

На правах рукописи

АЛИЕВА АМИНАТ ИСАГАЕВНА

**ДИАГНОСТИКА НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ:
КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

03.02.03 – микробиология

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет»
Минздрава России

Научные консультанты:

доктор биологических наук, доцент

Омарова Салидат Магомедовна

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук

Свитич Оксана Анатольевна

Официальные оппоненты:

Митрохин Сергей Дмитриевич доктор медицинских наук, профессор, ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, лаборатория биологии бифидобактерий, главный научный сотрудник;

Козлов Иван Генрихович доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Роспотребнадзора, лаборатория экспериментальной и клинической фармакологии, заведующий лабораторией

Федоскова Татьяна Германовна - доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ "Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА, лаборатория молекулярных механизмов аллергии, заведующая лабораторией

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.040.08, созданного на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Перинатальная патология стоит на первом месте в структуре младенческой заболеваемости и смертности в России (Н.Н. Володин, 2008; А.С. Лихачева, 2012; Е.Н.Байбарина, 2017). Неонатальные пневмонии (НП) являются одними из наиболее тяжелых проявлений перинатальной патологии (Л.Н.Журавлева, 2018). В соответствии с официальными статистическими данными частота заболеваемости пневмонией составляет около 1% среди доношенных и около 10% среди недоношенных детей, и достигает до 40% у новорожденных, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии, при различных видах респираторной патологии (Клинические рекомендации Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины «Врожденная пневмония» Минздрава РФ, 2016 год).

Внутриутробная пневмония (ВУП) – воспаление легких, сформировавшееся в процессе пренатального развития плода или развившееся в течение первых 72 часов после рождения, при котором поражение респираторного тракта оказывается ведущей формой заболевания или частью генерализованного остроинфекционного процесса (Н.Н. Володин, 2010). Вместе с тем, при установлении диагноза пневмония у ребенка в возрасте двух и более суток, находящегося в условиях родовспомогательного учреждения, достаточно непросто провести дифференциальную диагностику между внутриутробной и ранней неонатальной пневмониями (РНП), так как, клиническая картина очень часто не содержит оригинальных отличий (ВОЗ. Информационный бюллетень № 331, 2016). В этиологическом и эпидемиологическом плане ВУП и РНП имеют отличительные особенности соответственно популяции, к которой относится новорожденный, установок родильного стационара, особенностей перинатального периода, гестационного возраста и др. (Н.Н. Володин, 2008; Д.Н. Дегтярев, 2018). По данным клинических рекомендаций «Врожденная пневмония» Минздрава РФ (2017) рекомендовано использовать более емкий термин «неонатальная пневмония», сочетающий врожденные (внутриутробные), аспирационные и приобретенные, включая нозокомиальные пневмонии новорожденных. По данным литературы известно, что неонатальная пневмония является полиэтиологическим заболеванием, вызываемым множеством факторов. Показано, что микробиологические факторы являются одними и основных в этиологической структуре пневмоний. Если в конце прошлого столетия в этиологии неонатальных пневмоний преобладала грамположительная микрофлора, главным образом стафилококки и стрептококки группы В, то в последние десятилетия возросла значимость грамотрицательных бактерий (*Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Proteus* и т.д.) (Н.Н.Володин, 2008; Л.И. Кафарская, 2014; А.А. Баранов, 2018).

Также дискуссионными остаются вопросы специфичности этиопатогенов, клинического течения и дифференциальной диагностики неонатальных пневмоний (А.И.Сафина, 2017). Предрасположенность к развитию инфекционных осложнений у новорожденных может быть связана не только с наличием и с особенностями патогена, но и с состоянием иммунитета. В последние годы активно исследуются факторы врожденного иммунитета, в частности распознающие рецепторы. Большое значение в распознавании патогенов отводят Toll-подобным рецепторам (TLRs). Экспрессионный профиль рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек может свидетельствовать о функциональной активности врожденного мукозального иммунитета (Л.В. Ганковская, 2007; А.В. Караулов, С.С. Афанасьев, 2017). До настоящего времени остаются малоизученными вопросы о роли факторов врождённого иммунитета в развитии неонатальных пневмоний.

Следует отметить, что в последнее время нередко регистрируются неонатальные пневмонии с исключительно тяжелым течением, основным этиологическим фактором которых являются антибиотикорезистентные бактерии, осложняющие проведение этиотропной терапии (А. В. Дехнич, 2014; J. Courtier, 2015; С.Т. Нуржанова, 2015). В настоящее время, вопреки проводимой антибактериальной терапии, все еще остаются высокими показатели смертности среди новорожденных (Д.Н. Дегтярев, 2018). На сегодняшний день актуальным является поиск новых микробиологических и иммунологических маркеров, ассоциированных с риском развития неонатальных пневмоний с целью оптимизации профилактических и терапевтических мероприятий (В.В. Викторов, 2013).

Степень разработанности темы исследования

Неонатальным пневмониям посвящено значительное количество научных работ. Пневмония является одной из наиболее частых причин заболеваемости и смертности новорождённых, она остаётся сложным заболеванием для ранней диагностики и лечения. Клинические проявления неспецифичны из-за сочетания респираторных и гемодинамических признаков в совокупности с признаками незрелости бронхо-легочной системы, рентгенографические и лабораторные данные имеют ограниченную диагностическую ценность. Попытки идентифицировать микроорганизмы, ответственные за развитие воспалительного процесса в легких новорожденного, часто являются нерезультативными из-за множества причин.

При верификации диагноза «пневмония» использованы: классификация пневмоний у новорожденных К.А. Сотниковой и соавторов (1975), а также классификация Н.А. Геппе с соавт. (2009) которые внесли большой вклад в решение проблемы пневмоний у

новорожденных, что привело к существенному снижению неонатальной смертности. Проведенные исследования показали, что существующие критерии диагностики используются только в 30-40% случаев при постановке диагноза. Существующие критерии не пересматривались более 10 лет, а, с учетом внедрения новых диагностических методов, возникает необходимость их уточнения. На сегодняшний день актуальным является поиск новых микробиологических и иммунологических маркеров, ассоциированных с риском развития неонатальных пневмоний с целью оптимизации профилактических мероприятий. Существенный вклад в изучение данной проблемы внесли ученые с мировыми именами С.С. Афанасьев; Н.Н. Володин; В.В. Викторов; Л.В. Ганковская; Н.А. Геппе; Л.Н. Журавлева; В.В. Зверев; А.В. Караулов, Л.В. Ковальчук, О.А. Свитич, Barnett E.D., Duke T, Chen C.H. их работы в значительной мере способствовали изучению проблемы диагностики, лечения и профилактики неонатальных пневмоний.

Вопрос о действии микроорганизмов, возбудителей НП за счет факторов патогенности на организм новорожденного и влиянии на показатели врожденного иммунитета, проблемы диагностики и антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний являются малоизученными направлениями современной медицинской микробиологии (WHO / CDS/ CSR / DRS / 2001.2. (Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам); Т. В. Бирюкова, 2015; С.Т. Нуржанова 2015; О.А.Свитич, 2016, 2017, 2018)).

Дальнейший поиск и внедрение в клиническую практику точных, высокоспецифичных, доступных в стационарах, высокоинформативных и прогностически значимых методов диагностики, обладающих возможностью на доклинической стадии выявить вероятный риск развития пневмоний у новорожденных, остается на сегодняшний день открытым (WHO. Информационный бюллетень, 2018)

Цель исследования: провести комплексное микробиологическое и иммунологическое исследование неонатальных пневмоний и разработать на основе полученных данных прогностические и диагностические критерии развития внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний.

Задачи исследования:

1. Изучить клинико-рентгенологические факторы риска развития пневмоний у новорожденных.
2. Определить особенности видового состава микроорганизмов – возбудителей неонатальных пневмоний, а также их разновидностей (ВУП и РНП).

3. Провести оценку резистентности возбудителей к антибактериальным препаратам у новорожденных с неонатальными пневмониями и исследовать роль резистентных штаммов в развитии патологии.
4. Изучить экспрессионный профиль факторов врожденного иммунитета (TLRs, цитокинов, противомикробных пептидов и др.) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробной пневмонии и ранней неонатальной пневмонии.
5. Определить ассоциацию полиморфных маркеров, локализованных в генах *TLR2*, *TLR4*, *DEFB1*, *IL10*, *IL17*, *TNFA* с риском развития неонатальных пневмоний.
6. На основании микробиологических и иммунологических результатов разработать новые диагностические и прогностические маркеры развития внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний у новорожденных.

Научная новизна

Впервые в Республике Дагестан проведено комплексное научное изучение эффективных методов диагностики неонатальных пневмоний. На основании клинико-микробиологических и иммунологических исследований впервые получены новые данные по современной этиологической структуре, факторам врожденного иммунитета, особенностям клинического течения неонатальных пневмоний и антибиотикорезистентности выделенных штаммов микроорганизмов, с учетом которой была обоснована стратегия адекватной антибактериальной терапии.

Впервые определены доминирующие виды условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и выявлена их роль в возникновении пневмоний у новорожденных. Установлено, что среди основных возбудителей ВУП превалируют микроорганизмы семейства *Staphylococcus* (*S. epidermidis*) -15,5 %, а РНП лидируют микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*) - 19,7 и 17,1% соответственно.

Учитывая генотипические особенности и различия в формировании устойчивости к антибактериальным химиопрепаратам у штаммов, доминирующих в структуре неонатальных пневмоний, предложены рекомендации по коррекции стандартов лечения и организации микробиологического мониторинга в родильных стационарах.

Впервые проведен биоинформационный анализ, позволяющий выявить основные потенциальные факторы врожденного и адаптивного иммунитета, которые могут играть большую роль в патогенезе пневмонии новорожденных. Определен дисбаланс факторов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у новорожденных с неонатальной пневмонией. Выявлены генетические маркеры в генах *IL-17*, *IL10*, *DEFB1*, *TLR4*, ассоциированные с риском развития неонатальных пневмоний. Впервые

выявлено достоверное увеличение корреляционных взаимодействий между микробиологическими и иммунологическими показателями у новорожденных с неонатальными пневмониями. Получены новые региональные данные о высокой информативности иммунных показателей в качестве маркеров развития пневмоний у новорожденных.

Теоретическая и практическая значимость

Материалы диссертационной работы вносят вклад в изучение проблемы неонатальных пневмоний и расширяют представление об этиологии НП, в частности, о влиянии микробного фактора на клиническое течение и исход заболевания. В практическом плане установлено, что для микробиологической диагностики НП у новорожденных в качестве исследуемого материала целесообразно использовать трахеобронхиальный аспират (ТБА), а также мазки из зева, пуповинную кровь. Разработаны основные критерии оценки этиологической значимости УПМ, выделенных из дыхательных путей. Научно обоснована роль факторов патогенности возбудителей неонатальных пневмоний на организм новорожденного и их влияние на показатели врожденного иммунитета.

Высокая специфичность, прогностическая ценность и прямая корреляция с инфекционным возбудителем НП с тяжестью течения, позволяет предположить, что непосредственно возбудитель за счет действия факторов патогенности влияет на показатели врожденного иммунитета. Зафиксированные при ВУП и РНП общие закономерности и кардинальные отличия в микробиологических и иммунологических показателях, сопряженные с тяжестью течения неонатальных пневмоний, дополняют представления о механизмах формирования врожденного иммунитета. Снижение экспрессии генов TLR2, TLR4 и увеличение экспрессии генов TNF α и NF-kB в дебюте неонатальных пневмоний являются важными прогностическими факторами неблагоприятного течения и дополнительными предикторами развития НП.

Найдена ассоциация полиморфных маркеров в генах *IL-17*, *DEFB1*, *TLR4* с риском развития внутриутробного инфицирования плода. Показано, что генотип AG (ген *IL10* -1082 A>G) и GG (TNF α -308 G>A) ассоциированы с риском развития неонатальных пневмоний. Разработан алгоритм диагностики неонатальных пневмоний.

В результате работы разработан алгоритм диагностики неонатальных пневмоний на основе комплекса клинико-рентгенологических, микробиологических и иммунологических данных, которые в перспективе позволят выбрать и оптимизировать адекватную и рациональную этиотропную терапию.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Выявлены клинико-микробиологические предикторы развития внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний. Риск развития ВУП ассоциирован микроорганизмами семейства *Staphylococcus* (*S.epidermidis*). а РНП - ассоциирован микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*), безводным периодом более 24 часов и асфиксией новорожденных.
2. Проведена оценка антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний, которая показала, что между заболеваемостью новорожденных неонатальными пневмониями и резистентностью к антибактериальным препаратам имеется умеренная положительная связь, что свидетельствует о возможности формирования в ОРИТН «госпитальных» штаммов, которые и вызывают данные инфекционные осложнения.
3. У новорожденных с пневмониями определен дисбаланс в факторах врожденного иммунитета на уровне эпителиальных клеток верхних дыхательных путей: значительное снижение экспрессии рецепторов TLR2 и TLR4 на фоне высокого экспрессионного уровня эффекторных молекул.
4. Скрининг полиморфизмов в генах *TLRs*, цитокинов и *DEFB1* у родильниц и у новорожденных обладает высокой прогностической ценностью и позволяет оценить риск развития неонатальных пневмоний, и потенциально может быть использован для дифференциальной диагностики пневмоний у новорожденных.

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована, исходя из современных принципов научного познания (И.Н. Кузнецов, 2006). Методология организована адекватно поставленной цели. Предметом исследования стали проблемы, связанные с диагностикой неонатальных пневмоний.

Основными объектами исследования являлись биоматериал от новорожденных (пупочная кровь, трахеобронхиальный аспират, мазки с зева), смывы с медицинского оборудования (контуры ИВЛ). В работе применялись следующие методы исследования: бактериологические, иммунологические, молекулярно-генетические; метод иммерсионной микроскопии. Результаты анализировались при помощи статистических методов.

Использованные аппараты и оборудование: ламинарные шкафы, лабораторная посуда, холодильники, термостаты, сухожаровые шкафы, автоклавы, амплификатор для ПЦР-РВ ДТ96 (ДНК-технология, РФ), световые микроскопы, дозаторы пипеточные автоматические и другие устройства и инструменты.

Использованные реактивы: питательные среды для культивирования микроорганизмов, красители, антикоагулянты, микротестсистемы для биохимической идентификации

возбудителей, наборы «РИБОсорб» (ИЛС, РФ), «ОТ-1» (Синтол, РФ), HotStart Taq DNA Polymerase (Синтол, РФ) и др. Использованные информационные средства: программные пакеты Statistica, международные компьютерные базы данных и информационные научные ресурсы (PubMed, Science Direct, Scirus и другие).

Степень достоверности и апробация работы

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью, объективностью, а также поддерживаются программным обеспечением, позволяющим проводить статистический анализ больших массивов данных. Использование указанных методов, а также корректной статистической обработки позволило количественно оценить степень КОЕ/мл выделенных микроорганизмов, выделить и идентифицировать культуры микроорганизмов.

Диссертация апробировалась на заседании кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России 11 октября 2017 года (протокол № 5).

Основные положения работы доложены и апробированы на следующих научных форумах: IV международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований», Москва, 2014; IV международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные науки сегодня», North Charleston, USA, 2014; на International scientific conference Science, Technology And Life – 2014, Czech Republic, Karlovy Vary, 2015; Всероссийской научно-практической конференции «Новые методы экспресс диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии», Санкт-Петербург, 2015; I междисциплинарной конференции «Научно-практическая ревматология. Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания», Москва, 2016; IV Всероссийской научно-практической конференции «Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии», Махачкала, 2017.

Личный вклад автора

Участие автора заключалось в выборе темы диссертации, формулировке цели и задач, разработке критериев включения/не включения пациентов в исследование, в анализе медицинской и статистической документации (истории родов, истории развития новорожденных) по заболеваемости неонатальными пневмониями в республике Дагестан, в комплексном клинико-лабораторном обследовании новорожденных, сборе материала.

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, статистическая обработка полученных результатов, разработка алгоритма дифференциальной диагностики неонатальных пневмоний на основе клинико-

рентгенологических, микробиологических, иммунологических и генетических данных и написание диссертации выполнено лично автором.

Изучение выделенной микробиоты осуществлялось на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ и в лаборатории «Клиническая микробиология» ООО НПП «Питательные среды» г. Махачкала. Иммунологические исследования были выполнены в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва. Личный вклад автора составляет 85%. Вклад коллег отражен в соавторстве в ряде работ, опубликованных в периодических научных изданиях.

Внедрения результатов исследования

Значение полученных результатов исследования для практики подтверждается тем, что получена приоритетная справка на изобретение Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам (Роспатент) о государственной регистрации «Способ диагностики неонатальных пневмоний смешанной этиологии» № 2016150053/15 (080352) от 19.02.2016. Разработан и внедрен «Способ прогнозирования неонатальных пневмоний» (№ заявки 2017133564/15(059224) от 28.05.2018.

По результатам исследования получены акты внедрения в практику родильного дома ГБУ РД РКБ г. Махачкала и ООО НПП «Питательные среды». Материалы диссертации внедрены в учебный процесс, используются в лекциях и на практических занятиях при обучении студентов и врачей-бактериологов, на курсах последипломного образования кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа «Диагностика неонатальных пневмоний: Клинико-микробиологические и иммунологические аспекты» соответствует формуле научных специальностей: 03.02.03 — «Микробиология» со следующими областями исследований указанной специальности по пунктам: 2 - выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; 3 - морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов и 14.03.09 — «Клиническая иммунология, аллергология» со следующими областями исследований этой специальности: изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний (иммунодефицитных состояний, аллергической и аутоиммунной патологии) и разработка и

усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов».

Публикации

Результаты проведенного диссертационного исследования в полном объеме изложены в 60 научных работах, опубликованных автором, из которых 17 работ опубликованы в изданиях, включенных в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК Министерства образования Российской Федерации.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 298 страницах машинописного текста и состоит из введения, основного текста (обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследований, и 6 глав собственных исследований), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 37 таблицами и 44 рисунками. Библиографический указатель включает 216 источников литературы, в том числе 122 ссылки на отечественных авторов и 94 ссылки на зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Основная часть работы выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, в лаборатории «Клиническая микробиология» ООО НПП «Питательные среды» г. Махачкала (Договор о сотрудничестве № 5 от 15 декабря 2011г.), в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва (Договор о сотрудничестве и научных исследованиях № 56 от 19 сентября 2012). Биоматериал от новорожденных был получен в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных Родильного дома Республиканской клинической больницы г. Махачкала (заведующий отделением - М.Д. Джанбеков). Клинические наблюдения проведены у 579 пар «родильница-новорожденный». При формировании групп придерживались общепринятой классификации неонатальных пневмоний (Н.Н.Володин, 2009; Н.А.Геппе, 2009; А.А.Баранов, 2015). Первую группу составили 230 новорожденных, у которых была диагностирована внутриутробная пневмония (развитие в первые 72 часа после рождения). Во 2-ю группу включено 246 младенцев с ранней неонатальной пневмонией, поступивших в ОРИТН родильного дома. В контрольную группу включены здоровые новорожденные (103 детей), которые находились с первых суток жизни в отделении физиологии.

Ретроспективно проведен анализ медицинской документации 150 новорожденных детей с респираторными нарушениями, отобранных методом выкопировки в период с 2010 по 2014 годы.

Критерии включения в исследование: - наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании, подписанного родильницей; - верифицированный диагноз ВУП и РНП у новорожденных; наличие дыхательных расстройств с первых часов от рождения до 72 часов; - потребовавших проведение респираторной поддержки; - подтвержденной рентгенологическим исследованием и клиническими проявлениями пневмонии. Критерии исключения из исследования: синдромальная форма множественных врожденных пороков развития. Группу сравнения составили здоровые младенцы из отделения физиологии новорожденных родильного дома. Сроки гестации, в среднем, составили $36,8 \pm 3,36$ нед., с массой при рождении - $2900 \pm 450,5$ г.

Анализ возможных рисков развития НП изучали на основе медицинской документации 325 рожениц, в которой были отражены особенности течения беременности, наличие в период беременности различных соматических и инфекционных заболеваний, в том числе хронических, а также результаты выполненных лабораторных исследований. Особое внимание уделяли наличию в анамнезе инфекций, передающихся половым путем (ИППП), а также положительных анализов на TORCH - инфекции.

У детей с диагнозом «пневмония», находившихся на лечении, в соответствии с соответствующими инструктивными материалами исследовали кровь, ТБА, мазок из зева. Забор материала от новорожденных производили соответственно в 1,3 - 5 и 7 сутки после рождения, посев осуществляли в ближайшие 2 часа после взятия. Всем детям проспективной группы проводили комплексное клинико – рентгенологическое обследование. Материалом для бактериологического и иммунологического исследования послужили образцы крови, трахеобронхиального аспирата и мазки слизистой зева новорожденных, полученных сотрудниками отделения реанимации и интенсивной терапии родильного дома Республиканской клинической больницы г. Махачкала в процессе лечебного процесса и планового обследования.

С целью определения специфичности и чувствительности диагностических критериев пневмонии у новорожденных проведена верификация 450 историй болезни новорожденных детей с диагнозом пневмония, проходивших лечение в ОРИТН Родильного дома № 3 РКБ г. Махачкала. После ликвидации проявлений дыхательной недостаточности, интоксикации, гемодинамических нарушений дети переводились в отделение патологии новорожденных для дальнейшего лечения.

Основные принципы исследования: 1) Ретроспективный анализ медицинской документации (истории болезни родильниц и новорожденных) по единой схеме 2) Максимально приближенные друг к другу сроки проведения микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических исследований, а также определение состояния новорожденного с помощью функциональных методов исследования 3) Все исследования, носившие сравнительный характер, проводились на базе одного лечебного учреждения, для всех групп использовались одни и те же диагностические методы

Специальные методы исследования:

1. Бактериологические исследования проводили общепринятым способом в отношении основных групп микроорганизмов. Выделенные культуры микроорганизмов идентифицировали до вида, для идентификации использовали соответствующие наборы тестов. Исследование трахеобронхиальных аспиратов, крови и мазков со слизистой задней стенки глотки осуществляли стандартным количественным методом на широкий набор питательных сред для выделения аэробных и анаэробных факультативных микроорганизмов. Все бактериальные и грибковые культуры, полученные в аэробных и микроаэрофильных условиях, идентифицировали до рода и вида общепринятыми методами.

2. Иммунологические и молекулярно-генетические методы: выделение РНК и ДНК из биоматериала, постановка реакции обратной транскрипции, проведение ПЦР-РВ в режиме реального времени для определения экспрессии генов врожденного иммунитета, проведение ПЦР-РВ с TaqMan зондами для оценки полиморфных маркеров в генах *TLR2*, *TLR4*, *DEFB1*, *IL10*, *IL17*, *TNFA*.

3. Биоинформационный анализ - аннотации биологических объектов (в частности, белков, клеточных процессов и болезней), а также аннотации функциональных связей между ними, сформированные в результате обработки текстового массива полнотекстовых статей и абстрактов, индексированных в Medline.

4. Статистический анализ - использовали компьютерную статистическую программу BioStat, а также программу Excel. В таблицах и рисунках результаты представлены в виде $X \pm \sigma$. Для сравнения групп данных использовали параметрический критерий Стьюдента (t), а также непараметрические методы статистической обработки данных. В связи с разным числом наблюдений в каждой из групп для оценки статистической достоверности различий экспрессии генов в исследуемых группах использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (С. Гланс, 1999). Для сравнения бинарных данных использовались точный критерий Фишера и χ^2 . Достоверность различий показателей определялась при общепринятом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предикторы развития пневмонии у новорожденных

Для решения задачи по прогнозированию риска развития пневмоний у новорожденных требуется определение информативных критериев. В этой связи на первом этапе исследования нами проведена оценка анамнестических данных родильниц новорожденных с внутриутробными и ранними неонатальными пневмониями с группой сравнения.

Учитывались факторы, указывающие на возможную реализацию инфекционного процесса у ребенка. Анализ анамнестических характеристик родильниц новорожденных с диагнозом ВУП и РНП позволил установить, что факторами риска развития пневмонии у новорожденных является отягощённый акушерско-гинекологический анамнез (ОАГА), отмечавшиеся у родильниц, это: анемия, наличие воспалительных заболеваний женской половой сферы, хроническая фетоплацентарная недостаточность и отслойка плаценты.

Еще один фактор риска – влияние длительности безводного периода более 24 часов. В литературных источниках есть описание этого фактора, как фактор риска развития пневмонии. Данные полученные нами коррелируют с литературными данными. Проведение респираторной поддержки с рождения, сопряженной с асфиксией у новорожденных, приводят к вторичному дефициту сурфактанта и повреждению легких. Следовательно, вполне логично эти данные могут служить предикторами развития неонатальных пневмоний.

Следовательно, прогноз развития пневмонии у новорожденного опосредуется суммарным влиянием таких составляющих, как: ОАГА родильницы, продолжительность безводного периода более 24 часов, асфиксия при рождении новорожденного, эффективность реанимационных мероприятий в течение первых пяти минут жизни, наличие респираторной терапии с рождения.

Изучение клинико-рентгенологических показателей ВУП и РНП

Довольно затруднительно провести дифференциальный диагноз между внутриутробной и ранней неонатальной пневмониями, поскольку клинически специфических отличий не наблюдалось. У большинства новорожденных с первых часов жизни отмечались признаки дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности. Было проведено сравнительное изучение клинико-рентгенологических данных внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний у новорожденных детей (табл.1; рис. 1 а, б).

Таблица 1

Сравнительный анализ клинических показателей при ВУП и РНП

Показатели \ Вид пневмонии	ВУП n=230 (%)	РНП n=246 (%)
Реакция на осмотр: - беспокойный - вялый	27,5 72,5**	66,8 *** 33,2
Температура: - нормальная - гипертермия - гипотермия	92,1 7,9 -	57,7 42,3*** -
Врожденные рефлексы: ослаблены - угнетены	63,6 36,4*	68,3 26,7
Кожные покровы: бледно-розовые - бледные с цианотичным оттенком - акроцианоз - центральный цианоз	52,6 47,4 92,6** -	76,8 23,2 23,5 76,5**
Одышка	96,5***	78,5
ИВЛ	76,8***	-
ЧД: тахипноэ - брадипноэ	89,5* 10,5	68,9 31,1

Примечание - «*» - достоверность различий между группами при $p < 0,05$, «**» - $p < 0,01$, «***» - $p < 0,001$.

Анализ данных показывает, что имеется ряд достоверных клинико-рентгенологических различий внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний. Одышка с участием всей вспомогательной мускулатуры и высокой балльной оценкой дыхательной недостаточности по шкале Даунса с высокой степенью достоверности - 96,5% ($p < 0,001$) преобладали при внутриутробных пневмониях. При них чаще и тахипноэ - 89,5% ($p < 0,05$). Физикальные данные так же отличались. При обеих формах пневмоний чаще прослушивались ослабленное дыхание 10,5% и 31,1% соответственно ($p > 0,05$).

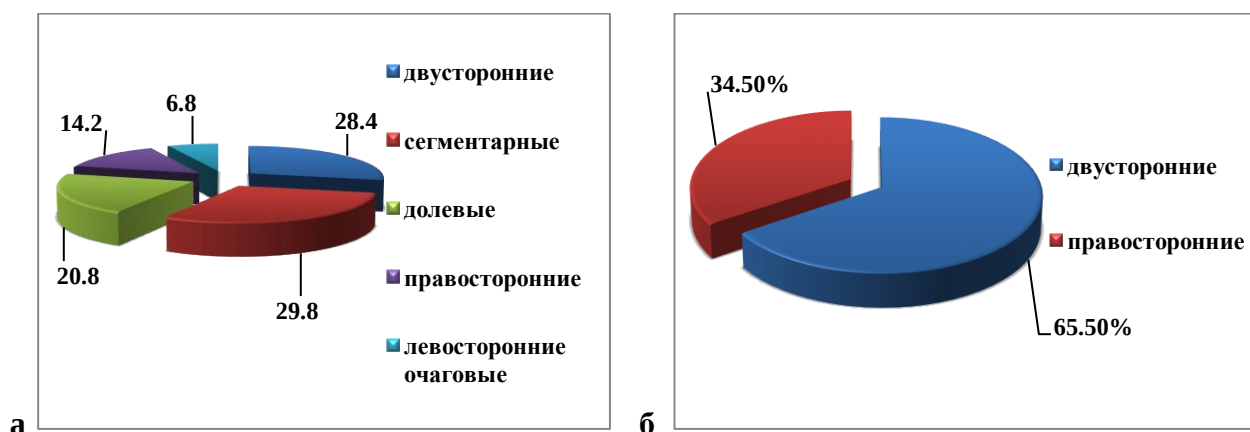


Рисунок 1. Доля воспалительных изменений в легких при ВУП (а), при РНП (б)

И в рентгенологической отмечались обширные воспалительные изменения в легких - сегментарные и двусторонние 29,8% и 28,4% соответственно ($p < 0,001$) типичны для внутриутробных пневмоний (рис. 1а), а для ранних неонатальных – двусторонние в 65,5% и правосторонние очаговые – 34,5% (рис. 1 б) ($p < 0,001$). Данный признак не может быть основным критерием диагностики внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний, так как его чувствительность невысокая, при очень высокой специфичности (В.В. Зубков, 2017).

Роль внутриутробных инфекций в развитии неонатальных пневмоний

Образцы клинического материала от 180 родильниц, выделенные из цервикального канала обследуемых женщин, с диагнозом хроническое ВУИ, были проанализированы на наличие специфических фрагментов ИППП.

У 132 из 180 женщин (73,3%) специфические антитела - Ig G к ЦМВИ суммарно были выявлены во всех группах. Практически у всех обследованных женщин (98%) отмечалась высокая частота вирусно-вирусных, вирусно-бактериальных инфекций. Частота выделения представителей аэробной микрофлоры в мазках со слизистой зева и ТБА у новорожденных высокого инфекционного риска в момент рождения составила от 38,6% (в группе клинически здоровых новорожденных) до 61,4% (у детей с тяжелыми формами ВУИ). Для тяжелых форм ВУИ была характерна высокая частота контаминации новорожденных представителями инфекций, передающихся половым путем: ВПГ-2 — 17,4%, ЦМВИ — 27%, хламидии — 25,8%, микоплазма — 29,8 %. Анализ данных показал, что ДНК изученных инфекций выявлена во всех группах, в том числе у детей без признаков ВУИ. Так, наиболее часто ДНК CMW и HSV выявлялась в группе с ВУИ чаще ($p < 0,001$), чем в других группах, а ДНК *M.pneumoniae* не выявлялась в группах среди новорожденных без ВУИ и контрольной.

Следовательно, инфекции плода и новорожденного формируются под влиянием многих факторов, в том числе и воспалительные заболевания матери, и как следствие, микробная антенатальная и интранатальная колонизация околоплодных вод, плаценты, пуповины плода и соответствующие изменения иммунной системы новорожденного ребенка.

Далее, с целью подтверждения внутриутробного характера развития пневмонии у новорожденных и дифференциации ВУП от РНП, а также для оценки санитарного состояния родильного стационара, нами было проведено санитарно-микробиологическое исследование воздуха, медицинского оборудования и изучено микробное носительство среди медицинского персонала.

Санитарно-микробиологическое исследование микробиоты родильного дома

В серии исследований нами проведена качественная и количественная (подсчет общего количества колониеобразующих единиц (КОЕ)) оценка бактериальной загрязненности воздушной среды родильного дома на присутствие санитарно-показательных

микроорганизмов. Из 128 образцов воздуха 94 образца (73,4%) были положительными. Из них грамположительная кокковая микробиота была выделена в 52 случаях (55,3%). Другие виды патогенов составили 42 (44,6%) положительных результатов. При проведении контроля обсемененности предметов обихода и медицинского оборудования в серии исследований нами было установлено, что в совокупности 94 образца (73,4%) были положительными. Из них коагулазоотрицательная кокковая микробиота была выделена в 52 случаях (55,3%). Другие виды патогенов составили 42 (44,6%) положительных результатов. Из изученных 62 образцов с сухих поверхностей, положительный результат дали 34 (54,8%) посева. С влажных поверхностей частота положительных посевов составила 34, из которых в 19 (55,9%) случаях выделялась грамотрицательная микрофлора, а грамположительная составила 15 (44,1%) случаев. По количеству положительных посевов доминировали *S.epidermidis* (23,5 %). Из 34 положительных находок полученных при исследовании 62 смывов с медицинского оборудования и инвентаря суммарно доминировали грамотрицательные микроорганизмы – 61,7%, тогда как на долю грамположительных микробов приходилось – 38,2% ($p<0,05$).

С целью выявления госпитальной микрофлоры нами было проведено бактериологическое исследование смывов, взятых с различных объектов родильного стационара. В нашем исследовании, по количеству положительных находок доминировали аппарат искусственного дыхания и контуры кислородной маски наркозного аппарата (23,5 и 14,7% соответственно).

С целью выявления носительства *S.aureus* среди медицинского персонала родильного дома было обследовано 29 медицинских работников (врачи, средний и младший медперсонал), которые имели постоянный контакт с новорожденными.

В ходе проведения исследования было установлено, что носительство *S. aureus* наиболее было распространено среди врачей в ОРИТН – 37,5%, в родблоке и в палатах новорожденных этот показатель составил – 25%, в послеродовом отделении – 12,5%.

Можно сделать вывод, что рост удельного веса условно-патогенной микрофлоры в этиологической структуре ранних неонатальных пневмоний напрямую зависит от инфицирования кожи рук медперсонала, обсемененности аппаратуры медицинского назначения, в частности аппарат ИВЛ, которые недостаточно стерилизуются и дезинфицируются.

Анализ результатов бактериологической диагностики неонатальных пневмоний

Как известно, этиологическая структура пневмоний изменчива и зависит от множества макро- и микроэкологических факторов риска, что затрудняет прогноз развития, профилактику, раннюю диагностику, направленное обследование и лечение заболевания.

В работе проведен сравнительный анализ результатов бактериологической диагностики неонатальных пневмоний. При бактериологическом исследовании клинического материала из различных биотопов от новорожденных обеих групп наблюдения отмечался рост как грамположительной, так и грамотрицательной микрофлоры (рис. 2).

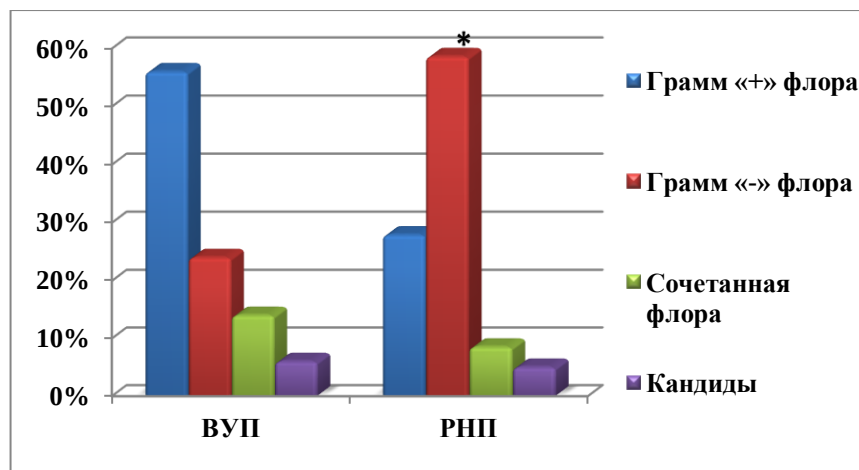


Рисунок 2. Соотношение выделенной микрофлоры из различных биотопов от новорожденных с ВУП и РНП

Примечание - По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – частота высеваемости микроорганизмов, «*» – показатель достоверно отличается от такового в группе РНП относительно группы ВУП, ($p < 0,001$).

Грамположительные микроорганизмы достоверно чаще ($p < 0,05$) высевалась при ВУП (56%). А грамотрицательная микрофлора с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$) чаще отмечалась при РНП (58,6%). В группе новорожденных с ВУП отмечались ассоциации грамположительной и грамотрицательной микрофлоры в равных соотношениях, а в группе РНП – преобладали грамотрицательные микробные ассоциации. Практически идентичны данным бактериологического исследования результаты ПЦР.

Из 230 обследованных новорожденных с ВУП у 213 (87,5%) бактериологический посев был положительным. Были выделены микроорганизмы, представители различных таксономических групп, доминирующим микроорганизмом являлся *S. epidermidis* (26,7%). У 246 обследованных новорожденных с РНП было выделено и идентифицировано 348 штаммов в этиологически значимом количестве. Среди выделенных микроорганизмов по частоте выявления на первом месте - *K. pneumoniae* (27,5%).

На основании вышеизложенного, следует констатировать, что при неонатальных пневмониях в этиологической структуре выявляется как грамположительная, так и грамотрицательная микрофлора. Однако достоверно чаще грамположительная отмечается при внутриутробных пневмониях ($p < 0,001$). А при ранних приобретенных пневмониях с высокой степенью достоверности преобладает грамотрицательная флора ($p < 0,001$).

Выделенные штаммы микроорганизмов обладали определенным набором факторов патогенности.

Анализ резистентности к антибактериальным препаратам возбудителей неонатальных пневмоний

В последние годы в структуре заболеваемости отделения реанимации и интенсивной терапии родильного дома РКБ г. Махачкалы стала отмечаться тенденция к увеличению пневмоний с нарастанием летальности в данной нозологической группе. Так в 2014 году диагноз «Пневмония» был выставлен в 26 (9,6%) случаях, умер 1 (3,8%) новорожденный, а в 2015 году уже 41 (16,7%) и 5 (12,1%) соответственно.

В связи вышеизложенным и с целью накопления информации о региональных особенностях антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний к антимикробным препаратам крайне важной задачей является проведение локального мониторинга.

Нами проведен анализ резистентности основных возбудителей неонатальных пневмоний к антибактериальным препаратам. Было протестировано 654 штамма микроорганизмов, в том числе ведущие этиотропные патогены: *K. pneumoniae* – 187(28,6%); *S. epidermidis* – 172 (26,3%); *E. coli* – 93 (14,2%); *A. baumannii* – 54 (8,2%); *S. haemolyticus* - 48 (7,3%); *Enterococcus spp.* – 38 (5,8%); *P. aeruginosa* – 36 (5,6%); *Enterobacter* – 26 (4%)

Наибольшая резистентность выявлена у возбудителей неонатальных пневмоний к пенициллинам (Оксациллин, Амоксициллин) – 46,2%; фторхинолонам (Ципрофлоксацин, Ломефлоксацин) – 43,4%; аминогликозидам (Гентамицин, Тобрамицин) – 32,9%; цефалоспорином 3-го поколения (Цефиксим, Цефотаксим) – 27,2% и к цефалоспорином 4-го поколения (Цефепим) – 16,8%.

Незначительная устойчивость определялась к цефалоспорином 2-го поколения (Цефуроксим, Цефокситим) – 11%; макролидам (Азитромицин, Кларитромицин) – 8,3%; цефалоспорином 1-го поколения (Цефазолин, Цефтазидим) – 8%, Амоксиклаву – 4,8%, к монобактамам (Азтреонам) - 2,5% и карбапенемам (Меропенем, Имипенем) 1,5%.

Полученные нами данные позволяют рекомендовать для проведения этиотропной терапии цефалоспорины 2-го поколения, или карбапенемы в виде монотерапии. В более тяжелых ситуациях можно рекомендовать комбинации макролидов с монобактамами и амоксиклавам. Таким образом, для проведения этиотропной терапии неонатальных пневмоний имеется достаточный резерв антибактериальных препаратов.

Между заболеваемостью новорожденных неонатальными пневмониями и резистентностью к антибактериальным препаратам имеется умеренная положительная связь

($r_{xy}=0,23$; $p < 0,05$), что свидетельствует о возможности формирования в ОРПТН «госпитальных» штаммов, которые и вызывают данные инфекционные осложнения.

Экспрессионный профиль факторов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей новорожденных с ВУП и РНП

Предрасположенность новорожденных к возникновению инфекционных осложнений может быть обусловлена не только особенностями госпитальных штаммов микроорганизмов, но и состоянием иммунной системы новорожденных детей.

Для успешной борьбы с пневмониями новорожденных требуется знание не только клинико-микробиологических, но и иммунологических особенностей данной патологии. В связи с этим одной из задач данной работы являлось изучение микробиоты и факторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, TNF α и NF- κ B) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и развития ранней неонатальной пневмонии.

Большое значение в распознавании патогенов имеют факторы врожденного иммунитета (Toll-подобные рецепторы, цитокины, противомикробные пептиды) (А.В.Караулов, С.С. Афанасьев, 2017, 2018; Л.В. Ганковская, 2018), которые распознают консервативные области микробов.

Понимание причин пневмонии новорожденных является сложной исследовательской проблемой, поскольку факторы риска и патофизиологические пути заболевания сложны и до сих пор плохо изучены. Не существует единой теории развития пневмонии. Есть много «патологических» путей, которые могут привести к внутриутробной инфекции и/или к развитию РНП. В работе было показано, что 181 ген имеет отношение к пневмонии, и все они вовлечены в активацию иммунной системы и воспалительный ответ. Мы также провели сепарацию генов по количеству библиографических источников и рассматривали в дальнейшей работе только те гены, количество работ, посвященных которым, было более двух. Проанализировав список генов, имеющих отношение к пневмонии новорожденных, мы выделили наиболее подходящие рецепторы распознавания паттернов, как мембранные, цитоплазматические и другие молекулы. При анализе использовали данные представленные в базе данных ResNet (Ariadne ® Expression Targets Pathways). Наиболее важными оказались основные модуляторы воспалительных сигнальных путей, которые активируются бактериальными инфекционными триггерами - TLRs и др. (Yuan TM, 2010; Into T., 2012).

На следующем этапе был проведен анализ обогащения по имеющимся картам канонических сигнальных путей (pathway enrichment analysis), в результате которого были

определены сигнальные пути, регулируемые различными гормонами, цитокинами и пептидными лигандами, в которых эти гены были представлены. Из полученных данных были отобраны сигнальные и регуляторные механизмы с наибольшим представительством генов.

Наиболее релевантными оказались основные модуляторы воспалительных сигнальных путей. Как правило, это опосредованно TLRs и транскрипционным фактором NF- κ B. Относительно пневмонии новорожденных нами были выбраны следующие маркеры: TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, NF- κ B и TNF α , которые впоследствии были изучены с точки зрения экспрессионного профиля. Поскольку эффект активации этих рецепторов осуществлялся через транскрипционный фактор NF- κ B, то его экспрессионный профиль также был интересен в работе. Помимо прочего были выбраны дефенсины, которые играют значительную роль как в качестве лигандов, так и в качестве эффекторной молекулы. Вероятно, они осуществляют дополнительную положительную регуляцию врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек. TLR4, TLR2 и TNF α имели прочную ассоциацию с развитием пневмонии. В целом можно отметить, что используемый нами биоинформационный подход позволили определить круг наиболее значимых сигнальных каскадов, которые активируются при пневмонии новорожденных (рис.3).

Несмотря на важную роль слизистой респираторного тракта в иммунной защите, на данный момент практически отсутствуют работы, посвященные изучению экспрессии факторов врожденного иммунитета в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта новорожденных. В связи с этим было проведено сравнительное исследование экспрессии факторов врожденного иммунитета: TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, NF- κ B и TNF α . В работе проведено исследование экспрессии генов TLR2 и TLR4, участвующих в распознавании большинства бактерий, с которыми “сталкивается” иммунная система в первые дни жизни ребенка. Также провели оценку экспрессии гена транскрипционного фактора NF- κ B, который активирует экспрессию генов эффекторных молекул врожденного иммунитета. Эти факторы, в свою очередь, приводят к развитию воспалительных реакций в ответ на проникновение патогена.

Другие молекулы, исследуемые в работе: цитокин TNF α и противомикробные пептиды HBD-1 и HBD-2. TNF α это противовоспалительный цитокин, который участвует в развитии воспаления при проникновении патогена. HBD-1 и HBD-2 – противомикробные пептиды, которые относятся к дефенсинам, причем HBD-1 экспрессируется конститутивно и его уровень часто генетически-опосредован, а HBD-2 является индуцибельным пептидом.

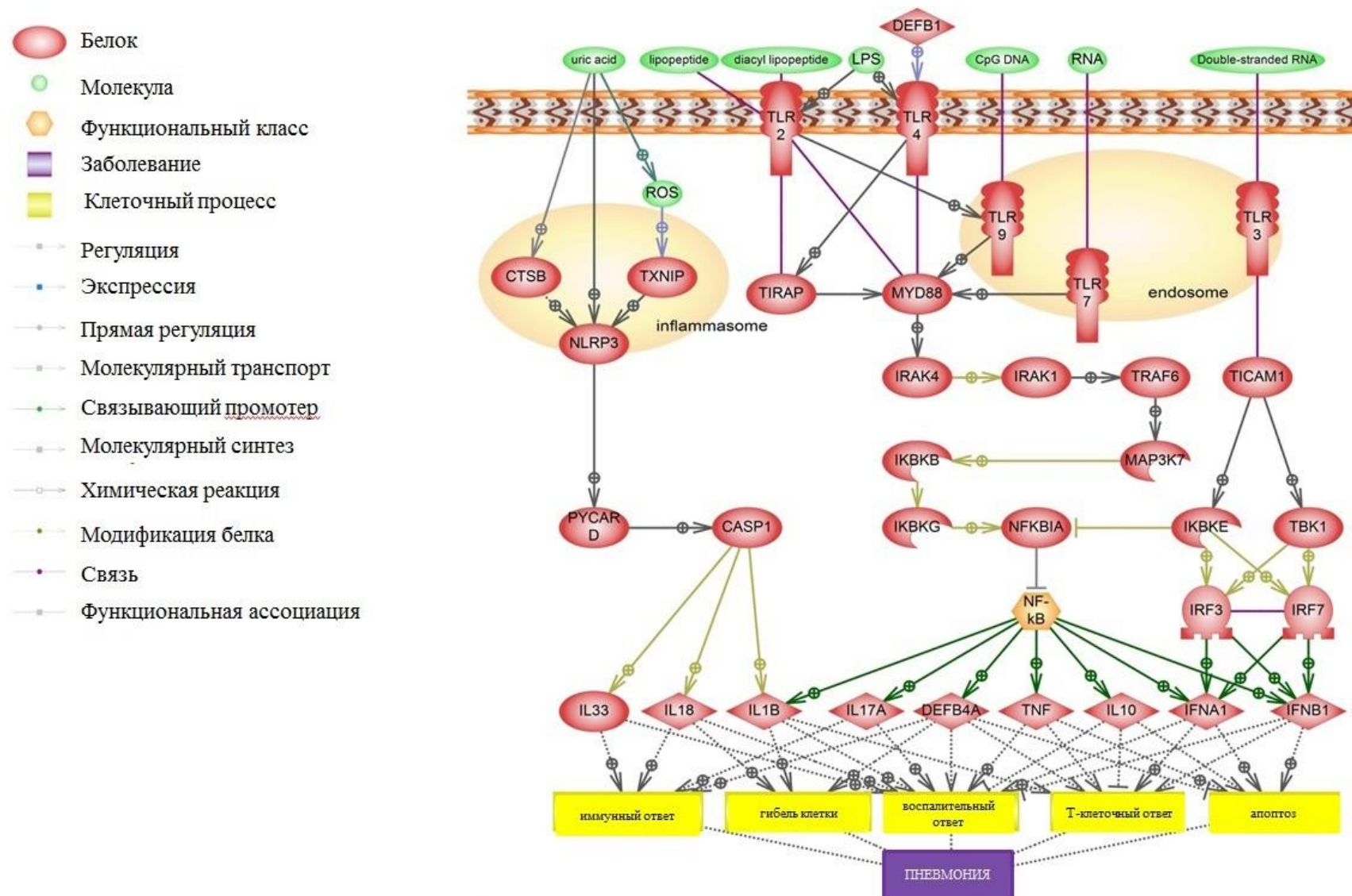


Рисунок 3. Карта экспрессионных мишеней канонического сигнального пути привязанного к развитию пневмонии

Нами было показано, что в эпителиальных клетках верхних отделов респираторного тракта здоровых новорожденных экспрессируются TLRs. В группе здоровых новорожденных в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта уровень экспрессии генов TLR2 составил – $149,7 \times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, TLR4 – $0,8 \times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина.

Экспрессия TLR2 была сопоставима с показателями у детей других возрастных категорий, в то время как показатель TLR4 – был достоверно выше на порядок (О.А. Ганковская, 2010). Это можно объяснить тем, что здоровые новорожденные до рождения не контактируют с инфекционными агентами. После родов резко увеличивается инфекционная нагрузка, что может быть ассоциировано с повышенной экспрессией рецепторов врожденного иммунитета. В подтверждение данной теории можно представить данные по экспрессии рецепторов TLR2 и TLR4 у здоровых новорожденных, у которых определены в верхних дыхательных путях возбудители (*E.coli*, *Acinetobacter*, *P.aeruginosa*, *Citribacter* и др.).

При этом следует отметить, что инфекционной патологии (пневмонии и др.) у этих новорожденных не было выявлено. В группе здоровых новорожденных с возбудителями в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта уровень экспрессии генов TLR2 составил – $379,9 \times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, TLR4 – $0,6 \times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина.

Таким образом, мы можем говорить о достоверном увеличении показателя TLR2 в 2,53 раза относительно такового в группе здоровых новорожденных, у которых инфекции не выявлялись. Активация рецепторов врожденного иммунитета может приводить к запуску сигнального пути через NF- κ B и к выработке противомикробных пептидов (HBD-2 и др.) и провоспалительных цитокинов (к примеру, TNF α и др.). Уровень экспрессии ядерного фактора NF- κ B в группе здоровых новорожденных составил $5,17 \times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, а в группе новорожденных с детектируемым инфекционным возбудителем (без патологии) – $10,86 \times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, что в 2,1 раза выше, чем в группе сравнения. Данный показатель может свидетельствовать об активации классического сигнального пути с рецепторов TLR.

Известно, что экспрессия β -дефенсинов в респираторном тракте приобретает особое значение у новорожденных, так как эти пептиды способствуют защите плода от инфекции. В ряде работ показано, что TLR индуцирует экспрессию дефенсинов эпителиальными клетками многих тканей (Л.В. Ковальчук, 2011). В связи с этим, одной из задач работы явилось изучение экспрессии генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках слизистой

верхних отделов респираторного тракта у здоровых новорожденных. Были определены фоновые показатели экспрессии генов HBD-1 и HBD-2, которые составили 7,6 и 39,7 ($\times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина), соответственно. В группе здоровых новорожденных с выявленными патогенами данные показатели были значительно выше и составили 14,9 и 182,2 ($\times 10^3$ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина), соответственно. Можно утверждать, что наличие патогена в респираторном тракте у новорожденных ведет к активации экспрессии противомикробных пептидов: HBD-1 – в 1,9 раз и HBD-2 – в 4,6 раз. При этом уровень эффекторной молекулы TNF α также возрастал в 2,3 раза.

Суммируя полученные данные можно заключить, что в эпителиальных клетках респираторного тракта здоровых новорожденных на фоновом уровне экспрессируются исследуемые показатели врожденного иммунитета, а наличие патогена в большинстве случаев приводит к активации экспрессии этих факторов. Механизмы активации связаны с взаимодействием лигандов (компонентов патогенов) с TLRs. В случае если врожденный иммунитет на уровне слизистой оболочки респираторного тракта новорожденного адекватно реагирует на патоген, в таком случае, не наблюдается какого-то патологического процесса. Нами проведено исследование экспрессии факторов врожденного иммунитета клетками слизистой респираторного тракта новорожденных с пневмонией (табл.2).

У новорожденных с ВУП выявлено умеренное снижение показателя TLR2 и резкое угнетение экспрессии гена TLR4 в 2,24 раза. Показатели дефенсинов при этом практически не отличались от нормы. У пациентов с РНП также наблюдалось небольшое снижение экспрессии гена TLR2 в 1,5 раз и TLR4 – в 1,75 раз. При этом у новорожденных с пневмонией наблюдался четкий рост уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина TNF α и ядерного фактора NF- κ B, что может свидетельствовать об активации воспалительных реакций на уровне слизистых оболочек. Следует отметить, что данная активация происходит на фоне супрессии экспрессии генов рецепторов

Далее нами был проведен корреляционный анализ полученных результатов представленных в табл.3. Как видно из таблицы в группе здоровых новорожденных выявлена положительная ассоциация экспрессии TLR2 и HBD-1, TLR2 и HBD-2, HBD-1 и HBD-2 (при этом коэффициент составил 0,734, 0,734, 0,781, соответственно). В группе новорожденных с ВУП была определена аналогичная зависимость. А в группе с РНП корреляция показателей была иной - HBD-1 и HBD-2 (коэффициент 0,918). Также была найдена слабая обратная зависимость между TLR4 и HBD-2. На следующем этапе работы мы провели исследование изменения экспрессионных профилей молекул врожденного иммунитета относительно этиологического фактора. Показано, что экспрессия гена TLR2 снижалась в 6,2 раза у

пациентов с *K.pneumonia* и в два раза и более при смешанной инфекции. Уровни экспрессии гена TLR4 были снижены более чем в три раза при инфекции, вызванной *E.coli* (рис.4 а, б).

Таблица 2

Показатели экспрессии генов врожденного иммунитета в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей у новорожденных с ВУП и РНП

Исследуемая группа		Группа сравнения 1 (здоровые новорожденные) $\times 10^3$	Группа сравнения 2 (здоровые новорожденные с инф.) $\times 10^3$	Группа новорожденных с ВУП $\times 10^3$	Группа новорожденных с РНП $\times 10^3$
Экспрессия гена TLR2	*	149,66 (64,9 - 428,8)	379,86 # (225,3 - 2872,5)	110,096 (72,14 - 140,0)	98,502 (57,02 - 160,25)
	**	1	2,538#	-1,359	-1,519
Экспрессия гена TLR4	*	0,796 (0,54-1,08)	0,604 (0,48-0,69)	0,354 # (0,31-0,37)	0,453 (0,28-0,60)
	**	1	-1,3180	-2,248#	-1,757
Экспрессия гена HBD-1	*	7,602 (6,47-12,59)	14,975 # (10,86-17,08)	7,44 (7,07-15,95)	7,148 (5,25-9,29)
	**	1	1,970#	-1,021	-1,063
Экспрессия гена HBD-2	*	39,746 (22,85-87,41)	182,17 # (101,91-32,98)	41,126 (22,39-67,14)	41,469 (22,30-69,62)
	**	1	4,583#	1,035	1,043
Экспрессия гена TNF α	*	2,19 (1,78-5,88)	5,05 (3,56-11,76)	13,32# (3,04-23,12)	10,04# (7,07 -16,95)
	**	1	2,3	6,069#	4,577#
Экспрессия гена NF-kB	*	5,17 (3,35-11,76)	10,86 (6,71-23,52)	21,84# (6,94-38,09)	13,42# (15,24-38,94)
	**	1	2,1	4,222#	2,594#

Примечание - «#» – показатель достоверно отличается от такового в группе сравнения 1

($p < 0,05$). Для расчета использовали критерий Манна-Уитни.

* - Количество копий относит экспрессии гена актина, ** - Отношение показателя в норме к показателю при патологии.

Далее были определены уровни экспрессии генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей в группах новорожденных с ВУП, с РНП и у здоровых детей. Показано, что экспрессия гена HBD-2 увеличивается в 2,3 раза у новорожденных, у которых определяется инфекционный возбудитель, но при этом отсутствуют клинические проявления пневмонии. Также показано достоверное снижение показателя HBD-2 (в 3,2 раза) у пациентов с пневмонией, вызванной *K. pneumonia* (рис.4 в, г).

Помимо дефенсинов, был проведен анализ экспрессии генов провоспалительного цитокина TNF α и фактора транскрипции NF-kB в эпителиальных клетках верхних

дыхательных путей в исследуемых группах. Данные молекулы участвуют в сигнальном пути с TLRs. Так, было показано, что у детей, у которых выявляли инфекционные возбудители, но не было клинических проявлений, показатель цитокина возрастал более чем в два раза.

Таблица 3

Изучение корреляционной зависимости между уровнем экспрессии исследуемых показателей врожденного иммунитета в эпителиальных клетках слизистой верхних дыхательных путей у здоровых новорожденных и детей с ВУП и РНП (коэффициент корреляции по Спирмену)

Здоровые новорожденные						
	TLR2	TLR4	HBD-1	HBD-2	TNF α	NF-kB
TLR2		rs = 0.101	rs = 0.734	rs = 0.781	rs = 0.543	rs = 0.54
TLR4	rs = 0.101		rs = 0.388	rs = 0.248	rs = 0.543	rs = 0.541
HBD-1	rs = 0.734	rs = 0.388		rs = 0.734	rs = -0.371	rs = -0.37
HBD-2	rs = 0.781	rs = 0.248	rs = 0.734		rs = 0.543	rs = 0.54
TNF α	rs = 0.543	rs = 0.543	rs = -0.371	rs = 0.543		rs = 0,96
NF-kB	rs = 0.54	rs = 0.541	rs = -0.37	rs = 0.54	rs = 0,96	
Новорожденные с ВУП						
	TLR2	TLR4	HBD-1	HBD-2	TNF α	NF-kB
TLR2		rs = -0.1	rs = 0.833	rs = 0.983	rs = -0.429	rs = -0.238
TLR4	rs = -0.1		rs = -0.117	rs = -0.2	rs = 0.452	rs = 0.667
HBD-1	rs = 0.833	rs = -0.117		rs = 0.85	rs = -0.143	rs = 0.
HBD-2	rs = 0.983	rs = -0.2	rs = 0.85		rs = -0.381	rs = -0.286
TNF α	rs = -0.429	rs = 0.452	rs = -0.143	rs = -0.381		rs = 0.833
NF-kB	rs = -0.238	rs = 0.667	rs = 0.	rs = -0.286	rs = 0.833	
Новорожденные с РНП						
	TLR2	TLR4	HBD-1	HBD-2	TNF α	NF-kB
TLR2		rs = -0.251	rs = 0.368	rs = 0.918	rs = 0.051	rs = 0.142
TLR4	rs = -0.251		rs = 0.274	rs = -0.323	rs = 0.188	rs = -0.032
HBD-1	rs = 0.368	rs = 0.274		rs = 0.308	rs = -0.072	rs = -0.115
HBD-2	rs = 0.918	rs = -0.323	rs = 0.308		rs = -0.024	rs = 0.136
TNF α	rs = 0.051	rs = 0.188	rs = -0.072	rs = -0.024		rs = 0.863
NF-kB	rs = 0.142	rs = -0.032	rs = -0.115	rs = 0.136	rs = 0.863	

В группах с внутриутробным инфицированием, с пневмонией новорожденных, вызванной *E. coli*, *P.aeruginosa*, кокками и при смешанной инфекции показатель TNF α возрастал в 3-4 раза относительно показателя в группе сравнения. Уровень экспрессии гена NF-kB достоверно увеличивался только в группах пациентов с внутриутробным инфицированием плода (в 2,5 раза) и у новорожденных с пневмонией, вызванной кокковой микрофлорой (в 3,1 раз).

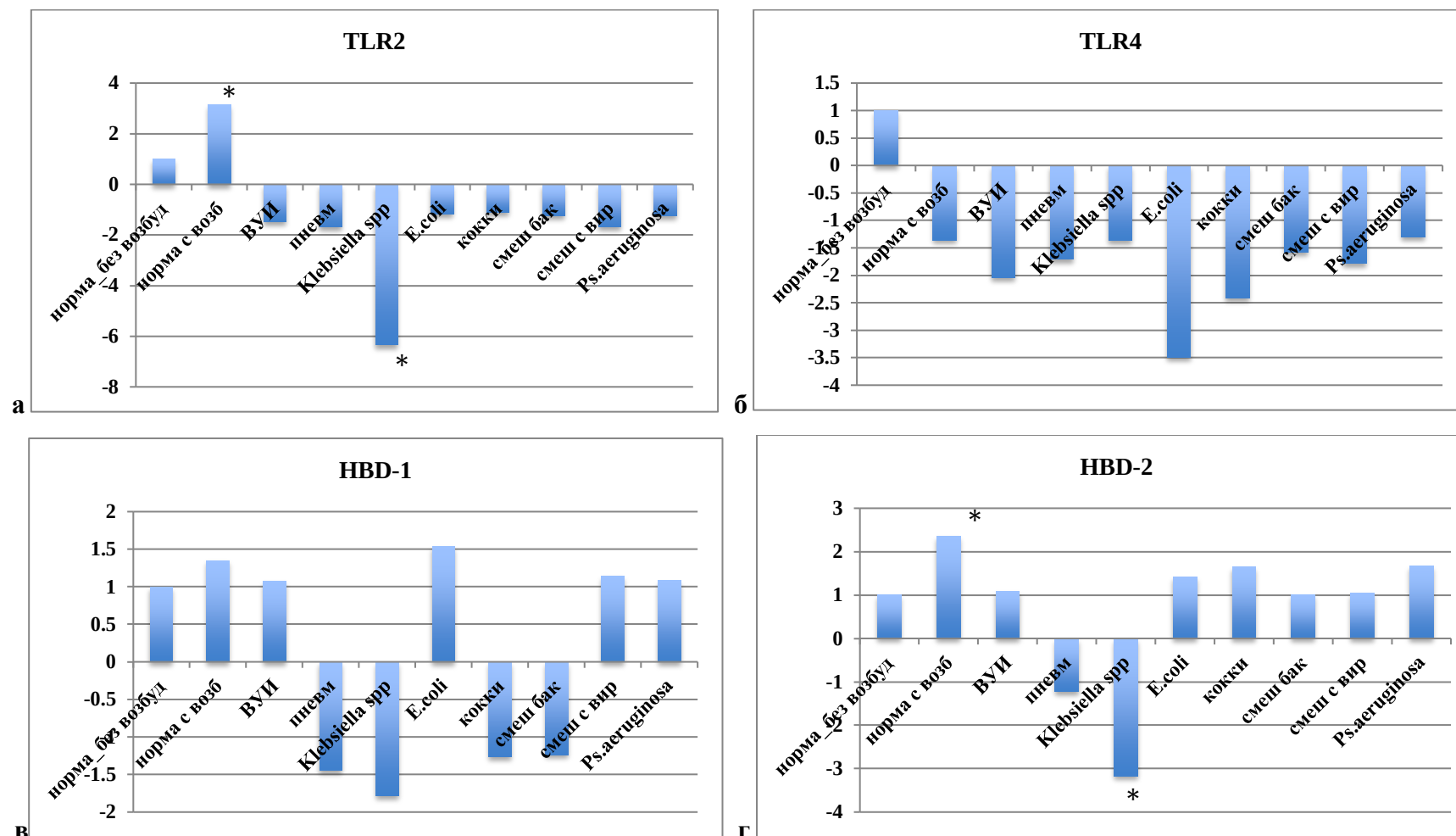


Рисунок 4. Экспрессия генов TLR2 (а), TLR4 (б), HBD-1 (в) и HBD-2 (г) в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей новорожденных с ВУП и РНП

Примечание - По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – относительные единицы показателя экспрессии (показатель в опытной группе относительно показателя в группе сравнения). «*» – показатель достоверно отличается от такового в группе сравнения 1 (здоровые новорожденные без инфекции) ($p < 0,05$). Для расчета использовали критерий Манна-Уитни.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что иммунологические показатели (распознающие структуры – TLR2, TLR4, дефенсины HBD-1, HBD-2, провоспалительный цитокин TNF α и фактор транскрипции NF-kB) у новорожденных с внутриутробным инфицированием и с пневмонией изменяются неоднозначно. Выявлена тенденция к снижению экспрессии генов TLR2, TLR4 и увеличению экспрессии генов TNF α и NF-kB. Данные изменения коррелируют с инфекционным возбудителем, следовательно, можно предположить, что непосредственно возбудитель за счет действия факторов патогенности влияет на показатели врожденного иммунитета.

Исследование ассоциации полиморфных маркеров в генах *TLRs*, *DEFB1* и цитокинов у новорожденных с неонатальными пневмониями

В последнее время доказана роль наследственных факторов в интенсивности реализации механизмов врожденного иммунитета. Генетическая предрасположенность к развитию ВУП и РНП связана с наследованием определенных аллелей и генотипов. В данной работе мы выбрали ряд факторов врожденного иммунитета, которые по данным биоинформационного анализа и по результатам экспрессионного профиля имеют большое значение в защите организма при ВУП/РНП. Все они являются компонентами *TLR*-опосредованного пути. При изучении распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg753Gln* гена *TLR2* среди родильниц, у которых родились дети с ВУП и РНП, а также в группе родильниц с физиологически протекавшей беременностью и без патологии плода обнаружено преобладание частоты аллеля *Arg* над частотой аллеля *Gln* и встречаемости генотипа *ArgArg* над встречаемостью генотипов *ArgGln* и *GlnGln* во всех исследуемых группах (у родильниц). Отличия распределения аллелей и генотипов между группами были недостоверны.

В нашей работе также исследовалось распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg753Gln* гена *TLR2* у новорожденных с ВУП и РНП. Полученные данные, не сильно отличались от данных родильниц. Частота аллеля *Arg* была значительно выше аллеля *Gln* и варьировала в диапазоне 0,86 - 0,95 (частота аллеля *Gln* варьировала в диапазоне 0,05 - 0,14). Следует отметить, что частота гетерозиготного генотипа была выше, чем в аналогичной группе родильниц. А генотип *GlnGln* отсутствовал в исследуемых нами группах новорожденных (табл.4).

Таким образом, можно заключить, что полиморфный маркер *Arg753Gln* гена *TLR2* не связан с ВУИ плода, а также с пневмонией новорожденных. Другой, исследуемый нами генетический маркер, локализовался в кодирующей области гена *TLR4* и реализовался через замену аминокислоты *Asp* на *Gly* в 299 положении. Нами показано, что и у родильниц, и у новорожденных доминировал аллель *Asp* и генотип *AspAsp* как в группе сравнения, так и в

опытных группах. Было выявлено, что у родильниц аллель *Gly* и генотип *GlyGly* ассоциированы с развитием ВУИ плода. Частота аллеля *Gly* при этом составляет 0,11, а генотипа - 0,09, в группе сравнения частота аллеля - 0,02, а генотип не определяется. У новорожденных аллель (частота 0,08) ассоциирована с ВУИ, а также генотип *AspGly* (частота 0,17). При этом в группе сравнения данный маркер не определялся. Можно сделать заключение, что представленные маркеры могут быть использованы сугубо на региональном уровне. Далее нами был проведен поиск других полиморфных маркеров в генах сигнальных рецепторов врожденного иммунитета, которые могут быть ассоциированы с риском развития преждевременных родов или с реализацией внутриутробной инфекции.

Таблица 4

Распределение аллелей и генотипов маркеров *Arg753Gln* гена *TLR2* и *Asp299Gly* гена *TLR4* родильниц и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения

<i>Arg753Gln</i> гена <i>TLR2</i>							
Родильницы	<i>Arg</i>	<i>Gln</i>	p	<i>Arg Arg</i>	<i>Arg Gln</i>	<i>Gln Gln</i>	p
группа сравнения 1	0,94	0,06	-	0,88	0,12	0	-
ВУП	0,94	0,06	≥0,05	0,90	0,08	0,02	≥0,05
РНП	0,91	0,09	≥0,05	0,88	0,06	0,06	≥0,05
новорожденные	<i>Arg</i>	<i>Gln</i>	p	<i>Arg Arg</i>	<i>Arg Gln</i>	<i>Gln Gln</i>	p
группа сравнения 1	0,86	0,14	-	0,71	0,29	0	-
ВУП	0,89	0,11	≥0,05	0,78	0,22	0	≥0,05
РНП	0,95	0,05	≥0,05	0,90	0,10	0	≥0,05
<i>Asp299Gly</i> гена <i>TLR4</i>							
Родильницы	<i>Asp</i>	<i>Gly</i>	p	<i>AspAsp</i>	<i>AspGly</i>	<i>GlyGly</i>	p
группа сравнения 1	0,98	0,02	-	0,96	0,04	0	-
ВУП	0,89	0,11*	<0,05	0,86	0,05	0,09*	<0,05
РНП	0,97	0,03	≥0,05	0,96	0,04	0	≥0,05
новорожденные	<i>Asp</i>	<i>Gly</i>	p	<i>AspAsp</i>	<i>AspGly</i>	<i>GlyGly</i>	p
группа сравнения 1	1	0	-	1	0	0	-
ВУП	0,92	0,08*	<0,05	0,83	0,17*	0	<0,05
РНП	1	0	≥0,05	1	0	0	≥0,05

Примечание - «*» – показатель достоверно отличается от такового в группе сравнения 1 (здоровые новорожденные без инфекции) ($p < 0,05$). Для расчета использовали критерий χ^2 , а также критерий Фишера.

Другой маркер, который был оценен в данной работе - *G(-20)A*, локализованный в гене *DEFB1*. Однонуклеотидная замена может изменить эффективность транскрипции и трансляции, так же как изменить аминокислотную последовательность и последующую структуру белка, и его функцию. В данном исследовании был выбран полиморфный маркер

G(-20)A, расположенный в нетранслируемой области. Предположительно этот SNPs может влиять на уровень экспрессии гена дефенсина. Jurevic R J, et al. (2002) предположил, что изменения в экспрессии противомикробных пептидов (в частности дефенсинов) могут быть связаны с различной восприимчивостью к инфекционным агентам и, как следствие, нарушением процессов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек. Известно, что *HBD-1* в основном экспрессируется конститутивно, и, значит, полиморфизмы могут потенциально влиять на фоновый уровень экспрессии. Ассоциация полиморфного маркера *G(-20)A* в гене *DEFB1* с инфекционной патологией новорожденных (в частности с пневмонией) до настоящего времени не исследовалась (рис.5 а, б).

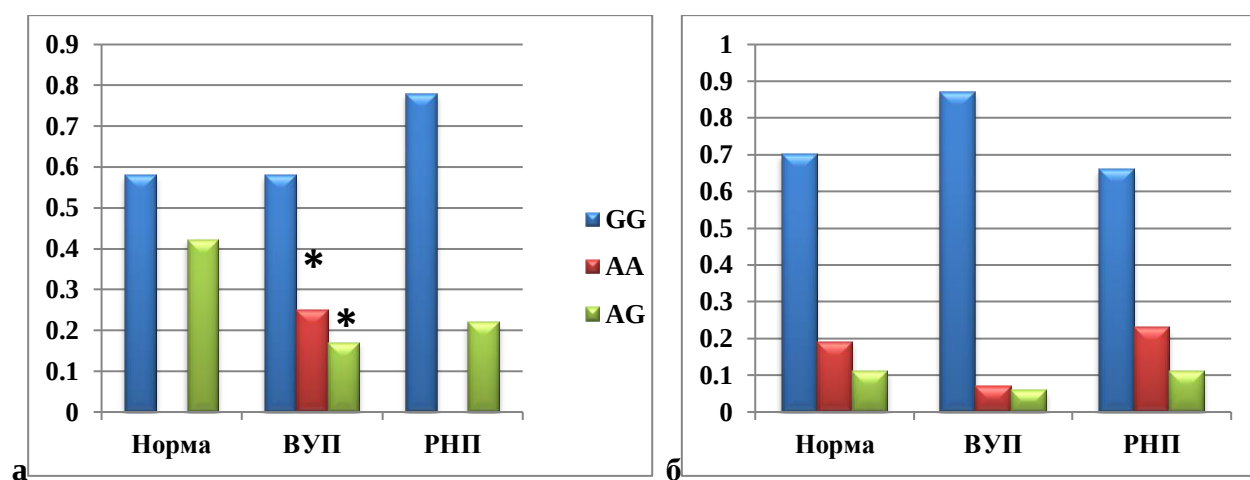


Рисунок 5. Распределение генотипов маркера *G(-20)A* гена *DEFB1* у родильниц (а) и новорожденных (б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения

Примечание - По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – частота встречаемости генотипа, «*» – показатель достоверно отличается от такового в группе сравнения 1 (норма), ($p < 0,05$). Для расчета использовали критерий χ^2 , а также критерий Фишера.

Анализ частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G(-20)A* у родильниц в исследуемых группах выявил некоторые достоверные различия. Так, частоты аллелей данного маркера в группе с внутриутробным инфицированием плода и в группе сравнения были следующими: аллель *G* - 0,66, 0,79, аллель *A* - 0,34, 0,21, соответственно. Частота аллелей у родильниц, у которых родились новорожденные с ВУП, достоверно не отличались от таковых в группе сравнения. Таким образом, аллель *A* (определяемая у родильниц) является маркером ВУП. Частоты генотипов исследуемого маркера у родильниц в группе ВУП, РНП и группе сравнения были следующими: *GG* - 0,78, 0,58, 0,58; *AA* – 0, 0,25, 0; *AG* - 0,22, 0,17, 0,42, соответственно. У новорожденных доминировал аллель *G* и генотип *GG* (частота составляла более 0,58). Было выявлено, что риск развития внутриутробного

инфицирования плода ассоциирован с генотипом *AA* у родильниц, а генотип *AG* – является «протективным».

У новорожденных также проводили исследование ассоциации маркера *G(-20)A* гена *DEFB1* с риском развития ВУП и РНП. Среди аллелей доминировал аллель *G* (частота была выше 0,73 во всех группах) и генотип *GG* (частота превышала 0,52). Такая же тенденция была определена и у родильниц. Однако ассоциаций аллелей и генотипов маркера *G(-20)A* у новорожденных с патологией не было выявлено. Полученные результаты указывают на то, что генетический маркер *G(-20)A* гена *DEFB1* ассоциирован с риском развития ВУП у новорожденного. Полученные результаты указывают на то, что генетический маркер *G(-20)A* гена *DEFB1* ассоциирован с риском развития ВУП у новорожденного. Это может быть связано с низкими показателями экспрессии этого гена и со сниженной защитой организма родильницы и как следствие инфицирование плода.

На следующем этапе была проведена оценка ассоциации полиморфных маркеров в генах цитокинов с НП. В данном исследовании было выбрано три цитокина: *IL-10*, *IL-17* и *TNFα*. Известно, что все эти цитокины могут вырабатываться в ответ на активацию *TLRs*. *IL-17* и *TNFα* относятся к провоспалительным цитокинам. Помимо провоспалительных цитокинов в работе также был исследован противовоспалительный цитокин - *IL-10*. Известно, что снижение экспрессии данного цитокина может приводить к активации провоспалительных механизмов и вероятно к разрушению ткани, а увеличение – к супрессии мукозального иммунитета.

На первом этапе нами был проведен сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров *TNFα* (-308 *G/A*) и *IL17A* (-197 *G/A*), которые локализованы в промотерных областях генов. Часто изменения последовательности ДНК в промотерной области гена связано с изменением экспрессии белка (табл. 5).

Во всех группах доминировал аллель *A* и гетерозиготный генотип. При этом достоверных различий между частотами аллелей и генотипов в группах с пневмонией новорожденных, внутриутробным инфицированием и группой сравнения в материале от родильниц выявлено не было. Иная тенденция наблюдалась непосредственно у новорожденных. Аллели в материале от новорожденных во всех группах распределились приблизительно одинаково. В группе новорожденных с пневмонией определяли достоверное увеличение частоты генотипа *GG*, которая составляла 0,18 относительно 0,04 – в группе сравнения. Таким образом, маркер *GG TNFα* (-308 *G/A*) ассоциирован с риском развития пневмонии у новорожденных и может быть использован в клинической практике. Вероятно, наличие данной замены в геноме новорожденных может быть связано с нарушением баланса выработки *TNFα* и нарушением защиты.

**Распределение аллелей и генотипов маркеров *TNFA* -308 G>A и *IL17A* -197 G>A у
родильниц и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

<i>TNFA</i> -308 G>A (rs1800629)							
Родильницы	A	G	p	GA	GG	AA	p
группа сравн. 1	0,62	0,38	-	0,77	0	0,23	-
ВУП	0,58	0,42	≥0,05	0,85	0	0,15	≥0,05
РНП	0,50	0,50	≥0,05	0,84	0,08	0,08	≥0,05
новорожденные							
группа сравн. 1	A	G	p	GA	GG	AA	p
ВУП	0,49	0,51	-	0,90	0,04	0,06	-
ВУП	0,50	0,50	≥0,05	1,00	0,00	0,00	≥0,05
РНП	0,52	0,48	≥0,05	0,68	0,18*	0,14	<0,05
<i>IL17A</i> -197 G>A (rs2275913)							
Родильницы	A	G	p	GA	GG	AA	p
группа сравн. 1	0,26	0,74	-	0,43	0,52	0,05	-
ВУП	0,31	0,69	≥0,05	0,61*	0,39*	0	
ВАП	0,34	0,66	≥0,05	0,34	0,63	0,03	≥0,05
новорожденные							
группа сравн. 1	A	G	p	GA	GG	AA	p
ВУП	0,66	0,34	-	0,31	0,50	0,19	-
ВУП	0,71	0,29	≥0,05	0,42	0,50	0,08	≥0,05
ВАП	0,72	0,28	≥0,05	0,44	0,50	0,06	≥0,05

Примечание - «*» – показатель достоверно отличается от такового в группе сравнения 1 (здоровые новорожденные без инфекции) ($p < 0,05$). Для расчета использовали критерий χ^2 , а также критерий Фишера.

Другой провоспалительный цитокин, который был исследован в работе - *IL17*. В клиническом материале от родильниц распределение частот аллелей среди исследуемых групп было следующее: аллель *A* – 0,26; 0,31 и 0,34, аллель *G* – 0,74; 0,69 и 0,66 в группах сравнения, ВУП и РНП, соответственно. Достоверных различий при этом не было определено. При исследовании частот генотипов было выявлено два маркера – генотип *GG* был ассоциирован с отсутствием развития внутриутробной инфекции, т.е. можно считать его «протективным». В то же время наличие генотипа *GA* ассоциировано с развитием инфекции у плода. Можно предположить, что нарушение экспрессии цитокина *IL17* у родильницы может служить причиной инфицирования плода.

На следующем этапе были исследованы полиморфные маркеры (*-1082A>G*) и (*-592A>C*) в гене *IL10*. Во всех исследуемых группах определялись аллели полиморфного маркера *IL10* (*-1082 A>G*), но достоверных изменений в распределении не было обнаружено. У родильниц выявлено, что генотип *GA* (частота которого составила 0,75 относительно 0,47 – в группе сравнения) ассоциирован с развитием пневмонии у новорожденных. При этом

генотип *AA* – является “протективным”. Генотип *GG*, который определяется как у родильниц, так и у новорожденных является «протективным» относительно развития внутриутробной инфекции плода. Частота данного генотипа составляет 0,09 (относительно 0,28 в группе сравнений у родильниц) и 0,07 (относительно 0,19 в группе сравнения у новорожденных) (табл.6).

У новорожденных во всех группах доминировал аллель *G* и генотип *GG*, но достоверных отличий между этими показателями в группах выявлено не было. При оценке распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера (*-592A>C*) в гене *IL10* было показано следующее. У родильниц не было определено достоверных ассоциаций частот аллелей и генотипов с внутриутробной патологией плода (ВУП) и новорожденных (РНП). У новорожденных были найдены две ассоциации: генотип *GA* - «протективный» маркер развития внутриутробного инфицирования плода (частота составляла 0,20 относительно 0,42 в группе сравнения), маркер *GG* – ассоциация с риском развития ВУП (частота составляла 0,80 относительно 0,58 в группе сравнения).

На следующем этапе нами проводился поиск ассоциаций гаплотипов в генах *TNFα* и *IL-10* с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией. Известно, что однонуклеотидные полиморфные маркеры могут оказывать существенное влияние на предрасположенность индивидуума к той или иной патологии, однако гораздо большее значение имеет совокупность сцепленных генов на одной хромосоме. Поэтому, помимо исследования связи между однонуклеотидными полиморфизмами *G-308A* и *G4682A* в гене *TNFα* и *A-1082G* и *A-592C* в гене *IL-10* и патологиями плода, мы провели гаплотипный анализ. Сначала был проведен анализ гаплотипов в гене *TNFα* среди родильниц с внутриутробной инфекцией у плода, ранней неонатальной пневмонией и контрольной группой. В исследуемых выборках из девяти возможных вариантов гаплотипов встречалось только семь. Достоверных отличий при сравнительном анализе гаплотипов группы с внутриутробной инфекцией и контрольной выборки найдено не было.

Статистически значимые различия были установлены между группой с ранними неонатальными пневмониями и контролем. Гаплотип *GAGG* достоверно чаще встречался при патологии, чем в группе здоровых женщин (0,400 и 0,177, OR = 3, $p \leq 0,01$). В гене *IL-10* был проведен анализ шести гаплотипов, остальные три варианта гаплотипов в исследуемых выборках не встречались. При проведении сравнительного анализа распределения гаплотипов между группой с ранней неонатальной пневмонией и контрольной группой, выявили достоверно повышенную частоту гаплотипа *AGCC* в гене *IL-10* (0,455 и 0,185, OR = 3,7, $p \leq 0,05$). Статистических различий между ранней неонатальной пневмонией и группой сравнения у родильниц при анализе гаплотипов в гене *IL-10* выявлено не было.

Таблица 6

**Распределение аллелей и генотипов маркеров *IL10* (-1082A>G) и *IL10* (-592A>C) у
родильниц и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

<i>IL10</i> -1082 A>G (rs 1800896)							
Родильницы	A	G	p	GA	GG	AA	p
группа сравн. 1	0,51	0,49	-	0,47	0,28	0,25	-
ВУП	0,59	0,41	≥0,05	0,64	0,09*	0,27	<0,05
РНП	0,47	0,53	≥0,05	0,75*	0,16	0,09*	<0,05
новорожденные	A	G	p	GA	GG	AA	p
группа сравн. 1	0,54	0,46	-	0,70	0,19	0,11	-
ВУП	0,50	0,50	≥0,05	0,87	0,07*	0,06	<0,05
РНП	0,56	0,44	≥0,05	0,66	0,23	0,11	≥0,05
<i>IL10</i> -592 A>C (rs1800872)							
Родильницы	C	A	p	CA	CC	AA	p
группа сравн. 1	0,74	0,26	-	0,52	0,48	0,00	-
ВУП	0,69	0,31	≥0,05	0,61	0,39	0,00	≥0,05
РНП	0,78	0,22	≥0,05	0,44	0,56	0,00	≥0,05
новорожденные	C	A	p	CA	CC	AA	p
группа сравн. 1	0,79	0,21	-	0,42	0,58	0,00	-
ВУП	0,90	0,10	≥0,05	0,20*	0,80*	0,00	<0,05
РНП	0,81	0,19	≥0,05	0,37	0,63	0,00	≥0,05

Примечание - «*» – показатель достоверно отличается от такового в группе сравнения 1 (здоровые новорожденные без инфекции) ($p < 0,05$). Для расчета использовали критерий χ^2 , а также критерий Фишера.

Помимо анализа гаплотипов в генах *TNFα* и *IL-10* родильниц исследование было также проведено непосредственно среди новорожденных с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией. В гене *TNFA* из девяти возможных вариантов гаплотипов у новорожденных встречались только четыре, причем во всех исследуемых группах преимущественно встречался гаплотип GGGG. Таким образом, сравнительный анализ распределений гаплотипов в гене *TNFA* у новорожденных не выявил достоверных различий в группах с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией по сравнению с контрольной группой. Статистически значимые различия при исследовании гаплотипов в гене *IL-10* также не были выявлены. Суммируя полученные данные можно заключить, что генотипы AG (ген *IL10* -1082 A>G) и GG (*TNFα* -308 G>A) ассоциированы с риском развития неонатальных пневмоний. Поиск генетических маркеров, контролирующих развитие болезней дыхательных путей у новорожденных, на современном этапе стало одной

из важных проблем генетики. Основную трудность в практике врача занимает полиэтиологичный характер заболеваний дыхательной системы.

На сегодняшний день не до конца изучены патогенетические пути поражения легких у новорожденных, обусловленные наличием полиморфизмов генов медиаторов воспаления. Следовательно, чтобы своевременно заподозрить пневмонию, необходимо: провести тщательный осмотр новорожденного с определением факторов риска пневмонии. У новорожденного в отсутствие патологической симптоматики при физикальном обследовании легких вероятность наличия пневмонии крайне мала.

Для диагностики пневмонии на современном этапе: 1) всем новорожденным, имеющим клинические и физикальные симптомы пневмонии, показано проведение рентгенографии грудной клетки; 2) инвазивные процедуры для получения диагностического материала (забор трахеобронхиального аспирата, крови, мазков слизистой зева) и проведение этиологической диагностики (бактериологическое исследование, ПЦР); 3) проведение дополнительной лабораторной диагностики с использованием молекулярно-генетических методов, позволяющих проведение дифференциальной диагностики.

Изучение факторов врожденного иммунитета (про- и противовоспалительных цитокинов; TLR (TLR2, TLR4); ПМП (HBD1, HBD2); NF- κ B, TNF α) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и развитии ранней неонатальной пневмонии позволяет выявить предрасположенность организма ребенка к пневмонии, либо его устойчивости к ней, дать оценку прогноза и эффективности лечения.

На основе комплекса клинико-рентгенологических, микробиологических и иммунологических данных нами разработан алгоритм диагностики неонатальных пневмоний (Рис. 6). Снижение показателя TLR4 свидетельствует о развитии ВУП. Показатели дефенсинов при этом практически не отличаются от нормы. У новорожденных с РНП также наблюдалось небольшое снижение экспрессии гена TLR2 и TLR4. При этом у новорожденных также может наблюдаться рост уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина TNF α и ядерного фактора NF- κ B. Снижение экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4) и увеличение экспрессии генов TNF α и NF- κ B может свидетельствовать в пользу развития неонатальной пневмонии вызванной *K. pneumoniae*. Экспрессия гена HBD-2 увеличивается у новорожденных, у которых определяется инфекционный возбудитель, но при этом отсутствуют клинические проявления пневмонии. Снижение показателя HBD-2 отмечается у новорожденных с пневмонией, вызванной *K. pneumoniae*.

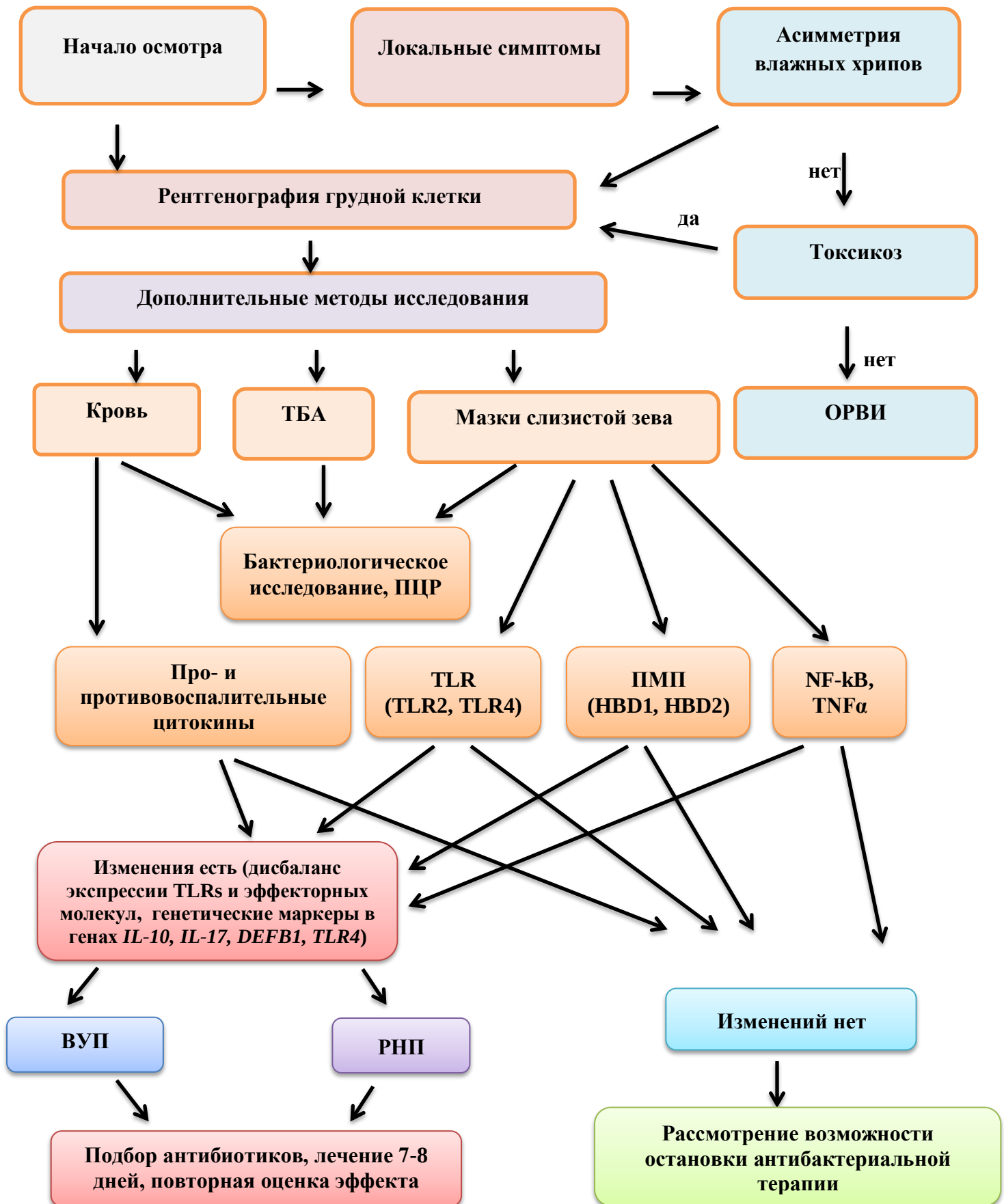


Рисунок 6. Алгоритм диагностики неонатальных пневмоний

Выводы

1. Определены критерии прогнозирования пневмоний у новорожденных и факторы риска: отягощенный акушерский анамнез, мужской пол ребенка, недоношенность, асфиксия. Достоверными клинико-рентгенологическими отличиями внутриутробных пневмоний от ранних неонатальных являлись: тяжелое течение, обширные воспалительные изменения в легких (сегментарные, долевые) ($p < 0,001$).
2. Установлено, что в этиологической структуре внутриутробных пневмоний у новорожденных доминировала грамположительная микробиота – коагулазоотрицательные стафилококки и энтерококки ($p < 0,001$). Грамотрицательная микробиота, представленная клибсиеллами, кишечной палочкой, псевдомонадами, ацинетобактерами, этиологически значима для ранних неонатальных пневмоний.
3. Показана ассоциация между заболеваемостью новорожденных неонатальными пневмониями и резистентностью к антибактериальным препаратам, что свидетельствовало о возможности формирования в ОРИТН «госпитальных» штаммов, которые вызывали инфекционные осложнения.
4. Рост удельного веса условно-патогенной микрофлоры в этиологической структуре ранних неонатальных пневмоний напрямую зависит от инфицирования кожи рук медперсонала и обсемененности аппаратуры медицинского назначения.
5. С использованием метода биоинформационного анализа построены схемы сигнальных путей, в которых описаны гипотетические молекулярные механизмы развития пневмонии новорожденных. С целью дальнейшего молекулярно-генетического анализа были отобраны гены *TLR2*, *TLR4*, *DEFB1*, *IL10*, *IL17*, *TNFA* и *NF-kB*.
6. Выявлен дисбаланс факторов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у новорожденных с неонатальной пневмонией. Показано, что снижение экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*) и увеличение экспрессии генов *TNFA* и *NF-kB* коррелировало с выявлением *K. pneumoniae*.
7. Найдена ассоциация полиморфных маркеров в генах *IL-17*, *DEFB1*, *TLR4* с риском развития внутриутробной пневмонии. Показано, что генотип AG (ген *IL10* -1082 A>G) и GG (*TNFA* -308 G>A) ассоциированы с риском развития неонатальных пневмоний.
8. Разработан алгоритм диагностики неонатальных пневмоний на основе комплекса клинико-рентгенологических, микробиологических и иммунологических данных, которые позволяют выбрать и оптимизировать адекватную и рациональную этиотропную терапию.

Практические рекомендации

1. Для определения этиологии неонатальных пневмоний (ВУП и РНП) в качестве исследуемого материала для микробиологического исследования целесообразно забирать ТБА (в случае интубирования трахеи), а также мазки из зева, ВДП и кровь на стерильность;
2. В случаях одновременного обнаружения УПМ в нескольких биотопах этиологически значимыми концентрациями следует считать: для ТБА – $\geq 10^3$ КОЕ/мл; для зева и ВДП – $\geq 10^4$ КОЕ/мл;
3. Выявление у новорожденных с риском развития пневмонии в этиологически значимых концентрациях *K. pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *A. baumannii*, а также различных ассоциаций следует рассматривать как показатель более тяжелого клинического течения заболевания, что необходимо учитывать при ведении таких новорожденных;
4. Для объективной расшифровки этиологии НП наряду с бактериологическим методом целесообразно проводить поиск труднокультивируемых микроорганизмов, с этой целью предпочтительнее применять ПЦР, а в качестве исследуемого материала использовать ТБА;
5. Основными предикторами реализации НП независимо от исхода является отягощённый акушерско-гинекологический анамнез родильниц: анемия, наличие воспалительных заболеваний женской половой сферы (ВУИ), хроническая фетоплацентарная недостаточность и преждевременная отслойка плаценты. Их наличие требует определенной настороженности медицинского персонала;
6. Для выявления риска развития пневмонии у новорожденных (ВУП или РНП), рекомендуется проводить оценку экспрессионного профиля факторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, TNF α и др.). Важными прогностическими маркерами неблагоприятного течения и дополнительными предикторами развития НП является снижение экспрессии генов TLR2, TLR4 и увеличение экспрессии генов TNF α и NF- κ B. Также рекомендуется проводить оценку генетических маркеров (в генах *IL-17*, *DEFB1*, *TLR4*, *IL10*), которые ассоциированы с риском развития ВУП или РНП у новорожденных в дагестанской популяции.
7. В результате проведенного исследования разработан алгоритм диагностики неонатальных пневмоний на основе комплекса клинико-рентгенологических, микробиологических и иммунологических данных, который в перспективе позволяет подобрать рациональную терапию.

Список научных работ автора, опубликованных по теме диссертации

1. Омарова, С.М. Мониторинг обсемененности условно-патогенными микроорганизмами различных объектов родовспомогательного стационара / Омарова С.М., **Алиева А.И.**, Абсерханова Д.У., Меджидова Д.Ш. // Успехи современного естествознания. М.: 2010.- № 9 - С.120-122.
2. Омарова, С.М. Микробиологическое исследование санитарного состояния Перинатального центра г. Махачкала/ Омарова С.М., **Алиева А.И.**, Абсерханова Д.У., Меджидова Д.Ш., Исаева Р.И., Горелова В.Г. // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** - М., 2010. - №5 - С. 77-80.
3. Омарова, С.М. Антибиотикорезистентность штаммов *P.aeruginosa*, выделенных от больных отделения реанимации и интенсивной терапии травматологического центра Махачкалы. / Омарова С.М., Нурмагомедова З.М., Меджидова Д.Ш., Муталипова З.М., Горелова В.Г., **Алиева А.И.**, Абсерханова Д.У. // **Клиническая лабораторная диагностика.** – М., 2011. – №2. – С. 46-48.
4. Абсерханова, Д.У. Совершенствование методов диагностики вентилятор-ассоциированных пневмоний в Перинатальном центре Махачкалы. / Абсерханова Д.У., Омарова С.М., **Алиева А.И.** // Актуальные проблемы эпидемиологии на современном этапе: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию кафедры эпидемиологии и доказательной медицины. МЗ и СР РФ, ГБОУ ВПО 1-ый МГМУ им. И.М. Сеченова. М.: Первый МГМУ им.И.М. Сеченова МЗ РФ, 2011. - С.12-13.
5. **Алиева, А.И.** Совершенствование методов диагностики нозокомиальных пневмоний в родильных домах г. Махачкала / **Алиева А.И.**, Омарова С.М., Абсерханова Д.У. // Актуальные вопросы разработки и производства микробиологических питательных сред и тестсистем: материалы 5-ой Всероссийской научно-практической конференции. МЗ и СР РФ; ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Филиал НПО «Питательные среды» МЗ РФ; ДГМА, ТУ «Роспотребнадзора» по РД, ВНПОЭМП, Всероссийское общество биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова. Махачкала: ИП Джамалудинов М.А., 2011. - С. 94-96.
6. **Алиева, А.И.** К вопросу о микробном пейзаже и антибиотикочувствительности условно-патогенных бактерий, выделенных в акушерских стационарах г. Махачкала / **Алиева А.И.**, Анатова А.А., Садыки М.Н., Гусейнова М.А. // Тезисы докладов 60-й юбилейной научной конференции молодых ученых и студентов. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ и СР РФ; Совет молодых ученых и специалистов; Совет студенческого научного общества им. Р.П. Аскерханова. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2011. - С. 140-141.

7. **Алиева, А.И.** Нозокомиальная пневмония новорожденных / **Алиева А.И.**, Гусейнова М.А.//Тезисы докладов 60-й юбилейной научной конференции молодых ученых и студентов. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ и СР РФ; Совет молодых ученых и специалистов; Совет студенческого научного общества им. Р.П. Аскерханова. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2011. - С. 175-176.
8. **Алиева, А.И.** Вакцина против ВИЧ / **Алиева А.И.**, Исаева З.Р.//Тезисы докладов 60-й юбилейной научной конференции молодых ученых и студентов. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ и СР РФ; Совет молодых ученых и специалистов; Совет студенческого научного общества им. Р.П. Аскерханова. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2011. - С. 183.
9. **Алиева, А.И.** Видовой состав возбудителей внутрибольничных инфекций (с учетом антибиотикорезистентности возбудителей)/ **Алиева А.И.**, Муталипова З.М., Исаева З.Р., Анатова А.А.//Тезисы докладов 60-й юбилейной научной конференции молодых ученых и студентов. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ и СР РФ; Совет молодых ученых и специалистов; Совет студенческого научного общества им. Р.П. Аскерханова. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2011. - С. 200-201.
10. **Алиева, А.И.** Носительство возбудителя ревматизма / **Алиева А.И.**, Садыки М.Н.//Тезисы докладов 60-й юбилейной научной конференции молодых ученых и студентов. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ и СР РФ; Совет молодых ученых и специалистов; Совет студенческого научного общества им. Р.П. Аскерханова. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2011. - С. 213-214.
11. Омарова, С.М. Определение резистентности к антибиотикам возбудителей нозокомиальной пневмонии в ОРИТ РКБ / Омарова С.М., Муталипова З.М., **Алиева А.И.**, Акаева Ф.С., Исаева Р.И // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. Тезисы XIV Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. / МАКМАХ, ESCMID, НИИ антимикробной химиотерапии, ГБОУ ВПО «СГМА» МЗ и СР РФ. М., 2012. - Том 14, № 2 (прилож. 1). - С. 39.
12. Омарова, С.М. Совершенствование методов микробиологической диагностики внутрибольничной инфекции бактериальной этиологии / Омарова С.М., Муталипова З.М., **Алиева А.И.**, Исаева Р.И, Акаева Ф.С. // Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека: труды юбилейной Всероссийской научной конференции./ МО РФ, Департамент образования МО РФ, Главное военно-медицинское управление МО РФ, Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Северо-Западное отделение РАМН, ВМедА им. С.М. Кирова. СПб: БАЛТИКА-XXI. - 2012.- С.103.

13. **Алиева, А.И.** Условно-патогенная микробиота в этиологии нозокомиальных пневмоний у новорожденных детей/**Алиева А.И.**, Омарова С.М.// Проблемы медицинской микологии. - СПб, 2012. - Т. -14. -№ 2. - С. – 64.
14. Касумова, А.М. К вопросу об инфекционно-воспалительной патологии у новорожденных детей / Касумова А.М., **Алиева А.И.**, Саидов М.С.// Проблемы медицинской микологии. - СПб, 2012. - Т. -14. -№ 2. - С. – 93.
15. Омарова, С.М. Этиологическая характеристика возбудителей внутрибольничных пневмоний, выделенных у новорожденных детей в Перинатальном Центре / Омарова С.М., Д.У.Абсерханова, **Алиева А.И.**// **Астраханский медицинский журнал.** – 2013. - №2 (8) - С. 72-77.
16. Омарова, С.М. Роль условно-патогенных микроорганизмов в развитии внутрибольничного инфицирования новорожденных / Омарова С.М., **Алиева А.И.**, Исаева Р.И., Акаева Ф.С. // Актуальные вопросы инфекционных заболеваний в клинике и эксперименте: материалы XVIII Республиканской. Научно-практической конференции. Вестник Дагестанской медицинской академии; ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра инфекционных болезней им. акад. Г.П.Руднева. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2013. - № 3 (8), - С. 39-40.
17. Касумова, А.М. Анализ чувствительности к антибиотикам штаммов, выделенных от новорожденных с инфекционно-воспалительной патологией / Касумова А.М., **Алиева А.И.**, Омарова С.М. // Актуальные вопросы инфекционных заболеваний в клинике и эксперименте: материалы XVIII Республиканской. Научно-практической конференции. Вестник Дагестанской медицинской академии; ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра инфекционных болезней им. акад. Г.П.Руднева. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2013. - № 3 (8), - С. 44-46.
18. **Алиева, А.И.** Оценка эффективности применения карбопенемов у новорождённых с перинатальной инфекционно-воспалительной патологией /**Алиева А.И.**, Касумова А.М., Саидов М.С. // Актуальные вопросы инфекционных заболеваний в клинике и эксперименте: материалы XVIII Республиканской. Научно-практической конференции. Вестник Дагестанской медицинской академии; ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра инфекционных болезней им. акад. Г.П. Руднева. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2013. - № 3 (8), - С. 46-49.
19. **Алиева, А.И.** Состояние антибиотикорезистентности грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии / **Алиева А.И.** // Актуальные вопросы инфекционных заболеваний в клинике и эксперименте: материалы XVIII Республиканской. Научно-практической конференции. Вестник Дагестанской медицинской академии; ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра инфекционных болезней им. акад. Г.П. Руднева. Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2013. - № 3 (8), - С. 49-51.

20. Гаджиева А.Д. Результаты многолетнего мониторинга устойчивости стафилококков к пенициллину / Гаджиева А.Д., **Алиева А.И.**, Царуева Т.В.// Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы III Всероссийской научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014, - С. 33-35.
21. Омарова, С.М. Антибиотикорезистентность возбудителей внутрибольничных инфекций в хирургическом стационаре / Омарова С.М., Муталипова З.М., **Алиева А.И.**// Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы III Всероссийской научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014, - С. 43-46.
22. **Алиева, А.И.** Состояние антибиотикорезистентности грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных / **Алиева А.И.**, Касумова А.М., Абсерханова Д.У.// Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы III Всероссийской научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014, - С. 52-54.
23. **Алиева, А.И.** Анализ антибактериальной терапии у новорождённых ОРИТ с перинатальной инфекционно-воспалительной патологией / **Алиева А.И.**, Касумова А.М., Кокина О.В.// Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы III Всероссийской научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014, - С. 54-58.
24. Касумова, А.М. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность основных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных / Касумова А.М., **Алиева А.И.** // Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы III Всероссийской научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014, - С. 59-60.
25. Омарова, С.М. Изучение роли условно-патогенных микроорганизмов в развитии инфекций органов дыхания у новорожденных ОРИТ / Омарова С.М., Абсерханова Д.У., **Алиева А.И.**, Касумова А.М.// Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы III Всероссийской научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014, - С. 102-105.

26. Омарова, С.М. Усовершенствование методов бактериологической диагностики госпитальных инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями / Омарова С.М., Горелова В.Г., Муталипова З.М., **Алиева А.И.**, Меджидова Д.Ш.// Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы III Всероссийской научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014, - С. 105-107.
27. Омарова, С.М. Усовершенствование методов диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в хирургических стационарах / Омарова С.М., **Алиева А.И.**, Акаева Ф.С., Горелова В.Г.// Проблемы медицинской микологии. - СПб, 2014. - Т. 16. - №2. - С.110-111.
28. **Алиева, А.И.** Этиология вентилятор-ассоциированных пневмоний у новорожденных / **Алиева А.И.**, Омарова С.М., Касумова А.М. // Современные концепции научных исследований: материалы IV международной научно-практической конференции. / Евразийский союз ученых. М.: Евразийский союз ученых, 2014. - Ч.4. - № 6 - С. 9-10.
29. Омарова, С.М. Микробиология инфекционно-воспалительной патологии новорожденных / Омарова С.М., Касумова А.М., **Алиева А.И.** // Современные концепции научных исследований: материалы IV международной научно-практической конференции. Евразийский союз ученых. М.: Евразийский союз ученых, 2014. - Ч.4. - № 6 - С. 50-52.
30. Абсерханова, Д.У. Роль условно-патогенных микроорганизмов в развитии внутрибольничных инфекций в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных / Абсерханова Д.У., **Алиева А.И.**, Джанбеков М.Д., Алискандиев А.М.// Актуальные проблемы педиатрии и детской хирургии: материалы научно-практической конференции. ГБОУ ВПО «ДГМА» МЗ РФ; МЗ РД; Региональное отделение «Союз педиатров России». Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2014. - С.74-77.
31. **Алиева, А.И.** Изучение клинико-микробиологических и иммунологических особенностей новорожденных с вентилятор-ассоциированной пневмонией / **Алиева А.И.**, Свитич О.А., Алиев И.М.// Фундаментальные и прикладные науки сегодня: материалы IV международной научно-практической конференции. / Научно-издательский центр «Академический». Издательство: Create Space Independent Publishing Platform, 2014. - Том 2. - С. – 49-51.
32. Свитич, О.А. Исследование ассоциации полиморфных маркеров в генах TLR9, TNF и DEFB1 с преждевременными родами инфекционного генеза и с развитием пневмонии у новорожденных / Свитич О.А., **Алиева А.И.**, Рассказова Н.Д., Семенова Е.А., Малушенко С.В., Ганковская Л.В.// **Российский иммунологический журнал.** – М.: Наука, 2014. - Т. 8 (17). - № 3, С. 871-873

33. Свитич, О.А. Оценка генетических и экспрессионных маркеров в генах цитокинов - один из подходов персонализированной медицины при иммунопатологии / Свитич О.А., Власова А. В., Кинкулькина А. Р., Семенова Е. А., Рассказова Н. И., **Алиева А.И.**, Ганковская Л. В. // Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы: труды Международного форума. Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ), Государственный научный центр «Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства». - Казань: Фармарус Принт Медиа (Москва), 2014. – С. 234-235.
34. Свитич, О.А. Ассоциация полиморфных маркеров в генах, белковые продукты которых участвуют во врожденном иммунитете, с развитием пневмонии у новорожденных / Свитич О.А, Семенова Е.А., **Алиева А.И.**, Рассказова Н.Д., Русанова К. В. // Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы: труды Международного форума. Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ), Государственный научный центр «Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства». - Казань: Фармарус Принт Медиа (Москва), 2014. - С.236.
35. **Алиева, А.И.** Клинико-микробиологические и иммунологические (TLR2, TLR4) особенности новорожденных, находящихся на искусственной вентиляции легких / **Алиева А.И.**, Свитич О.А., Н.Д.Рассказова, Ганковская Л.В. // **Ученые записки Орловского государственного университета.** - Орел: Изд-во ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», 2014.- №7 (63), Т.2. - С.116-117.
36. Касумова, А.М. Структура инфекционно-воспалительной патологии новорожденных ОРВИ Перинатального центра г. Махачкала / Касумова А.М., Омарова С.М., **Алиева А.И.**, Моллаева А.М. // **Ученые записки Орловского государственного университета.** - Орел: Изд-во ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», 2014.- №7 (63), Т.2. - С.120-121.
37. Свитич, О.А. Ассоциация полиморфных маркеров в генах TLR9, TNF и DEFB1 с развитием пневмонии у новорожденных / Свитич О.А., **Алиева А.И.**, Рассказова Н.Д., Ганковская Л.В. // **Ученые записки Орловского государственного университета.** - Орел: Изд-во ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», 2014.- №7 (63), Т.2. - С.153-154.
38. **Алиева, А.И.** Пневмонии новорожденных: особенности этиологии, диагностики и лечения / **Алиева А.И.**, Касумова А.М., Абсерханова Д.У. // **Известия Самарского научного центра РАН.** Самара, 2014. – Т. 16. - №5(4). - С. 1427-1429.
39. Касумова, А.М. Результаты микробиологического мониторинга перинатальной инфекционно-воспалительной патологии, вызванной условно-патогенными

микроорганизмами у новорожденных родильного дома РКБ г. Махачкала / Касумова А.М., **Алиева А.И.**, Омарова С.М., Ф.С.Акаева // **Электр. Вестник новых медицинских технологий** (электронное издание). - 2014. №1. Публикация 2-119. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4929.pdf> (дата обращения: 12.12.2014).

40. Свитич, О.А. Исследование ассоциации маркеров в генах, белковые продукты которых участвуют в реакциях иммунитета, с развитием внутриутробной инфекции / Свитич О.А., Ганковская Л.В., Семенова Е.А., Рассказова Н.Д., **Алиева А.И.**, Лабжинов П.А., Зверев В.В. // International scientific conference SCIENCE, TECHNOLOGY AND LIFE – 2014, Czech Republic, Karlovy Vary. Издательство: Международный центр научно-исследовательских проектов (Киров), 2014. - С.1020-1024.

41. Свитич, О.А. Исследование уровней экспрессии генов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, ФНОА) у новорожденных, находящихся на искусственной вентиляции легких / Свитич О.А., Шуленина Е.А., **Алиева А.И.**, Рассказова Н.Д., Ганковская Л.В. // Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии: труды XIII Международного Конгресса. / Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ) «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства М., 2015. - С.116-117.

42. Омарова, О.М. Спектр и антибиотикорезистентность возбудителей внутрибольничного инфицирования операционных ран и органов мочевыделительной системы у хирургических больных / Омарова С.М., Моллаева А.М., **Алиева А.И.**, Саидова П.С., Алиева С.Ф., Касумова А.М. // **Клиническая лабораторная диагностика**. - М.: Медицина, 2015. - № 5, - С.45-48.

43. **Алиева, А.И.** Эффективность современных критериев диагностики и рациональной антибиотикотерапии вентилятор-ассоциированных пневмоний у новорожденных / **Алиева, А.И.**, Омарова С.М., Свитич О.А., Абсерханова Д.У. // **Российский иммунологический журнал**. – М.: Наука – 2015. - Т.–9 (8). - № 2(1). - С. 120-122.

44. Саидова, П.С. Препарат для ускоренной диагностики инфекций, вызванных энтеробактериями на основе выявления внутриклеточного фермента у клебсиелл / Саидова П.С., Омарова С.М., Горелова В.Г., **Алиева А.И.**, Исаева Р.И., Алиева С.Ф. // **Российский иммунологический журнал**. – М.: Наука – 2015. - Т.–9 (8). - № 2(1). - С. 156-157.

45. **Алиева, А.И.** Клинико-микробиологическое и иммунологическое обоснование вентилятор-ассоциированных пневмоний у новорожденных / **Алиева А.И.**, Свитич О.А., Омарова С.М., Касумова А.М. // **Российский иммунологический журнал**. – М.: Наука – 2015. - Т.–9 (8). - № 2(1). - С. 184-185.

46. Омарова, С.М. Резистентность штаммов *P.aeruginosa*, выделенных у пациенток акушерского стационара с инфекцией мочевых путей / Омарова С.М., Моллаева А.М., **Алиева А.И.**, Исаева Р.И., Акаева Ф.С. // **Российский иммунологический журнал**. – М.: Наука – 2015. - Т.-9 (8). - № 2(1). - С. 413-415.
47. **Алиева, А.И.** Факторы врожденного иммунитета - новые диагностические маркеры риска развития вентилятор-ассоциированной пневмонии у новорожденных / **Алиева А.И.**, Свитич О.А.// Новые методы экспресс диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции. /под ред. В.Б. Сбойчакова, В.В. Малышева; Министерство обороны РФ, Главное военно-медицинское управление МО РФ, РАМН, Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. - СПб.: Человек и его здоровье, 2015 - С.187-189.
48. **Алиева, А.И.** Результаты микробиологического мониторинга вентилятор-ассоциированных пневмоний у новорожденных / **Алиева А.И.**, Алиев И.М. // Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - М., Изд-во: Медиаль (Нижний Новгород), 2015. - №3(17). – С.32.
49. Свитич, О.А. Исследования микрофлоры и врожденного иммунитета слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных / Свитич О.А., Омарова С.М., **Алиева А.И.**, Рассказова Н.Д., Зверев В.В.// **Медицинская иммунология**. – СПб., 2016. - Т.18. - №2. - С. - 163-170.
50. **Алиева, А.И.** Развитие внутриутробной инфекции: исследование ассоциации маркеров в генах / **Алиева А.И.**, Свитич О.А.// Актуальные вопросы инфекционных болезней в клинике и эксперименте: XXI юбилейная Всероссийская научно-практическая конференция. / МЗ РД; ФГБОУ ВО ДГМУ Минздрава России, кафедра инфекционных болезней им. акад. Г.П. Руднева. – Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2016. - С. 97-100.
51. Акаева, Ф.С. Урогенитальный хламидиоз: диагностика, лечение / Акаева Ф.С., Эседова А.Э., **Алиева А.И.**, Хабибулаева Л.М.// Актуальные вопросы инфекционных болезней в клинике и эксперименте: XXI юбилейная Всероссийская научно-практическая конференция. / МЗ РД; ФГБОУ ВО ДГМУ Минздрава России, кафедра инфекционных болезней им. акад. Г.П. Руднева. – Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2016. - С. 125-131.
52. Акаева, Ф.С. Факторы риска формирования врожденных пневмоний / Акаева Ф.С., Эседова А.Э., **Алиева А.И.**, Касумова А.М., Абсерханова Д.У.// Актуальные вопросы инфекционных болезней в клинике и эксперименте: XXI юбилейная Всероссийская научно-практическая конференция. / МЗ РД; ФГБОУ ВО ДГМУ Минздрава России, кафедра

инфекционных болезней им. акад. Г.П. Руднева. – Махачкала: ИПЦ ДГМА, 2016. - С. 171-175.

53. Свитич, О.А. Ассоциация SNP в генах цитокинов с риском развития инфекционной патологии у плода / Свитич О.А., **Алиева А.И.**, Меремьянина Е.А., Русанова К.В., Ганковская Л.В.// **Российский иммунологический журнал**. М.: Наука, 2016. - Т.10 (19). - № 2(1). - С.489-491.

54. Меремьянина, Е.А. Генетические маркеры в генах цитокинов матери как фактор риска развития инфекционной патологии у плода / Меремьянина Е.А., **Алиева А.И.**// Глобализация научных процессов: сборник статей Международной научно-практической конференции. / Уфа: МЦИИ OMEGA SCIENCE, 2016. - Ч.2 - С. 120-122.

55. **Алиева, А.И.** Микробиологический и иммунологический профили вентилятор-ассоциированных пневмоний у новорожденных / **Алиева А.И.** // Обеспечение эпидемиологической безопасности и профилактика инфекции в хирургии: тезисы научных трудов Всероссийской научно-практической конференции, г. Казань. Медицинский Альманах. – Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье. -2016. - № 3 (43). - С. 145

56. Свитич, О.А. Ассоциация полиморфных маркеров в генах цитокинов с развитием пневмонии новорожденных / Свитич О.А., Меремьянина Е.А., **Алиева А.И.**, Ганковская Л.В.// Научно-практическая ревматология. Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания: Тезисы докладов I междисциплинарной конференции. /РАН, ФАНО России, Совет молодых ученых РАН, Координационный совет по делам молодежи в научной и образовательной сферах при Совете при Президенте РФ по науке и образованию. - М., ИМА-ПРЕСС.- 2016. 54(3). - С. 50-51.

57. **Алиева, А.И.** Оценка эффективности применения карбопенемов у новорожденных с неонатальной пневмонией / **Алиева А.И.**, Ханахмедова К.Ш.// Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. / ФГБОУ ВО «ДГМУ» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМУ.- 2017. - С. 12-15.

58. **Алиева, А.И.** Диагностика вентилятор-ассоциированной пневмонии на основе факторов врожденного иммунитета / **Алиева А.И.**, Касумова А.М. // Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. / ФГБОУ ВО «ДГМУ» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМУ. -2017. - С. 126-131.

59. **Алиева, А.И.** Новые диагностические маркеры риска развития неонатальной пневмонии у новорожденных / **Алиева А.И.** // Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии: материалы IV Всероссийской научно-практической

конференции. / ФГБОУ ВО «ДГМУ» МЗ РФ, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.- Махачкала: ИПЦ ДГМУ.- 2017.- С. 131-134.

60. Свитич, О.А. Молекулярные механизмы регуляции врожденного иммунитета при инфекционной патологии: пневмония новорожденных / Свитич О.А., **Алиева А.И.**, Меремьянина Е.А., Ганковская Л.В.// **Аллергология и иммунология.** М.: Медицина-Здоровье, 2017. - Т.18. - № 3. - С.152-156.

Список сокращений и условных обозначений

ВДП – верхние дыхательные пути

ВУП – внутриутробная пневмония

ВУИ – внутриутробное инфицирование

ГВЗ – гнойно-воспалительные заболевания

ДН - дыхательная недостаточность

ЗВУР – задержка внутриутробного развития

ИВЛ - искусственная вентиляция легких

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

НП – неонатальная пневмония

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РД РКБ – родильный дом Республиканской клинической больницы

РНП – ранняя неонатальная пневмония

РДС - респираторный дистресс-синдром

ТБА - трахеобронхиальный аспират

BD-2 – beta defensin-2 (бета дефенсин 2)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

HBD – human β -defensin (бета дефенсин человека)

HD – human defensin (дефенсин человека)

HLA – human leucocyte antigens (лейкоцитарные антигены человека)

HNP – human neutrophil protein (человеческий нейтрофильный пептид)

Ig – immunoglobulin (иммуноглобулин)

IL – interleukin (интерлейкин)

MHC – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

TLR - Toll-like receptor (Toll-подобный рецептор)