

*На правах рукописи*

**ХИШТИЛОВА Патимат Багировна**

**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ  
ТЯЖЕСТИ И ИСХОДОВ  
БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У ДЕТЕЙ**

14.01.08 – Педиатрия

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Астрахань – 2021**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**СЕРГИЕНКО Диана Фикретовна**, доктор медицинских наук, доцент

**Официальные оппоненты:**

**ПАВЛИНОВА Елена Борисовна**, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра госпитальной педиатрии, заведующая кафедрой

**МАЛЮЖИНСКАЯ Наталья Владимировна**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра детских болезней педиатрического факультета, заведующая кафедрой

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится « \_\_\_\_ » апреля 2021г в \_\_\_\_ часов на заседании совета Д 208.005.02 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук при ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России (414000, г.Астрахань, ул. Бакинская, 121).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://astgmu.ru> ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России.

Автореферат разослан «.....» \_\_\_\_\_ 2021г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
к.м.н.

Севостьянова Ирина Викторовна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ:**

**Актуальность проблемы.** Бронхолегочная дисплазия (БЛД) занимает лидирующее место по частоте и клинической значимости как наиболее распространенная форма хронического заболевания легких (ХЗЛ) у детей [Павлинова Е. Б. и соавт., 2020].

Главными предикторами тяжести БЛД признаны респираторный дистресс-синдром (РДС), гестационный возраст (ГВ), длительность искусственной вентиляции легких (ИВЛ), а также сопутствующая патология [Овсянников Д. Ю., 2020; Павлинова Е. Б. и соавт., 2019]. В то же время у ряда недоношенных детей, несмотря на идентичные условия выхаживания, режимы вентиляционной поддержки, диагностируют различные варианты тяжести течения и исходов БЛД, что диктует необходимость дальнейшего изучения патогенетических механизмов.

Данные современной литературы свидетельствуют о том, что одной из ведущих и доказанных позиций в формировании БЛД как хронического типа легочной деструкции и особенности ее течения является модификация механизмов защиты организма [Пожарищенская В. К., 2020; Pierro M. et al., 2017]. Безусловно, изучение патогенетических механизмов, невозможно без понимания их генетической основы. Варианты генетических полиморфизмов способны трансформировать почти все звенья реализации БЛД у детей, чем и объясняется вариабельность клинического течения и исходов заболевания при идентичных условиях выхаживания.

Анализ литературы свидетельствует о том, что, несмотря на высокий интерес к изучению молекулярно-генетических аспектов заболевания, исследования носят противоречивый и фрагментарный характер [Овсянников Д. Ю., 2020; Пожарищенская В. К., 2017]. Все вышеизложенное диктует необходимость углубленного изучения патогенетических механизмов БЛД в фокусе фенотип-ассоциированных полиморфизмов кандидатных генов, что позволит конкретизировать варианты генетической изменчивости с учетом степени тяжести и исходов заболевания.

### **Степень разработанности темы исследования.**

Большинство работ посвященных изучению формирования БЛД у детей, рассматривают этиопатогенетические аспекты за-

болевания в призме развития, вариантов течения и исходов БЛД у детей [Павлинова Е. Б. и соавт., 2019; Беляшова М. А. и соавт., 2015]. Однако в доступной медицинской литературе не найдено научных работ, в которых приводилось бы комплексное определение клиничко-биохимических и генетических маркеров, модифицирующих течение и прогноз заболевания, несмотря на высокую медико-социальную значимость данной патологии у детей. Проведенный анализ публикаций показал высокий диагностический и прогностический потенциал имеющихся сегодня некоторых лабораторных показателей, таких как матриксная металлопротеиназа (ММР), белки системы сурфактанта, активные формы витамина D в генезе БЛД.

Отечественные и зарубежные авторы в последнее десятилетие уделяют особое внимание системе ММР и их антагонистам как основным медиаторам коллагенообразования и формирования внеклеточного матрикса, что, безусловно, оказывает влияние на течение и прогноз БЛД [Малинина У. И., 2019]. В то же время результаты исследований показателей обмена коллагена и оценки их клиничко-прогностического потенциала малочисленны, противоречивы и требуют дополнения.

Сегодня приобрел актуальность поиск новых высокоинформативных генетических маркеров, отражающих различные патогенетические аспекты реализации и течения БЛД у детей [Пожарищенская В. К., 2017]. Однако эти исследования единичны и не позволяют сформировать целостное представление об их патогенетическом и прогностическом значении. Малоизученность генетической гетерогенности в контексте клиничко-значимости и вариантов исходов заболевания является одной из причин неполного понимания патогенетических аспектов развития ХЗЛ как неблагоприятного варианта исхода БЛД.

Исследование полиморфизмов генов коллагенообразования, сурфактантных белков и факторов, влияющих на степень воспаления в легочной ткани у данной когорты больных, будет способствовать пониманию глубинных механизмов прогрессирования заболевания с формированием основ для персонализированной терапии.

**Цель исследования.** На основе многокомпонентного анализа за клинико-anamnestических, биохимических и молекулярно-генетических факторов установить предикторы тяжести течения и вариантов исходов бронхолегочной дисплазии у детей.

#### **Задачи исследования**

1. Установить клинико-anamnestические предикторы степени тяжести и исходов БЛД у детей.
2. Изучить клинико-диагностическое значение определения MMP-9 и кальцидиола в сыворотке крови у детей с БЛД для прогноза заболевания после 3-х лет.
3. Определить клинико-патогенетическое влияние полиморфизма rs3918242 гена MMP-9 у детей с БЛД.
4. Определить клинико-диагностическую значимость полиморфизма rs721917 гена сурфактантного белка D (SFTPD) у детей с БЛД.
5. Изучить ассоциации полиморфизма FokI (rs2228570) гена рецептора витамина D (VDR) с течением БЛД у детей и вариантами исходов заболевания.

#### **Методология и методы исследования**

В работе была применена базирующаяся на системном подходе научная методология с использованием общенаучных, формально-логических и специальных методов. В соответствии с дизайном исследования определена репрезентативная группа из 146 детей (основная группа) с ранее установленным диагнозом бронхолегочная дисплазия в возрасте от 2 лет 11 месяцев до 4 лет 1 месяца, которые были обследованы как стандартизированными методами с учетом клинических рекомендаций по ведению детей с БЛД, так и дополнительными клинико-биохимическими (определение уровня MMP-9 и кальцидиола в сыворотке крови) и молекулярно-генетическими (исследование FokI полиморфизмов гена VDR, rs3918242 гена MMP-9 rs721917 гена SFTPD) методами. Результаты исследования обработаны и проанализированы с применением современных статистических методов, соответствующих цели и задачам данной работы, а также спецификой исходных данных. Исследование осуществлено в соответствии с российскими и международными законодательными нормами, регламентирующими этические и юридические аспекты меди-

цинских исследований.

### **Научная новизна исследования**

Уточнено патогенетическое влияние MMP-9 и кальцидиола в сыворотке крови у детей с БЛД на этапе пересмотра диагноза. Определены показатели желатиназы-В и кальцидиола в зависимости от степени тяжести заболевания, периода заболевания и исходов.

Установлена частота аллелей, а также генотипов полиморфных локусов генов MMP-9, VDR и SFTPD у пациентов с БЛД, у недоношенных детей без формирования БЛД, проживающих на территории Астраханской области.

Впервые изучено влияние аллелей и генотипов полиморфных локусов генов SFTPD, MMP-9, VDR у детей в зависимости от степени тяжести БЛД и определена их роль в формировании исходов заболевания. Доказано, что полиморфизм rs721917 гена SFTPD ассоциирован с развитием БЛД, а присутствие в генотипе дикого аллеля С в гомозиготном состоянии является предрасполагающим генетическим фактором для реализации ХЗЛ у детей. Генотип Т/Т является упреждающим в отношении полного морфофункционального восстановления легочной ткани и снижает риск инфицирования дыхательных путей патогенной микрофлорой.

Доказано предрасполагающее влияние генотипа С/С полиморфизма rs3918242 гена MMP-9 к повышению кратности бронхообструктивного синдрома (БОС) на фоне респираторных инфекций у детей, риску инфицирования дыхательных путей грамотрицательной микрофлорой и длительному курсу ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС).

Установлено протективное действие гомозиготного генотипа F/F полиморфного FOK1 гена VDR в отношении формирования БЛД у детей, а также выявлена ассоциация гетерозиготного генотипа F/f с высокой частотой и ранним стартом острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ), с реализацией тяжелого БОС у детей с БЛД.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты исследования вносят существенный вклад в изучение патогенетических механизмов БЛД, способствуют форми-

рованию индивидуализированного подхода в терапии больных детей, что может улучшить прогноз заболевания и повысить качество жизни пациентов.

Определение уровня ММР-9 и кальцидиола в сыворотке крови может быть использовано в качестве дополнительного диагностического критерия для уточнения обострения и варианта исхода заболевания.

Доказано предрасполагающее влияние генотипа С/Т полиморфного локуса rs721917 гена SFTPD и гомозиготного генотипа F/F полиморфизма FOK1 гена VDR в отношении формирования БЛД у детей. Выявлены основные генотипы и аллели, оказывающие протективное или предрасполагающее действие на фенотипические признаки заболевания, что позволяет рекомендовать исследование этих генов для прогнозирования степени тяжести, исходов заболевания и выбора рациональной персонализированной терапии.

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

1. Предрасполагающими факторами к формированию тяжелой формы БЛД являются низкий ГВ, масса тела при рождении менее 1000 г, грамотрицательный характер микробиоты дыхательных путей. Доказана высокая частота и тяжесть БОС с заинтересованностью в длительной терапии ИГКС у детей с тяжелой формой БЛД, в отличие от пациентов со средней тяжестью заболевания. Определены предикторы формирования ХЗЛ у детей с БЛД: низкие антропометрические показатели, агрессивный характер респираторной поддержки, ранний старт и рецидивирующий характер респираторных вирусных инфекций, ряд коморбидных состояний.

2. К моменту пересмотра диагноза у детей с новой формой БЛД наблюдаются референтные сывороточные значения ММР-9, что связано с завершением процессов фиброобразования легочной ткани, с одной стороны, и благоприятным влиянием введения сурфактанта в неонатальном периоде, с другой. Желатиназа-В в контексте клинической картины может рассматриваться как еще один диагностический маркер воспаления при обострении бронхолегочного процесса.

Уровень сывороточного кальцидиола способен влиять на фе-

нотипические характеристики БЛД. Согласно результатам данного исследования, выявлена корреляция между VD-статусом, тяжестью течения, кратностью респираторных инфекций и вариантами исходов заболевания.

3. Установлено влияние полиморфизма rs721917 гена SFTPD на фенотипические проявления БЛД. Выявлены ассоциации гомозиготного генотипа Т/Т полиморфного локуса rs721917 гена SFTPD с благоприятным характером микробиоты респираторного тракта и исходами БЛД у детей. Доказано предрасполагающее влияние генотипа С/С к формированию хронических бронхолегочных заболеваний.

4. Генотип С/С полиморфизма rs3918242 гена MMP-9 является генетическим триггером формирования БЛД у девочек. У носителей генотипа С/С полиморфизма rs3918242 гена MMP-9 выявлено частое развитие БОС на фоне респираторных инфекций, высокий риск инфицирования дыхательных путей грамотрицательной микрофлорой и необходимость длительного применения ИГКС.

5. Доказано влияние полиморфизма FOK1 на вероятность реализации заболевания и модификацию чувствительности к инфекционным агентам с воплощением тяжелого обструктивного синдрома.

**Апробация результатов.** Основные положения диссертации опубликованы в «Астраханском медицинском журнале» (2020), в журнале «Успехи современной науки и образования» (2017), в международном медицинском журнале «Archiv Euromedica» (2020), в журнале «Фарматека» (2020). Материалы диссертации также представлены в сборниках III международной конференции «Актуальные вопросы современной медицины» (2018) и X международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе» (2016) и обсуждены на межкафедральном заседании с участием кафедр факультетской педиатрии, госпитальной педиатрии с курсом последипломного образования, пропедевтики внутренних болезней, поликлинической и неотложной педиатрии, педиатрии и неонатологии, анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России.

**Внедрение результатов работы.** Результаты представленного исследования были освоены и включены в практику пульмонологическим отделением ГБУЗ АО «ОДКБ им. Н.Н. Силищевой» г. Астрахани, а также кабинетом пульмонолога консультативной поликлиники данного лечебного учреждения и ГБУЗ АО «ДГП № 3». Теоретический материал был внедрен в учебный процесс, основные положения и результаты активно использованы в семинарских и практических занятиях студентов V курса, интернов, клинических ординаторов на кафедре факультетской педиатрии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ МЗ РФ.

**Публикации.** По теме диссертации написано и опубликовано 10 печатных работ. Из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и 1 статья в журнале, относящемся к базе Web of Science

**Личный вклад автора.** Авторский вклад состоит в личном участии диссертанта в работе над всеми этапами представленного исследования. Совместно с научным руководителем осуществлялось планирование работы, были сформулированы ее цель и задачи, определены параметры дизайна. Автор лично участвовал в организации и выполнении исследования в соответствии с разделами диссертации, в определении объема и выполнении спектра клинико-лабораторных изысканий, в литературном поиске по изучаемой теме, осуществлении статистической обработки и интерпретации полученных результатов. Диссертантом написана рукопись и подготовлены публикации по представленной теме.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 3-х глав собственных наблюдений, обсуждения полученных результатов, выводов. В список литературы вошли 199 источников, из них 107 отечественных и 92 зарубежных. Работа содержит 64 таблицы и 3 рисунка.

**Связь с планом научных исследований.** Диссертационное исследование осуществлено в соответствии с планом НИОКТР ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава РФ на тему «Клинико-лабораторные и иммуногенетические предикторы развития

атопических заболеваний кожи и дыхательных путей у детей». Номер государственной регистрации 114070770018.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В соответствии с поставленными целями и задачами исследования проведено комплексное обследование 146 детей (основная группа) с ранее установленным диагнозом бронхолегочная дисплазия в возрасте от 2 лет 11 месяцев до 4 лет 1 месяца ( $3,35 \pm 0,13$  года). Пациентов обследовали и лечили на этапе пересмотра диагноза бронхолегочная дисплазия на базе ГБУЗ АО ОДКБ им. Н.Н. Силищевой, отделения пульмонологии, в период с 2016 по 2019 гг. С учетом степени тяжести БЛД пациенты были разделены на 3 группы.

В первую группу вошли 14 (9,6 %) пациентов, которым диагностировали легкую форму заболевания; вторая группа включала в себя 72 (49,3 %) ребенка со среднетяжелым течением БЛД; третью группу составили 60 (41,1 %) детей с тяжелым течением БЛД.

В зависимости от варианта течения заболевания пациенты после 3-х лет, были разделены на две подгруппы: первая – 88 детей ( $3,7 \pm 0,43$  года), у которых наблюдалось восстановление морфофункциональных структур с реализацией в виде выздоровления или рецидивирующего бронхита (РБ); вторая – 58 ( $3,2 \pm 0,66$  года) пациентов, у которых произошло формирование неблагоприятных исходов заболевания в виде хронического бронхита (ХБ) или облитерирующего бронхиолита (ОБ).

Контрольная группа для проведения дополнительного биохимического исследования (определения уровня ММР-9 и кальцидиола в сыворотке крови) и генетического типирования была представлена 93 детьми в возрасте от 3 до 5 лет ( $3,9 \pm 0,26$  года), которые появились на свет недоношенными, но не сформировали БЛД.

Исследование осуществлено в соответствии с клиническими рекомендациями по ведению детей с БЛД (2016г.):

- на основе собственных наблюдений и данных анализа медицинской документации, заключения узких специалистов;

- реализован полный комплекс клинико-лабораторных методов обследования

- спектр инструментальных исследований был представлен данными бронхофонограммы, компьютерной томографии (КТ), ультразвуковым исследованием органов брюшной полости, забрюшинного пространства и эхокардиографии.

Для решения поставленных задач в работу вошли дополнительные исследования:

- анкетирование посредством разработанной анкеты-опросника для анализа клинико-анамнестических особенностей течения заболевания;

- определение MMP-9 в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы «ELISA Kit for MMP-9» (Cloud-Clone Corp., США).

- определение кальцидиола в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы ЗАО «Техсистемс» (Россия);

- молекулярно-генетические методы с целью определения полиморфизмов rs721917 гена SFTPD, полиморфизма rs3918242435 гена MMP-9 и FOK1 полиморфизма гена VDR. Генотипирование полиморфных маркеров изучаемых генов осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Статистическую обработку результатов исследования реализовали общепринятыми методами вариационной статистики (Statistika 10). Математическая обработка данных осуществлена с использованием программы «Excel» для «Windows XP». Критический уровень значимости принимался меньше или равным 0,05.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Проведена сравнительная гендерная характеристика, обнаружившая преобладание мальчиков ( $n = 98$ ) вне зависимости от срока гестации.

В ходе исследования было доказано, что на степень тяжести БЛД влияет масса тела и гестационный возраст при рождении. У детей, рожденных с IV степенью недоношенности (в ГВ 28 не-

дель и менее), легкое течение БЛД отмечалось у 2 (14,8 %) обследованных, в то время как тяжелое диагностировано у 18 (30,0 %) пациентов. OR = 2,204 (ДИ 0,995–4,883). Отмечено, что масса тела при рождении менее 1000 г является предрасполагающим фактором к тяжелому течению БЛД у недоношенных младенцев ( $\chi^2 = 11,181$ ,  $p = 0,011$ ,  $df = 3$ , OR = 2,643 (ДИ 1,161–6,017)).

С учетом степени тяжести дыхательной недостаточности (ДН) дети получали респираторную поддержку, продолжительность которой составила от 3 суток до 3,5 месяцев. Анализ статистических данных свидетельствует о том, что новорожденные с легким течением получали наиболее кратковременную по длительности вентиляционную поддержку ( $3,6 \pm 1,2$  дней) по сравнению с пациентами со средним ( $5,1 \pm 11,8$  дней) и тяжелым ( $4,9 \pm 1,2$  дней) течением ( $h_{\text{эмп.}} = 6,23608$ ,  $p = 0,04424$ ) в пределах 1 недели. В группе больных, находившихся на ИВЛ более месяца, длительность аппаратного дыхания при тяжелом течении заболевания была выше ( $80,4 \pm 11,8$  дней), чем у новорожденных со средней ( $51,3 \pm 11,7$  дней) и легкой ( $38,5 \pm 0,5$  дней) формой недуга ( $h_{\text{эмп.}} = 14,5522$ ,  $p = 0,00069$ ).

В ходе статистической обработки показателей бронхофонограммы выявлено, что при среднетяжелом течении БЛД достоверно чаще наблюдали умеренные нарушения бронхиальной проходимости (OR = 4,790 (ДИ 2,278–10,073)). В то же время среди обследуемых больных с тяжелым течением недуга у 44 пациентов из 60 степень нарушения дыхательной проходимости была определена как выраженная (OR = 4,461 (ДИ 2,259–9,535)).

При комплексной оценке характера микробиоты с учетом тяжести течения БЛД у детей были получены статистически значимые различия, а именно – у пациентов с тяжелым течением заболевания достоверно чаще выявлены представители грамотрицательной микрофлоры (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) ( $\chi^2 = 18,181$ ,  $p < 0,001$ ,  $df = 2$ ) OR = 4,462 (ДИ 2,204–9,035) (рис. 1).

В ходе исследования доказано, что у пациентов с тяжелой формой БЛД чаще диагностировался БОС на фоне респираторной инфекции ( $\chi^2$  с поправкой Йейтса = 3,576,  $p = 0,059$ ,  $df = 1$ ).

Определено, что дети с тяжелым течением БЛД достоверно

чаще нуждаются в длительном применении ИГКС по сравнению с пациентами со среднетяжелой формой дисплазии ( $\chi^2$  с поправкой Йейтса = 10,59,  $p = 0,002$ ,  $df = 1$ ,  $OR = 4,250$  (ДИ 1,797–10,051)).



Рисунок 1 – Характер микробиоты дыхательных путей с учетом степени тяжести БЛД

Таким образом, согласно проведенному клинико-анамнестическому исследованию можно утверждать, что основными предикторами тяжести БЛД признаны низкий ГВ (28 недель и менее), ЭНМТ при рождении, длительные сроки респираторной поддержки. При этом тяжелое течение заболевания характеризуется рецидивирующим БОС, грамотрицательной микробиотой дыхательных путей, необходимостью в длительных курсах ИГКС, а также выраженными нарушениями ФВД согласно данным бронхофонограммы.

Согласно определению Классификации клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей (2008), диагноз БЛД устанавливается у детей до 3-летнего возраста. В последующем происходит трансформация заболевания в хронические формы (ХБ и ОБ) или восстановление морфофункциональных структур легочной ткани с реализацией в виде выздоровления и РБ

При анализе влияния степени тяжести заболевания на исходы БЛД, отмечено что у пациентов с тяжелым течением БЛД достоверно чаще формируются ХЗЛ ( $OR = 7,556$  (ДИ 3,580–15,947)), в то время как у больных со средней степенью тяжести преобладают благоприятные исходы заболевания в виде выздоровления и РБ ( $OR = 3,529$  (ДИ 1,748–7,126)) (табл. 1).

Таблица 1 – Исходы БЛД в зависимости от тяжести течения заболевания

Тяжесть течения	Исходы		Статистическая достоверность: $\chi^2 = 33,935$ , $p < 0,001$ , $df = 2$
	1 подгруппа (n = 88)	2 подгруппа (n = 58)	
Легкая (n = 14)	14 (100 %)	0	–
Средняя (n = 72)	54 (75 %), OR = 3,529 (ДИ 1,748– 7,126)	18 (25 %)	$\chi^2 = 12,865$ , $p < 0,001$ , $df = 1$
Тяжелая (n = 60)	20 (33,3 %)	40 (66,7 %), OR = 7,556 (ДИ 3,580– 15,947)	$\chi^2 = 30,876$ , $p < 0,001$ , $df = 1$

Примечание: p – уровень статистической значимости между группами по вариантам исхода заболевания.

При анализе влияния ГВ на частоту формирования хронических заболеваний (ХБ и ОБ) и благоприятных исходов в виде выздоровления или РБ как исхода БЛД было выявлено, что у детей, рожденных в ГВ менее 31 недели, достоверно чаще в катамнезе диагностированы ХЗЛ ( $\chi^2 = 8,411$ ,  $p = 0,004$ ,  $df = 1$ ).

Статистический анализ данных установил, что исход определяется длительностью проводимой оксигенотерапии. Выявлено, что дети, сформировавшие в дальнейшем ХЗЛ, получали достоверно более длительно кислородную поддержку даже в пределах идентичных временных групп (до 3 недель и более месяца) ( $p < 0,05$ ). Одновременно с анализом длительности, была проведена оценка параметров респираторной терапии. При анализе данных было выявлено, что одним из основных предикторов формирования исходов БЛД в виде ХЗЛ ( $F = 0,00000$ ,  $p < 0,05$ ) необходимо признать вентиляционную поддержку с «жесткими» параметрами ( $FiO_2 \geq 0,45$ ;  $P_{ip} \geq 26$  см вод.ст.), применяемую медленно после рождения ребенка.

Согласно результатам исследования, дети с ХЗЛ статистически значимо чаще переносили ОРВИ (более 8 раз в год), чем пациенты из первой подгруппы ( $\chi^2 = 5,655$ ,  $p < 0,05$ ,  $df = 1$ ). У больных первой подгруппы ранний старт (на первом году жизни)

заболеваний назофарингеальной зоны вирусной этиологии наблюдался достоверно реже, чем у детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями легких в катамнезе ( $\chi^2 = 14,067$ ,  $p < 0,001$ ,  $df = 1$ ).

Анализ данных КТ - на момент пересмотра диагноза, выявил, что у детей с тяжелым и среднетяжелым течением заболевания изменения в виде эмфиземы, булл, ателектазов, локального и распространенного пневмофиброза встречаются достоверно чаще, чем у больных с легкой формой ( $\chi^2 = 19,752$ ,  $p < 0,01$ ,  $df = 5$ ).

Таким образом, согласно проведенному исследованию, основными клиническими предикторами ХЗЛ у детей являются: тяжелое и среднетяжелое течение заболевания, низкий ГВ (до 31 недели), «жесткие режимы» и длительность респираторной поддержки, ранний старт (до года) и высокая частота респираторно-вирусных инфекций.

Однако, несмотря на выявленные закономерности формирования степени тяжести и исходов заболевания, у ряда недоношенных детей с идентичными условиями выхаживания, режимами вентиляционной поддержки диагностировали различные варианты тяжести течения и исходов БЛД, что побудило к дальнейшему изучению патогенетических механизмов в фокусе фенотип-ассоциированных полиморфизмов кандидатных генов и факторов тканевого ремоделирования ММР.

В ходе работы проведен анализ показателей содержания в сыворотке крови ММР-9 и варианты исходов БЛД. Отмечено, тенденция к пограничным максимальным значениям фермента в группе формирования хронических заболеваний.

Одним из перспективных кандидатов в регулировании процессов воспаления при ХЗЛ является витамин D3 за счет мультифакториального влияния на систему воспаления. Согласно дизайну исследования, были проанализированы ассоциации VD-статуса в контексте степени тяжести, вариантов исходов, частоты ОРВИ у детей с БЛД на этапе пересмотра диагноза. Руководствуясь национальной программой «Недостаточность витамина D у детей и подростков РФ» 2018 г., дефицит VD определяли как концентрацию 25(OH)D в сыворотке крови  $< 20$  нг/мл, недостаточность – от 20 до 30 нг/мл, адекватные уровни – 30–100 нг/мл.

Согласно результатам, в основной когорте пациентов статистически значимо чаще определяли недостаточность VD ( $\chi^2$  с поправкой Йейтса = 6,422, df = 1, p = 0,012), тогда как в контрольной группе – референтные значения.

Согласно результатам статистического анализа, у детей с дефицитными значениями статистически значимо чаще регистрировалась тяжелая форма заболевания ( $\chi^2 = 21,500$ , df = 1, p < 0,0010), в то время как при референтных значениях и уровне, соответствующим недостаточности VD, – среднетяжелое течение БЛД ( $\chi^2 = 17,379$ , df = 1, p < 0,001).

Анализ результатов свидетельствует о том, что дефицит VD ассоциирован с развитием ХЗЛ у детей с БЛД в качестве исходов ( $\chi^2 = 23,036$ , df = 1, p < 0,001), в то время как при референтных значениях статистически чаще регистрируется выздоровление или РБ ( $\chi^2 = 15,021$ , df = 1, p < 0,001) (табл. 2)

Таблица 2 – Варианты исходов БЛД в зависимости от уровня сывороточного кальцидиола

Уровень витамина D3 в сыворотке крови	Исходы		Статистическая значимость
	1-я подгруппа (n = 50)	2-я подгруппа (n = 32)	
Дефицит < 20 нг/мл (n = 27)	6 (22,2 %)	21 (77,8%), OR–14,000 (ДИ 4,557–43,010)	$\chi^2 = 23,036$ p < 0,001, df = 1
Недостаточность 21–29 нг/мл (n = 33)	23 (69,7 %)	10 (30,3 %)	$\chi^2 = 1,765$ p = 0,184, df = 1
Референтные значения > 30 нг/мл (n = 22)	21 (95,5 %), OR–22,448 (ДИ 2,835– 177,728)	1 (4,5 %)	F= 0,00007, p < 0,001, df = 1

Примечание: p – уровень статистической значимости между подгруппами

Проведенный анализ позволяет утверждать, что изменение показателей сывороточного кальцидиола оказывает модифицирующее влияние на исходы БЛД и особенности ее течения, вероятно, за счет геномных и негеномных механизмов регуляции хронического воспаления.

В результате поиска однонуклеарных полиморфных замен с предполагаемым фенотипическим эффектом в промоторных и интронных областях с помощью методов биоинформатики выделены полиморфизм rs3918242 гена MMP-9, полиморфизм rs721917 гена SFTPD и полиморфизм FokI (rs2228570) гена рецептора витамина D. Чтобы оценить их влияние, проанализированы ассоциации клинических проявлений БЛД и вариантов исхода с полиморфными вариантами представленных генов, изучена частота этих полиморфизмов в выборках пациентов с БЛД и в контрольной группе.

В ходе исследования анализ статистических данных показал гендерные различия по распределению генотипов: генотип С/С является протективным у мальчиков в основной группе больных ( $\chi^2 = 5,049$ ,  $p = 0,025$ ,  $df = 1$ , OR = 0,200 (ДИ 0,044–0,917))

В ходе анализа данных, определено достоверное влияние генотипа С/С полиморфизма rs3918242 гена MMP-9 на длительность респираторной поддержки. А именно: гомозиготный мажорный генотип является предрасполагающим для краткосрочной ИВЛ ( $\chi^2 = 7,185$ ,  $p = 0,008$ ,  $df = 1$ , OR = 5,000 (ДИ 1,574–15,880)) и протективным по отношению к длительным срокам ИВЛ (более 1 месяца) (OR = 0,510 (ДИ 0,104–0,768)).

Согласно полученной статистике, выявлено, что генотип С/С является предрасполагающим к развитию БОС у детей на фоне респираторной инфекции ( $\chi^2 = 16,133$  ( $p < 0,001$ ),  $df = 1$ , OR = 7,200 (ДИ 2,550– 20,333)), тогда как совокупное влияние генотипов С/Т и Т/Т оказывает протективное действие по данному признаку ( $\chi^2 = 6,318$ ,  $p = 0,012$ , OR = 0,216 (ДИ 0,071–0,662),  $df = 1$ ;  $\chi^2 = 7,038$ ,  $p = 0,008$ , OR = 0,125 (ДИ 0,021–0,731)). Анализ результатов свидетельствует о том, что генотип С/С является упреждающим к длительным срокам использования ИГКС у детей с БЛД ( $\chi^2 = 4,203$ ,  $p = 0,041$ ,  $df = 1$ , OR = 3,429 (ДИ 1,185–9,917))

При генетической вариабельности полиморфизма rs3918242 гена MMP-9 получены статистически значимые различия по влиянию генотипов на характер микробиоты дыхательных путей у детей с БЛД. У пациентов с генотипом С/С и аллелем С достоверно чаще выявлялись представители грамтрицательной флоры (*P. aeruginosa*, *Klebsiella*, *E. coli*), ( $\chi^2 = 9,708$ ,  $p = 0,008$ ,  $df = 2$ ),

в то же время генотип Т/Т и минорный аллель являются предрасполагающими к грамположительной флоре ( $\chi^2 = 9,373$ ,  $p = 0,010$ ,  $df = 2$ ).

Таким образом, в ходе работы было доказано, что, несмотря на ассоциацию генотипа С/С полиморфизма rs3918242 гена MMP-9 с краткосрочной респираторной поддержкой, при нем увеличивается частота развития БОС на фоне респираторных инфекций у детей, повышает риск инфицирования дыхательных путей грамотрицательной микрофлорой и ассоциирован с необходимостью длительного применения ИГКС.

Статистический анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма rs721917 гена SFTPD определил, что гетерозиготный генотип С/Т является предрасполагающим для формирования БЛД у недоношенных детей (OR = 2,002 (ДИ 1,135–3,533)). (табл. 12).

Таблица 12 – Распределение генотипов и частот аллелей полиморфизма rs721917 гена SFTPD в основной и контрольной группах

Генотипы SFTPD	Контрольная группа (n = 93)	Основная группа (n = 106)	Статистическая достоверность: $\chi^2_{C/C-T/C-T/T} = 6,568$ , $p = 0,038$ , $df = 2$
С/С	39 (42 %)	36 (34 %)	$\chi^2 = 1,341$ , $p = 0,247$ , $df = 1$
С/Т	35 (37,6 %)	58 (54,7 %), OR = 2,002 (ДИ 1,135–3,533)	$\chi^2 = 5,807$ , $p = 0,016$ , $df = 1$
Т/Т	19 (20,4 %)	12 (11,3 %)	$\chi^2 = 3,126$ , $p = 0,078$ , $df = 1$
Аллели	n = 128	n = 164	$\chi^2 \cdot p$
С	74 (57,8 %)	94 (57,3 %)	$\chi^2 = 0,007$ , $p = 0,933$ , $df = 1$
Т	54 (42,2 %)	70 (42,7 %)	

Примечание: p – уровень статистической значимости между носителями генотипа по сравнению с группой контроля.

При осуществлении сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов с учетом исхода заболевания, определено, что генотип С/С и аллель С являются маркерами предрасположенности к формированию ХЗЛ (OR = 4,400 (ДИ 1,833–

10,563)), в то время как генотип T/T является протективным (ДИ 1,180–27,347).

В ходе исследования выявлено, что у пациентов с генотипом T/T достоверно чаще отсутствует колонизация патогенной бактериальной флорой дыхательных путей ( $\chi^2 = 6,238$ ,  $p = 0,045$ ).

При анализе влияния полиморфизма FOK1 гена VDR на формирование БЛД, выявлено, что аллель F и генотип F/F данного полиморфизма, являются предрасполагающими к развитию заболевания (OR = 2,811 (ДИ 1,513–5,221)), то время как генотип F/f – упреждающим или протективным (OR = 0,520 (ДИ 0,277–0,976)) (табл. 13).

Таблица 13 – Распределение генотипов и частот аллелей полиморфизма FOK1 гена VDR в основной и контрольной группах

Генотипы VDRFOK1	Контрольная группа (n = 93)	Основная группа (n = 80)	Статистическая достоверность: $\chi^2_{F/F-F/f-f/f} = 12,084$ , $p = 0,003$ , $df = 2$
F/F	37 (39,8 %)	52 (65,0 %)	$\chi^2 = 10,946$ , $p < 0,001$ , $df = 1$
F/f	42 (45,2 %)	24 (30,0 %)	$\chi^2 = 4,190$ , $p = 0,041$ , $df = 1$
f/f	14 (15 %)	4 (5,0 %)	F=NaN, $p > 0,05$ , $df = 1$
Аллели	n = 135	n = 104	$\chi^2 \cdot p$
F	79 (58,5 %)	76 (73,1 %), OR = 1,924 (ДИ 1,108–3,342)	$\chi^2 = 5,462$ , $p = 0,020$ , $df = 1$
f	56 (41,5 %)	28 (26,9 %)	

Примечание: p – уровень статистической значимости между носителями генотипа по сравнению с группой контроля.

Анализ статистических данных показал неравномерное распределение генотипов по группам пациентов с различной длительностью ИВЛ. В группе детей с длительностью ИВЛ до 1 недели генотип F/F встречался достоверно чаще (OR = 5,625 (ДИ 2,050–15,436)). Помимо этого, статистический анализ демонстрирует, что в группе пациентов, нуждавшихся в наименьшей по длительности респираторной поддержке, предрасполагающее влияние оказывал аллель F (OR = 3,438 (ДИ 1,346–8,781)).

При анализе полученных данных выявлена достоверная

взаимосвязь гетерозиготного генотипа F/f полиморфного маркера FOK1 гена VDR с высокой частотой ОРВИ ( $F= 0,00618$ ,  $p < 0,05$ ,  $df = 1$ ), а также их ранним стартом ( $F= 0,00003$ ,  $p < 0,05$ ,  $df = 1$ ).

Согласно статистическому анализу, генотип F/f и мутантный аллель f являются предрасполагающими к тяжелому течению БОС во время обострения БЛД ( $OR = 18,000$  (ДИ 4,728–68,533) и  $OR = 5,000$ (ДИ 3,011–33,209)).

Сравнительный анализ данных показал, что у гетерозиготных носителей генотипа F/f полиморфного маркера FOK1 гена VDR достоверно чаще имелись тяжелые поражения ЦНС ( $F= 0,00009$ ,  $p < 0,05$ ,  $df = 1$   $OR = 9,000$  (ДИ 1,638–49,447)).

Таким образом, в ходе проведенного исследования было доказано влияние генотипа F/f полиморфного локуса FOK1 гена VDR на вероятность реализации частых эпизодов ОРВИ, их старт на первом году жизни и модификацию чувствительности к инфекционным агентам с воплощением тяжелого БОС. Данный генотип ассоциирован с тяжелыми поражениями ЦНС. .

Это позволяет сделать выводы, что, в ходе проведенного исследования было доказано влияние полиморфизма FOK1 на вероятность реализации заболевания и модификацию чувствительности к инфекционным агентам с воплощением тяжелого БОС. Представляется оправданным рекомендовать генотипирование на наличие неблагоприятных аллелей полиморфизма FOK1 гена VDR для объективизации прогноза течения и выработки персонализированных программ VD-терапии у данной категории больных.

## **ВЫВОДЫ**

1. Основными факторами формирования тяжелого течения БЛД у детей являются: низкий ГВ, масса тела менее 1000 г, грамотрицательный характер микробиоты дыхательных путей. Определено, что основными предикторами формирования ХЗЛ у детей с БЛД являются: тяжелое и среднетяжелое течение заболевания, низкий ГВ (до 31 недели), «жесткие режимы» и длительность респираторной поддержки, ранний старт (до года) и высокая частота респираторно-вирусных инфекций.

2. Уровень ММР-9 в сыворотке крови у детей с БЛД отражает остроту воспалительного процесса в легких, поэтому его

определение может рассматриваться в качестве патогенетического маркера воспаления. На этапе трансформации диагноза БЛД статистически значимых различий уровня ММР-9 в зависимости от исходов и степени тяжести заболевания не выявлено. Дефицит кальцидиола в сыворотке крови ассоциирован с тяжелым течением БЛД, высокой кратностью респираторных инфекций дыхательных путей и развитием ХЗЛ в качестве исходов заболевания.

3. Установлено предрасполагающее влияние генотипа С/С полиморфизма rs3918242 гена ММР-9 на формирование БЛД у девочек. Генотип С/С ассоциирован с высокой частотой БОС на фоне респираторных инфекций, риском колонизации дыхательных путей грамотрицательной микрофлорой и длительной терапией ингаляционными глюкокортикостероидами.

4. Доказано, что присутствие генотипа С/С полиморфизма rs721917 гена SFTPD является генетическим предиктором реализации ХЗЛ у детей. Генотип Т/Т оказывает предрасполагающее действие на выздоровление детей и снижает риск инфицирования дыхательных путей патогенной микрофлорой.

5. Получена ассоциация полиморфизма FOK1 гена VDR с развитием БЛД у детей. Доказано предрасполагающее действие генотипа F/f полиморфного локуса FOK1 гена VDR на ранний старт, высокую частоту ОРВИ и на реализацию более тяжелого течения БОС у детей с БЛД

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Рекомендовать использование клинико-anamnestических и молекулярно-генетических показателей формирования и неблагоприятного течения БЛД для персонализированного подхода к терапии.

2. Целесообразно мониторинг уровня кальцидиола в сыворотке крови у детей с БЛД носителями неблагоприятных генотипов полиморфизма FOK1 гена VDR 1 раз в месяц, с динамической коррекцией дозы до достижения референтных показателей для улучшения прогноза заболевания и качества жизни данной категории больных.

3. Полученные данные по распределению полиморфизмов rs3918242 гена MMP-9, rs721917 гена SFTPD, FOK1 гена VDR в популяции недоношенных младенцев без формирования БЛД в Астраханской области могут быть рекомендованы как опорные для дальнейших эпидемиологических генетических исследований, а так же как предикторы тяжести течения и исходов БЛД.

4. Рекомендовать прием витамина D по 3000 МЕ в сутки в когорте детей с БЛД с дефицитом и 2000МЕ в сутки с недостаточностью витамина D, с контролем показателя через 1 месяц, до достижения целевых значений, с последующий переходом на 1000 МЕ в сутки.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Хиштилова П.Б. Клинико-генетические аспекты формирования и тяжести течения бронхолегочной дисплазии у детей на современном этапе / П.Б. Хиштилова, Д.Ф. Сергиенко // Журнал «Успехи современной науки и образования». – 2017. – Т. 6. №2, - С.169-172.
2. Хиштилова П.Б. Особенности клинического течения бронхолегочной дисплазии у детей / П.Б. Хиштилова, Д.Ф. Сергиенко // **Астраханский медицинский журнал**. – 2020. – Т. 15, № 1. – С. 21-28
3. Хиштилова П.Б. Влияние полиморфизма rs721917 гена SFTPD на течение и исходы бронхолегочной дисплазии у детей / П.Б. Хиштилова, Д.Ф. Сергиенко // Научно-практический медицинский журнал «Фарматека» – № 9. – 2020. – С.63-67
4. Хиштилова П.Б. Бронхолегочная дисплазия у детей в фокусе генетической вариабельности рецептора витамина D / П.Б. Хиштилова, Д.Ф. Сергиенко // Научно-практический медицинский журнал «Фарматека». – № 10. – 2020. – С.94-99
5. Хиштилова П.Б. Влияние различных факторов на формирование исходов бронхолегочной дисплазии у детей / П.Б. Хиштилова, Д.Ф. Сергиенко // Научно-практический медицинский журнал «Фарматека». – № 1. – 2021. – С.14-18
6. Khishtilova P.B. Effect of the genetic variability of metalloproteinase 9 rs3918242435 gene polymorphism on the course and outcome of bronchopulmonary dysplasia in children / P.B. Khishtilova, D.F. Sergienko, S.A. Krasovsky // Archiv Euromedica. – 2020. – Vol. 10, №1. – P. 97-99
7. Хиштилова П.Б. Клинико-эпидемиологические и патогенетические аспекты бронхолегочной дисплазии на современном этапе / П.Б. Хиш-

тилова, Д.Ф. Сергиенко // Сборник материалов X международной научно - практической конференции «Наука в современном информационном обществе». – Норт-Чарлстон, США, 2016. – Т. 1. – С.17-19.

8. Хиштилова П.Б. Бронхолегочная дисплазия: факторы, определяющие течение заболевания / П.Б. Хиштилова, Д.Ф. Сергиенко // Сборник Актуальные вопросы современной медицины материалы III Международной конференции Прикаспийских государств. – Астрахань, 2018. – С. 194-195.

9. Хиштилова П.Б. Факторы, определяющие степень тяжести и исходы бронхолегочной дисплазии у детей / П.Б. Хиштилова, Д.Ф. Сергиенко // Сборник Актуальные вопросы современной медицины материалы III Международной конференции Прикаспийских государств. – Астрахань, 2018. – С. 196-197.

10. Сергиенко Д.Ф. Матриксная металлопротеиназа-9 как биомаркер тяжести течения и исходов бронхолегочной дисплазии у детей. Д.Ф. Сергиенко, П.Б. Хиштилова // Сборник тезисов научной конференции, посвященной Дню работников здравоохранения и медицинской промышленности Туркменистана 2020. – С. 708

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛД	- бронхолегочная дисплазия
БОС	- бронхообструктивный синдром
ГВ	- гестационный возраст
ИВЛ	- искусственная вентиляция легких
ИГКС	- ингаляционные глюкокортикостероиды
КТ	- компьютерная томограмма
ОБ	- облитерирующий бронхиолит
ОРВИ	- острая респираторная вирусная инфекция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РБ	- рецидивирующий бронхит
РДС	- респираторный дистресс-синдром
ФВД	- функция внешнего дыхания
ХБ	- хронический бронхит
ХЗЛ	- хроническое заболевание легких
ЦНС	- центральная нервная система
ЭДТА	- этилендиамидтетраацетат Na
ЭНМТ	- экстремально низкая масса тела
ММР	- матриксная металлопротеиназа
OR(odd ratio)	- отношение шансов
SFTPD	- сурфактантный белок D
VDR	- рецептор витамина D

ХИШТИЛОВА Патимат Багировна

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ  
ТЯЖЕСТИ И ИСХОДОВ  
БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У ДЕТЕЙ

14.01.08 – Педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Подписано в печать  
Тираж 100 экз. Заказ №

---

Издательство ФГБОУ ВО «Астраханский государственный  
медицинский университет» Минздрава России  
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121