

УДК: 616.23/.24.–007.17–092.–07–053.31:575.174.015.3

Г.С. Сенаторова, О.Л. Логвінова,
О.В. Омельченко, О.Л. ОнікієнкоХарківський національний медичний університет
(м. Харків, Україна)РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНУ
МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-1
(1607INSG) В ФОРМУВАННІ
БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ ДИСПЛАЗІЇ
У НОВОНАРОДЖЕНИХ**Ключові слова:** діти, бронхолегенева дисплазія,
спадкові фактори поліморфізм гену ММП-1.**Резюме.** На формування бронхолегеневої дисплазії (БЛД) середовищні (0,54) та спадкові (0,46) фактори впливають рівноцінно, що обумовлює необхідність вивчення поліморфізму генів та їх регуляторної функції для можливості прогнозування цього хронічного захворювання протягом вагітності та в новонароджених. Поліморфізм гену ММП-1 (1607insG) впливає на схильність індивідуума до БЛД ($KW=N(n=58)=18,85$; $p = 0,0001$). Для дітей з БЛД характерно переважання домінантних гомозигот (AA) та гетерозигот (Aa) по інсерції гуаніну в 1607 положенні ($p < 0,001$), що ймовірно, було підґрунтям до підвищеної експресії ММП-1, притаманної дітям з БЛД. Визначена висока ймовірність менделєвського, полігенного наслідування схильності до БЛД, що підтверджується помірним порушенням рівняння Харді-Вайнберга.**Вступ**

Питання високого рівня клінічної варіативності щодо бронхолегеневої дисплазії (БЛД) серед індивідуумів в популяції, які мають однаковий гестаційний вік і помірний ятрогенний вплив під час реанімації досі не вирішене [8]. Це ініціює дослідження ролі генетичних факторів та впливу поліморфізму тригерних генів в етіології даного захворювання [1,2,3,4,5]. У фізіологічному сенсі на етапі розвитку та при сформованій БЛД особливість ремоделювання легень і судин є атрибутом клітинних та позаклітинних регуляторних процесів, які забезпечуються молекулярними індукторами, регуляторами та сигнальними системами, що детермінують процеси кардіо-респіраторного ремоделювання. Клітинна та/або внутрішньоклітинна експресія цитокінів-індукторів, а також рівень презентації специфічних рецепторів визначається тонкими генетичними механізмами [2,3,5]. Вивчення цих механізмів важливе для запобігання гальмування росту та фіброзування легеневої тканини [7].

Розвиток БЛД залежить від поєданого впливу декількох факторів, які обумовлюють пневмофіброз та гальмування онтогенезу легень. В якості тригерного гену пригнічення онтогенезу легень та пневмофіброзу нами обраний ген матриксної металопротеїнази-1 [1,4,6]. Патогенетичну роль ММП-1 в розвитку БЛД доведено в попередніх дослідженнях [9]. ММП-1 сьогодні розглядається як особлива форма біологічного контролю при БЛД, займає центральне місце в реалізації різноманітних біохімічних процесів та швидкої фізіологічної відповіді на умови, що змінюються.

Мета роботи - удосконалення діагностики формування бронхолегеневої дисплазії шляхом визначення ролі генетичних та середовищних факторів у

формуванні бронхолегеневої дисплазії у новонароджених.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилося на кафедрі педіатрії №1 та неонатології Харківського національного медичного університету (зав. кафедри - Г.С.Сенаторова) у Обласному центрі діагностики та лікування БЛД у дітей Харківської обласної дитячої лікарні (головний лікар - Г.Р.Муратов). Під спостереженням знаходились 60 близнюків/ 30 пар ($24,1 \pm 2,7\%$): 54 пацієнти ($90,0 \pm 3,9\%$) з діагнозом БЛД (основна група) та 6 спостережених ($10,0 \pm 3,9\%$), що народилися недоношеними, мали респіраторні розлади, але в яких не сформувалася БЛД (група порівняння). Діагноз БЛД був встановлений згідно міжнародній класифікації хвороб 10 перегляду (шифр P27.0). Всі 6 близнюків групи порівняння були із пар, де одна дитина хворіла на БЛД. Для оцінки відносної ролі спадкових та середовищних факторів використовували близнюковий метод. Визначали парну конкордантність, обчислювалась частка спадковості в формування БЛД за формулою Хольцингера, оцінювалась роль середовищних факторів.

Поліморфізм гену матриксної металопротеїнази-1 визначався полімеразною ланцюговою реакцією діагностичними наборами «SNP-експрес» виробництва НПФ «Літех», методом алейної дискримінації. За допомогою реагенту «ДНК-ЕКСПРЕС» відділялась ДНК із букального епітелію. Розраховувались частоти алей та частоти алейних сполучень та їх співвідношення рівновазі Харді – Вайнберга по критерію χ^2 .

Детекція поліморфізму проводилась методом горизонтального електрофорезу [12]. Статистична обробка даних здійснювалась за допомогою про-

грами «Statistica-6».

Результати та їх обговорення

Розподіл обстежених за статтю та зиготністю

представлено в табл.1. Виявлена різниця в групах тільки серед монозиготних близнюків жіночої статі ($p < 0,05$), що з нашої точки зору потребує подальших досліджень.

Таблиця 1

Розподіл близнюків за статтю, зиготністю (основна група та група порівняння)

| | Основна група n=54 | | Група порівняння n=6 | | р о.г.-г.п. |
|------------------------|-----------------------|-----------|-------------------------|------------|--------------------|
| | абс. | M±m% | абс. | M±m% | |
| Монозиготні близнюки: | | | | | |
| • діти чоловічої статі | 10 | 18,5±5,3% | 1 | 16,6±16,6% | 0,823 |
| • діти жіночої статі | 12 | 22,2±5,7% | 0 | - | 0,039 ¹ |
| Загалом: | 22 | 30,1±6,7% | 1 | 16,6±16,6% | 0,317 |
| Дизиготні близнюки: | | | | | |
| • діти чоловічої статі | 18 | 33,3±6,4% | 1 | 16,6±16,6% | 0,913 |
| • діти жіночої статі | 14 | 25,9±6,0% | 4 | 66,6±21,1% | 0,213 |
| Загалом: | 32 | 59,1±6,4% | 5 | 83,2±25,7% | 0,754 |

Примітка: різниці достовірні ($\chi^2 - p < 0,05$).

Вагомий відсоток близнюків у генеральній сукупності (24,1±2,7%) дозволив використати близнюковий метод для оцінки спадковості за БЛД, який включає вивчення закономірностей можливого наслідування патології в парах моно- та дизиготних близнюків. Метод базується на високій частоті конкордантності за ознаками в монозиготний парях. Зіставлення парної конкордантності за даною ознакою у генетично ідентичних монозиготних та дизиготних близнюків дає можливість об'єктивно судити про роль генотипу в формуванні БЛД.

Парна конкордантність за БЛД складала 0,8, що свідчить за вагомість спадкового впливу на розвиток захворювання (формула 1).

$$C = c / (c+d) = 24 / (24+6) = 0,8 \quad (1)$$

Де, C- парна конкордантність; c та d – кількість конкордантних та дискордантних пар.

24 пари (80±7,4%) були конкордантні за БЛД, 6 пар (20±7,4%) – дискордантні. Конкордантних пар по формуванню БЛД було достовірно більше ($p < 0,0001$), що свідчило про можливий вплив спадкових факторів на формування захворювання.

Виявлено, що із 16 пар монозиготних близнюків 9 пар були конкордантні за БЛД у неонатальному періоді (парна конкордантність – 0,562). Із 10 пар дизиготних близнюків 7 пар – конкордантні за БЛД (парна конкордантність – 0,7).

Частка спадковості (0,46) за формулою Хольцингера знаходилась в інтервалі від 0,3 до 0,7, а частка впливу факторів середовища складала 0,54, що свідчило за рівну роль спадкових і середовищних факторів у формуванні БЛД (формули 2; 3).

$$H = (CMz - CDz) / 1 - CDz = (0,625 - 0,7) / 1 - 0,7 = 0,46 \quad (2)$$

де, H – частка впливу спадковості на розвиток БЛД;

CMz, CDz – парна конкордантність монозиготних та дизиготних пар.

$$E = 1 - H = 1 - 0,46 = 0,54 \quad (3)$$

де, E – частка впливу факторів середовища; H – частка впливу спадковості на розвиток БЛД.

У ході дослідження доведено рівноцінний вплив середовищних та генетичних факторів на формування БЛД, що диктує необхідність вивчення алельних варіантів поліморфізму генів щодо можливості прогнозування цього хронічного захворювання під час вагітності та у новонароджених.

60 близнюків були обстежені на наявність тригерного поліморфізму (інерції) гену матричної метлопротеїнази-1. Поліморфізм гену ММП-1 (1607insG) впливав на схильність індивідууму до БЛД ($KW = H(n=58) = 18,85$; $p = 0,0001$). Частота зустральності алельних варіантів поліморфізму 1607insG гену ММП-1 в групах наведено в табл. 2.

Із даних табл. 2 видно, що в обстежених основної групи більш розповсюджена алель А (59,2±4,7%; $p < 0,05$), у той час як алель а складала 40,7±4,7%. Виявлені достовірні різниці в частотах алельних сполучень із переважанням доміантних гомозигот (AA) у близнюків основної групи ($p < 0,001$). Рецесивні гомозиготи (aa) по 1607insG гену ММП-1 частіше спостерігались в групі порівняння ($p < 0,001$).

Частота алелей та алельних сполучень поліморфізму гену (1607insG) ММП-1 у близнюків з БЛД (основна група) та близнюків, які народжені недоношеними, мали дихальні розлади в ранньому неонатальному періоді, але не сформували БЛД (група порівняння)

| Алелі та алельні сполучення | Основна група n=54 | | Група порівняння n=6 | | χ^2 о.г-г.п. |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| | абс. | Частота алелі та алельних сполучень | абс. | Частота алелі та алельних сполучень | |
| Алелі: | | | | | |
| алель А | 64 | 0,592 | 1 | 0,083 | 0,297 ² |
| алель а | 44 | 0,407 | 11 | 0,916 | 0,120 ² |
| Загалом: | 108 | 1,000 | 12 | 1,000 | |
| Алельні сполучення: | | | | | |
| АА | | | | | |
| Аа | 25 | 0,462 | 0 | - | 0,388 ² |
| аа | 14 | 0,259 | 1 | 0,166 | 0,016 ¹ |
| | 15 | 0,277 | 5 | 0,833 | 0,185 ² |
| Загалом: | 54 | 1,000 | 6 | 1,000 | |

Примітка: різниці достовірні (χ^2 – $p < 0,01$; χ^2 – $p < 0,001$).

Для оцінки відповідності даних щодо частоти зустріальності зигот у популяції дітей з БЛД проведено зі-

ставлення частот алельних варіантів, що спостерігалися й очікувалися за рівнянням Харді-Вайнберга (табл. 3).

Таблиця 3

Частоти алельних сполучень поліморфізму гену (1607insG) ММП-1 у близнюків з БЛД (основна група; n=54)

| Алельні сполучення | Частота, що спостерігається | | Частота, що очікується | χ^2 спостерігається/ очікується |
|--------------------|-----------------------------|---------|------------------------|--|
| | абс. | частота | | |
| АА | 25 | 0,462 | 0,321 | 0,018 ¹ |
| Аа | 14 | 0,259 | 0,424 | 0,029 ² |
| аа | 15 | 0,277 | 0,255 | 0,007 ¹ |
| | 54 | 1,000 | 1,000 | |

Примітка: різниці не достовірні χ^2 – $p > 0,05$; різниці достовірні χ^2 – $p < 0,01$

У групі хворих на БЛД переважно частота алелей відповідала рівнянню Харді-Вайнберга. Достовірних різниць між спостереженою і очікуваною частотою за доміантними (АА) і рецесивними гомозиготами (аа) виявлено не було (χ^2 0,007-0,018; $p > 0,05$). Проте визначені різниці в частоті гетерозиготної алелі Аа, яку спостерігали та очікували (χ^2 0,029; $p < 0,01$). Гетерозиготний варіант алелі Аа зустрічався в 2 рази рідше, ніж очікувалось (0,259/0,424), що порушувало рівняння Харді-Вайнберга.

Помірне порушення рівняння Харді-Вайнберга за рахунок рідкості гетерозиготних алелей можуть бути обумовлено полігенним наслідуванням схильності до БЛД, зниженням життєздатності гетерозиготних носіїв, наявністю коморбідної патології, з тригерним впливом гену ММП-1 та популяційними відмінностями, що потребує подальших досліджень.

Отже, в ході дослідження виявлено переважання доміантних гомозигот (АА) та гетерозигот (Аа) по інсерції гуаніну у 1607 положенні у ді-

тей з БЛД ($p < 0,001$) та доведений вплив поліморфізму гену ММП-1 (1607insG) на формування БЛД ($KW=N(n=58)=18,85$; $p = 0,0001$). Дані особливості ймовірно являлись підґрунтям до інтрацелюлярної, інтерстиціальної активації пневмофіброзу та підвищеної експресії ММП-1. Проте, нами визначена висока ймовірність менделевського, полігенного наслідування схильності до БЛД, що підтверджувалося помірним порушенням рівняння Харді-Вайнберга.

Висновки:

1. На формування БЛД середовищні (0,54) і спадкові (0,46) фактори мають рівноцінний вплив, що обумовлює необхідність вивчення поліморфізму генів та їх регуляторної функції щодо можливості прогнозування цього хронічного захворювання під час вагітності та у новонароджених.

2. Поліморфізм гену ММП-1 (1607insG) впливає на схильність індивідууму до БЛД.

3. Для дітей з БЛД характерне переважання до-

мінантних гомозигот (AA) та гетерозигот (Aa) по інсерції гуаніну у 1607 положенні у дітей з БЛД ($p < 0,001$), що ймовірно, є підґрунтям до підвищеної експресії ММП-1, притаманної дітям з БЛД.

4. Визначена висока ймовірність неменделівського, полігенного наслідування схильності до БЛД, що підтверджується помірним порушенням рівняння Харді-Вайнберга.

Література

1. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats / T. Van Haften, R. Byrne, S. Bonnet [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2009. – №180(11). – P. 1131-1142.
2. A genome-wide association study (GWAS) for bronchopulmonary dysplasia. / H. Wang, K. R. St Julien, D. K. Stevenson [et al.] // *Pediatrics*. – 2013. – № 132. – P. 290.
3. Akogmalm A. Role of CXС chemokine receptor-2 in a murine of bronchopulmonary dysplasia / A. Akogmalm // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2012. – № 47(6). – P. 746-758.
4. Argandoña E.G. Harkaitz Bengoetxea Effects of Visual Experience on Vascular Endothelial Growth Factor Expression during the Postnatal Development of the Rat Visual Cortex [Електронний ресурс] / E.G. Argandoña, V. J. Lafuente // *Cereb Cortex*. – 2008. – №18(7) – P. 1630–1639. – Режим доступу до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals>.
5. Association between bronchopulmonary dysplasia and MBL2 and IL1-RN polymorphisms / B. C. Cakmak, S. Calkavur, F. Ozkinay [et al.] // *Pediatrics International*. – 2012. – № 54. – P. 863-868.
6. Augello A. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells / A. Augello, C. De Bari // *Hum. Gene Ther.* – 2010. – № 21. – С. 1226-1238.
7. Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells / A. P. Popova, P. D. Bozyk, A.M. Goldsmith [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol*. – 2010. – № 298. – С. 735-743.
8. Eber E. Paediatric respiratory medicine / Eber E., Midulla F. – Hermes, 2013. – 710с.
9. Frey U. Paediatric lung function / Frey U., Merkus P.J.F.M. – ERS Publication office, 2010. – 324с.
10. Черненко Л.М. Експресія протеїназ вазоконстрикторної дії в дітей із різними формами бронхолегеневої дисплазії / Г.С.Сенаторова, Л.М.Черненко, Л.М.Самохіна // *Запорозький медичинський журнал*. - №3 (72). – 2012. – С. 122-124.
11. Черненко Л.М. Рівень IL-1ss та ФНП- α в індукованій мокроті при бронхолегеневій дисплазії / Л.М.Черненко // *Експериментальна та клінічна медицина*. - №2 (55). – 2012. – С. 117-121.
12. Руководство по применению диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР. – М., 2014. – 20с.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-1 (1607INSG) В ФОРМИРОВАНИИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ

*А.С. Сенаторова, А.Л. Логвинова,
А.В. Омельченко, А.Л. Оникиенко*

**Харьковский национальный
медицинский университет
(г. Харьков, Украина)**

THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASE-1 GENE POLYMORPHISM (1607INSG) IN THE BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA DEVELOPMENT IN NEONATES

*G.S. Senatorova, A.L. Logvinova,
A.V. Omelchenko, A.L. Onikiyenko*

**Kharkiv National
Medical University
(Kharkiv, Ukraine)**

Резюме. На формирование бронхолегочной дисплазии (БЛД) средовые (0,54) и наследственные (0,46) факторы влияют равноценно, что обуславливает необходимость изучения полиморфизма генов и их регуляторной функции для возможности прогнозирования этого хронического заболевания в течение беременности и у новорожденных. Полиморфизм гена ММП-1 (1607insG) влияет на склонность индивидуума к БЛД ($KW = H$ ($n = 58$) = 18,85; $p = 0,0001$). Для детей с БЛД характерно преобладание доминантных гомозигот (AA) и гетерозигот (Aa) по инсерции гуанина в 1607 положении ($p < 0,001$), что вероятно, было основой в повышенной экспрессии ММП-1, присущей детям с БЛД. Требуется высокая вероятность неменделевского, полигенного наследования склонности к БЛД, что подтверждается умеренным нарушением уравнения Харди-Вайнберга.

Ключевые слова: дети, бронхолегочная дисплазия, наследственные факторы полиморфизм гена ММП-1.

Summary. The environmental (0.54) and hereditary (0.46) factors contribute equally to development of BPD, which requires studying of the polymorphism of genes and their regulatory functions for the prediction of chronic disease during pregnancy and in newborns. MMP-1 gene (1607insG) polymorphism affects on the individual tending to bronchopulmonary dysplasia ($KW = H$ ($n = 58$) = 18.85, $p = 0.0001$). The prevalence of dominant homozygotes (AA) and heterozygotes (Aa) by insertion of guanine at position 1607 ($p < 0.001$) is specific for children with BPD. This was probable basis for increased expression of MMP-1, which is peculiar to children with BPD. Moderate violation of Hardy-Weinberg equation suggests high probability of non-mendelian polygenic inheritance of predisposition to bronchopulmonary dysplasia.

Keywords: children, bronchopulmonary dysplasia, hereditary factors, MMP-1 gene polymorphism.