

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ВРОЖДЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

ПРИ ЗАДЕРЖКЕ РОСТА ПЛОДА

Одним из самых часто встречающихся осложнений раннего неонатального периода у новорожденных с задержкой роста плода является врожденная инфекция. Расширение диагностических возможностей путем внедрения молекулярно-генетического исследования у данного контингента пациентов будет способствовать разработке эффективных методов профилактики и своевременного лечения.

Цель исследования. Определение полиморфизма генов цитокинов у беременных с задержкой роста плода и их новорожденных с последующей реализацией врожденной инфекции.

Материал и методы. Изучение распределения аллелей и генотипов полиморфных локусов генов цитокинов у 196 пар «мать – новорожденный».

Результаты исследования. У беременных с задержкой роста плода к факторам риска развития внутриутробной инфекции относятся хронические заболевания мочевыделительной системы (хронический пиелонефрит и цистит) и самопроизвольные выкидыши в анамнезе, многоводие во время данной беременности. Наличие генотипа А/А полиморфизма гена IL10: -592 А > С у новорожденного ассоциируется с повышением вероятности внутриутробной инфекции при задержке роста и хронической гипоксии плода в антенатальном периоде ($p = 0,031$, $OR = 18,9$ (1,7–215,2)).

Заключение. Результаты исследования позволяют использовать у беременных с задержкой роста плода клинические предикторы для выявления группы высокого риска реализации внутриутробной инфекции с последующим проведением генетического скрининга среди их новорожденных.

Ключевые слова: задержка роста плода, полиморфизм генов цитокинов, врожденная инфекция.

LOMOVA N.A., GANICHKINA M.B., KHACHATURYAN A.A., MANTROVA D.A., KAN N.E., DONNIKOV A.E., TYUTYUNNIK V.L.

Academician V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology Ministry of Health of Russia, Moscow

MOLECULAR GENETIC PREDICTORS OF CONGENITAL INFECTION IN FETAL GROWTH RESTRICTION PREGNANCY.

Congenital infection is one of most frequent complications of early neonatal period in newborns with fetal growth restriction. The use of molecular genetic testing in this group of patients may promote the development of new methods of prophylaxis and treatment.

Objective. To detect cytokines genes polymorphisms in pregnant women and newborns with fetal growth restriction and congenital infection.

Materials and methods. The investigation of distribution of alleles and genotypes of cytokines genes polymorphic loci in 196 pairs «mother-newborn».

Results. Congenital infection risk factors in pregnant women with fetal growth restriction are: chronic urinary tract diseases (chronic pyelonephritis and chronic cystitis), history of spontaneous abortion and hydramnios in current pregnancy. The presence of A/A IL10 gene polymorphism: -592 A > C in a newborn is associated with increased risk of congenital infection in pregnancies complicated by fetal growth restriction and chronic fetal hypoxia ($p = 0,031$, $OR = 18.9$ (1.7–215.2)).

Conclusion: Results of the study suggest the use of clinical predictors for revealing the group of fetal growth restriction patients with high risk of congenital infection and subsequent genetic screening of newborns in this group of patients.

Keywords: fetal growth restriction, cytokines genes polymorphisms, congenital infection.

ВВЕДЕНИЕ

Задержка роста плода (ЗРП) – актуальная проблема современного акушерства, занимающая одно из ведущих мест в структуре перинатальной заболеваемости и смертности. Наряду с инфекционными причинами и врожденными аномалиями развития плода, ЗРП вносит весомый вклад в перинатальную смертность. ЗРП оказывает влияние не только на внутриутробное состояние плода, но и на последующее развитие ребенка и во многом определяет уровень его здоровья на протяжении жизни [1, 2].

Исследование генов, контролирующей активность цитокинов, являющихся медиаторами воспаления, – одна из важных задач в раскрытии патогенетических

звеньев инициации и течения врожденной инфекции. Цитокины определяют функциональную кооперацию клеток при реализации реакции воспаления; при этом кооперация клеток может быть как позитивная, так и негативная. По данным литературы, аллель А полиморфизма гена IL10: 592 С > А ассоциирована с повышенным уровнем спонтанной и стимулированной продукции IL10 мононуклеарами крови, что приводит к снижению интенсивности воспалительной реакции и переключению Th1 > Th2-ответа [3]. Ряд авторов указывает на взаимосвязь повышенной частоты аллеля IL10-592 А с тяжестью сепсиса, развитием полиорганной недостаточности и высокой вероятностью летального исхода [3, 4].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение полиморфизма генов цитокинов у беременных с ЗРП и их новорожденных с последующей реализацией у них врожденной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено проспективное обследование 196 пар «мать – новорожденный», выполненное в ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

КРИТЕРИИ ВКЛЮЧЕНИЯ

Плацентарная недостаточность (ПН), установленная по данным клинического обследования, результатам функциональных методов исследования (нарушение фетоплацентарного кровотока и/или кровотока в венозном протоке и/или усиление кровотока в среднемозговой артерии по данным доплерометрии, ЗРП по данным УЗИ).

КРИТЕРИИ ИСКЛЮЧЕНИЯ

Многоплодная беременность, тяжелая экстрагенитальная патология, пороки развития плода.

Все пациентки были разделены на две группы. В I группу были включены 86 пациенток с ПН, во II – 110 пациенток без ПН. Был проведен стандартный набор обследований и молекулярно-генетическое исследование цельной и пуповинной крови матери и новорожденного. Получено письменное информированное согласие на включение в научное исследование. После родоразрешения, в зависимости от исхода беременности, пациентки I и II групп были разделены на подгруппы. В подгруппы 1А (n = 50, ВУИ с ПН) и 2А (n = 36, внутриутробная инфекция (ВУИ) без ПН) вошли пациентки с ВУИ у новорожденных, развившейся в раннем неонатальном периоде и подтвержденной при клинико-лабораторном обследовании. В подгруппы 1Б (n = 36, ПН без ВУИ) и 2Б (n = 74, без ПН и без ВУИ) – без реализации ВУИ у новорожденного. К легкой форме ВУИ относили гнойный конъюнктивит, везикулопустулез, к тяжелой – пневмонию, сепсис.

На сегодняшний день принято выделять такие факторы риска развития ЗРП и ВУИ, как возраст и вредные привычки матери, повреждающее воздействие физических или химических факторов на ранних сроках гестационного периода, наличие очагов латентной инфекции, экстрагенитальная патология, отягощенный акушерско-гинекологический анамнез и осложнения беременности

Выполнено определение следующих полиморфных локусов генов цитокинов у матерей и их новорожденных детей: CD14-260 (-159) C > T, IL6 174 C > G, ESR1 Pvull -397

T > C, IL8-251 A > T, ESR1 XbaI, TGFB -509 C > T, IL10 -592 A/C, TLR9 -1486 T > C, IL1A -889 C > T, VEGFA -2578 A-C, IL1B-31 T > C, VEGFA -634 G-C, IL1R1390 T > C (Ser130Ser) [11100 msp1], VEGFA 936 C > T, IL1B 3953 (3954) C > T, IL1R1 -15858 C > T [Pst1 1970], TNF -308 G > A, TNF -238 G > A, IL4 -590 C > T, IL4 -33 C > T, IL4R 1902 A > G (Gln576Arg), IL6R1510 (1073) A > C (Asp358Ala) (обозначение в базе данных dbSNP национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI)). Определение замен одиночных нуклеотидов проводили модифицированным методом «примыкающих проб» (adjacent probes, kissing probes), используя оригинальные олигонуклеотиды. Полимеразную цепную реакцию и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Исследование генов, контролирующих активность цитокинов, являющихся медиаторами воспаления, – одна из важных задач в раскрытии патогенетических звеньев инициации и течения врожденной инфекции

Статистическая обработка полученных результатов была проведена на персональном компьютере при помощи программного пакета «SPSS Statistics 17.0 for Windows». Для определения статистической значимости различий применялись точный двухсторонний критерий Фишера и U-тест Манна – Уитни для несвязанных совокупностей. Отношение шансов (OR) приведено с 95%-ным доверительным интервалом (CI).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На сегодняшний день принято выделять такие факторы риска развития ЗРП и ВУИ, как возраст (до 17 и старше 35 лет) и вредные привычки матери (курение, алкоголь, наркотики), повреждающее воздействие физических или химических факторов на ранних сроках гестационного периода, наличие очагов латентной инфекции, экстрагенитальная патология, отягощенный акушерско-гинекологический анамнез и осложнения беременности [5, 6, 8–12].

У пациенток основной группы имело место достоверное увеличение частоты хронического пиелонефрита (20,0%) (p < 0,05) и хронического цистита (26,0%) (p < 0,05). В структуре гинекологической заболеваемости было отмечено достоверное увеличение в I группе хронического эндометрита (18,0%) и бесплодия (16%) (p < 0,05). Анализ исходной инфекционно-воспалительной заболеваемости с определением спектра возможных возбудителей показал, что в группе I достоверно чаще встречался хронический вирус простого герпеса I и II типов (40,0%) (p < 0,05).

Был проведен анализ акушерского анамнеза. В основной группе достоверно чаще встречались самопроизвольные выкидыши (18,0%) (p < 0,05).

В структуре экстрагенитальной патологии у пациенток 1Б-подгруппы достоверно чаще отмечались заболевания ЛОР-органов, в то время как у пациенток с ПН и реализацией ВУИ чаще выявлялись хронический пиелонефрит, цистит ($p < 0,05$) и аутоиммунный тиреоидит ($p > 0,05$).

В подгруппах 1А и 1Б достоверно чаще встречался хронический эндометрит (23,0 и 13,9%) ($p < 0,05$).

Поскольку большинство пациенток, включенных в исследование, были повторнородящими, у нас была возможность провести анализ акушерского анамнеза. В подгруппе 1А достоверно чаще встречались самопроизвольные выкидыши (19,2%) и бесплодие (26,9%) ($p < 0,05$); в подгруппе 1Б – интранатальная гибель плода (8,3%), прерывание беременности до 12 недель (33,3%) ($p < 0,05$).

Ранняя диагностика ПН очень важна для прогнозирования риска развития таких серьезных осложнений для новорожденного, как ретинопатия новорожденных и внутрижелудочковые кровотечения

При анализе акушерских и перинатальных исходов доказано, что в ходе настоящей беременности в I триместре у пациенток основной группы (I группы) установлено наличие достоверно более частых осложнений: угрозы прерывания беременности (76,0%), ретрохориальной гематомы (по данным УЗИ) (12,0%) ($p < 0,05$). Во II триместре у пациенток I группы отмечалась угроза прерывания беременности (78,5%) и анемия беременных (38,0%) ($p < 0,05$). Из особенностей течения III триместра беременности следует отметить преобладание в I группе анемии беременных – 36,0%, бессимптомной бактериурии в 6,0% случаев, патологии околоплодных вод в виде многоводия (16,3%) ($p < 0,05$), неспецифического вульвовагинита (20,0%) ($p < 0,05$). В 10% случаев у пациенток I группы отмечалось преждевременное излитие околоплодных вод.

В I группе 68,0% пациенток были родоразрешены путем операции кесарева сечения, из них по экстренным показаниям 38,0% ($p < 0,05$). Более чем в половине случаев операция была выполнена в связи с ухудшением состояния плода и нарастанием тяжести хронической гипоксии плода. В I группе средний гестационный срок, на котором пациентка была родоразрешена, составил 35 недель, тогда как во II группе (контрольной) – 39 недель.

Послеродовой период у пациенток I группы в 16% случаев протекал с осложнениями: в 4,0% диагностировали эндометрит, в 12,0% – субинволюцию матки ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ акушерских исходов в двух подгруппах (подгруппа 1А – пациентки с ПН и реализацией ВУИ у новорожденных, 1Б – ПН без ВУИ) показал, что обострение инфекции имелось при ПН с дальнейшей реализацией ВУИ у новорожденных и без такового. Это подтверждает воспалительный характер развития ПН. В то же время только у пациенток I подгруппы (ВУИ) отмечались такие проявления, как неспецифический вульвовагинит и многоводие, которые, по-видимому, являются факторами риска ВУИ в большей степени, чем ПН. По данным F. Moscuzza et al. [7], ПН, осложняющая беременность, напрямую влияет на

прогноз для новорожденного. Во время беременности ПН может служить критерием для ранней диагностики хронической гипоксии плода и подробного мониторинга течения беременности. Ранняя диагностика ПН очень важна для прогнозирования риска развития таких серьезных осложнений для новорожденного, как ретинопатия новорожденных и внутрижелудочковые кровотечения.

В подгруппе 1А 61,5% пациенток были родоразрешены путем операции кесарева сечения, из них по экстренным показаниям 38,5% ($p < 0,05$). Более чем в половине случаев операция выполнялась в связи с ухудшением состояния плода и нарастанием тяжести хронической гипоксии плода. В подгруппе 1Б 75% пациенток были родоразрешены путем операции кесарева сечения, из них по экстренным показаниям 37,5% ($p < 0,05$). При этом у 12,5% пациенток подгруппы 1Б отмечалось преждевременное излитие околоплодных вод ($p < 0,05$). В подгруппе 1А средний гестационный срок, при котором пациентка была родоразрешена, составил 33,6 недели, в подгруппе 1Б – 36,4 недели, тогда как в группе контроля – 39,3 недели.

Послеродовой период у пациенток подгруппы 1А в 23,1% случаев протекал с осложнениями: диагностировали эндометрит (7,7%) и субинволюцию матки (15,4%) ($p < 0,05$).

У детей подгруппы 1А достоверно чаще диагностировалась асфиксия (53,2 и 33,3%) и неонатальная желтуха (23,0 и 8,3%) ($p < 0,05$).

ПН и ВУИ достоверно чаще встречались при хроническом пиелонефрите (24,2%), хроническом цистите (30,6%) ($p < 0,05$), самопроизвольных выкидышах (19,2%) и бесплодии (26,9%) ($p < 0,05$) в анамнезе, неспецифическом вульвовагините (23,0%) и многоводии (19,4%) ($p < 0,05$) во время данной беременности. Полученные нами результаты позволяют выделить такие факторы риска для диагностики ПН и ВУИ, как хронический пиелонефрит, хронический цистит, самопроизвольные выкидыши и бесплодие в анамнезе, неспецифический вульвовагинит и многоводие во время беременности.

В дальнейшем был проведен молекулярно-генетический анализ полиморфных вариантов генов цитокинов и ряда их рецепторов среди исследуемых пар «мать – новорожденный».

Полученные нами результаты позволяют выделить такие факторы риска для диагностики ПН и ВУИ, как хронический пиелонефрит, хронический цистит, самопроизвольные выкидыши и бесплодие в анамнезе, неспецифический вульвовагинит и многоводие во время беременности

В нашем исследовании у матерей с генотипом А/А уровень IL10 в сыворотке крови не отличался от такового при наличии аллеля С в генотипе.

При исследовании пуповинной крови наличие генотипа IL10: 592 А/А у ребенка ассоциировалось с ЗРП (85,7% против 32,6% при других генотипах, OR = 12,4 (1,7–89,9), $p = 0,007$). Соответственно, чаще наблюдалась хрониче-

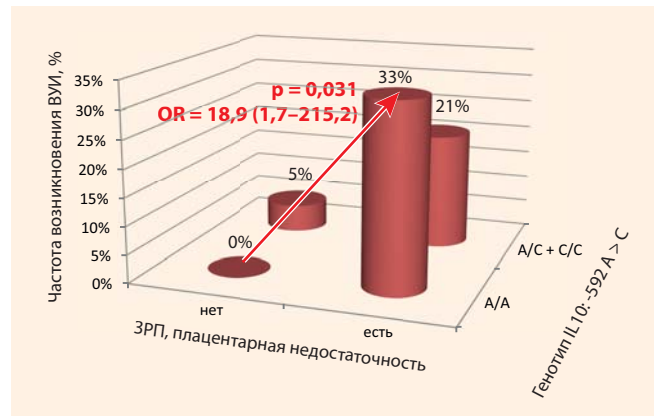
ская гипоксия плода (71,4% против 17,6%, OR = 11,7 (2,5–55,8), $p = 0,003$). Влияния материнского генотипа на возникновение данной патологии выявлено не было. Ряд авторов, исследовавших уровни IL10 в пуповинной крови, указывают на достоверно более низкий уровень данного противовоспалительного цитокина в кровотоке новорожденных с ЗРП [13, 15]. Учитывая предрасположенность носителей генотипа IL10: 592 A/A к снижению воспалительного ответа, ожидалось повышение вероятности ВУИ при наличии данного генотипа у ребенка. Указанная тенденция действительно наблюдалась (28,6% против 10,4%), но не достигала статистической значимости ($p = 0,173$). Учитывая приведенные выше данные о связи генотипа A/A с ПН, была проанализирована ассоциация ВУИ, ПН и генотипа IL10: 592 A/A у ребенка.

Влияние генотипа A/A с ВУИ прослеживалось у детей, рожденных у матерей с ПН, тогда как при отсутствии ПН частота ВУИ оставалась низкой при всех генотипах (рис.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Факторами риска развития ВУИ при ЗРП являются: наличие хронического пиелонефрита (24,2%, OR = 6,4 (2,0–20,2), $p = 0,001$), хронического цистита (30,6%, OR = 3,5 (1,0–11,8), $p = 0,04$) и самопроизвольных выкидышей в анамнезе (19,2%, OR = 7,7 (2,2–27,3), $p = 0,0003$), многоводие (19,4%, OR = 4,7 (1,2–18,1), $p = 0,02$) во время данной беременности.

Рисунок. Частота ВУИ у детей, рожденных от матерей групп I и II, в зависимости от задержки роста плода и генотипа IL10: 592 A/A



Наличие генотипа A/A полиморфизма гена IL10: -592 A > C у ребенка ассоциируется с повышением вероятности ВУИ при задержке развития плода и хронической гипоксии во время беременности (OR = 18,9 (1,7–215,2), $p = 0,031$).

Результаты исследования позволяют использовать у беременных с ЗРП клинические предикторы для выявления группы высокого риска реализации ВУИ с последующим проведением генетического скрининга среди их новорожденных.



ЛИТЕРАТУРА

- Maziad AA, Schaa K, Bell EF, Dagle JM, Cooper M, Marazita ML, Murray JC. Role of Polymorphic Variants as Genetic Modulators of Infection in Neonatal Sepsis. *Pediatr Res*, 2010, 68(4): 323-329.
- Курганова Е.В., Голованова О.В., Шевченко А.В. Клинико-иммунологические особенности сепсиса и полиморфизм генов TNFα и IL-10 у больных с гнойно-хирургической патологией. *Цитокины и воспаление*, 2007, 6(2): 40-45. / Kurganova E.V., Golovanova O.V., Shevchenko A.V. Clinical and immunological features of sepsis and TNFα and IL-10 gene polymorphisms in patients with surgical infection. *Cytokiny i vospalenie*, 2007, 6(2): 40-45.
- Chauhan M, McGuire W. Interleukin-6 (-174C) polymorphism and the risk of sepsis in very-lowbirth-weight infants: meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2008, 93: 427-429.
- Schuurhof A, Janssen R, Groot H, Hodemaekers HM, Klerk A, Kimpen J, Bont L. Local interleukin-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with post-bronchiolitis wheeze Abstract. *Respiratory Research*, 2011, 12: 121.
- Тютюнник В.Л. Хроническая плацентарная недостаточность при бактериальной и вирусной инфекции (патогенез, диагностика, профилактика, лечение). Автореф дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2002. / Tyutyunnik V.L. Chronic placental insufficiency in pregnancies complicated by bacterial and viral infections (pathogenesis, diagnostics, prophylaxis, treatment). PhD thesis abstract, Moscow, 2002.
- Hui L, Challis D. Diagnosis and management of fetal growth restriction: the role of fetal therapy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2008, 22(1): 139-158.
- Moscuzza F, Belcari F, Nardini V, Bartoli A, Domenici C, Cuttano A, Ghirri P, Boldrini A. Correlation between placental histopathology and fetal/neonatal outcome: chorioamnionitis and funisitis are associated to intraventricular haemorrhage and retinopathy of prematurity in preterm newborns. *Gynecol Endocrinol*, 2011, 27(5): 319-323.
- Зубков В.В., Рюмина И.И., Михайлова О.И., Тютюнник В.Л. Частота развития инфекционно-воспалительных заболеваний новорожденных при плацентарной недостаточности. *Акушерство и гинекология*, 2012, 3: 65-70. / Zubkov V.V., Ryumina I.I., Mikhailova O.I., Tyutyunnik V.L. The frequency of infectious and inflammatory diseases in newborns with placental insufficiency. *Akush. i Gin.*, 2012, 3: 65-70.
- Тирская Ю.И., Белкова Т.Н., Рудакова Е.Б., Долгих Т.И., Шакина И.А. Врачебная тактика при внутриутробных инфекциях. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*, 2011, 8: 42-47. / Tirskaia Yu.I., Belkova T.N., Rudakova E.B., Dolgikh T.I., Shakina I.A. Management of congenital infections. *Epidemiology and infectious diseases. Actual questions*, 2011, 8: 42-47.
- Farkash E, Weintraub AY, Sergienko R, Wiznitzer A, Zlotnik A, Sheiner E. Acute antepartum pyelonephritis in pregnancy: a critical analysis of risk factors and outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2012, 162 (1): 24-27.
- Sacco G, Carmagnola D, Abati S, Luglio PF, Ottolenghi L, Villa A, Maida C, Campus G. Periodontal disease and preterm birth relationship: a review of the literature. *Minerva Stomatol*, 2008, 57(5): 233-246, 246-250.
- Vedmedovska N, Rezeberga D, Teibe U, Zodzika J, Donders GG. Preventable maternal risk factors and association of genital infection with fetal growth restriction. *Gynecol Obstet Invest*, 2010, 70(4): 291-298.
- Bose C, Van Marter LJ, Laughon M, O'Shea TM, Allred EN, Karna P, Ehrenkranz RA, Boggess K, Leviton A. Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. Extremely Low Gestational Age Newborn Study Investigators. *Pediatrics*, 2009, 124(3): 450-458.
- Amu S, Hahn-Zoric M, Malik A, Ashraf R, Zaman S, Kjellmer I, Hagberg H, Padyukov L, Hanson LA. Cytokines in the placenta of Pakistani newborns with and without intrauterine growth retardation. *Pediatr Res*, 2006, 59(2): 254-258.
- Neta G, von Ehrenstein OS, Goldman LR, Lum K, Sundaram R, Andrews W, Zhang J. Umbilical cord serum cytokine levels and risks of small-for-gestational-age and preterm birth. *Am J Epidemiol*, 2010, 171(8): 859-867.