную прогностическую шкалу, подобраны согласно статистическим критериям, а также результатам проведенного ROC-анализа. В шкалу включены следующие клинические и анамнестические данные: показатели гестационного возраста и массы тела при рождении, балльные оценки согласно шкале APGAR на первой и пятой минутах жизни, а также длительность проводимой ИВЛ; следующие лабораторные данные: уровень ANGPT2 и PDGF-BB в сыворотке крови недоношенных детей. Каждый показатель был оценен в 0 баллов или 1 балл.

В исследовании проведена верификация данной прогностической шкалы развития БЛД. Риск формирования БЛД у пациентов на этапе РДСН оценивается исходя из суммы баллов по 7 клинико-лабораторным критериям. Сумма баллов 0-3 соответствует низкому риску формирования БЛД, сумма баллов 4-7 баллов соответствует высокому риску формирования БЛД. Рекомендуемый временной интервал оценки суммы баллов с использованием предложенной нами шкалы для прогнозирования развития БЛД у пациента соответствует 10 – 20 дню жизни пациента, после завершения раннего неонатального периода. Чувствительность данной шкалы соответствует 80%, специфичность - 86%

ВЫВОДЫ

1. Дети, перенесшие РДСН в анамнезе и сформировавшие БЛД к 28 дню жизни, в отличии от не сформировавших БЛД пациентов, имели следующие клиничко-анамнестические характеристики: экстремально низкие и очень низкие показатели массы тела при рождении, гестационный возраст преимущественно менее 28 недель, оценки на шкале APGAR на 1-й и 5-й минутах от 4 до 6 баллов и менее, необходимость во введении препаратов экзогенного сурфактанта; потребность в проведении длительной респираторной поддержки в неонатальном периоде с применением инвазивной ИВЛ.

2. Патогенетически значимыми биомаркерами нарушений ангиогенеза и формирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей, перенесших РДСН в анамнезе, являются: фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A, VEGF- D, тромбоцитарный фактор роста PDGF-BB, молекула клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию PECAM-1, ангиопоэтин – 2.

3. У пациентов, сформировавших БЛД было выявлено выявлено значимое снижение в сыворотке крови следующих проангиогенных факторов:

- фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A в группе детей, сформировавших БЛД, по сравнению с группой детей, не сформировавших БЛД (Me = 82 пг/мл против 122 пг/мл, $p=0,03$).

- фактора роста эндотелия сосудов VEGF- D в группе детей на этапе РДСН по сравнению с детьми, с перенесенным РДСН, не сформировавшими впоследствии БЛД (Me = 1,8 нг/мл против 2,3 нг/мл, ($p=0,05$).

- тромбоцитарного фактора роста PDGF-BB в группе детей сформировавших БЛД по сравнению с группой детей, не сформировавших БЛД (5720 пг/мл против 9326 пг/мл, $p=0,02$)

- молекулы клеточной адгезии тромбоцитов к эндотелию PECAM-1 в группе детей, перенесших РДСН в анамнезе, сформировавших впоследствии

БЛД, по сравнению с группой недоношенных детей на этапе РДСН (Me = 3918 пг/мл против 5872 пг/мл, $p=0,016$).

4. У пациентов, включенных в исследование, было выявлено значимое повышение антиангиогенного фактора – ангиопоэтина – 2 (ANGPT-2) на этапе РДСН по сравнению с детьми, перенесшими РДСН и не сформировавшими БЛД (Me = 7656 пг/мл против 5837 пг/мл, $p=0,039$).

5. Выявленное снижение проангиогенных факторов и повышение антиангиогенного фактора, приводящее к нарушению ангиогенеза микрососудистого русла легких и нарушению развития эндотелия, определяет высокий риск формирования бронхолегочной дисплазии у глубоко недоношенных новорожденных с РДСН.

6. Выявленные в исследовании клинические и анамнестические факторы риска развития бронхолегочной дисплазии и дисбаланс биомаркеров ангиогенеза дают возможность прогнозирования формирования данного заболевания у недоношенных детей с РДСН с помощью разработанной шкалы балльной оценки, где суммарная оценка в 0-3 балла соответствует низкому риску развития бронхолегочной дисплазии, а оценка в 4-7 баллов соответствует высокому риску развития данной патологии.

Практические рекомендации

1. Выявленные по результатам работы клинико-анамнестические и лабораторные факторы риска формирования БЛД, рекомендованы для прогнозирования развития БЛД у недоношенных детей на этапе РДСН с целью определения групп риска, угрожаемых по развитию данной патологии, и проведения своевременной индивидуальной профилактики формирования заболевания.
2. Разработанная по результатам исследования балльная шкала прогнозирования развития бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей на этапе РДСН рекомендуется для использования в перинатальных центрах и других учреждениях выхаживания недоношенных новорожденных 1-го и 2-го этапов с целью определения индивидуального подхода и тактики лечения пациентов, угрожаемых по развитию БЛД.

Список литературы

1. Антонов А.Г., Борисевич О.А., Буркова А.С. и др., Байбарина Е.Н., Дегтярев Д.Н., Широкова В.И., ред. Интенсивная терапия и принципы выхаживания детей с экстремально низкой и очень низкой массой тела при рождении. Методическое письмо Минздравсоцразвития России от 16.12.2011. № 15-0/10/2-11336. М. 2011: 36
2. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Володин Н.Н., Давыдова И.В., Овсянников Д.Ю., Иванов Д.О., Бойцова Е.В., Яцык Г.В., Антонов А.Г., Ионов О.В., Рындин А.Ю., Гребенников В.А., Солдатова И.Г., Чубарова А.И. Ведение детей с бронхолегочной дисплазией. Педиатрическая фармакология. 2016; 13(4): 319-333
3. Басаргина М.А., Давыдова И.В., Турко Х.Р., Бондарь В.А., Фисенко А.П., Селиверстова А.А. Значение эхокардиографии в инструментальной диагностике лёгочной гипертензии у детей с бронхолегочной дисплазией. Российский педиатрический журнал. 2023; 26 (2): 134–139. doi: 10.46563/1560-9561-2023-26-2-134-139
4. Бондарь В.А., Давыдова И.В., Басаргина М.А., Фисенко А.П. Роль генетических предикторов в доклинической диагностике бронхолегочной дисплазии. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2022; 1: 5-9. doi: 10.26269/m7zs-qa3
5. Давыдова И.В., Фисенко А.П., Пожарищенская В.А., Казакова К.А., Басаргина Е.Ю., Бондарь В.А. Новая форма бронхолегочной дисплазии: реалии сегодняшнего дня. Доктору.Ру. 2020; 19 (10): 6-9. doi: 10.31550/1727-2378-2020-19-10-6-9
6. Ионов О.В. Ведение новорожденных с респираторным дистресс синдромом. Аверин А.П., Антонов А.Г., Байбарина Е.Н., Гребенников В.А., Дегтярев Д.Н., Дегтярева М.В., Иванов Д.О. и др. В книге: Клинические рекомендации (протоколы) по неонатологии под ред. Д.О.Иванова. Санкт – Петербург: ООО Информ-Навигатор. 2016; 217-250

7. Милованов А. П., Савельев С.В. Внутриутробное развитие человека. Москва: Медицина для всех, 2006: 297-306
8. Овсянников Д.Ю., Геппе Н.А., Малахов А.Б. и др., ред. Бронхолегочная дисплазия. Москва. 2020; 12-34
9. Овсянников Д.Ю., Дегтярёва Е.А., Мирошниченко В.П., Стрельникова В.А., Абрамян М.А. Факторы риска, диагностика, скрининг и терапия легочной гипертензии у детей с бронхолегочной дисплазией. Доктор.Ру. 2022; 21 (7): 12-19. doi: 10.31550/1727-23782022-21-7-12-19
10. Селиверстова А.А., Давыдова И.В., Басаргина М.А., Фисенко А.П., Семикина Е.Л. Механизмы развития легочной гипертензии у детей с бронхолегочной дисплазией. Доктор.Ру. 2022; 21 (7): 6-11. doi: 10.31550/1727-2378-2022-21-7-6-11.
11. Селиверстова А.А., Давыдова И.В., Фисенко А.П., Басаргина М.А., Сновская М.А., Жужула А.А. Биомаркеры нарушения ангиогенеза при формировании бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2023; 3: 56-59. doi: 10.48612/cgma/4vn9-u38n-p76a
12. Abman S.H. Bronchopulmonary dysplasia: «a vascular hypothesis». American journal of respiratory and critical care medicine. 2001; 164 (10): 1755–1756. doi: 10.1164/ajrccm.164.10.2109111c
13. Aghai Z.H. Faqiri S., Saslow J.G., Nakhla T., Farhath S., Kumar A., Eydelman R., Strande L., Stahl G., Leone P., Bhandari V. Angiopoietin 2 concentrations in infants developing bronchopulmonary dysplasia: attenuation by dexamethasone. Journal of perinatology. 2008; 28 (2): 149-155. doi: 10.1038/sj.jp.7211886
14. Alapati D., Rong M., Chen S., Hehre D., Rodriguez M.M., Lipson K.E., Wu S. Connective tissue growth factor antibody therapy attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2011; 45 (6): 1169-1177. doi: 10.1165/rcmb.2011-0023OC
15. Alapati D., Rong M., Chen S., Lin C., Li Y., Wu S. Inhibition of LRP5/6-mediated Wnt/ β -catenin signaling by Mesd attenuates hyperoxia-induced pulmonary

- hypertension in neonatal rats. *Pediatric research*. 2013; 73 (6): 719-25. doi: 10.1038/pr.2013.42.
16. Arjaans S., Wagner B.D., Mourani P.M., Mandell E.W., Poindexter B.B., Berger R.M.F., Abman S.H. Early angiogenic proteins associated with high risk for bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension in preterm infants. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2020; 318 (4): 644-654. doi: 10.1152/ajplung.00131.2019.
17. Arjaans S., Zwart E.A.H., Ploegstra M.J., Bos A.F., Kooi E.M.W., Hillege H.L., Berger R.M.F. Identification of gaps in the current knowledge on pulmonary hypertension in extremely preterm infants: A systematic review and meta-analysis. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2018; 32 (3): 258-267. doi: 10.1111/ppe.12444
18. Bancalari E., Claure N., Sosenko I.R. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Seminars in Neonatology*. 2003; 8 (1): 63-71. doi: 10.1016/s1084-2756(02)00192-6
19. Been J.V., Debeer A., van Iwaarden J.F., Kloosterboer N., Passos V.L., Naulaers G., Zimmermann L.J. Early alterations of growth factor patterns in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric research*. 2010; 67 (1): 83-89. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181c13276
20. Bhandari V., Choo-Wing R., Lee C.G., Zhu Z., Nedrelow J.H., Chupp G.L., Zhang X., Matthay M.A., Ware L.B., Homer R.J., Lee P.J., Geick A., de Fougerolles A.R., Elias J.A. Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nature medicine*. 2006; 12 (11): 1286-1293. doi: 10.1038/nm1494
21. Bhatt A.J., Pryhuber G.S., Huyck H., Watkins R.H., Metlay L.A., Maniscalco W.M. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001; 164 (10): 1971-1980. doi: 10.1164/ajrccm.164.10.2101140

22. Cabrera-Benítez N.E., Valladares F., García-Hernández S., Ramos-Nuez Á., Martín-Barrasa J.L., Martínez-Saavedra M.T., Rodríguez-Gallego C., Muros M., Flores C., Liu M., Slutsky A.S., Villar J. Altered Profile of Circulating Endothelial-Derived Microparticles in Ventilator-Induced Lung Injury. *Critical care medicine*. 2015; 43 (12): 551-559. doi: 10.1097/CCM.0000000000001280
23. Caldeira I., Fernandes-Silva H., Machado-Costa D., Correia-Pinto J., Moura R.S. Developmental Pathways Underlying Lung Development and Congenital Lung Disorders. *Cells*. 2021; 2; 10 (11): 2987. doi: 10.3390/cells10112987
24. Calthorpe R.J., Poulter C., Smyth A.R., Sharkey D., Bhatt J., Jenkins G., Tatler A.L. Complex roles of TGF- β signaling pathways in lung development and bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2023; 324 (3): 285-L296. doi: 10.1152/ajplung.00106.2021
25. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeys S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380 (6573): 435-439. doi: 10.1038/380435a0
26. Carmeliet P., Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *American journal of physiology*. 1997; 273 (5): H2091-104. doi: 10.1152/ajpheart.1997.273.5.H2091
27. Chao C.M., Moiseenko A., Kosanovic D., Rivetti S., El Agha E., Wilhelm J., Kampschulte M., Yahya F., Ehrhardt H., Zimmer K.P., Barreto G., Rizvanov A.A., Schermuly R.T., Reiss I., Morty R.E., Rottier R..J, Bellusci S., Zhang J.S. Impact of Fgf10 deficiency on pulmonary vasculature formation in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Human molecular genetics*. 2019; 28 (9): 1429-1444. doi: 10.1093/hmg/ddy439
28. Chao C.M., Yahya F., Moiseenko A., Tiozzo C., Shrestha A., Ahmadvand N., El Agha E., Quantius J., Dilai S., Kheirollahi V., Jones M., Wilhem J., Carraro G., Ehrhardt H., Zimmer K.P., Barreto G., Ahlbrecht K., Morty R.E., Herold S., Abellar R.G., Seeger W., Schermuly R., Zhang J.S., Mino P., Bellusci S. Fgf10

- deficiency is causative for lethality in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of pathology*. 2017; 241(1): 91-103. doi: 10.1002/path.4834
29. Chen I.L., Chen H.L. New developments in neonatal respiratory management. *Pediatrics and neonatology*. 2022; 63 (4): 341-347. doi: 10.1016/j.pedneo.2022.02.002
 30. Chen S., Rong M., Platteau A., Hehre D., Smith H., Ruiz P., Whitsett J., Bancalari E., Wu S. CTGF disrupts alveolarization and induces pulmonary hypertension in neonatal mice: implication in the pathogenesis of severe bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2011; 300 (3): 330-340. doi: 10.1152/ajplung.00270.2010
 31. Choi C.W., Chorioamnionitis: Is a major player in the development of bronchopulmonary dysplasia? *Korean journal of pediatrics*. 2017; 60 (7): 203-207. doi: 10.3345/kjp.2017.60.7.203
 32. De Paepe M.E., Greco D., Mao Q. Angiogenesis-related gene expression profiling in ventilated preterm human lungs. *Experimental lung research*. 2010; 36 (7): 399-410. doi: 10.3109/01902141003714031
 33. De Paepe M.E., Mao Q., Powell J., Rubin S.E., DeKoninck P., Appel N., Dixon M., Gundogan F. Growth of pulmonary microvasculature in ventilated preterm infants. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 173 (2): 204-211. doi: 10.1164/rccm.200506-927OC
 34. DeMello D.E., Reid L.M. Embryonic and early fetal development of human lung vasculature and its functional implications. *Pediatric and developmental pathology*. 2000; 3 (5): 439-449. doi: 10.1007/s100240010090
 35. DeMello D.E., Sawyer D., Galvin N., Reid L.M. Early fetal development of lung vasculature. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997; 16 (5): 568-581. doi: 10.1165/ajrcmb.16.5.9160839
 36. Dumas de la Roque E., Smeralda G., Quignard J.F., Freund-Michel V., Courtois A., Marthan R., Muller B., Guibert C., Dubois M. Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both eNOS phosphorylation and calcium signaling.

- Public Library of Science one. 2017; 12 (2): e0173044. doi: 10.1371/journal.pone.0173044
37. El Agha E., Moiseenko A., Kheirollahi V., De Langhe S., Crnkovic S., Kwapiszewska G., Szibor M., Kosanovic D., Schwind F., Schermuly R.T., Henneke I., MacKenzie B., Quantius J., Herold S., Ntokou A., Ahlbrecht K., Braun T., Morty R.E., Günther A., Seeger W., Bellusci S. Two-Way Conversion between Lipogenic and Myogenic Fibroblastic Phenotypes Marks the Progression and Resolution of Lung Fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2017; 20 (2): 261-273. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.004
38. Eldridge L., Wagner E.M. Angiogenesis in the lung. *The Journal of physiology*. 2019; 597 (4): 1023-1032. doi: 10.1113/JP275860
39. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K.S., Powell-Braxton L., Hillan K.J., Moore M.W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380 (6573): 439-442. doi: 10.1038/380439a0
40. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 2003; 9 (6): 669-76. doi: 10.1038/nm0603-669.
41. Fornasa G., Groyer E., Clement M., Dimitrov J., Compain C., Gaston A.T., Varthaman A., Khallou-Laschet J., Newman D.K., Graff-Dubois S., Nicoletti A., Caligiuri G. TCR stimulation drives cleavage and shedding of the ITIM receptor CD31. *The Journal of immunology*. 2010; 184 (10): 5485-5492. doi: 10.4049/jimmunol.0902219
42. Fourn J.C., Le Guennec J.C., Villemant D., Perreault G., Davignon A. Value of echocardiography in assessing the outcome of bronchopulmonary dysplasia of the newborn. *Pediatrics*. 1980; 65 (3): 529-535
43. Grover T.R., Parker T.A., Balasubramaniam V., Markham N.E., Abman S.H. Pulmonary hypertension impairs alveolarization and reduces lung growth in the ovine fetus. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2005; 288 (4): 648-654. doi: 10.1152/ajplung.00288.2004

44. Grover T.R., Parker T.A., Zenge J.P., Markham N.E., Kinsella J.P., Abman S.H. Intrauterine hypertension decreases lung VEGF expression and VEGF inhibition causes pulmonary hypertension in the ovine fetus. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2003; 284 (3): 508-517. doi: 10.1152/ajplung.00135.2002
45. Hall S.M., Hislop A.A., Haworth S.G. Origin, differentiation, and maturation of human pulmonary veins. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2002; 26 (3): 333-340. doi: 10.1165/ajrcmb.26.3.4698
46. Hall S.M., Hislop A.A., Pierce C.M., Haworth S.G. Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2000; 23 (2):194-203. doi: 10.1165/ajrcmb.23.2.3975
47. Hansmann G., Koestenberger M., Alastalo T.P., Apitz C., Austin E.D., Bonnet D., Budts W., D'Alto M., Gatzoulis M.A., Hasan B.S., Kozlik-Feldmann R., Kumar R.K., Lammers A.E., Latus H., Michel-Behnke I., Miera O., Morrell N.W., Pielek G., Quandt D., Sallmon H., Schranz D., Tran-Lundmark K., Tulloh R.M.R., Warnecke G., Wähländer H., Weber S.C., Zartner P. 2019 updated consensus statement on the diagnosis and treatment of pediatric pulmonary hypertension: The European Pediatric Pulmonary Vascular Disease Network (EPPVDN), endorsed by AEPC, ESPR and ISHLT. *The Journal of heart and lung transplantation.* 2019; 38 (9): 879-901. doi: 10.1016/j.healun.2019.06.022
48. Hansmann G., Sallmon H., Roehr C.C., Kourembanas S., Austin E.D., Koestenberger M., European Pediatric Pulmonary Vascular Disease Network (EPPVDN). Pulmonary hypertension in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric research.* 2021; 89 (3): 446-455. doi: 10.1038/s41390-020-0993-4
49. Hilgendorff A., Reiss I., Ehrhardt H., Eickelberg O., Alvira C.M. Chronic lung disease in the preterm infant. Lessons learned from animal models. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2014; 50 (2): 233-245. doi: 10.1165/rcmb.2013-0014TR

50. Hyde I., English R.E., Williams J.D. The changing pattern of chronic lung disease of prematurity. *Archives of disease in childhood*. 1989; 64 (4): 448-451. doi: 10.1136/adc.64.4_spec_no.448
51. Inoki I., Shiomi T., Hashimoto G., Enomoto H., Nakamura H., Makino K., Ikeda E., Takata S., Kobayashi K., Okada Y. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB journal*. 2002; 16 (2): 219-221. doi: 10.1096/fj.01-0332fje
52. Jakkula M., Le Cras T.D., Gebb S., Hirth K.P., Tuder R.M., Voelkel N.F., Abman S.H. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2000; 279: 600-607. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.3.L600
53. Jensen E.A., Edwards E.M., Greenberg L.T., Soll R.F., Ehret D.E.Y., Horbar J.D. Severity of Bronchopulmonary Dysplasia Among Very Preterm Infants in the United States. *Pediatrics*. 2021; 148 (1): e2020030007. doi: 10.1542/peds.2020-030007
54. Jian M., He S., Liu Y., Liu X., Gui J., Zheng M., Feng B., Zhang X., Liu C. The high-risk factors of different severities of bronchopulmonary dysplasia (BPD) based on the national institute of child health and human development (NICHD) diagnosis criteria in 2018. *Journal Brasileiro de Pneumologia*. 2021; 29; 47 (5): e20210125. doi: 10.36416/1806-3756/e20210125
55. Jobe A.H. The new bronchopulmonary dysplasia. *Current opinion in pediatrics*. 2011; 23 (2): 167. doi: 10.1097/MOP.0b013e3283423e6b.
56. Jobe A.H., Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001; 163 (7): 1723-1729. doi: 10.1164/ajrccm.163.7.2011060
57. Kasahara Y., Tuder R.M., Taraseviciene-Stewart L., Le Cras T.D., Abman S., Hirth P.K., Waltenberger J., Voelkel N.F. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 106 (11): 1311-1319. doi: 10.1172/JCI10259

58. Khemani E., McElhinney D.B., Rhein L., Andrade O., Lacro R.V., Thomas K.C., Mullen M.P. Pulmonary artery hypertension in formerly premature infants with bronchopulmonary dysplasia: clinical features and outcomes in the surfactant era. *Pediatrics*. 2007; 120 (6): 1260-1269. doi: 10.1542/peds.2007-0971
59. Kim D.H., Kim H.S. Serial changes of serum endostatin and angiopoietin-1 levels in preterm infants with severe bronchopulmonary dysplasia and subsequent pulmonary artery hypertension. *Neonatology*. 2014; 106 (1): 55-61. doi: 10.1159/000358374
60. Kim D.H., Kim H.S., Choi C.W., Kim E.K., Kim B.I., Choi J.H. Risk factors for pulmonary artery hypertension in preterm infants with moderate or severe bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology*. 2012; 101 (1): 40–46. doi:10.1159/000327891
61. Kim H.T., Panza P., Kikhi K., Nakamichi Y., Atzberger A., Guenther S., Ruppert C., Guenther A., Stainier D.Y.R. WNT/RYK signaling functions as an antiinflammatory modulator in the lung mesenchyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2022; 119 (24): e2201707119. doi: 10.1073/pnas.2201707119
62. Kolesnichenko O.A., Whitsett J.A., Kalin T.V., Kalinichenko V.V. Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cells in Pulmonary Diseases. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2021; 65 (5): 473-488. doi: 10.1165/rcmb.2021-0152TR
63. Kuiper E.J., Roestenberg P., Ehlken C., Lambert V., van Treslong-de Groot H.B., Lyons K.M., Agostini H.J., Rakic J.M., Klaassen I., Van Noorden C.J., Goldschmeding R., Schlingemann R.O. Angiogenesis is not impaired in connective tissue growth factor (CTGF) knock-out mice. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 2007; 55 (11): 1139-1147. doi: 10.1369/jhc.7A7258.2007
64. Kumar V.H., Hutchison A.A., Lakshminrusimha S., Morin F.C. III, Wynn R.J., Ryan R.M. Characteristics of pulmonary hypertension in preterm neonates. *J Journal of perinatology*. 2007; 27 (4): 214–219. doi:10.1038/sj.jp.7211673

65. Lacaze-Masmonteil T. That chorioamnionitis is a risk factor for bronchopulmonary dysplasia-the case against. *Paediatric respiratory reviews*. 2014; 15 (1): 53-55. doi: 10.1016/j.prrv.2013.09.005.
66. Le Cras T.D., Kim D.H., Markham N.E., Abman A.S. Early abnormalities of pulmonary vascular development in the Fawn-Hooded rat raised at Denver's altitude. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2000; 279 (2): 283-291. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.2.L283
67. Le Cras T.D., Markham N.E., Tuder R.M., Voelkel N.F., Abman S.H. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2002; 283 (3): 555-562. doi: 10.1152/ajplung.00408.2001
68. Lignelli E., Palumbo F., Myti D., Morty R.E. Recent advances in our understanding of the mechanisms of lung alveolarization and bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2019; 317 (6): 832-887. doi: 10.1152/ajplung.00369.2019
69. Maeda S., Suzuki S., Suzuki T., Endo M., Moriya T., Chida M., Kondo T., Sasano H. Analysis of intrapulmonary vessels and epithelial-endothelial interactions in the human developing lung. *Laboratory investigation*. 2002; 82 (3): 293-301. doi: 10.1038/labinvest.3780423
70. Maitre N.L., Ballard R.A., Ellenberg J.H., Davis S.D., Greenberg J.M., Hamvas A., Pryhuber G.S. Prematurity and Respiratory Outcomes Program. Respiratory consequences of prematurity: evolution of a diagnosis and development of a comprehensive approach. *Journal of perinatology*. 2015; 35 (5): 313-321. doi: 10.1038/jp.2015.19
71. Makinde T., Agrawal D.K. Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008; 12 (3): 810-828. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00254.x

72. Mandell E.W., Abman S.H., Fetal Vascular Origins of Bronchopulmonary Dysplasia. *The Journal of pediatrics*. 2017; 185: 7-10.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.03.024
73. Mariduena J., Ramagopal M., Hiatt M., Chandra S., Laumbach R., Hegyi T.. Vascular endothelial growth factor levels and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2022; 35 (8): 1517-1522. doi: 10.1080/14767058.2020.1760826
74. Mathew R. Signaling Pathways Involved in the Development of Bronchopulmonary Dysplasia and Pulmonary Hypertension. *Children (Basel)*. 2020; 18 (7): 100. doi: 10.3390/children7080100
75. McDonald P.C., Fielding A.B., Dedhar S. Integrin-linked kinase-essential roles in physiology and cancer biology. *Journal of cell science*. 2008; 121 (19): 3121-3132. doi: 10.1242/jcs.017996
76. Melincovici C.S., Boşca A.B., Şuşman S., Mărginean M., Mişu C., Istrate M., Moldovan I.M., Roman A.L., Mişu C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology*. 2018; 59 (2): 455-467
77. Mestan K.K., Gotteiner N., Prota N., Grobman W., Su E.J., Ernst L.M. Cord blood biomarkers of placental maternal vascular underperfusion predict bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension. *The Journal of pediatrics*. 2017; 185: 33–41. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.01.015
78. Mirza H., Ziegler J., Ford S., Padbury J., Tucker R., Laptook A. Pulmonary hypertension in preterm infants: prevalence and association with bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of pediatrics*. 2014; 165 (5): 909-914. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.07.040
79. Morrow L.A., Wagner B.D., Ingram D.A., Poindexter B.B., Schibler K., Cotten C.M., Dagle J., Sontag M.K., Mourani P.M., Abman S.H. Antenatal Determinants of Bronchopulmonary Dysplasia and Late Respiratory Disease in Preterm Infants. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2017; 196 (3): 364-374. doi: 10.1164/rccm.201612-2414OC

80. Moschino L., Bonadies L., Baraldi E. Lung growth and pulmonary function after prematurity and bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric pulmonology*. 2021; 56 (11): 3499-3508. doi: 10.1002/ppul.25380
81. Mourani P.M., Sontag M.K., Younoszai A., Miller J.I., Kinsella J.P., Baker C.D., Poindexter B.B., Ingram D.A., Abman S.H.. Early pulmonary vascular disease in preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015; 191 (1):87-95. doi: 10.1164/rccm.201409-1594OC
82. Northway W.H. Jr., Rosan R.C., Porter D.Y. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. *Bronchopulmonary dysplasia*. *The New England journal of medicine*. 1967; 16; 276 (7): 357-368. doi: 10.1056/NEJM196702162760701
83. Oak P., Hilgendorff A. The BPD trio? Interaction of dysregulated PDGF, VEGF, and TGF signaling in neonatal chronic lung disease. *Molecular and cellular pediatrics*. 2017; 4 (1): 11. doi: 10.1186/s40348-017-0076-8
84. Parera M.C., van Dooren M., van Kempen M., de Krijger R., Grosveld F., Tibboel D., Rottier R. Distal angiogenesis: a new concept for lung vascular morphogenesis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2005; 288 (1): 141-149. doi: 10.1152/ajplung.00148.2004
85. Parsons A., Netsanet A., Seedorf G., Abman S.H., Taglauer E.S. Understanding the role of placental pathophysiology in the development of bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2022; 1; 323 (6): 651-658. doi: 10.1152/ajplung.00204.2022
86. Perl A.K., Whitsett J.A. Molecular mechanisms controlling lung morphogenesis. *Clinical genetics*. 1999; 56 (1): 14-27. doi: 10.1034/j.1399-0004.1999.560103.x
87. Privratsky J.R., Paddock C.M., Florey O., Newman D.K., Muller W.A., Newman P.J. Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity. *Journal of cell science*. 2011; 124 (9): 1477-1485. doi: 10.1242/jcs.082271

88. Ramaswamy V.V., Bandyopadhyay T., Nanda D., Bandiya P., Ahmed J., Garg A., Roehr C.C., Nangia S. Assessment of Postnatal Corticosteroids for the Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Neonates: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2021;175(6):e206826. doi: 10.1001/jamapediatrics.2020.6826
89. Ramazani Y., Knops N., Elmonem M.A., Nguyen T.Q., Arcolino F.O., van den Heuvel L., Levtchenko E., Kuypers D., Goldschmeding R. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biology.* 2018; 68-69: 44-66. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.007
90. Sahni M., Bhandari V. Patho-mechanisms of the origins of bronchopulmonary dysplasia. *Molecular and cellular pediatrics.* 2021; 11; 8 (1): 21. doi: 10.1186/s40348-021-00129-5
91. Sahni M., Yeboah B., Das P., Shah D., Ponnalagu D., Singh H., Nelin L.D., Bhandari V. Novel biomarkers of bronchopulmonary dysplasia and bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension. *Journal of Perinatology.* 2020; 40 (11):1634-1643. doi: 10.1038/s41372-020-00788-8
92. Salaets T., Gie A., Tack B., Deprest J., Toelen J. Modelling Bronchopulmonary Dysplasia in Animals: Arguments for the Preterm Rabbit Model. *Current pharmaceutical design.* 2017; 23 (38): 5887-5901. doi: 10.2174/1381612823666170926123550
93. Salimi U., Menden H.L., Mabry S.M., Xia S., Sampath V. Angiopoietin-1 protects against endotoxin-induced neonatal lung injury and alveolar simplification in mice. *Pediatric research.* 2022; 91 (6): 1405-1415. doi: 10.1038/s41390-021-01544-0
94. Sato T., Shima C., Kusaka S. Vitreous levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in eyes with retinopathy of prematurity. *American journal of ophthalmology.* 2011; 151 (2): 353-357. doi: 10.1016/j.ajo.2010.08.037. .
95. Schachtner S.K., Wang Y., Scott Baldwin H. Qualitative and quantitative analysis of embryonic pulmonary vessel formation. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2000; 22 (2): 157-165. doi: 10.1165/ajrcmb.22.2.3766

96. Slaughter J.L., Pakrashi T., Jones D.E., South A.P., Shah T.A. Echocardiographic detection of pulmonary hypertension in extremely low birth weight infants with bronchopulmonary dysplasia requiring prolonged positive pressure ventilation. *Journal of perinatology*. 2011; 31 (10): 635-640. doi: 10.1038/jp.2010.213
97. Speer C.P. Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology*. 2009; 95 (4): 353-361. doi: 10.1159/000209301
98. Speer C.P. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Seminars in fetal and neonatal medicine*. 2006; 11 (5): 354-362. doi: 10.1016/j.siny.2006.03.004
99. Stark A., Dammann C., Nielsen H.C., Volpe M.V. A Pathogenic Relationship of Bronchopulmonary Dysplasia and Retinopathy of Prematurity? A Review of Angiogenic Mediators in Both Diseases. *Frontiers in pediatrics*. 2018; 6: 125. doi: 10.3389/fped.2018.00125.
100. Stoll B.J., Hansen N.I., Bell E.F., Shankaran S., Laptook A.R., Walsh M.C., Hale E.C., Newman N.S., Schibler K., Carlo W.A., Kennedy K.A., Poindexter B.B., Finer N.N., Ehrenkranz R.A., Duara S., Sánchez P.J., O'Shea T.M., Goldberg R.N., Van Meurs K.P., Faix R.G., Phelps D.L., Frantz I.D. 3rd, Watterberg K.L., Saha S., Das A., Higgins R.D. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010; 126 (3): 443-456
101. Stoll B.J., Hansen N.I., Bell E.F., Walsh M.C., Carlo W.A., Shankaran S., Laptook A.R., Sánchez P.J. Van Meurs K.P., Wyckoff M., Das A., Hale E.C., Ball M.B., Newman N.S., Schibler K., Poindexter B.B., Kennedy K.A., Cotten C.M., Watterberg K.L., D'Angio C.T., DeMauro S.B., Truog W.E., Devaskar U., Higgins R.D.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *Journal of the American Medical Association*. 2015; 314 (10): 1039-1051. doi: 10.1001/jama.2015.10244
102. Syed M., Das P., Pawar A., Aghai Z.H., Kaskinen A., Zhuang Z.W., Ambalavanan N., Pryhuber G., Andersson S., Bhandari V. Hyperoxia causes miR-

- 34a-mediated injury via angiopoietin-1 in neonatal lungs. *Nature communications*. 2017; 8 (1): 1173. doi: 10.1038/s41467-017-01349-y
103. Thébaud B., Abman S.H. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007; 175 (10): 978–985. doi: 10.1164/rccm.200611-1660PP
104. Thébaud B., Goss K.N., Laughon M., Whitsett J.A., Abman S.H., Steinhorn R.H., Aschner J.L., Davis P.G., McGrath-Morrow S.A., Soll R.F., Jobe A.H. Bronchopulmonary dysplasia. *Nature reviews. Disease primers*. 2019; 14; 5 (1): 78. doi: 10.1038/s41572-019-0127-7
105. Thébaud B., Ladha F., Michelakis E.D., Sawicka M., Thurston G., Eaton F., Hashimoto K., Harry G., Haromy A., Korbitt G., Archer S.L. Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation*. 2005; 112 (16): 2477-2486. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.541524.
106. Varghese N., Rios D. Pulmonary Hypertension Associated with Bronchopulmonary Dysplasia: A Review. *Pediatric allergy, immunology, and pulmonology*. 2019;32 (4): 140-148. doi: 10.1089/ped.2018.0984
107. Varghese S., Braggio D.A., Gillespie J., Toland A.E., Pollock R., Mayerson J., Scharschmidt T., Iwenofu O.H. TGF- β and CTGF are Mitogenic Output Mediators of Wnt/ β -Catenin Signaling in Desmoid Fibromatosis. *Applied immunohistochemistry and molecular morphology*. 2017; 25 (8): 559-565. doi: 10.1097/PAI.0000000000000340
108. Villar J., Muros M., Cabrera-Benítez N.E., Valladares F., López-Hernández M., Flores C., Martín-Barrasa J.L., Blanco J., Liu M., Kacmarek R.M. Soluble platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, a biomarker of ventilator-induced lung injury. *Critical care*. 2014; 18(2): 41. doi: 10.1186/cc13754

109. Villar J., Zhang H., Slutsky A.S. Lung Repair and Regeneration in ARDS: Role of PECAM1 and Wnt Signaling. *Chest*. 2019; 155 (3): 587-594. doi: 10.1016/j.chest.2018.10.022
110. Volpe J.J. Dysmaturation of Premature Brain: Importance, Cellular Mechanisms, and Potential Interventions. *Pediatric neurology*. 2019; 95: 42-66. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.02.016
111. Wallace B., Peisl A., Seedorf G., Nowlin T., Kim C., Bosco J., Kenniston J., Keefe D., Abman S.H. Anti-sFlt-1 Therapy Preserves Lung Alveolar and Vascular Growth in Antenatal Models of Bronchopulmonary Dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2018;197 (6): 776-787. doi: 10.1164/rccm.201707-1371OC
112. Wang X., Cui H., Wu S.. CTGF: A potential therapeutic target for Bronchopulmonary dysplasia. *European journal of pharmacology*. 2019; 860: 172588. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172588
113. Willems M.G.M., Kemp M.W., Fast L.A., Wagemaker N.M.M. et al. Pulmonary vascular changes in extremely preterm sheep after intra-amniotic exposure to *Ureaplasma parvum* and lipopolysaccharide. *Public Library of Science one*. 2017; 12 (6): e0180114. doi: 10.1371/journal.pone.0180114
114. Wu S., Platteau A., Chen S., McNamara G., Whitsett J., Bancalari E.. Conditional overexpression of connective tissue growth factor disrupts postnatal lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010; 42(5):552-563. doi: 10.1165/rcmb.2009-0068OC
115. Yanagihara T., Tsubouchi K., Ghohiof M., Chong S.G. et al. Connective-Tissue Growth Factor Contributes to TGF- β 1-induced Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2022;66(3):260-270. doi: 10.1165/rcmb.2020-0504OC