

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ *TNF*, *NOS3* И *MMP9* В РИСКЕ РАЗВИТИЯ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ

Меремьянина Е.А.^{1,2}, Свитич О.А.^{1,3}, Алиева А.И.⁴, Соболев В.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Резюме. Неонатальные пневмонии являются одной из самых распространенных причин детской смертности. Вместе с тем диагностика данной патологии представляет собой непростую задачу и требует поиска дополнительных решений в клиническо-лабораторной практике. Одним из современных и перспективных направлений в диагностике является поиск предиктивных маркеров в генах факторов врожденного и адаптивного иммунитета, которые задействованы в процессах развития патологии. Для подбора генов, имеющих весомое значение в развитии неонатальных пневмоний, мы использовали биоинформационный анализ. Далее методом полимеразной цепной реакции в реальном времени была исследована пуповинная кровь от 234 новорожденных на девять полиморфных маркеров в генах *TNF*, *IL10*, *IL17A*, *IL17F*, *IL6*, *NOS3* и *MMP9*. Статистический анализ полученных результатов показал ассоциацию гетерозиготных генотипов в генах *MMP9* и *TNF* с риском развития ранней неонатальной пневмонии, а также протективную роль гомозигот AA в гене *MMP9* и GG в гене *TNF*. Поиск ассоциаций с риском развития внутриутробной пневмонии выявил неблагоприятную роль гетерозиготных генотипов в генах *NOS3* и *MMP9*. Таким образом, при трудностях в диагностике и новорожденным, находящимся в группе риска по развитию неонатальной пневмонии, в дополнение к классическим методам исследования можно рекомендовать сделать генетический анализ на исследование полиморфных маркеров в генах *MMP9* (rs17576), *TNF* (rs1800629) и *NOS3* (rs1549758).

Ключевые слова: врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет, ранняя неонатальная пневмония, внутриутробная пневмония, полиморфные маркеры, биоинформационный анализ, полимеразная цепная реакция

Адрес для переписки:

Меремьянина Екатерина Андреевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (926) 184-14-89.
E-mail: ekatterine@gmail.com

Address for correspondence:

Meremianina Ekaterina A.
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (926) 184-14-89.
E-mail: ekatterine@gmail.com

Образец цитирования:

Е.А. Меремьянина, О.А. Свитич, А.И. Алиева,
В.В. Соболев «Роль полиморфных маркеров в генах
TNF, *NOS3* и *MMP9* в риске развития неонатальных
пневмоний» // Российский иммунологический журнал,
2020. Т. 23, № 3. С. 257-262.
doi: 10.46235/1028-7221-346-ARO
© Меремьянина Е.А. и соавт., 2020

For citation:

E.A. Meremianina, O.A. Svitich, A.I. Alieva, V.V. Sobolev
“A role of single nucleotide polymorphism in *TNF*, *NOS3* and
MMP9 genes at the risk of developing neonatal pneumonia”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 3, pp. 257-262.
doi: 10.46235/1028-7221-346-ARO
DOI: 10.46235/1028-7221-346-ARO

A ROLE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN *TNF*, *NOS3* AND *MMP9* GENES AT THE RISK OF DEVELOPING NEONATAL PNEUMONIA

Meremianina E.A.^{a, b}, Svitich O.A.^{a, c}, Alieva A.I.^d, Sobolev V.V.^a

^a I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

^c First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^d Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

Abstract. Neonatal pneumonia is one of the most common causes of infant mortality. Moreover, the diagnosis of this pathology represents a difficult task and requires to seek for additional solutions in clinical and laboratory practice. One of the current and promising ways to diagnose relies on search of predictive markers among the innate and adaptive immunity genes involved in disease pathogenesis. We used bioinformatics analysis to select genes playing essential role developing neonatal pneumonia. Next, cord blood samples collected from 234 newborns were examined by real-time polymerase chain reaction for nine polymorphic markers in the *TNF*, *IL10*, *IL17A*, *IL17F*, *IL6*, *NOS3*, and *MMP9* genes. The results of statistical analysis showed that heterozygous genotypes in the *MMP9* and *TNF* genes were associated with the risk of developing early neonatal pneumonia, and also the protective role of homozygotes AA in the *MMP9* gene and GG in the *TNF* gene. A search for associations with a risk of intrauterine pneumonia revealed an unfavorable role for heterozygous genotypes in the *NOS3* and *MMP9* genes. Thus, due to difficulties in diagnosis or in case of developing neonatal pneumonia, it may be recommended to add genetic analysis for assessing polymorphic markers in the *MMP9* (rs17576), *TNF* (rs1800629) and *NOS3* (rs1549758) genes along with standard test assays.

Keywords: innate immunity, adaptive immunity, neonatal pneumonia, congenital pneumonia, single nucleotide polymorphism, bioinformatic analysis, polymerase chain reaction

Введение

Одной из наиболее актуальных проблем современной неонатологии являются пневмонии новорожденных. Ежегодно во всем мире от пневмонии умирает до 500 000 детей в возрасте до 1 года [6]. Тяжесть и течение пневмонии зависят от множества факторов: срока гестации, веса новорожденного, инфекционного агента, наличия осложнений, произошло ли заражение внутриутробно или нет. Наиболее часто пневмония у преждевременно рожденных детей проявляется как системное ухудшение и сочетается с неинфекционными респираторными осложнениями недоношенности, что сильно усложняет проблему дифференциальной диагностики, определения типа пневмонии и тактики лечения. Для диагностики неонатальных пневмоний собирают клинические данные, проводят физикальное обследование, рентгенограмму, делают бактериологические посевы отделяемого из зева и трахеобронхиального аспирата, проводят гистологическое исследование плаценты, пуповины и плодных оболочек, а также выполняют ге-

матологические и серологические тесты. Однако не всегда возможно провести весь комплекс исследований вследствие особенностей строения новорожденного (наличие технических барьеров для отбора проб в нижних отделах дыхательных путей), более того, многие исследования имеют схожую картину при других патологиях (например, болезнь гиалиновых мембран имеет схожую клиническую и рентгенологическую картину), поэтому даже этого комплекса исследований бывает недостаточно, чтобы поставить точный диагноз.

Среди современных диагностических методов определенную нишу также занимают иммунологические анализы. Роль иммунных реакций в развитии неонатальных пневмоний была многократно продемонстрирована [2, 3]. В последнее время, наряду с классическими способами изучения факторов иммунитета, активно развивается направление генетических исследований, в частности изучение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах цитокинов и других иммунных факторов, играющих ключевую роль в развитии иммунного ответа. Исследование «полиморфиз-

мов» в генах факторов врожденного и адаптивно-го иммунитета может помочь и найти дополнительный инструмент для диагностики патологии, и адекватно оценить риски развития пневмонии, когда пациент еще здоров. Таким образом, **целью настоящего исследования** явилась оценка генетического риска развития неонатальных пневмоний на основании изучения полиморфных маркеров врожденного и адаптивного иммунитета.

Материалы и методы

Для исследования было собрано 234 образца пуповинной крови у новорожденных Дагестанской популяции. Образцы были распределены по группам (ранняя неонатальная пневмония (РНП) – 100 образцов; внутриутробная пневмония (ВУП) – 48 образцов; контрольная группа – 86 образцов) в соответствии с общепринятой классификацией неонатальных пневмоний [1]. Биоинформационный анализ был проведен с использованием программы Pathway Studio® и реферативной базы данных ResNet® (Ariadne Genomics, США). Отобранные полиморфные маркеры изучались методом полимеразной цепной реакции в реальном времени при помощи коммерческих наборов (Синтол, РФ; Литех, РФ). *IL10* rs1800896 и *TNF* rs1800629 изучались при помощи специально синтезированных праймеров и реактивов из набора для проведения ПЦР-РВ (Синтол, РФ). Маркер rs2275913 в гене *IL17A* исследовался методом рестрикционного анализа. Статистический анализ был осуществлен посредством критерия χ^2 , отношения шансов и 95% доверительного интервала. Результаты с $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

При помощи биоинформационных технологий были обработаны научные труды, индексированные в Medline, и в результате установлены гены, чей вклад в развитие неонатальных пневмоний наиболее вероятен. Далее были изучены литературные данные и найдены полиморфные маркеры, потенциально имеющие наибольшее влияние на экспрессию отобранных генов: *TNF* (*G(-308)A* и *G4682A*), *IL10* (*A(-1082)G* и *A(-592)C*), *IL17A* (*G(-197)A*), *IL17F* (*C11139G*), *IL6* (*C174G*), *NOS3* (*C774T*) и *MMP9* (*G279A*). В ходе нашего исследования было выявлено, что существенную роль в развитии неонатальных пневмоний играют полиморфные маркеры *G279A* в гене *MMP9*, *G(-308)A* в гене *TNF* и *C774T* в гене *NOS3*.

Ген *MMP9* располагается на двадцатой хромосоме (20q13.12) и содержит тринадцать экзонов.

Не все выявленные на сегодняшний день однонуклеотидные замены в гене оказывают влияние на его экспрессию. Полиморфный маркер rs17576 является одним из значимых «полиморфизмов» в гене *MMP9*. Так, ранее уже было продемонстрировано его значение в риске развития таких патологий, как глаукома, рак предстательной железы и др. [11, 12], однако его ассоциация с риском развития неонатальных пневмоний показана впервые. Согласно литературным данным, распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера rs17576 в гене *MMP9* может сильно варьировать в зависимости от популяции [9], в нашей выборке во всех исследуемых группах отмечалось незначительное преобладание аллеля А (РНП – 0,534; ВУП – 0,562; контрольная группа – 0,650). Статистический анализ также выявил, что у носителей гетерозиготного генотипа в 8,6 раза выше риск заболеть РНП ($\chi^2 = 14,25$; $p < 0,05$; OR = 8,63; 95%CI = 2,67-27,91) и в 3,8 раза – ВУП ($\chi^2 = 4,19$; $p < 0,05$; OR = 3,88; 95%CI = 1,21-12,47) по сравнению с контрольной группой. С другой стороны, носительство гомозиготы АА уменьшает риск развития РНП в 5,5 раз ($\chi^2 = 8,38$; $p < 0,05$; OR = 0,18; 95% CI = 0,05-0,61). Таким образом, полиморфный маркер *G279A* (rs17576) в гене *MMP9* является прогностическим при оценке риска развития неонатальных пневмоний.

Также в прогнозировании риска развития РНП, согласно данным нашего исследования, существенную роль играет полиморфный маркер *G(-308)A* (rs1800629) в гене *TNF*. Ген *TNF* локализован в сегменте 6p21.33, содержит четыре экзона и является достаточно хорошо изученным. Одним из самых значимых полиморфных маркеров, представленных в этом гене, является rs1800629. Существует огромная база литературных данных по его влиянию на риски развития самых разных заболеваний [8], в том числе и на восприимчивость к септическому шоку, вызванному пневмонией [5]. При изучении полиморфного маркера rs1800629 в гене *TNF* мы выявили преобладание аллеля G во всех исследуемых группах (РНП – 0,698; ВУП – 0,848; контрольная группа – 0,816), что сопоставимо с другими популяциями, согласно литературным обзорам [10]. Однако в группе с РНП аллель G встречался значительно реже, нежели аллель А, по сравнению с контрольной выборкой ($\chi^2 = 6,52$; $p < 0,05$; OR = 0,52; 95% CI = 0,31-0,86). Изучение распределения генотипов также показало, что носители гетерозиготы в 3,5 раза больше подвержены риску развития РНП ($\chi^2 = 15,58$; $p < 0,01$; OR = 3,55; 95%CI = 1,87-6,75), а носительство гомозиготы GG, наоборот,

Патология Pathology	Полиморфный маркер Single nucleotide polymorphism	<i>MMP9</i> G279A (rs 17576)	<i>TNF</i> G(-308)A (rs 1800629)	<i>NOS3</i> C774T (rs 1549758)
Ранняя неонатальная пневмония (РНП) Early neonatal pneumonia		GA ↑ в 8,6 раза GA ↑ 8.6 times AA ↓ в 5,5 раз AA ↓ 5.5 times	аллель G ↓ в 1,9 раз GA ↑ в 3,5 раза GG ↓ в 3 раза Allele G ↓ 1.9 times GA ↑ 3.5 times GG ↓ 3 times	
Внутриутробная пневмония (ВУП) Congenital pneumonia		GA ↑ в 3,8 раза GA ↑ 3.8 times		CT ↑ в 3 раза CT ↑ 3 times

Рисунок 1. Ассоциация маркеров в генах цитокинов с риском развития неонатальных пневмоний

Figure 1. Association of markers in cytokine genes with a risk of developing neonatal pneumonia

уменьшает таковой риск в 3 раза ($\chi^2 = 12,42$; $p < 0,05$; OR = 0,33; 95%CI = 0,18-0,62). Таким образом, в оценке риска развития РНП играют существенную роль «полиморфизмы» в генах *TNF* (rs1800629) и *MMP9* (rs17576).

Третьим статистически значимым полиморфным маркером в нашем исследовании оказался *C774T* (rs1549758) в гене *NOS3*. Данный полиморфизм на данный момент мало изучен, и в базах данных представлено очень незначительное количество научных трудов его исследовавших. Так, например, Н.С. Фаттахов и соавт. продемонстрировали взаимосвязь гетерозиготного генотипа с риском развития метаболического синдрома [4], а J.W. Jeoung и соавт. показали отсутствие связи данного «полиморфизма» с глаукомой [7], однако остается огромное множество патологий, в риске развития которых роль данного полиморфного маркера еще предстоит изучить. В нашей научной работе мы выявили преобладание аллеля С во всех выборках (РНП – 0,764; ВУП – 0,646; контрольная группа – 0,722), а гомозигота *TT* встречалась только в контрольной группе и с наименьшей частотой (0,056). Также мы обнаружили, что гетерозиготный генотип *CT* увеличивает риск развития ВУП в 3 раза ($\chi^2 = 4,05$; $p < 0,05$;

OR = 3,04; 95%CI = 1,01-9,11). Таким образом, полиморфные маркеры *NOS3* rs1549758 и *MMP9* rs17576 ассоциированы с риском развития ВУП.

Заключение

Диагностика неонатальной пневмонии является трудоемкой задачей в силу физиологических особенностей новорожденного. Наряду с общепринятыми клиническими и инструментальными методами, врачам часто приходится искать дополнительные способы для дифференциальной диагностики. Оценка полиморфных маркеров в генах иммунологических факторов, играющих существенную роль в развитии и течении воспалительных процессов в легких, может служить еще одним вспомогательным инструментом при постановке диагноза. В нашем исследовании мы продемонстрировали ассоциацию полиморфных маркеров в генах *MMP9*, *TNF* и *NOS3* с риском развития неонатальных пневмоний (рис. 1), таким образом, предложив не только еще один вариант диагностического исследования у уже заболевших новорожденных, но и метод оценки риска заболеть неонатальной пневмонией, например, у здорового, но недоношенного ребенка.

Список литературы / References

1. Антонов А.Г., Арестова Н.Н., Байбарина Е.Н. Неонатология: национальное руководство / Под ред. Н.Н. Володина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 848 с. [Antonov A.G., Arestova N.N., Baybarina E.N. Neonatology: national guideline. Ed. by N.N. Volodin]. Moscow: GOETAR-Media, 2009. 848 p.
2. Журавлева Л.Н., Новикова В.И. Показатели врожденного иммунитета при пневмониях у новорожденных // Охрана материнства и детства, 2018. № 2 (32). С. 27-31. [Zhuravleva L.N., Novikova V.I. System of congenital immunity in pneumonia in newborns. *Okhrana materinstva i detstva = Maternal and Child Health*, 2018, no. 2 (32), pp. 27-31. (In Russ.)]
3. Bellanti J.A., Zeligs B.J. Current concepts of immune interventions in children with respiratory diseases. *Respiration*, 1994, Vol. 61, no. 1, pp. 3-7.
4. Fattakhov N., Smirnova L., Atochin D., Parshukova D., Skuratovskaia D., Painter Q., Zatulokin P., Semke A., Litvinova L., Ivanova S. Haplotype analysis of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) genetic variants and metabolic syndrome in healthy subjects and schizophrenia patients. *Int. J. Obes. (Lond)*, 2018, Vol. 42, no. 12, pp. 2036-2046.
5. Feng B., Mao Z-R, Pang K., Zhang S-L., Li L. Association of tumor necrosis factor α -308G/A and interleukin-6 -174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *J. Crit. Care*, 2015, Vol. 30, no. 5, pp. 920-923.
6. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 2016, Vol. 388, no. 10053, pp. 1459-1544.
7. Jeoung J.W., Kim D.M., Oh S., Lee J-S., Park S.S., Kim J.Y. The relation between endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and normal tension glaucoma. *J. Glaucoma*, 2017, Vol. 26, no. 11, pp. 1030-1035.
8. Qidwai T., Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand. J. Immunol.*, 2011, Vol. 74, no. 6, pp. 522-547.
9. Wu M.Y., Wu Y., Zhang Y., Liu C.Y., Deng C.Y., Peng L., Zhou L. Associations between matrix metalloproteinase gene polymorphisms and glaucoma susceptibility: a meta-analysis. *BMC Ophthalmol.*, 2017, Vol. 17, no. 1, 48. doi: 10.1186/s12886-017-0442-2.
10. Zhang Y., Cao Y., Xin L., Gao N., Liu B. Association between rs1800629 polymorphism in tumor necrosis factor- α gene and dilated cardiomyopathy susceptibility: Evidence from case-control studies. *Medicine (Baltimore)*, 2018, Vol. 97, no. 50, e13386. doi: 10.1097/MD.00000000000013386.
11. Zhao F., Fan Z., Huang X. Role of matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms in glaucoma: a hospital-based study in chinese patients. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020, Vol. 34, no. 3, e23105. doi: 10.1002/jcla.23105.
12. Zhou H., Zhu X. Association between matrix-metalloproteinase polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis and systematic review. *Cancer Manag. Res.*, 2018, Vol. 10, pp. 5247-5259.

Авторы:

Меремьянина Е.А. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; старший преподаватель кафедры вирусологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Meremianina E.A., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Senior Lecturer, Department of Virology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University); Director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Алиева А.И. — д.м.н., доцент, декан медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Alieva A.I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Dean, Faculty of Medicine and Prevention, Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

Соболев В.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Sobolev V.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.06.2020
Принята к печати 01.07.2020

Received 09.06.2020
Accepted 01.07.2020