

© Коллектив авторов, 2016

И.В. НИКИТИНА<sup>1</sup>, О.С. НЕПША<sup>1</sup>, А.Е. ДОННИКОВ<sup>1</sup>, Д.Ю. ТРОФИМОВ<sup>1</sup>,  
О.В. МИЛАЯ<sup>1</sup>, А.В. ДЕГТЯРЕВА<sup>1,2</sup>, О.В. ИОНОВ<sup>1,2</sup>, В.В. ЗУБКОВ<sup>1,2</sup>, Д.Н. ДЕГТЯРЕВ<sup>1,2</sup>**СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ  
В ДИАГНОСТИКЕ РАННЕГО НЕОНАТАЛЬНОГО СЕПСИСА  
У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ**<sup>1</sup>ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова  
Минздрава России, Москва<sup>2</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Россия

**Цель исследования.** Поиск ранних диагностических биомаркеров раннего неонатального сепсиса (РНС) у недоношенных новорожденных с использованием молекулярно-генетических методов.

**Материал и методы.** Исследованы клетки буккального соскоба (БС) и венозная кровь (ВК) 71 недоношенного ребенка, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) ФГБУ НЦАГиП им. В.И. Кулакова в период с 08.2012 г. по 03.2015 г.

**Результаты.** В ходе проведенного исследования показано, что течение РНС у недоношенных детей сопровождается общим состоянием иммуносупрессии. Выявлено изменение экспрессии генов *IL12A* в клетках БС и *TNFA* и *GATA3* в ВК.

**Заключение.** С помощью современных молекулярно-генетических методов определены кандидатные диагностические биомаркеры РНС у недоношенных новорожденных. Создана математическая модель, позволяющая диагностировать РНС на основании определения уровня экспрессии генов *IL12A* и *CD68* в клетках БС недоношенных новорожденных с чувствительностью 81% и специфичностью 74%. Предлагаемая к использованию методика носит неинвазивный характер, способна ускорить диагностический поиск и оптимизировать сроки начала патогенетической терапии РНС у недоношенных детей в условиях ОРИТН.

**Ключевые слова:** недоношенные новорожденные, биомаркеры, сепсис, экспрессия генов, цитокины, м-рибонуклеиновая кислота (мРНК), полимеразная цепная реакция (ПЦР), буккальный соскоб, венозная кровь.

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Для цитирования: Никитина И.В., Непша О.С., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю., Милая О.В., Дегтярева А.В., Ионов О.В., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н. Современные возможности молекулярно-генетических методов в диагностике раннего неонатального сепсиса у недоношенных новорожденных. *Акушерство и гинекология*. 2016; 12: 106-13. <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.12.106-13>

I.V. NIKITINA<sup>1</sup>, O.S. NEPSHA<sup>1</sup>, A.E. DONNIKOV<sup>1</sup>, D.Yu. TROFIMOV<sup>1</sup>, O.V. MILAYA<sup>1</sup>,  
A.V. DEGTYAREVA<sup>1,2</sup>, O.V. IONOV<sup>1,2</sup>, V.V. ZUBKOV<sup>1,2</sup>, D.N. DEGTYAREV<sup>1,2</sup>**MODERN CAPABILITIES OF MOLECULAR GENETIC METHODS  
IN THE DIAGNOSIS OF EARLY NEONATAL SEPSIS IN PRETERM NEONATES**<sup>1</sup>Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia,  
Moscow 117997, Ac. Oparina str. 4, Russia<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

**Objective.** To search for early diagnostic biomarkers for early neonatal sepsis (ENS) in preterm neonates, by using molecular genetic methods.

**Subject and methods.** Buccal scrape (BS) cells and venous blood (VB) were investigated in 71 preterm infants treated in the Intensive Care Unit (ICU), Academician V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, in the period August 2012 to March 2015.

**Results.** The investigation showed that the course of ENS in the preterm infants was accompanied by the general state of immunosuppression. There were changes in the expression of the *IL12A* gene in the BS cells and in that of the *TNF-α* and *GATA3* genes in VC.

**Conclusion.** Current molecular genetic methods were used to identify diagnostic biomarker candidates for ENS in preterm infants. A mathematical model was created to diagnose a neural network based on the determination of the expression level of the *IL12A* and *CD68* genes in the BS cells of preterm infants (sensitivity 81%, specificity 74%). The procedure proposed for use is non-invasive and able to accelerate a diagnostic search and to optimize the timing of pathogenetic therapy for ENS in premature infants in ICU.

**Key words:** preterm infants, biomarkers, sepsis, gene expression, cytokines, messenger ribonucleic acid (mRNA), polymerase chain reaction (PCR), buccal scrape, venous blood.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

For citations: Nikitina I.V., Nepsha O.S., Donnikov A.E., Trofimov D.Yu., Milaya O.V., Degtyareva A.V., Ionov O.V., Zubkov V.V., Degtyarev D.N. Modern capabilities of molecular genetic methods in the diagnosis of early neonatal sepsis in preterm neonates. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2016; (12): 106-13. (in Russian) <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.12.106-13>

Частота рождения недоношенных детей в последнее десятилетие не имеет тенденции к снижению. Данный показатель вариабелен и в большинстве развитых стран Европы находится в диапазоне от 5 до 10%, в Китае — 6%, в различных регионах России составляет от 4 до 16% [1, 2]. Сепсис и тяжелые инфекции остаются одной из актуальных проблем современной неонатологии, несмотря на улучшение показателей выживаемости глубоко недоношенных детей. Клинические проявления раннего неонатального сепсиса (РНС) развиваются у новорожденных в первые трое суток. Основными микроорганизмами, вызывающими РНС у доношенных детей, являются *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* [3, 4]. Критерии клинической диагностики РНС у доношенных новорожденных в настоящее время хорошо известны и стандартизованы. У недоношенных детей, родившихся до завершения 34 недели беременности, спектр возбудителей, вызывающих РНС, несколько иной, чем у доношенных новорожденных. Наиболее частыми возбудителями РНС у глубоко недоношенных детей являются *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.* и *Prevotella spp.* [5, 6]. Следует также отметить, что истинная частота РНС, вызванного анаэробными микроорганизмами, в настоящее время неизвестна.

В силу неполноценности механизмов врожденного иммунитета бактериальные инфекции у глубоко недоношенных детей имеют склонность к быстрой генерализации и тяжелому течению. Клиническая картина инфекционных заболеваний часто маскируется другими патологическими состояниями. Частой причиной возникновения угрожающих жизни осложнений при РНС у таких детей является отсроченная постановка диагноза и, как следствие, позднее начало целенаправленной терапии [7].

Ранняя диагностика септического процесса у недоношенных новорожденных сложна ввиду неспецифического характера клинических симптомов, отсутствия надежных диагностических критериев и высокочувствительных биомаркеров. Основными методами обследования новорожденных детей при подозрении на РНС в настоящее время являются микробиологические (посев крови на стерильность), клинико-лабораторные (клинический анализ крови с определением количества лейкоцитов и нейтрофилов в периферической крови, подсчет нейтрофильного индекса, определение белков острой фазы воспаления) и инструментальные (рентгенологическое исследование органов грудной полости) [8].

Традиционная диагностика путем анализа гемокультуры имеет низкую чувствительность и требует длительного времени для проведения исследования. Частота обнаружения возбудителя в крови у больных с сепсисом по данным различных авторов не превышает 45%, а отсутствие бактериемии не исключает развития РНС при наличии основных критериев этого заболевания [9, 10]. В случае выявления возбудителя РНС, как правило, требуется не менее 48 часов для идентификации вида и определения чувствительности к антибиотикам. При этом многие анаэробные бактерии относятся к некультивируемым формам, то есть не растут на питательных средах и могут быть идентифицированы в биологических жидкостях лишь благодаря применению молекулярно-генетических методов. Однако, учитывая крайне незначительное количество возбудителя в кровотоке, прямое определение микроорганизмов в крови сопряжено со значительными технологическими трудностями и не обладает достаточной чувствительностью для ранней диагностики.

Количество лейкоцитов в периферической крови у глубоко недоношенных детей, так же как и у доношенных, зависит от времени взятия образца крови после рождения и имеет ограниченное значение в постановке диагноза РНС. Нейтрофильный индекс (отношение незрелых форм нейтрофилов к их общему количеству) в большей степени позволяет исключить, нежели подтвердить наличие инфекционного процесса в периоде новорожденности [7]. Анализ белков острой фазы воспаления в сыворотке крови при РНС также не всегда является информативным. Выявляемые нередко рентгенологические изменения в виде снижения пневматизации легочной ткани и усиления бронхо-сосудистого рисунка у недоношенных детей не являются специфичными для РНС [3, 10].

Значительным потенциалом в отношении быстрой диагностики РНС, понимания патогенеза, оценки эффективности проводимого лечения и прогнозирования исходов могут обладать молекулярные биомаркеры. Идеальный биомаркер должен быть элементом патогенеза РНС, обладать достаточной чувствительностью и специфичностью. Современные биомаркеры могут быть использованы не только как индикаторы наличия/отсутствия сепсиса, но и для дифференциальной диагностики бактериальной, грибковой и вирусной инфекции, а также для мониторинга эффективности терапии, прогноза развития осложнений и исхода заболевания. Важными факторами должны являться также легкость сбора

материала, неинвазивный характер, быстрота исследования, возможность стандартизации в различных клинических лабораториях и точность методики измерения [11, 12]. Биомаркер должен отвечать требованиям концепции SMART, то есть быть:

S – specific and sensitive – чувствительным и специфичным;

M – measurable – измеряемым;

A – available and affordable – доступным;

R – responsive and reproducible – воспроизводимым;

T – timely – своевременным [13].

Таким образом, поиск новых биомаркеров РНС у недоношенных новорожденных представляется особенно актуальным. В последние годы большое внимание уделяется определению роли генов иммунного ответа в патогенезе развития РНС у новорожденных. Хорошим маркером активности гена может служить уровень специфической м-рибонуклеиновой кислоты (мРНК). Применение молекулярно-генетических методов исследования, в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени (РТ-ПЦР), позволяет с высокой точностью определить количество конкретной изоформы мРНК целевого гена в любом доступном биоматериале. Ответ может быть получен через несколько часов после взятия биоматериала, а широкое распространение технологии РТ-ПЦР в клинико-диагностических лабораториях делает это исследование доступным врачам различных специальностей. Таким образом, анализ транскрипционного профиля генов иммунного ответа полностью соответствует требованиям концепции SMART и может быть использован для ранней диагностики РНС.

Целью исследования стал поиск ранних диагностических биомаркеров РНС у недоношенных новорожденных с использованием молекулярно-генетических методов.

## Материал и методы исследования

В период с 08.2012 г. по 03.2015 г. был обследован 71 недоношенный ребенок, проходивший лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) ФГБУ НЦАГиП им. В.И. Кулакова. Исследование было одобрено этическим комитетом Центра. Критериями включения в исследование были: гестационный возраст новорожденных 32 недели и менее и наличие дыхательных расстройств. Из исследования были исключены дети с гемолитической болезнью новорожденных, а также с врожденными пороками развития, требующими срочного хирургического вмешательства.

Все новорожденные с целью диагностики РНС были обследованы согласно протоколу, разработанному в ОРИТН отдела неонатологии и педиатрии ФГБУ НЦАГиП им. В.И. Кулакова и включающему анализ гемокультуры, рентгенологическое исследование органов грудной полости, оценку содержания белков острой фазы воспаления (С-реактивный белок), клинический анализ крови с определением абсо-

лютного числа лейкоцитов, тромбоцитов, нейтрофилов и вычисление нейтрофильного индекса [8].

По результатам проведенного клинико-лабораторного и клинико-инструментального обследования в возрасте 72 часов жизни делали вывод о наличии или отсутствии РНС. Диагноз РНС ставился на основании двух или более клинических симптомов и одного или более лабораторных признаков системной воспалительной реакции, или при наличии инфильтративных изменений в легких по данным рентгенографии органов грудной полости [7].

Все дети, включенные в исследование, были разделены на 2 группы: первую группу составили 40 новорожденных с РНС (основная группа), вторую – 31 ребенок с респираторным дистресс-синдромом (РДС) без клинических проявлений РНС (группа сравнения). Сбор биологического материала (венозная кровь (ВК) и буккальный соскоб (БС)) осуществляли у новорожденных в первые часы жизни, сразу после поступления в ОРИТН до начала медикаментозной терапии и энтерального кормления. Клетки БС получали путем взятия соскоба из щечной области в пробирки с раствором для стабилизации мРНК (лизирующий раствор набора «Проба НК» (ДНК-Технология, Россия)). Кровь для исследования забирали в пробирку с антикоагулянтом (этилендиаминтетрауксусная кислота). Во избежание деградации мРНК пробирки с кровью немедленно транспортировали в отделение биобанка, где производилось ее аликвотирование (по 100 мкл) в лизирующий раствор набора «Проба НК» (ДНК-Технология, Россия) для стабилизации мРНК. До момента исследования все образцы хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Проводили измерение уровней экспрессии следующих генов, участвующих в иммунном ответе: цитокины (*интерлейкины (IL) 1b, IL6, IL8, IL10, IL12a, IL15, IL18, фактор некроза опухоли (TNF) a, трансформирующий фактор роста (TGF) b1, интерферон  $\gamma$  (IFNG)*), транскрипционные факторы (*TBX21, GATA3, RORC2*), поверхностные клеточные структуры (*CD45, CD68, CD69*), толл-подобные рецепторы (*TLR2, TLR4, TLR9*), матриксная металлопротеиназа (*MMP8*).

Осаждение РНК проводили изопропанолом в присутствии соосадителя, с последующими отмывками промывочными растворами. Объем образцов после выделения составил 100 мкл. В работе использовались коммерческие реактивы (ДНК-Технология, Россия). Производитель гарантировал отсутствие амплификации на матрице геномной ДНК исследуемых и референсных генов. Это позволило не использовать дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНК-азой. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) ставили в объеме 40 мкл (в реакцию брали 33 мкл образца). В качестве праймеров для ОТ использовали специфические олигонуклеотиды. Реакцию проводили при температуре  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 5 раз в ТЕ-буфере.

Аmplификацию осуществляли в режиме реального времени на приборе «ДТ-384» в объеме 12,5 мкл по следующей программе: 1 цикл – 80°C 30 сек, 94°C 1 мин 30 сек; 50 циклов – 94°C 20 сек, 62°C 20 сек; 10°C – хранение 94°C. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 62°C по каналу FAM. Реакцию ставили в двух повторах для каждой точки. Нормировка проводилась по четырем референсным генам *HPRT1*, *TBP*, *B2M*, *GUSB*. Использован метод сравнения индикаторных циклов (метод  $\Delta\Delta C_p$ ).

Статистическую обработку результатов исследования уровней экспрессии генов проводили с использованием методов непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представлены в виде  $Me (L-H)$ , где  $Me$  – медиана,  $L$  – нижний квартиль,  $H$  – верхний квартиль.

Для наглядности представления экспрессионного профиля была проведена нормировка на уровень экспрессии соответствующего гена в группе сравнения. Значения  $Me$  в группе сравнения были приняты за 1, а значения  $Me$  в исследуемой группе показывали, во сколько раз уровень экспрессии гена был выше или ниже по отношению к группе сравнения. Для сопоставления двух групп по количественным признакам использовался  $U$ -критерий Манна-Уитни. Статистическую значимость различий двух или нескольких относительных показателей оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ . Различия между группами полагали статистически значимым при  $p < 0,05$ . Для дискриминации образцов в группах использовался многофакторный анализ (бинарная логистическая регрессия), который позволил вычислить вероятность «классификации в группу наличия признака или заболевания» ( $P$ ) для каждого клинического образца. Для расчёта оптимального значения величины порога отсечения  $P$  (точки cut off) использовали ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic).

По техническим причинам у 4 детей не удалось получить образцы БС. В 13 случаях экспрессия референсных генов в образцах БС была крайне низкой ввиду недостаточного количества биологического материала. Также из исследования были исключены 2 образца крови (по 1 из каждой группы) в связи с присутствием ингибиторов ПЦР.

## Результаты исследования

Клиническая характеристика новорожденных представлена в таблице. По большинству перина-

тальных параметров обе группы пациентов были сопоставимы.

Анализ уровня экспрессии мРНК показал, что транскрипты всех изучаемых генов были детектированы как в клетках БС ( $n=54$ ), так и в клетках ВК ( $n=69$ ) новорожденных. Первоначально в ВК и БС был исследован пул из 20 маркеров, однако в результате проведенного первичного анализа ряд генов: *IL6*, *IL12A*, *IL10*, *IL18*, *RORC2* в клетках ВК и *IL6*, *IL10*, *IL15*, *IFNG*, *TLR9* в клетках БС были исключены из дальнейшего анализа ввиду низкого уровня экспрессии (менее  $10^3$  копий мРНК на образец). Значения уровней экспрессии мРНК других генов находились в области линейного диапазона и детектировались во всех образцах, что позволяло использовать их для дальнейшего анализа. Количество анализируемых транскриптов в образцах варьировало в диапазоне от  $10^3$  до  $10^6$  копий мРНК/образец.

В результате проведения сравнительного анализа нами были получены статистически значимые различия в отношении ряда изучаемых маркеров в клетках БС и ВК у недоношенных новорожденных с наличием РНС и без признаков инфекции. В клетках ВК недоношенных новорожденных с РНС было выявлено достоверное снижение экспрессии *TNFA* в 2 раза ( $p=0,021$ ) и повышение *GATA3* в 2 раза ( $p=0,045$ ) по сравнению с группой сравнения (рис. 1).

Была выявлена тенденция к повышению экспрессии мРНК *TLR9* в группе новорожденных с РНС по отношению к группе сравнения, однако различия не достигли уровня статистической значимости ( $p=0,066$ ). Также в группе новорожденных с РНС отмечалось общее снижение экспрессии некоторых генов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*) и провоспалительных цитокинов (*IL1B*, *IL8*).

В результате анализа транскриптов в клетках БС в группе детей с признаками РНС получено достоверное снижение экспрессии мРНК *IL12A* в 2 раза ( $p=0,003$ ) по сравнению с группой детей с дыхательной патологией неинфекционного генеза. Следует отметить общее снижение представленности транскриптов некоторых генов провоспалительных цитокинов (*IL1B*, *IL8*) и толл-подобных рецепторов (*TLR2*, *TLR4*) в группе детей с проявлениями РНС (рис. 2).

При построении математической модели для дифференциальной диагностики РНС использовался многофакторный анализ (бинарная логистическая регрессия). В результате анализа методом обратной

Таблица. Клиническая характеристика новорожденных детей, включенных в исследование

| Параметры                               | Основная группа (РНС, n=40) | Группа сравнения (РДС, n=31) | P     |
|---|-----------------------------|------------------------------|-------|
| Гестационный возраст (недели), Me (L-H) | 29 (27–31)                  | 30 (29–30,5)                 | >0,05 |
| Мальчики n, (%)                         | 23 (57,5%)                  | 16 (51,6%)                   | >0,05 |
| Девочки n, (%)                          | 17 (42,5%)                  | 15 (48,4%)                   |       |
| Масса (г), Me (L-H)                     | 995 (830–1360)              | 1280 (965–1429)              | >0,05 |
| Длина (см), Me (L-H)                    | 36 (33–39)                  | 38 (35,3–39)                 | >0,05 |
| Самопроизвольные роды n, (%)            | 3 (7,5%)                    | 8 (25,8%)                    | <0,05 |
| Кесарево сечение n, (%)                 | 37 (92,5%)                  | 23 (74,2%)                   |       |
| Апгар, 1 мин, Me (L-H)                  | 6 (6–6,5)                   | 6 (5–6)                      | >0,05 |
| Апгар, 5 мин, Me (L-H)                  | 7 (6–7)                     | 7 (6–7)                      | >0,05 |

селекции были идентифицированы два 2 ключевых гена (IL12A и CD68), экспрессия которых вносит наибольший вклад для дискриминации групп. Значение экспрессии этих генов в клетках БС дало возможность дифференцировать новорожденных с РНС и новорожденных с дыхательными нарушениями иного генеза. Уравнение классифицирующей функции, полученное при многофакторном анализе, имело вид:

$$Y = -20,48 \times [IL12A] + 0,22 \times [CD68] + 0,40, \text{ где}$$

[IL12A] – уровень экспрессии мРНК IL12A в БС,  
[CD68] – уровень экспрессии мРНК CD68 в БС.

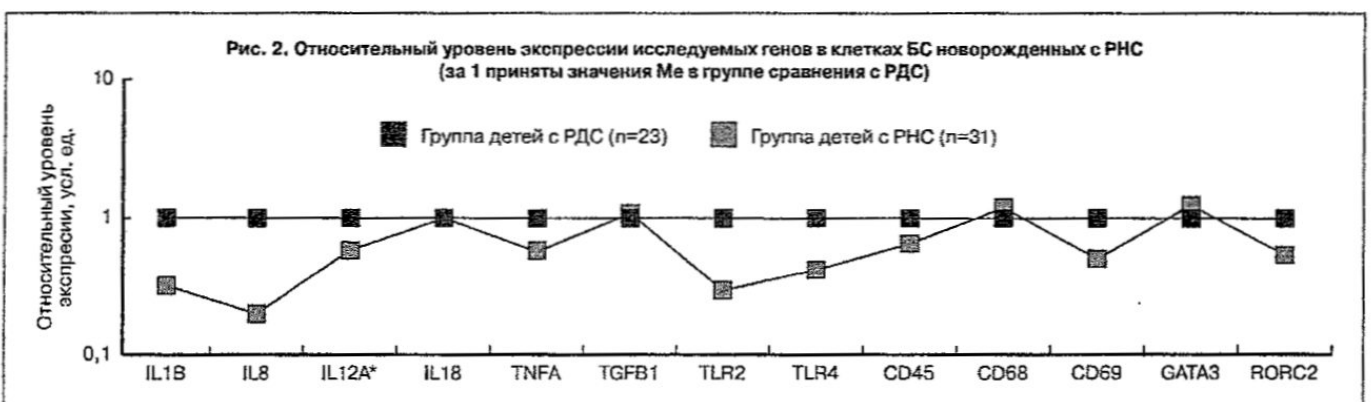
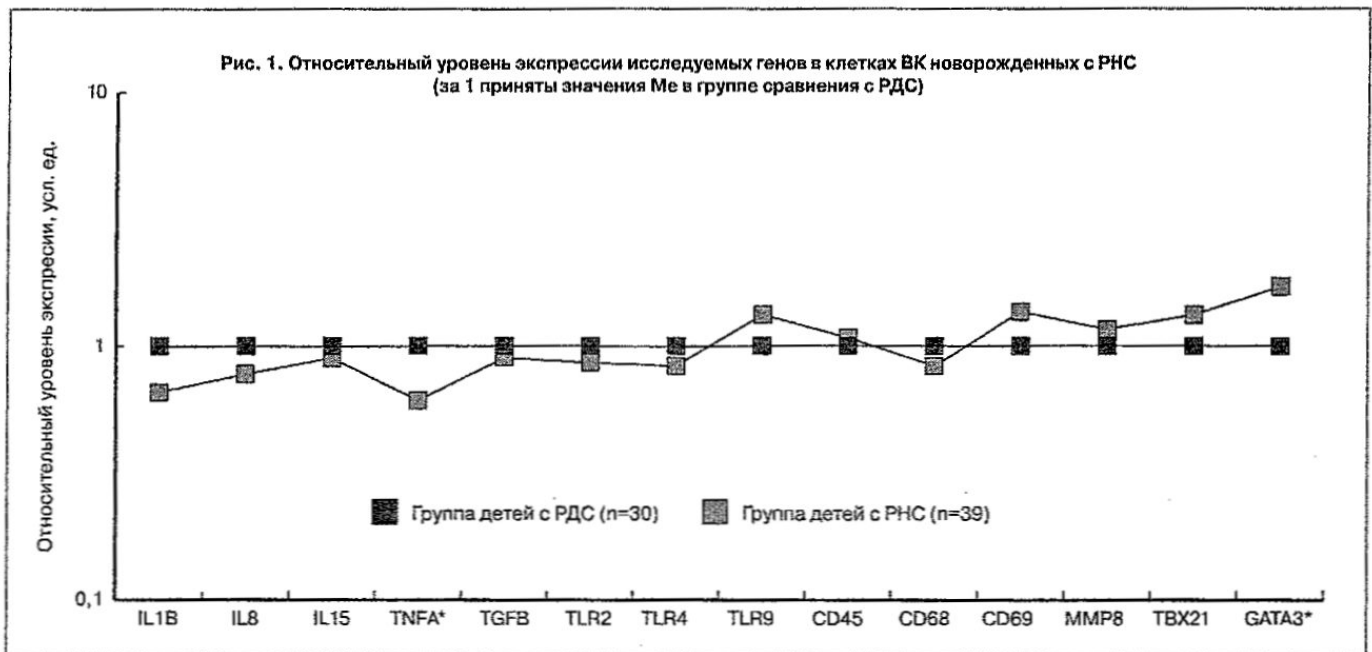
Необходимо отметить, что анализируемые маркеры ВК не вошли в модель, что может быть связано с высокой информативностью БС, так как развитие РНС связывают с наличием микроорганизмов в генитальном тракте матери, инфицирование которыми происходит внутриутробно или во время родов при прохождении через родовые пути [8]. В качестве входных ворот инфекции в данном случае выступает ротоглотка новорожденного, и состояние локального иммунитета в ней может определять вероятность инфицирования.

Для определения качества предложенной диагностической модели РНС с использованием полу-

ченного линейного уравнения был выполнен ROC-анализ. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,83 (0,72–0,94,  $p < 0,05$ ), что согласно экспертной шкале для оценки предсказательной способности модели позволило классифицировать ее как «очень хорошую». Чувствительность и специфичность предложенной модели в области порогового значения составила 81 и 74% соответственно (рис. 3). В качестве порогового значения (точка cut-off) выбрано значение функции, соответствующее максимальной сумме чувствительности и специфичности предложенной модели, которое составило 0,45. Значения показателей функции выше 0,45 следует классифицировать как маркер РНС.

## Обсуждение

В процессе нормально протекающей беременности иммунная система плода и иммунная система матери находятся в состоянии равновесия и иммунологической толерантности. «Иммунологическая провокация» со стороны плода по отношению к материнскому организму может привести к преждевременным родам. В связи с чем, в норме иммунный ответ новорожденных смещен в сторону противовоспалительного Th2-ответа.



При реализации РНС инфицирование плода бактериальными патогенами чаще всего происходит антенатально восходящим путем вследствие проникновения микроорганизмов из цервикального канала с последующим развитием хориоамнионита, а также при внутриутробном заглатывании амниотической жидкости или в результате аспирации инфицированных околоплодных вод во время родов [14]. Наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов приводит к стимуляции иммунокомпетентных клеток, и клеток буккального эпителия, что влечет за собой изменение уровня экспрессии ряда молекул данными клетками. Взаимодействие структур микроорганизмов с паттерн-распознающими рецепторами, прежде всего толл-подобными рецепторами (TLR-2, TLR-4) на поверхности дендритных клеток, макрофагов, эпителиальных клеток приводит к изменению синтеза TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 [15, 16]. Преобразование транскрипционной активности одних клеток приводит к направленной миграции других и, как следствие, к изменению локального клеточного состава. Все эти события предшествуют развитию РНС и происходят в процессе антенатального или интранатального инфицирования плода.

Отличительной чертой иммунной системы недоношенных новорожденных является малочисленный пул моноцитов и нейтрофилов, который не способен бороться в полной мере с патогенными микроорганизмами, по сравнению с детьми, рожденными в срок [17]. Индуцированные мононуклеары новорожденных по сравнению со взрослыми людьми секретируют заметно меньше провоспалительных Th1-поляризационных цитокинов (TNF- $\alpha$ , интерферон (IFN)- $\gamma$  и субъединицы p70 IL-12), в то время как секреция IL-6, цитокина с противовоспалительными и Th2-поляризующими свойствами, у них значительно выше [18, 19]. Достоверное увеличение экспрессии транскрипционного фактора GATA3 в клетках ВК, ответственного за дифференцировку наивных Th-лимфоцитов в сторону Th2-

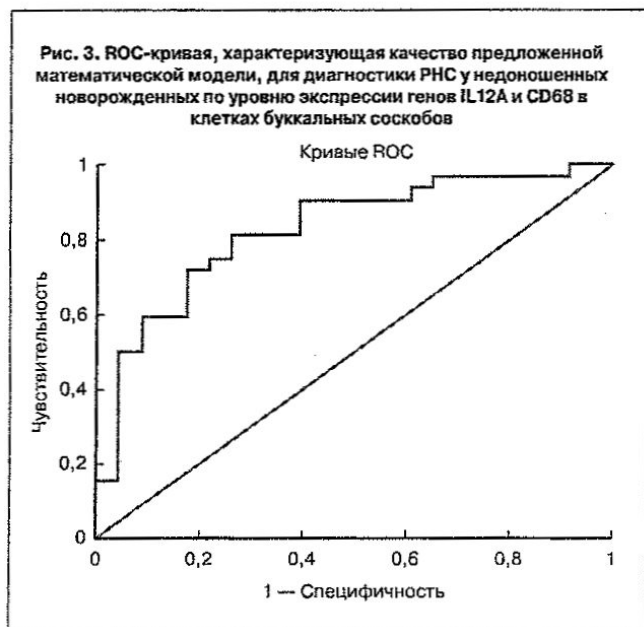
клеток в группе недоношенных детей с признаками врожденной инфекции свидетельствует о смещении иммунологического ответа в сторону противовоспалительного, что вероятно связано с поддержанием состояния иммунологического равновесия во внутриутробной среде.

Показано, что врожденный иммунитет недоношенных детей при внутриутробном инфицировании развивается быстрее по сравнению с неинфицированными детьми, при этом выявлено истощение пула моноцитов при активации механизмов иммунной защиты новорожденных, подвергавшихся внутриутробному воздействию патогенов [20]. На этом фоне первостепенное значение для защиты новорожденных от инфекции принадлежит факторам врожденного иммунитета, среди которых наиболее значимыми являются фагоциты, способные быстро мигрировать к месту инвазии патогена, распознавать его и обезвреживать за счет действия бактерицидных ферментов и небелковых молекул [21].

Проведенное исследование показало, что как в клетках ВК, так и в клетках БС в группе недоношенных детей, развивших РНС после рождения, имеется общая тенденция к снижению экспрессии мРНК генов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, IL1B, IL8 и TNFA по сравнению с группой новорожденных с дыхательными нарушениями неинфекционной природы. Данные результаты могут свидетельствовать либо о врожденной недостаточности иммунной системы таких детей, либо являются следствием истощения компонентов системы врожденного иммунитета вследствие внутриутробного течения инфекции.

В результате анализа транскриптов в клетках БС в группе детей с признаками РНС нами получено достоверное снижение экспрессии мРНК IL12A в 2 раза по сравнению с группой детей с дыхательной патологией неинфекционного генеза. Похожая картина описана для слизистой влагаллица при вагинитах, ассоциированных с чрезмерным ростом условно-патогенных микроорганизмов, что свидетельствует о единых механизмах мукозального иммунитета. На большой выборке пациенток было показано снижение представленности транскриптов IL12A и IL18 в клетках соскобов слизистой влагаллица [20]. Основными клетками-продуцентами IL12 являются моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, активированные лимфоциты. Возможно, снижение количества транскрипта IL12A в клетках БС недоношенных новорожденных с РНС связано с миграцией антиген презентующих клеток в региональные лимфоузлы для презентации антигенов Т-лимфоцитам.

Таким образом, транскрипционный профиль клеток слизистой ротовой полости может служить дополнительным критерием дифференциальной диагностики РНС. Предложенный способ основан на измерении экспрессии генов в клетках БС новорожденных и имеет ряд преимуществ перед традиционно применяемыми диагностическими методиками, а именно: неинвазивность процедуры получения биологического материала, быстрота выполнения исследования (около 4 ч от момента



поступления образца в лабораторию до получения результатов). Очевидны и возможные перспективы широкого использования данного подхода в будущем для диагностики и оценки эффективности проводимой терапии у новорожденных.

### Заключение

Течение РНС у недоношенных детей сопровождается общим состоянием иммуносупрессии, которое проявляется в изменении экспрессии генов IL12A в клетках буккального эпителия и TNFA и GATA3 в ВК. Оценка профиля экспрессии генов врожденного иммунитета в клетках БС является информативным и неинвазивным методом диагностики РНС у недоношенных новорожденных. В ходе проведенного исследования создана математическая модель, позволяющая на основании определения уровня экспрессии генов-кандидатов IL12A и CD68 в клетках БС недоношенных детей, с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать РНС. Необходимо проведение дальнейших исследований на большой выборке новорожденных с целью совершенствования предложенной диагностической методики. Применение в клинической практике данных молекулярных биомаркеров позволит валидировать их использование для улучшения результатов диагностики и лечения РНС. В эру персонализированной медицины биомаркеры могут также служить ключевым инструментом для индивидуального подбора и контроля эффективности терапии у новорожденных с клиникой РНС, находящихся в критическом состоянии.

По результатам проведенного исследования в «Федеральный институт промышленной собственности» (ФИПС) подана заявка на изобретение «Способ диагностики раннего неонатального сепсиса у новорожденных первых суток жизни по профилю экспрессии мРНК в клетках буккального соскоба» (регистрационный №2016115704).

### Литература/References

- Chen Y., Li G., Ruan Y., Zou L., Wang X., Zhang W. An epidemiological survey on low birth weight infants in China and analysis of outcomes of full-term low birth weight infants. BMC Pregnancy Childbirth. 2013; 13: 242.
- Иванова И.Е. Физическое развитие недоношенных детей. Здравоохранение Чувашии. 2014; 1: 52-60. [Ivanova I.E. The physical development of premature infants. Zdravoohranenie Chuvashii. 2014; 1: 52-60. (in Russian)]
- Huang F.K., Chen H.L., Yang P.H., Lin H.C. Bird's eye view of a neonatologist: clinical approach to emergency neonatal infection. Pediatr. Neonatol. 2016; 57(3): 167-73.
- Wang X., Wang X., Liu X., Wang X., Xu J., Hou S. et al. MiR-15a/16 are upregulated in the serum of neonatal sepsis patients and inhibit the LPS-induced inflammatory pathway. Int. J. Clin. Exp. Med. 2015; 8(4): 5683-90.
- Kim S.M., Romero R., Lee J., Chaensathong P., Docheva N., Yoon B.H. Gastric fluid-versus amniotic fluid analysis for the identification of intra-amniotic infection due to Ureaplasma species. J. Matern. Fetal Neonatal Med. 2016; 29(16): 2579-87. doi: 10.3109/14767058.2015.1098614
- DiGiulio D.B. Diversity of microbes in amniotic fluid. Semin. Fetal Neonatal Med. 2012; 17(1): -11. doi: 10.1016/j.siny.2011.10.001.
- Голубцова Ю.М., Дегтярев Д.Н. Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению раннего неонатального сепсиса. Неонатология: новости, мнения, обучение. 2014; 2: 15-25. [Golubtsova Yu.M., Degtyarev D.N. Current approaches to prevention, diagnosis and treatment of early neonatal sepsis. Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie. 2014; 2: 15-25. (in Russian)]
- Ионов О.В., Никитина И.В., Зубков В.В., Митрохин С.Д., Крохина К.Н., Киртбая А.Р., Левадная А.В., Любасовская Л.А., Рюмина И.И., Дегтярев Д.Н., Крючко Д.С. Порядок обследования новорожденных с подозрением на инфекционную патологию и правила назначения антибактериальной терапии, принятые в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Минздрава России. Неонатология: новости, мнения, обучение. 2014; 1: 95-106. [Ionov O.V., Nikitina I.V., Zubkov V.V., Mitrohin S.D., Krohina K.N., Kirtbaya A.R., Levadnaya A.V., Lyubasovskaya L.A., Rymina I.I., Degtyarev D.N., Kryuchko D.S. For further evaluation of newborns with suspected infectious pathology and assignment rules antibiotic therapy taken in intensive care unit newborns of Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie. 2014; 1: 95-106. (in Russian)]
- Хаертыинов Х.С., Анохин В.А., Бойчук С.В. Патофизиология неонатального сепсиса. Вестник современной клинической медицины. 2014; 7(6): 97-104. [Haertyinov H.S., Anohin V.A., Boychuk S.V. Pathophysiology of neonatal sepsis. Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny. 2014; 7(6): 97-104. (in Russian)]
- Baltimore R.S. Consequences of prophylaxis for group B Streptococcal infections of the neonate. Semin. Perinatol. 2007; 31: 33-8.
- Мороз В.В., Голубев А.М., Кузовлев А.Н., Писарев В.М. Новые диагностические кандидатные молекулярные биомаркеры острого респираторного дистресс-синдрома. Общая реаниматология. 2014; 10(4): 6-10. [Moroz V.V., Golubev A.M., Kuzovlev A.N., Pisarev V.M. New diagnostic Candidate molecular biomarkers of acute respiratory distress syndrome. Obshchaya reanimatologiya. 2014; 10(4): 6-10. (in Russian)]
- Беневоленский Д.С. Биомаркеры в диагностике неотложных состояний. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 9: 36-7. [Benevolenskiy D.S. Biomarkers in the diagnosis of emergency conditions. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2012; 9: 36-7. (in Russian)]
- Павлушкина Л.В., Черневская Е.А., Дмитриева И.Б., Белобородова Н.В. Биомаркеры в клинической практике. Лабораторная диагностика. 2013; 3: 10-4. [Pavlushkina L.V., Chernevskaya E.A., Dmitrieva I.B., Beloborodova N.V. Biomarkers in Clinical Practice. Laboratornaya diagnostika. 2013; 3: 10-4. (in Russian)]
- Groer M.W., Gregory K.E., Louis-Jacques A., Thibeau S., Walker W.A. The very low birth weight infant microbiome and childhood health. Birth Defects Res. C Embryo Today. 2015; 105(4): 252-64.
- Долгушина В.Ф., Долгушин И.И., Телешова Л.Ф. Местный иммунитет половой системы у беременных с генитальной инфекцией. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2000; 2: 92-5. [Dolgushina V.F., Dolgushin I.I., Teleshova L.F. Local immunity of the reproductive system in women with genital infection. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2000; 2: 92-5. (in Russian)]
- Medzhitov R., Janeway C.A. Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 1997; 91(3): 295-8.
- Melville J.M., Mass T.J.M. The immune consequences of preterm birth. Front. Neurosci. 2013; 7: 79.
- McAdams R.M., Juul S.E. The role of cytokines and inflammatory cells in perinatal brain injury. Neurol. Res. Int. 2012; 2012: ID 561494.
- Wynn J.L., Levy O. Role of innate host defenses in susceptibility to early onset neonatal sepsis. Clin. Perinatol. 2010; 37(2): 307-37.
- Сулах Г.Т., Трофимов Д.Ю., Бурменская О.В., Байрамова Г.Р., Непша О.С., Донников А.Е., Дуринян Э.Р., Бирюкова А.М. Профиль экспрес-

сии мРНК генов цитокинов в вагинальных мазках женщин репродуктивного возраста при неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе. *Акушерство и гинекология*. 2011; 7-2: 33-8. [Sukhikh G.T., Trofimov D.Yu., Burmenskaya O.V., Baimarova G.R., Nepsha O.S., Donnikov A.E., Durinyan E.R., Biryukova A.M. Cytokine mRNA gene expression profile in the vaginal smears of reproductive- age women with nonspecific vaginitis and bacterial vaginosis. *Akusherstvo i ginekologiya/ Obstetrics and Gynecology*. 2011; 7-2: 33-8. (in Russian)]

21. *Беляева А.С., Балашова Е.Н., Вацько Л.В., Матвеева Н.К., Милая О.В., Кречетова Л.В., Ионов О.В., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н.* Фенотипическая и функциональная характеристика фагоцитарных клеток в крови недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде.

*Акушерство и гинекология*. 2014; 10: 59-65. [Belyaeva A.S., Balashova E.N., Vanko L.V., Matveeva N.K., Milaya O.V., Krechetova L.V., Ionov O.V., Zubkov V.V., Degtyarev D.N. The phenotypic and functional characteristics of phagocytes in the blood of premature infants in the early neonatal period. *Akusherstvo i ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2014; 10: 59-65. (in Russian)]

Поступила 26.08.2016

Принята в печать 02.09.2016

Received 26.08.2016

Accepted 02.09.2016

**Сведения об авторах:**

*Никитина Ирина Владимировна*, к.м.н., врач отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных отдела неонатологии и педиатрии, ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: i\_nikitina@oparina4.ru  
*Непша Оксана Сергеевна*, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: nepshonok@yandex.ru  
*Донников Андрей Евгеньевич*, к.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: a\_donnikov@oparina4.ru  
*Трофимов Дмитрий Юрьевич*, профессор, д.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических методов ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-13-41. E-mail: d\_trofimov@oparina4.ru  
*Милая Ольга Владимировна*, аспирант отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных отдела неонатологии и педиатрии ФГБУ НЦАГиП им. В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-76-56. E-mail: o\_milaya@oparina4.ru  
*Дегтярева Анна Владимировна*, д.м.н., руководитель научно-консультативного педиатрического отделения ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-26-00. E-mail: a\_degtyareva@oparina4.ru  
*Ионов Олег Вадимович*, к.м.н., зав. отделением реанимации и интенсивной терапии новорожденных отдела неонатологии и педиатрии ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-22-77. E-mail: o\_ionov@oparina4.ru  
*Зубков Виктор Васильевич*, д.м.н., зав. отделом неонатологии и педиатрии ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-22-66. E-mail: victor.zubkov@mail.ru  
*Дегтярев Дмитрий Николаевич*, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-23-88. E-mail: d\_degtyarev@oparina4.ru

**About the authors:**

*Nikitina Irina V.*, Ph.D., doctor of the intensive care department of neonatology and pediatrics, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954382277. E-mail: i\_nikitina@oparina4.ru  
*Nepsha Oksana S.*, Ph.D., research scientist of the Laboratory of Molecular-genetic methods, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +79257805767. E-mail: nepshonok@yandex.ru  
*Donnikov Andrey E.*, Ph.D., Senior Researcher of the Laboratory Of Molecular-genetic Methods, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. E-mail: a\_donnikov@oparina4.ru  
*Trophimov Dmitrii Yurievich*, Ph.D., The Head of molecular-genetical laboratory, Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954381341. E-mail: d\_trofimov@oparina4.ru  
*Milaya Olga Vladimirovna*, graduate student, Resuscitation and Neonatal Intensive Care, Department of Neonatology and Pediatrics, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954387656. E-mail: o\_milaya@oparina4.ru  
*Degtyareva Anna V.*, MD, Head of the Scientific Advisory Pediatrics Division of Neonatology and Pediatrics, Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954382600. E-mail: a\_degtyareva@oparina4.ru  
*Ionov Oleg V.*, Ph.D., Head of the intensive care department of neonatology and pediatrics, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954382277. E-mail: o\_ionov@oparina4.ru  
*Zubkov Victor V.*, MD, PhD, Head of department of neonatology and pediatrics, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954382266. E-mail: victor.zubkov@mail.ru  
*Degtyarev Dmitriy N.*, MD, PhD, Deputy Director on scientific work, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954382277. E-mail: d\_degtyarev@oparina4.ru