

ОСОБЕННОСТИ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ САЙТОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (TLR) У ДЕТЕЙ С ДЕФЕКТОМ МЕЖЖЕЛУДОЧКОВОЙ ПЕРЕГОРОДКИ

Шабалдин А.В., Цепочкина А.В., Шмудевич С.А., Понасенко А.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Врожденные пороки сердца – ведущая причина инвалидизации и смертности в детском возрасте. Развитие новых технологий позволило продвинуться в диагностике и лечении врожденных пороков сердца, однако этиология данного патологического состояния остается до сих пор не изученной. Учитывая то, что патогенез данного заболевания имеет мультифакториальную природу, несомненной актуальностью обладает поиск биомаркеров, обладающих фундаментальной и практической значимостью. Одним из направлений исследований является изучение генетической составляющей. Toll-подобные рецепторы являются важными регуляторами восприимчивости к инфекционным и неинфекционным заболеваниям. Полиморфные варианты с однонуклеотидными заменами, присущие и этим генам, могут сопровождаться изменением структуры и экспрессии кодируемых ими белков, что будет сказываться на функциональной активности рецепторов. Цель: поиск генетических предикторов врожденных пороков сердца у детей.

Обследовано 47 детей (21 девочка и 26 мальчиков) с врожденными пороками сердца (у 23 детей – дефект межжелудочковой перегородки – ДМЖП, у 24 детей – дефект межпредсердной перегородки – ДМПП). Возраст обследованных пациентов основной группы был в пределах 5–8 лет. В качестве контроля было обследовано 96 условно здоровых детей, соответствующих по половому и возрастному критериям основной группе. Проведено типирование в режиме реального времени на амплификаторе Viia7 (Applied Biosystems, США) с использованием TaqMan зондов четырех генов *TLR* (*TLR1* rs5743611, rs5743551, *TLR2* rs5743708, rs3804099, *TLR4* rs4986791, rs4986790, *TLR6* rs3775073, rs5743810).

Все исследуемые полиморфизмы соответствовали закону равновесия Харди–Вайнберга. Показано, что риск развития ДМЖП ассоциирован с наличием в генотипе аллеля *G* *TLR2* rs5743708, а также с аллелем *T* полиморфного варианта rs3775073 гена *TLR6*. Кроме того, сочетание данных аллелей является значимым (по данным ROC-анализа, $p < 0,05$) и имеет высокую чувствительность (82,4%). Оба полиморфизма *TLR2* (rs5743708) и *TLR6* (rs3775073) определяют аминокислотную замену (миссенс мутации) в молекулах TLRs. Таким образом, можно сделать вывод о том, что генетическое тестирование можно использовать для выявления групп риска на ранних стадиях.

Ключевые слова: TLR, врожденные пороки сердца, дефект межжелудочковой перегородки, дефект межпредсердной перегородки

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.
Тел.: 8 (903) 907-51-97.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Address for correspondence:

Shabalдин Andrey V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnoviy blvrd, 6.
Phone: 7 (903) 907-51-97.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Цепочкина, С.А. Шмудевич,
А.В. Понасенко «Особенности сочетаний полиморфных
сайтов генов Toll-подобных рецепторов (TLR) у
детей с дефектом межжелудочковой перегородки»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,
№ 3. С. 377-380.
doi: 10.46235/1028-7221-993-FOP

© Шабалдин А.В. и соавт., 2021

For citation:

A.V. Shabalдин, A.V. Tsepokina, S.A. Shmulevich,
A.V. Ponasenko “Features of polymorphic site combinations
of Toll-like receptor (TLR) genes in children with ventricular
septal defects”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 377-380.
doi: 10.46235/1028-7221-993-FOP

DOI: 10.46235/1028-7221-993-FOP

FEATURES OF POLYMORPHIC SITE COMBINATIONS OF TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) GENES IN CHILDREN WITH VENTRICULAR SEPTAL DEFECTS

Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Shmulevich S.A., Ponasenko A.V.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Congenital heart disease is the leading cause of the childhood disability and mortality. The development of new technologies has made it possible to advance in diagnosis and treatment of congenital heart disease, but its etiology is poorly understood. Considering multifactorial origin of this disease, a search for biomarkers having fundamental and practical importance is of current interest. Study of the genetic component is one of the areas of research. E.g., Toll-like receptors (TLR) are important regulators of susceptibility to infectious and non-infectious diseases. Polymorphic variants with single nucleotide substitutions in these genes may be accompanied by changes in the structure and expression of the encoded proteins, thus affecting functional activity of these receptors. Our aim was to study some genetic predictors of congenital heart defects in children. **Materials and methods.** We examined 47 children (21 girls and 26 boys) with congenital heart defects: 23 children had a ventricular septal defect (VSD); 24 children, atrial septal defect (ASD). The patients in the main group were 1 to 9 years old. As a control group, 96 conditionally healthy age- and sex-matched children were examined. Real-time genotyping was carried out with Viia7 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) using TaqMan probes of four TLR genes (*TLR1* rs5743611, rs5743551, *TLR2* rs5743708, rs3804099, *TLR4* rs4986791, rs4986790, *TLR6* rs3775073, rs5743810). **Results.** The distribution of all studied polymorphic variants corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium. It was revealed that sporadic nonsyndromal VSD are associated with G allele of the *TLR2* gene (rs5743708) and T allele of the *TLR6* gene (rs3775073). According to ROC analysis, the combination of these alleles is a significant parameter showing high degree of sensitivity (82.4%). Both *TLR2* (rs5743708) and *TLR6* (rs3775073) gene variants define amino acid substitutions (missense mutations) in TLR molecules. Thus, we concluded that genetic testing can be used to identify risk groups at the early stages.

Keywords: TLR, congenital heart defects, ventricular septal defect, atrial septal defect

Исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002.

Введение

Эпидемиологические исследования в мире показали, что частота новорожденных детей с врожденными пороками сердца (ВПС) достигает 1%. Показано, что более 50% среди всех ВПС приходится на септальные формы [3]. Кроме того, многочисленные исследования показали, что более 80% ВПС не имеют семейных историй, не являются моногенными заболеваниями и не связаны с хромосомной патологией [1]. Тем самым, ВПС можно рассматривать как полигенные болезни, где конституциональные факторы взаимодействуют с экзогенными и эндогенными триггерами. В отечественной педиатрии сформировалось представление о том, что эта группа ВПС является эмбриопатией, развивающейся при нарушении соотношения процессов дифференцировки и пролиферации в кардиальных прогениторных клетках [4]. Эти процессы могут

регулироваться по цепочке: мембранные сигнальные рецепторы, каскадная сеть до факторов транскрипции и активация синтеза цитокинов, в том числе ответственных за пироптоз [2]. Важными сигнальными мембранными рецепторами являются Toll-подобные рецепторы (TLR). Активация этих рецепторов приводит к синтезу цитокинов и хемокинов. Полиморфные сайты генов *TLR* ассоциированы не только с различными иммунопатологическими заболеваниями, но и с клеточным циклом кардиальных прогениторных клеток [5]. С этих позиций, полиморфные участки *TLR* могут быть ассоциированы с ВПС.

Целью исследования стал поиск генетических предикторов развития врожденных пороков сердца у детей.

Материалы и методы

В исследование включено 47 детей (21 девочка и 26 мальчиков) с врожденными пороками сердца, требующими кардиохирургического лечения (основная группа). Дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) встречался у 23 детей, дефект межпредсердной перегородки (ДМПП) был

выявлен у 24 детей. Возраст обследованных пациентов был в пределах 1-9 лет.

В качестве контроля обследовано 96 условно здоровых детей, сопоставимых по возрасту с основной группой, проходивших профилактический осмотр у врача педиатра.

В основной и контрольной группах проводился сбор периферической в пробирки, содержащих КЗЭДТА, для последующего выделения геномной ДНК методом фенол хлороформной экстракции. Типирование полиморфных участков *TLR* проведен методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Viia7 (Applied Biosystems, США) с использованием Taq man зондов. Для исследования отобрано четыре гена *TLR1* (rs5743611, rs5743551), *TLR2* (rs5743708, rs3804099), *TLR4* (rs4986791, rs4986790), *TLR6* (rs3775073, rs5743810), для отбора которых использовались базы данных dbSNP, SNPinfo, SNPnexus.

Статистическую обработку данных проводили в пакетах программ Statistica версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики. Анализ соблюдения закона Харди–Вайнберга проводили при помощи программы SNPstats. Для поиска предикторов ВПС в *TLR* была использована логистическая пошаговая регрессия. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что распределение частот аллелей и генотипов *TLR* соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди–Вайнберга во всей группе обследованных. Однако поиск предикторов ВПС среди полиморфных участков *TLR* не выявил статистически значимых ассоциаций.

Список литературы / References

1. Демикова Н.С., Лапина А.С., Подольная М.А., Путинцев А.Н. Значение генетических исследований в изучении природы врожденных пороков развития // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2020. Т. 65, № 5. С. 7-11. [Demikova N.S., Lapina A.S., Podolnaya M.A., Putintsev A.N. The value of genetic research in the study of the nature of congenital malformations. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, Vol. 65, no. 5, pp. 7-11. (In Russ.)]
2. Кувачева Н.В., Моргун А.В., Хилажева Е.Д., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. Формирование инфламмосом: новые механизмы регуляции межклеточных взаимодействий и секреторной активности клеток // Сибирское медицинское обозрение, 2013. № 5. С. 3-10. [Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Khilazheva E.D., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Pozhilenkova E.A., Salmina A.B. Inflammasomes formation: new mechanisms of regulation of intercellular interactions and secretory activity of cells. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2013, no. 5, pp. 3-10. (In Russ.)]
3. Нагорнева С.В., Прохорова В.С., Шелаева Е.В., Худовекова А.М. Анализ частоты выявления врожденных пороков развития у плодов за последние 5 лет (2013-2017) // Журнал акушерства и женских болезней, 2018. Т. 67, № 3. С.44-48. [Nagorneva S.V., Prokhorova V.S., Shelaeva E.V., Khudovcovova A.M. The prevalence of congenital fetal anomalies for the past 5 years (2013-2017). *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2018, Vol. 67, no. 3, pp. 44-48. (In Russ.)]

При изучении взаимосвязей между полиморфными сайтами *TLR* с риском развития ДМЖП и ДМПП по отдельности выявлены статистически значимые ассоциации для сочетаний аллелей *TLR* с ДМЖП, но не с ДМПП.

Показано, что риск развития ДМЖП ассоциирован с наличием в генотипе аллеля *G TLR2* rs5743708, а также с аллелем *T* полиморфного варианта rs3775073 гена *TLR6*. Кроме того, сочетание данных аллелей является значимым (по данным ROC-анализа, $p < 0,05$) и имеет высокую чувствительность (82,4%).

Оба полиморфизма *TLR2* (rs5743708) и *TLR6* (rs3775073) определяют аминокислотную замену (миссенс мутации) в молекулах TLRs, что будет отражаться в функциональной активности рецепторов. Причем, рецепторы семейства *TLR2* активно функционируют как мембранные гетеродимеры [6]. Соответственно реализация патологического эффекта, кодируемого этим сочетанием генотипов, может быть связана с доминированием на мембранах эмбриональных прогениторных кардиальных клеток гомодимеров *TLR2* и отсутствием гетеродимеров *TLR2-TLR6*. Этот феномен ограничивает внутриклеточный сигналинг и последующий за ним синтез молекул межклеточных контактов. Нарушенные межклеточные контакты при эмбриогенезе сердца могут быть основой патогенеза ДМЖП.

Заключение

Полиморфные варианты rs5743708 *TLR2* и rs3775073 *TLR6* ассоциированы с риском развития ДМЖП.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

4. Шабалов Н.П. Неонатология: в 2 т. Т. 1: учебное пособие. 7-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 53-131 [Shabalov N.P. Neonatology: in 2 vol. Vol. 1: textbook. 7th ed., revised and add]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 53-131.
5. Suluba E., Shuwei L., Xia Q., Mwanga A. Congenital heart diseases: genetics, non-inherited risk factors, and signaling pathways. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.*, 2020, 11. doi: 10.1186/s43042-020-0050-1.
6. Qian C., Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2013, Vol. 1283, pp. 67-74.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Цепочкина А.В. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмулевич С.А. — к.м.н., старший преподаватель научно-образовательного отдела ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Понасенко А.В. — к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Defects, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Tsepokina A.V., Junior Research Associate, Laboratory for Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Scientific and Educational Department, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Ponassenko A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 20.07.2021

Received 17.05.2021
Accepted 20.07.2021