

2016; (1): 93–104. [Pushkarev B.S., Vitkovskiy Yu.A. Calcium channels. Part II. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2016; (1): 93–104. (In Russ.)]

7. Mannhardt I., Breckwoldt K., Letuffe-Brenière D. et al. Human engineered heart tissue: Analysis of contractile force. *Stem. Cell Reports*. 2016; 7 (1): 29–42.

DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.04.011.

8. Дымшиц Г.М., Саблина О.В. «Разорванные» гены и сплайсинг. *Вавиловский ж. генетики и селекции*. 2014; 18 (1): 71–80. [Dymshits G.M., Sablina O.V. «Split» genes and splicing. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2014; 18 (1): 71–80. (In Russ.)]

УДК 616.9-053.34-037: 575.174.015.3: 616.002.1

© 2017 Рагимова Н.Д., Гулиев Н.Д.

КЛИНИКО-ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НОВОРОЖДЁННЫХ С ПЕРИНАТАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Наиля Джалил кызы Рагимова*, Насиб Джафар оглы Гулиев

НИИ педиатрии им. К. Фараджевой, г. Баку, Азербайджан

Поступила 10.04.2017; принята в печать 24.04.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-362

Цель. Изучение цитокинового статуса и ассоциации полиморфизма промоторных регионов генов интерлейкинов -6, -10 и 18 у новорождённых с перинатальными инфекциями.

Методы. Проведено комплексное обследование 743 новорождённых с перинатальными инфекциями. Определение уровня интерлейкинов-1β, -6, -10, -18 и фактора некроза опухоли α выполняли стандартным методом твердофазового («сэндвич»-вариант) иммуноферментного анализа. Полиморфные варианты генов анализировали методами полимеразной цепной реакции и полиморфизма длины рестрикционных фрагментов.

Результаты. Результаты полученных данных свидетельствуют об общей тенденции повышения уровня цитокинов как у доношенных, так и у недоношенных детей с перинатальными инфекциями. Проведённое нами исследование позволило установить значимость аллельных вариантов интерлейкина-6 в позициях -174 G/C, -572 G/C, -597 G/A, интерлейкина-10 в позициях -1082 G/C, -819 T/C, интерлейкина-18 в позициях -656 T/G, -137 G/C в риске возникновения и развития инфекций. Установлено, что носительство аллеля G интерлейкина-6 в позиции -174 и -572, аллеля C интерлейкина-10 в позиции -819, аллеля C интерлейкина-18 в позиции -137 и аллеля G в позиции -656 ассоциировано с риском перинатальных инфекций у новорождённых.

Выводы. У новорождённых с перинатальными инфекциями выявлено наличие дисбаланса в цитокиновом профиле, подтверждающееся повышением уровня провоспалительных цитокинов (интерлейкины-1β, -6, -18, фактор некроза опухоли α) и снижением уровня противовоспалительного цитокина (интерлейкин-10) в сравнении с неинфицированными детьми. Аллельные варианты генов цитокинов интерлейкина-6 в позиции -572 G/C, интерлейкина-10 -819 T/G и интерлейкина-18 -652 T/G и 137 G/C имеют значимую ассоциацию с инфекционными заболеваниями. Повышенный риск развития внутриутробных инфекций формируют генотипы GG интерлейкина-6, TT интерлейкина-10, а также TT и GG интерлейкина-18. Определение частот гаплотипов и гаплогенотипов в популяциях здоровых и больных детей выявило благоприятные гаплотипы: GCC и GGG интерлейкина-6, ATA интерлейкина-10, AGG и CGC интерлейкина-18.

Ключевые слова: перинатальные инфекции, новорождённые, цитокины, полиморфизмы генов, прогноз.

CLINICAL AND IMMUNOGENETIC FEATURES OF NEONATES WITH PERINATAL INFECTIONS

N.Dzh. Ragimova, N.Dzh. Guliev

Scientific Research Institute of Pediatrics named after K. Faradzheva, Baku, Azerbaijan

Aim. Investigation of cytokine status and the association between promoter regions polymorphism of interleukin-6, -10 and -18 genes in neonates with perinatal infections.

Methods. Complex examination of 743 neonates with perinatal infections was conducted. The level of interleukin-1β, -6, -10, -18, and TNFα was measured with the use of standard method of enzyme-linked immunosorbent assay («sandwich» variant). Polymorphic variants of genes were analyzed with the methods of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

Results. The results of the received data are indicative of the general tendency to increasing level of cytokines both in full-term and preterm infants with perinatal infections. Our study revealed the role of allelic variants at positions -174 G/C, -572 G/C, -597 G/A of interleukin 6, at positions -1082 G/C, -819 T/C of interleukin-10 and at positions -656 T/G, -137 G/C of interleukin-18 genes in the risk of development and progression of infections. It was determined that the presence of G allele at -174 and -572 positions of interleukin-6 gene, C allele at -819 and -137 positions of interleukin-10 and -18 genes, respectively, and G allele at -656 position of interleukin-18 gene was associated with the risk of perinatal infections in newborns.

Conclusions. In neonates with perinatal infections imbalance of cytokine profile was revealed, that can be confirmed by increased level of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1β, -6, -18, and TNFα) and decreased level of anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) compared to uninfected neonates. Allelic variants of cytokine gene of interleukin-6 at position -572 G/C, interleukin-10 at position -819 T/G and interleukin-18 at position -652 T/G and 137 G/C are significantly associated with infectious diseases. Increased risk of prenatal infections is associated with genotypes GG of interleukin-6, TT of interleukin-10 and TT and GG of interleukin-18. Detection of haplotypes and haplogenotypes in the population of healthy and infected neonates revealed favorable haplotypes: GCC and GGG of interleukin-6, ATA of interleukin-10 and AGG and CGC of interleukin-18.

Keywords: perinatal infections, newborns, cytokines, gene polymorphisms, prognosis.

Перинатальные инфекции являются наиболее важными и дискуссионными проблемами современной неонатологии, так как они занимают ведущее место в причине мертворождаемости, преждевременных родов, младенческой смертности, заболеваемости и ранней инвалидизации [1–3]. Неуклонный рост данной патологии связан с неспецифическим инфекционным процессом у женщин во время беременности, латентным и субклиническим течением заболевания, а также полиморфизмом клинической картины у детей первых месяцев жизни [4, 5].

Внутриутробная инфекция развивается на фоне незрелой иммунной системы плода, а также пониженной способности клеток новорождённых синтезировать некоторые цитокины и иммуноглобулины [6, 7]. При внедрении патогенов специфичность иммунологических реакций и характер протекания воспалительного ответа определяются различиями в генах, контролируемых защитные реакции организма. При этом первостепенную роль играют регуляторные регионы генов, обеспечивающие синтез медиаторов-цитокинов.

Наиболее частыми мутациями, встречаемыми в генах цитокинов, бывают полиморфизмы одиночных нуклеотидов. В зарубежной литературе их обозначают как SNP (от англ. Single Nucleotide Polimorfizm). Для многих генов цитокинов известны SNP, локализирующиеся в регуляторных участках генов, что способствует их влиянию на транскрипционную активность, соответственно увеличивая или уменьшая уровень цитокина в плазме крови [8–10].

В последние годы активно изучают роль цитокинов в регуляции состояния иммунной системы при развитии и протекании инфекционных болезней. Проведение комплексной оценки влияния аллельных вариантов генов и их комбинаций на риск развития инфекций у новорождённых вносит существенный вклад в понимание механизмов развития инфекции. Однако существуют противоречивые данные по влиянию полиморфизма генов цитокинов на риск развития неонатальных инфекций [11, 12].

Целью настоящего исследования было изучение цитокинового статуса и ассоциации полиморфизма промоторных регионов генов интерлейкинов (ИЛ) — ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-18 — у новорождённых с перинатальными инфекциями.

Проведено проспективное комплексное

обследование 817 новорождённых, находившихся на стационарном лечении в отделениях анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии, а также патологии доношенных и недоношенных Научно-исследовательского института педиатрии им. К.Я. Фараджевой (Баку, Азербайджан) в период 2012–2016 гг. Основную группу (734 ребёнка) составили новорождённые с внутриутробными инфекциями: цитомегаловирусной (ЦМВИ), инфекцией, вызванной вирусом простого герпеса 2-го типа, токсоплазмозом, бактериальной инфекцией. Контрольную группу составили 83 условно здоровых новорождённых без внутриутробной инфекции.

По результатам комплексного обследования с учётом этиологии заболевания 734 новорождённых с перинатальными инфекциями были распределены на три группы.

– Первая группа — 397 новорождённых с внутриутробной ЦМВИ.

– Вторая группа — 215 новорождённых со смешанной (микст) инфекцией. Среди них у 158 новорождённых была диагностирована ЦМВИ и инфекция, вызванная вирусом простого герпеса 2-го типа, у 12 — ЦМВИ и токсоплазмоз, у 45 — ЦМВИ и бактериальная инфекция.

– Третья группа — 122 новорождённых с бактериальной инфекцией (неонатальным сепсисом). В данной группе бактериологическое исследование крови выявило у 67 (54,9±4,5%) детей *Staphylococcus aureus*, у 24 (19,7±3,6%) — *Streptococcus spp.*, у 16 (13,1±3,1%) — *Klebsiella spp.*, у 15 (12,3±3,0%) — *Escherichia coli*. Все виды возбудителей присутствовали в концентрациях 10^5 – 10^7 колониеобразующих единиц в 1 мл.

Доношенным с массой тела при рождении более 2500 г родился 301 новорождённый, недоношенными — 433 ребёнка, в том числе с низкой массой тела при рождении — 245 (56±2,4%) детей, с очень низкой массой тела — 65 (15±1,7%), с экстремально низкой массой тела — 14 (3,2±0,9%) новорождённых.

Средний гестационный возраст доношенных на момент рождения составил $38,5 \pm 0,2$ нед, недоношенных — $33,9 \pm 0,1$ нед. Масса тела доношенных на момент рождения составила в среднем $3328,3 \pm 28,3$ г, недоношенных — $2035,9 \pm 27,8$ г. В группе находившихся под наблюдением новорождённых были 456 (62,17±1,8%) мальчиков и 278 (37,9±1,8%) девочек.

Возраст матерей детей с перинатальной инфекцией колебался от 17 до 53 лет и составил в среднем $25,8 \pm 0,2$ года. Первородящих было 333 ($45,4 \pm 1,8\%$), первородящих — 445 ($60,6 \pm 1,8\%$), повторнородящих — 289 ($39,4\%$).

Всем детям были проведены динамическое клиническое наблюдение, базисное лабораторное обследование, биохимическое обследование; выборочно при наличии показаний — бактериологическое исследование крови, мочи, кала.

Для выявления структурных изменений со стороны центральной нервной системы детям обследуемых групп провели нейросонографическое исследование на аппарате ALOKA SSD — 3500 SV, Medison X-6 с мультислотным линейным датчиком 7,5 Гц, конвексным датчиком 5 Гц, по показаниям — компьютерную томографию головного мозга и магнитно-резонансную томографию. Всем детям было проведено ультразвуковое исследование внутренних органов. По показаниям использовали трансабдоминальное исследование кишечника. Всем новорождённым выполнена рентгенография органов грудной клетки и брюшной полости. Детям с судорожным синдромом проводили электроэнцефалографию.

Верификацию этиологического диагноза выполняли методом иммуноферментного анализа для обнаружения специфических антител (иммуноглобулинов классов М и G) к ЦМВИ, вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «NovaLisa» (Германия) на анализаторе Sirio (Италия). Для уточнения этиологии врождённой инфекции также проведено исследование биологических сред ребёнка (крови, слюны, мочи) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Определение ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-18 и фактора некроза опухоли α (ФНО α) выполняли стандартным методом твердофазового («сэндвич»-вариант) иммуноферментного анализа с использованием диагностических тест-систем производства «Вектор-Бест» (Новосибирск) на анализаторе Elisys Uno Human (Германия). Образцы сыворотки крови (0,5–1,0 мл) исследуемых новорождённых, взятые на 3–5-е сутки жизни, хранили при температуре -20°C .

Полиморфизм генов промоторных регионов ИЛ-6 в позициях -174 G/C , -572 G/C , -597 G/A , ИЛ-10 в позициях -1082 G/A , -819 T/C , ИЛ-18 в позициях -656 T/G ,

-137 G/C определяли у 76 здоровых детей и 50 новорождённых с перинатальными инфекциями. Генотипирование проводили методами ПЦР с анализом длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP).

ПЦР осуществляли в амплификаторе (Gene Amp 9700 Applied Biosystems Thermal Cycler) по следующим этапам: денатурация дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) при температуре 94°C в течение 5 мин, инкубирование при температуре 72°C в течение 7 мин. При амплификации генов различных цитокинов использовали олигонуклеотидные праймеры, комплементарные фланкирующим областям амплифицируемого ДНК-фрагмента. Полиморфизм генов цитокинов изучали с помощью аллель-специфичной ПЦР с последующей детекцией в электрофорезе.

Амплифицированные фрагменты ДНК при помощи специфических рестриктаз расщеплялись на фрагменты. Фрагменты RFLP наносили на 2% агарозные гели. В последующем гелевые пластинки окрашивали 0,05% раствором бромистого этидия. Для определения фрагментов ДНК гели фотографировали камерой Bio Rad Gel Doc 1000. Частоту соответствующих аллелей и генотипов рассчитывали по агарозным гелям.

Для оценки статистической значимости параметрических признаков применяли критерий Стьюдента. Сравнительный анализ непараметрических признаков осуществляли при помощи χ^2 -теста. Статистический анализ проведён с использованием программ Excel и SPSS 20.0.

Чаще других в группе с внутриутробной инфекцией выявлены такие факторы риска, как отягощённый соматический ($54,0 \pm 1,8\%$), гинекологический ($45,0 \pm 1,8\%$), акушерский анамнез (медицинские аборты — $20,2 \pm 1,5\%$, выкидыши — $19,5 \pm 1,5\%$), а также высокая частота осложнённого течения беременности и родов (гестозы — $42,4 \pm 1,7\%$, анемия — $32,6 \pm 1,7\%$, оперативные роды — $27,0 \pm 1,6\%$).

Изучение особенностей неврологического статуса у новорождённых с различными внутриутробными инфекциями показало высокую частоту и степень выраженности неврологических симптомов у детей. По данным нейросонографии, у инфицированных детей выявлены гипоксически-ишемические (378 ; $51,5 \pm 1,8\%$), гипоксически-геморрагические (239 ; $32,6 \pm 1,7\%$), инфекционные (28 ; $3,8 \pm 0,7\%$) поражения центральной нервной системы.

Цитокиновый статус новорождённых с перинатальными инфекциями

Показатели, пг/мл		Контрольная группа	Первая группа (n=16)	Вторая группа (n=13)	Третья группа (n=16)
ИЛ-1 β	доношенные	4,9 \pm 0,47 (3,1–6,1)	12,9 \pm 2,0 (3,9–29,2)**	22,1 \pm 3,1 (3,2–38,7)***^	17,9 \pm 1,6 (10,6–27,1)***
	недоношенные	2,8 \pm 0,2 (1,9–3,6)	14,2 \pm 2,5 (3,1–28,3)***	9,5 \pm 1,9 (5–20,1)**	21,8 \pm 3,4 (6,9–34,8)***.n.s.##
ИЛ-6	доношенные	4,7 \pm 0,2 (4–6,1)	14,6 \pm 1,3 (4,2–22)***	18,3 \pm 2,3 (6,2–29,6)***	30,8 \pm 3,5 (16,3–49,6)***^^##
	недоношенные	3,4 \pm 0,1 (3–4)	12,7 \pm 1,6 (4,7–23)***	16,1 \pm 2,0 (5,5–23,8)***	28,2 \pm 2,2 (13,9–42,8)***^^###
ИЛ-10	доношенные	6,7 \pm 0,3 (5,5–9,1)	2,1 \pm 0,2 (1,3–4,1)***	2,4 \pm 0,2 (1,1–3,6)***	2,0 \pm 0,2 (1,1–3,28)***
	недоношенные	3,7 \pm 0,3 (2,8–5,5)	2,5 \pm 0,2 (1,4–3,8)***	2,1 \pm 0,2 (1,1–3,2)***	2,0 \pm 0,1 (1,2–2,7)***
ИЛ-18	доношенные	186,0 \pm 13,7 (106,7–270,2)	276,7 \pm 18,6 (162–368)**	392,2 \pm 24,3 (240,6–569,8)***^^^	435,4 \pm 36,0 (310,3–596,6)***^^^
	недоношенные	115,3 \pm 4,5 (102–146,8)	254,5 \pm 20,5 (152–377)***	358,8 \pm 27,0 (200–491,2)***	449,0 \pm 31,1 (309,4–596,7)***^^^#
ФНО α	доношенные	2,5 \pm 0,2 (1,7–3,2)	4,6 \pm 1,4 (0,9–22,2) ^{n.s.}	7,4 \pm 1,2 (3,2–17,8)**	5,8 \pm 0,6 (3,0–8,7)***
	недоношенные	1,5 \pm 0,2 (0,6–2,8)	3,3 \pm 1,0 (0,7–15,1)	6,1 \pm 1,3 (2,9–13,8)**	4,9 \pm 0,5 (1,9–6,2)***

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$. M — среднее значение; m — стандартная ошибка; (min–max) — размах вариации, минимальные и максимальные значения ряда. Статистическая значимость различий: с показателями контрольной группы — * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; с показателями первой группы — ^ $p_1 < 0,05$, ^^ $p_1 < 0,01$, ^^ $p_1 < 0,001$; с показателями второй группы — # $p_2 < 0,05$, ## $p_2 < 0,01$, ### $p_2 < 0,001$, ^{n.s.} недостоверная разница. ИЛ — интерлейкин; ФНО α — фактор некроза опухоли α .

В структуре церебральных расстройств у новорождённых с перинатальной инфекцией доминировал синдром угнетения центральной нервной системы (406; 55,3 \pm 1,8%) в виде снижения уровня церебральной активности, мышечной гипотонии, гипорефлексии. Среди патологических неврологических симптомов также отмечены синдром гипервозбудимости у 322 (42,9 \pm 1,8%) детей, гипертензионно-гидроцефальный синдром — у 322 (42,9 \pm 1,8%) новорождённых, судорожный синдром — у 143 (19,5 \pm 1,5%), синдром вегетативно-висцеральных нарушений — у 87 (11,9 \pm 1,2%) новорождённых.

Наиболее часто регистрировали поражения дыхательной системы (пневмония, респираторный дистресс-синдром) — в 371 (50,5 \pm 1,8%) случае. Патологическая гипербилирубинемия (271 \pm 6,0 мкмоль/л) в 2 раза чаще отмечалась у инфицированных, чем у неинфицированных детей. Фетальный гепатит был выявлен у 135 (18,4 \pm 1,4%), энтероколит — у 165 (22,5 \pm 1,5%), поражение почек — у 83 (11,3 \pm 1,2%) новорождённых с перинатальными инфекциями.

Одной из основных задач настоящего исследования было изучение особенностей цитокинового статуса новорождённых с перинатальными инфекциями в зависимости от гестационного возраста.

Результаты полученных данных, представленные в табл. 1, свидетельствуют об общей тенденции повышения уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-18, ФНО α) как у доношенных, так и у недоношенных детей с перинатальными инфекциями. Иной характер носят изменения уровня ИЛ-10. В отличие от провоспалительных цитокинов содержание ИЛ-10 у доношенных и недоношенных с ЦМВИ и смешанной инфекцией уменьшается по сравнению с детьми контрольной группы (см. табл. 1).

Согласно данным, представленным в табл. 1, у новорождённых с бактериальными инфекциями содержание ИЛ-6 и ИЛ-1 β достигает наивысшего уровня по сравнению с контролем.

Концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови у доношенных была выше в 6,5 раза уровня новорождённых контрольной группы, в 2,1 раза — показателей новорождённых первой группы, в 1,4 раза — второй группы. Уровень ИЛ-6 у недоношенных достоверно превысил в 8,2 раза контроль, а также был выше в 2,2 раза по отношению к первой группе и в 1,8 раза — ко второй.

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов по локусу интерлейкина-6 (ИЛ-6) у здоровых и больных новорождённых

Генотип	Контрольная группа (n=76), абс. (%)	Больные новорождённые (n=50), абс. (%)
ИЛ-6 –174 G/C		
GG	26 (34,2)	27 (54)
GC	14 (18,4)	11 (22)
CC	36 (47,4)	12 (24)
Частота аллелей		
G	33 (43,4)	32,5 (65)
C	43 (56,6)	17,5 (35)
Равенство Харди–Вайнберга	$\chi^2=0,00^{**}$	$\chi^2=0,001^{**}$
ИЛ-6 –572 G/C		
GG	37 (48,7)	38 (76)
GC	26 (34,2)	12 (24)
CC	13 (17,1)	0 (0)
Частота аллелей		
G	50 (65,8)	44 (88)
C	26 (34,2)	6 (12)
Равенство Харди–Вайнберга	$\chi^2=0,248^{n.s.}$	$\chi^2=0,548^{n.s.}$
ИЛ-6 –597 G/A		
GG	39 (51,3)	27 (54)
GA	25 (32,9)	13 (26)
AA	12 (15,8)	10 (20)
Частота аллелей		
G	51,5 (67,8)	33,5 (67)
A	24,5 (32,2)	16,5 (33)
Равенство Харди–Вайнберга	$\chi^2=0,201^{n.s.}$	$\chi^2=0,018^*$

Примечание: статистическая значимость различий с показателями контрольной группы — *p <0,05, **p <0,01; n.s. недостоверная разница.

Содержание ИЛ-1 β у доношенных новорождённых с бактериальной инфекцией было выше в 3,7 раза по сравнению с контролем, в 1,4 раза — по сравнению с первой группой, в 1,2 раза — по сравнению со второй группой. У недоношенных этой же группы содержание ИЛ-1 β было в 7,8 раза выше по сравнению с контрольной группой, в 1,5 раза — по сравнению с первой группой, в 2,3 раза — по сравнению со второй группой.

Обнаружено, что у доношенных с бактериальной инфекцией уровень ИЛ-18 и ФНО α в 2,3 и 2,3 раза, а у недоношен-

ных — в 3,9 и 3,2 раза выше аналогичных показателей у здоровых детей.

Согласно полученным данным, уровень цитокинов у новорождённых в зависимости от этиологии заболевания значительно варьирует. Самый высокий уровень цитокинов, особенно ИЛ-6 и ИЛ-1 β , зарегистрирован при смешанной инфекции, а также у новорождённых с бактериальной инфекцией по сравнению с ЦМВ-инфекцией.

При сравнительном анализе аллельных вариантов промоторных регионов генов ИЛ-6, -10 и -18 выявлены статистически значимые различия между здоровыми и инфицированными новорождёнными (табл. 2).

В позиции –174 G/C ИЛ-6 установлена более высокая частота аллеля G у больных новорождённых по сравнению со здоровыми (43,4%). Аллель C в данной позиции превалирует у здоровых новорождённых. Аналогичная зависимость зарегистрирована у генотипов GG и CC. Определённая связь установлена между аллельными вариантами гена ИЛ-6 в позиции –572 G/C. Частота аллеля C значительно ниже у больных новорождённых. Помимо этого, гомозиготы CC не встречаются у больных детей, у здоровых же составляют 17,1%. Статистически значимая корреляция между аллельными вариантами G/A в позиции –597 не обнаружена. Проведённое нами исследование промоторного региона гена ИЛ-6 в позициях –174 и –572 показало, что замена C→G увеличивает риск заболеваемости перинатальными инфекциями.

Определение частоты генотипов и аллелей промоторного региона ИЛ-10 в позициях –592 A/C и –819 T/C выявило достоверно значимую разницу между здоровыми и инфицированными новорождёнными, ассоциированную с однонуклеотидными заменами.

Высокий уровень аллеля C и генотипа CC в позиции –819 связан с развитием инфекции у новорождённых. Генотип TT встречается только в группе здоровых детей, составляя 18,4%, у инфицированных больных отмечен нулевой показатель. Статистически значимых различий в позиции –1082 G/A между группами больных и здоровых новорождённых не обнаружено (табл. 3).

Мы также изучили аллельные варианты в промоторном участке гена ИЛ-18 (–656 C/T, –137 G/C) в группе здоровых и инфицированных новорождённых. При сравнительном анализе гена ИЛ-18 в по-

Таблица 3

Частота генотипа и аллелей локуса интерлейкинов-10, -18 у новорождённых с перинатальными инфекциями

Таблица 4

Частота гаплотипов и гаплогенотипов по локусу интерлейкинов-6, -10 и -18 у здоровых и больных новорождённых

Генотип	Контрольная группа (n=76), абс. (%)	Больные новорождённые (n=50), абс. (%)
ИЛ-10 –1082 G/A		
GG	5 (6,6)	7 (14,0)
GA	30 (39,5)	18 (36,0)
AA	41(53,9)	25 (50,0)
Частота аллелей		
G	20 (26,3)	16 (32,0)
A	56 (73,7)	34 (68,0)
Равенство Харди-Вайнберга	$\chi^2=0,996^{n.s.}$	$\chi^2=0,442^{n.s.}$
ИЛ-10 –819 T/C		
TT	14 (18,4)	0 (0,0)
TC	32 (42,1)	16 (32,0)
CC	30 (39,5)	34 (68,0)
Частота аллелей		
T	30 (39,5)	8 (16,0)
C	46 (60,5)	42 (84,0)
Равенство Харди-Вайнберга	$\chi^2=0,730^{n.s.}$	$\chi^2=0,175^{n.s.}$
ИЛ-18 –656 T/G		
TT	23 (30,3)	1 (2)
TG	34 (44,7)	29 (58)
GG	19 (25)	20 (40)
Частота аллелей		
T	40 (52,6)	15,5 (31)
G	36 (47,4)	34,5 (69)
Равенство Харди-Вайнберга	$\chi^2=0,770^{n.s.}$	$\chi^2=0,016^*$
ИЛ-18–137 G/C		
GG	53 (69,7)	26 (52)
GC	15 (19,8)	13 (26)
CC	8 (10,5)	11 (22)
Частота аллелей		
G	60,5 (79,6)	32,5 (65)
C	15,5 (20,4)	17,5 (35)
Равенство Харди-Вайнберга	$\chi^2=0,041^*$	$\chi^2=0,008^{**}$

Примечание: ИЛ — интерлейкин; статистическая значимость различий — *p <0,05; **p <0,01; n.s. недостоверная разница.

Генотип	Контрольная группа (n=76), n (%)	Больные новорождённые (n=50), n (%)
ИЛ-6, генотип –597, –572, –174		
Гаплотип		
GGG	25,5 (33,6)	27,5 (55)
AGC	24,5 (32,2)	16,5 (33)
GCG	7,5 (9,9)	5 (10)
GCC	18,5 (24,3)	1 (2)
χ^2	0,004**	
Гаплогенотип		
GGG/GGG	15 (19,7)	20 (40)
GGG/AGC	10 (13,1)	8 (16)
AGC/AGC	12 (15,8)	10 (20)
GGG/GCG	11 (14,5)	7 (14)
AGC/GCG	4 (5,3)	3 (6)
GCC/GCC	13 (17,1)	0 (0)
AGC/GCC	11(14,5)	2 (4)
χ^2	0,01**	
ИЛ-10, генотип –1082, –819, –592		
Гаплотип		
GCC	20 (26,3)	16 (32,0)
ACC	26 (34,2)	26 (52,0)
ATA	30 (39,5)	8 (16,0)
χ^2	0,017*	
Гаплогенотип		
GCC/GCC	5 (6,6)	7 (14,0)
GCC/ACC	15 (19,7)	12 (24,0)
GCC/ATA	15 (19,7)	6 (12,0)
ACC/ACC	10 (13,2)	15 (30,0)
ATA/ATA	14 (18,4)	0 (0,0)
ACC/ATA	17 (22,4)	10 (20,0)
χ^2	0,005**	
ИЛ-18, генотип +105, –656, –137		
Гаплотип		
ATG	34 (44,7)	15,5 (31)
AGG	20,5 (27,0)	17 (34)
CGC	15,5 (20,4)	17,5 (35)
CTG	6 (7,9)	0 (0)
χ^2	0,045*	

Продолжение таблицы 4

Гаплогенотип		
ATG/ATG	11 (14,5)	1 (2)
ATG/CGC	15 (19,7)	13 (26)
ATG/CGC	19 (25,0)	16 (32)
ATG/AGG	11 (14,5)	—
AGG/AGG	8 (10,5)	11 (22)
CGC/CGC	12 (15,8)	0 (0)
χ^2	0,005**	

Примечание: ИЛ — интерлейкин; статистическая значимость различий — * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

зиции –656 установлена точечная замена T→G у больных новорождённых. В контрольной группе гомозиготы TT составляют 30,3%, в популяции инфицированных — только 2%. Соответственно количество гомозигот GG (25%) в популяции здоровых детей было значительно ниже по сравнению с больными. Замены нуклеотидов G→T в промоторном регионе гена ИЛ-18 в позиции –656, а также в позиции –137 G→C у больных новорождённых свидетельствует об ассоциированности SNP с риском заболеваемости.

Полиморфные варианты генов ИЛ локализованы на одной хромосоме и образуют группу сцепления, совместно передающуюся потомству, что позволяет провести гаплотипный анализ. Возникшие в результате одиночных нуклеотидных замен несбалансированные корреляции (disequilibrium linkage) вносят существенный вклад в формирование различных гаплотипов и гаплогенотипов.

Согласно литературным данным и результатам собственных исследований, можно утверждать, что аллели генов, а также их сочетания обуславливают различия в подверженности перинатальным инфекциям. В связи с присутствием в изучаемых локусах несбалансированного сцепления изменяется частота гаплотипов и гаплогенотипов. Результаты сравнительного анализа гаплотипов и гаплогенотипов по локусам ИЛ-6, -10 и -18 у здоровых и больных новорождённых представлены в табл. 4.

Сравнительный анализ гаплотипов и гаплогенотипов локуса ИЛ-6 показал достоверно значимую разницу между здоровыми и больными новорождёнными. Гаплотип GCC встречается у 18 (24,3%) детей контрольной группы и только 1 (2%) больного. Гаплотип GGG характерен для больных новорождённых (55%), у здоро-

вых его доля составляет 33,6%.

Согласно полученным данным, высокая устойчивость к патогенам отмечена у новорождённых с гаплогенотипом GCC/GCC, поскольку данный гаплотип присутствует у 17,1% детей контрольной группы, тогда как у больных новорождённых данный гаплогенотип не встречается. В популяции больных новорождённых гаплогенотип GGG/GGG встречается в 2 раза чаще по сравнению со здоровыми.

Статистически значимые различия по гаплотипам и гаплогенотипам между здоровыми и инфицированными новорождёнными установлены по локусу гена ИЛ-10. Гаплотип АТА ИЛ-10 ассоциирован с популяцией здоровых детей. Гаплотип ACC чаще встречается у больных новорождённых — 52%, у здоровых новорождённых его доля составляет 34,2%. Гомозиготные носители гаплогенотипа АТА/АТА в популяции здоровых детей составляют 18,4%, в то время как у больных они не встречаются. Гомозиготные гаплогенотипы ACC/ACC у больных новорождённых встречаются в 2,4 раза чаще. Из полученных данных следует, что носители гаплотипов ACC и GCC, гаплогенотипов GCC/GCC и ACC/ACC входят в группу риска по врождённым инфекциям. Гаплотип АТА, а также гаплогенотипы GCC/АТА и АТА/АТА характеризуются как комбинации благоприятных аллелей.

При сравнительном анализе частоты гаплотипов и гаплогенотипов в популяциях здоровых и инфицированных новорождённых ИЛ-18 выявлены носители благоприятных аллелей и групп риска. В группу риска входят носители гаплотипов AGG и CGC. Гомозиготы ATG/ATG встречаются в основном в популяции здоровых новорождённых, из инфицированных детей только 1 из 50 — носитель данного гаплогенотипа. Благоприятно также сочетанное носительство ATG/CTG, составляющее в контроле 15,8% и отсутствующее в группе больных детей. Гомозиготное носительство гаплогенотипа CGC/CGC наоборот двукратно увеличивает риск заболеваемости инфекционными заболеваниями.

Проведённое нами исследование позволило установить значимость аллельных вариантов ИЛ-6 в позициях –174 G/C, –572 G/C, –597 G/A, ИЛ-10 в позициях –1082 G/A, –819 T/C, ИЛ-18 в позициях –656 T/G, –137 G/C в риске возникновения и развития инфекций у новорождённых.

ных. Согласно полученным данным, увеличение аллеля G гена ИЛ-6 в позициях -174 G/C и -572 G/C — серьёзный предрасполагающий фактор развития перинатальных инфекций у новорождённых. Присутствие аллеля C и генотипа CC в позиции -819 ИЛ-10 также связано с развитием инфекций у новорождённых. Носители аллеля T в позиции -819 и аллеля A в позиции -592 гена ИЛ-18, а также гомозиготы TT и AA проявляют устойчивость к действию патогенов инфекционного генеза.

Полученные данные позволяют использовать полиморфизм генов цитокинов у новорождённых в качестве предиктора неонатальных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. У новорождённых (доношенных и недоношенных) с перинатальными инфекциями выявлено наличие дисбаланса в цитокиновом профиле, подтверждающееся повышением уровня провоспалительных цитокинов (интерлейкины-1 β , -6, -18 и фактор некроза опухоли α) и снижением уровня противовоспалительного цитокина (интерлейкин-10) в сравнении с неинфицированными детьми.

2. Аллельные варианты генов цитокинов интерлейкина-6 в позиции -572 G/C, интерлейкина-10 -819 T/G и интерлейкина-18 -652 T/G и 137 G/C имеют значимую ассоциацию с инфекционными заболеваниями. Повышенный риск развития внутриутробных инфекций формируют генотипы GG интерлейкина-6, TT интерлейкина-10, а также TT и GG интерлейкина-18.

3. Определение частоты гаплотипов и гаплогенотипов в популяциях здоровых и больных детей выявило благоприятные гаплотипы: GCC и GGG интерлейкина-6, ATA интерлейкина-10, AGG и CGC интерлейкина-18.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакхуйзен С.Е., де Хан Т.Р., Теюн М.Д. и др. Сепсис у новорождённых ассоциирован с высоким риском смерти и развития тяжёлых осложнений. Результаты метаанализа. *Неонатология: НМО*. 2015; (2): 17–27. [Bakhuyzen S. E., de Khayn T.R., Teyun M.D. et al. Sepsis in newborns is associated with high risk of death and development of severe complications. The results of meta-analysis. *Neonatologiya: NMO*. 2015; (2): 17–27. (In Russ.)] DOI: 10.1111/apa.12764.

2. Борисова Т.Л., Беседина М.В., Зайцева Н.С. и др. Особенности клинических проявлений и лечебной тактики при внутриутробных герпесвирусных инфекциях у детей первых месяцев жизни. *Педиатрия. Ж.*

им. Г.Н. Сперанского. 2015; 94 (1): 79–82. [Borisova T.L., Besedina M.V., Zajceva N.S. et al. The features of clinical manifestations and treatment tactics of herpes intrauterine infection in children during the first months of life. *Pediatrija. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2015; 94 (1): 79–82. (In Russ.)]

3. Колобов А.В., Меркулова А.И., Цинзерлинг В.А. Инфекционные поражения последа как причина невынашивания беременности. *Ж. инфектол.* 2015; 7 (1): 47–52. [Kolobov A.V., Merkulova A.I., Cinzerling V.A. Infectious lesions of placenta as cause of miscarriage. *Zhurnal infektologii*. 2015; 7 (1): 47–52. (In Russ.)] DOI: 10.22625/2072-6732-2015-7-1-47-52.

4. Verma I., Avasthi K., Berry V. Urogenital infections as a risk factor for preterm labor: a hospital-based case-control study. *J. Obstet. Gynaecol. India*. 2014; 64 (4): 274–278. DOI: 10.1007/s13224-014-0523-6.

5. *Red Book. Report of the Committon on infection diseases*. 29th. American Academy of Pediatrics. 2010: 935 p.

6. Долгих Т.П., Белкова Т.Н., Тирская Ю.И. и др. Клинико-иммунологические аспекты внутриутробных инфекций с поражением центральной нервной системы у новорождённых. *Цитокины и воспаление*. 2011; 10 (1): 46–50. [Dolghih T.P., Belkova T.N., Tirskaia Yu.I. et al. Clinical and immunological aspects of intrauterine infections with central nervous system damage in newborns. *Citokiny i vospalenie*. 2011; 10 (1): 46–50. (In Russ.)]

7. Кравченко Л.В., Афонин А.А. Особенности цитокинового статуса у детей первых месяцев жизни с генерализованной цитомегаловирусной инфекцией. *Педиатрия. Ж. им. Г.Н. Сперанского*. 2011; 90 (1): 39–43. [Kravchenko L.V., Afonin A.A. Peculiarities of cytokine status in infants during the first months of life with generalized cytomegaloviral infection. *Pediatrija. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2011; 90 (1): 39–43. (In Russ.)]

8. Ризванова Ф.Ф., Пикуза О.И. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов. *Практ. мед.* 2010; (45): 41–42. [Rizvanova F.F., Pikuza O.I. Genetic diagnosis: polymorphism of cytokine genes. *Prakticheskaja medicina*. 2010; (45): 41–42. (In Russ.)]

9. Силков А.Н., Шкаруба Н.С., Горева Е.П. и др. Аллельный полиморфизм и альтернативный сплайсинг в системе цитокинов. В кн.: *Иммунотопогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике*. Под ред. В.А. Козлова, С.В. Сеникова. Новосибирск: НГМУ. 2011; 46–48. [Silkov A.N., Shkaruba N.S., Goreva E.P. et al. Allelic polymorphism and alternative splicing in the cytokine system. In: *Immunopatogenez i immunoterapija osnovnyh zabolevanij cheloveka: ot jeksperimenta k klinike*. (Immunopathogenesis and immunotherapy of major human diseases: from the experiment to the clinic.) Ed. by V.A. Kozlov, S.B. Sennikov. Novosibirsk. 2011; 46–48. (In Russ.)]

10. Цыган В.Н., Иванов А.М., Камилова Т.А. и др. Генный полиморфизм иммуногенетической сигнальной системы. *Ж. инфектол.* 2011; 3 (2): 21–27. [Cygan V.N., Ivanov A.M., Kamilova T.A. Genetic polymorphism of immunogenic signaling system. *Zhurnal infektologii*. 2011; 3 (2): 21–27. (In Russ.)] DOI: 10.22625/2072-6732-2011-3-2-21-27.

11. Esposito S., Zampiero A., Pagni L. Genetic polymorphisms and sepsis in premature neonates. *PLoSOne*. 2014; 9 (7): e101248. DOI: 10.1371/journal.pone.0101248.

12. Reiman M., Kujari H., Ekholm E. et al. Interleukin-6 polymorphism is associated with chorioamnionitis and neonatal infections in preterm infants. *J. Pediatr.* 2008; 153 (1):19–24. DOI: 10.1016/j.jpeds.2008.02.009.