

УДК 616.2-002.6-036.1-053.4:[575.113.2:577.112.8
5:577.151.4](043.3)
DOI: 10.24061/2413-4260. XIV.4.54.2024.7

АЛЕЛЬНІ ВАРІАНТИ ГЕНІВ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ 1 І 3 ТИПІВ У ДІТЕЙ ДОШКІЛЬНОГО ВІКУ З РЕКУРЕНТНИМИ РЕСПІРАТОРНИМИ ІНФЕКЦІЯМИ

О. М. Волошин^{1,4}, Г. В. Макух^{2,3},
Ю. В. Марушко¹, І. І. Савченко⁴,
Л. М. Осичнюк⁴

Національний медичний університет імені
О. О. Богомольця¹ (м. Київ, Україна),
КНП ЛОР «Львівський обласний клінічний
перинатальний центр»² (м. Львів, Україна),
Науковий медико-генетичний центр «ЛеоГен»³
(м. Львів, Україна),
Луганський державний медичний університет⁴
(м. Рівне, Україна)

Резюме

Матриксні металопротеїнази (ММП) мають вельми широкий спектр фізіологічних і патологічних ефектів. Зокрема, вони задіяні в деградації й ремоделюванні позаклітинного матриксу, диференціації й апоптозі клітин, реалізації імунних і запальних механізмів, ембріогенезі тощо.

Мета дослідження. Визначити стан взаємозалежності між алейними варіантами генів ММП-1-1607 (1G/2G) і ММП-3-1171 (5A/6A), з одного боку, та різною частотою гострих респіраторних інфекцій у дітей дошкільного віку, з іншого.

Матеріали і методи. Обстежено 33 неспоріднені дитини (15 хлопчиків і 18 дівчаток) віком 1-6 років які перебували на госпітальному лікуванні з приводу гострих респіраторних інфекцій. У них враховано кількість епізодів гострої респіраторної інфекції за попередній рік їхнього життя та вивчено розподілення алейних варіантів, а саме: 1) 1G/2G гена ММП-1 в позиції 1607 (rs 1799750) і 2) 5A/6A гена ММП-3 в позиції 1171 (rs 35068180). Статистичний аналіз отриманих цифрових даних здійснено з використанням ліцензованої програми «IBM SPSS Statistics 28» (№ 3922/01/2021). Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження схвалено локальними етичними комітетами Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та Луганського державного медичного університету. На проведення досліджень отримано інформовану згоду батьків дітей. Дослідження проводилося в межах виконання ініціативної науково-дослідної роботи кафедри педіатрії з дитячими інфекціями Луганського державного медичного університету (м. Рубіжне, Україна) – «Актуальні аспекти впливу перинатальних чинників на формування соматичної патології у дітей віком 1-14 років» (2017-2021, № державної реєстрації 0117U003041).

Результати. Продемонстровано залежність між приналежністю дітей дошкільного віку до підгрупи з частішими епізодами гострих респіраторних інфекцій від 2G/2G генотипу за локусом поліморфізму rs 1799750 гена ММП-1-1607 (ВШ=7,778; $p_1=0,008$; $p_2=0,025$; ДІ: 1,561-38,756). На противагу тому, 1G/2G генотип вірогідно частіше визначався в пацієнтів, які склали підгрупу з меншою кількістю епізодів ГРІ (ВШ=0,127; $p_1=0,014$; $p_2=0,039$; ДІ: 0,022-0,739). До того ж алей 1G переважав серед дітей з меншою кількістю епізодів ГРІ, а алей 2G частіше був присутнім серед тих, хто мав більшу кількість таких епізодів в анамнезі (ВШ=2,778; $p_1=0,044$; $p_2=0,080$; ДІ: 1,016-7,639). Водночас не встановлено жодного поєднання між алейми 5A і 6A, а також відповідними їм генотипами, що визначені для локусу поліморфізму rs 35068180 гена ММП-3 в позиції 1171, та підгрупами дітей із рідшими й частішими епізодами ГРІ.

Висновки. Отримані результати свідчать про значущу залежність частоти епізодів гострих респіраторних інфекцій у дітей дошкільного віку від досліджених генотипів (2G/2G і 1G/2G) гену ММП-1 (rs 1799750). Вони мають бути враховані при прогнозуванні приналежності таких дітей до групи ризику щодо рекурентного перебігу гострих респіраторних інфекцій.

Ключові слова: діти дошкільного віку; рекурентні респіраторні інфекції; матриксні металопротеїнази 1 і 3 типів; генетичні варіанти.

Вступ

Матриксні металопротеїнази (ММП) – це група цинквмісних і кальційзалежних ендопептидаз, що мають вельми широкий спектр фізіологічних і патологічних впливів [1-3]. Вони продукуються в більшості клітин сполучної тканини, лейкоцитах, макрофагах, ендотелії судин, а також у нейронах, гліальних і пухлинних клітинах. Подібно іншим протеолітичним ферментам, ММП виробляються й секретуються у вигляді неактивних проензимів, а їх активація відбувається в позаклітинному просторі [4].

На теперішній час сімейство ММП нараховує 28 членів і щонайменше 23 з них виявляють експресію в тканинах людини. Враховуючи особливості структурних доменів і субстратів, ці 23 ендопептидази класифіковані на 6 груп: 1) колагенази (ММП-1, ММП-8 і ММП-13); 2) желатинази (ММП-2 і ММП-9); 3) стромелізини (ММП-3, ММП-10 і ММП-11); 4) матрилізини (ММП-7 і ММП-26); 5) ММП мембранного типу (ММП-14, ММП-15, ММП-16, ММП-17, ММП-24 і ММП-25); 6) інші ММП (ММП-12, ММП-19, ММП-20, ММП-21, ММП-23, ММП-27, ММП-28) [5].

Доведено, що ММП беруть участь у деградації й ремодельованні позаклітинного матриксу, диференціації й апоптозі клітин, реалізації імунних і запальних механізмів, ангиогенезі, ембріогенезі, загоєнні ран, формуванні кісткової тканини, проліферації та інвазії пухлинних клітин тощо [1, 6-9]. Окремі ММП розглядаються як достатньо інформативні біомаркери багатьох захворювань, насамперед серцево-судинних, онкологічних, неврологічних, ревматологічних, а також різноманітних запальних процесів [5, 10-13]. Вони регулюють біологічну активність нематриксних субстратів, до яких належать фактори росту, молекули адгезії та інші протеїнази [14]. Виявляючи достатньо добре досліджені позаклітинні ефекти, ММП також впливають на інтрацелюлярні функції або шляхом ко-регування дії хемокінів і цитокінів, або безпосереднім впливом на рецептори клітинної поверхні, активуючи клітинну сигналізацію [13]. До того ж відомо, що деякі ММП перебувають усередині клітини, зокрема в таких специфічних субклітинних компартментах, як цитозоль, саркомер, ендоплазматичний ретикулум, ядро й мітохондрії [8].

На сьогодні з'ясовано, що в патофізіології людини найважливішу роль відіграють желатинази – ММП-2 і ММП-9 – та їх тканинні інгібітори, насамперед 1 й 2 типу. Ціла низка інших ММП задіяна в активації желатинази і регулюванні їхніх біологічних ефектів. Основним субстратом желатинази є колаген IV типу, що є важливим компонентом базальної мембрани судинного ендотелію [4].

ММП є значущими патогенетичними факторами і при захворюваннях респіраторної системи. Наприклад, в одному з досліджень продемонстровано, що мультисистемний запальний синдром у дітей, який ускладнює перебіг інфекції COVID-19, супроводжується підвищеними рівнями ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ММП-12 і ММП-13 у плазмі крові. Водночас зафіксовано високу плазмову концентрацію ММП-3, ММП-7 і ММП-9 під час одужання від інфекції COVID-19 [15].

Заслугове на увагу також наявність асоціації між окремими представниками сімейства ММП і деякими вітамінами, наприклад, вітаміном D. Добре відомо, що останній є вкрай важливим регулятором кальцієвого гомеостазу, впливає на імунні механізми, антивірусну відповідь, проліферацію й диференціацію клітин, вироблення прозапальних цитокінів тощо. До того ж підтверджено його участь у прямій і непрямій регуляції активності окремих ММП, зокрема ММП-2 і ММП-9 [11]. В іншому експериментальному дослідженні зафіксовано гіперекспресію ММП-3 в умовах кальцифікації артерій, індукованої цим вітаміном [16].

Зважаючи на мультифункціональність ММП, що підтверджено численними результатами клінічних й експериментальних досліджень, достатньо обґрунтованим є вивчення взаємозалежності між цими ендопептидазами та рекурентними респіраторними інфекціями (PPI). На теперішній час PPI вважаються однією з найактуальніших проблем повсякденної педіатричної практики. Найчастіше вони реєструються серед дітей

дошкільного віку з досить широким діапазоном варіювання їх частоти – від 6 % до 30 % – за даними різних авторів [17-19]. Останніми роками багато досліджень присвячено виявленню найбільш значущих факторів, що обумовлюють підвищену ймовірність виникнення повторних епізодів гострих респіраторних інфекцій (ГРІ) [18, 20, 21].

Мета дослідження. Визначити стан взаємозалежності між алельними варіантами генів ММП-1-1607 (1G/2G) і ММП-3-1171 (5A/6A), з одного боку, та різною частотою ГРІ в дітей дошкільного віку, з іншого.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснене в дитячому соматичному відділенні багатопрофільної міської лікарні м. Северодонецьк Луганської області (Україна) у 2021 році. У його межах проведено обстеження 33 неспоріднених дітей – 15 (45,5 %) хлопчиків і 18 (54,5 %) дівчаток – віком 1-6 років, госпіталізованих з приводу ГРІ. За даними анамнезу в пацієнтів зареєстровано від 1 до 9 епізодів ГРІ протягом попереднього року, включно з поточним захворюванням. Розподіл клінічних форм гострого інфекційного ураження респіраторного тракту серед обстежених дітей виявився наступним: 1) ринофарингіт – 3 (9,1 %); 2) ларинготрахеїт – 2 (6,1 %); 3) бронхіт – 17 (51,5 %); 4) обструктивний бронхіт – 3 (9,1 %); 5) позалікарняна пневмонія – 8 (24,2 %).

Були використані такі критерії залучення дітей до групи спостереження: 1) вік – від 1 року, що виповнився, до 6 років 11 місяців 29 днів; 2) стать – хлопчик і дівчатка; 3) діагностований епізод ГРІ з ураженням верхніх або нижніх дихальних шляхів; 4) відсутність будь-якого хронічного захворювання; 5) наявність добровільної інформованої згоди батьків щодо проведення наукових досліджень у дитини, а також щодо збору й обробки персональних відомостей пацієнта. Водночас, у разі виникнення будь-яких ускладнень під час проведення терапевтичних заходів або самовільного припинення батьками лікування дитини до закінчення запланованого обстеження, цю дитину вилучали з групи спостереження. Слід зауважити, що дизайном дослідження не було передбачено формування групи контролю, оскільки діти в групі спостереження суттєвим чином відрізнялися за частотою епізодів ГРІ.

У кожної дитини розраховано два інтегральні клінічні показники, а саме: 1) модифікований інфекційний індекс (ІнІ) у вигляді співвідношення кількості епізодів ГРІ за попередній рік до віку дитини в місяцях; 2) індекс резистентності (ІнР), що відображає середню кількість епізодів ГРІ за 1 місяць протягом попереднього року життя дитини. Враховано також значення максимальної температури тіла (t_{max}) під час поточного захворювання.

Генетичні дослідження проведено у науковому медико-генетичному центрі «ЛеоГен» (м. Львів, Україна) у 2021 році. Вони полягали у вивченні алельних варіантів, а саме: 1) 1G/2G в позиції 1607 гена ММП-1 (rs 1799750); 2) 5A/6A в позиції 1171 гена ММП-3 (rs 35068180). В обстежених дітей матеріалом для ана-

лізу була венозна кров, забір якої в кількості 2-3 мл здійснено вранці натщесерце у вакутайнер з етилендіамінтетраоцтовою кислотою. Подальше виділення й очищення ДНК з лейкоцитів попередньо замороженої цільної крові виконане методом висолювання [22]. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проведено з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції, що здійснено в автоматичному режимі на термоциклері T100 («BioRad», США). При цьому були використані наступні олігонуклеотидні праймери: 1) для фрагменту гена ММП-1 – прямий 5'-GAC TTT TAA AAC ATA GTC TAT GTT CA-3' і зворотний 5'-CTT GGA TTG ATT TGA GAT AAG TCA TAG C-3'; 2) для фрагменту гена ММП-3 – прямий 5'-GGT TCT CCA TTC CTT TGA TGG GGG GAA AGA-3' і зворотний 5'-CTT CCT GGA ATT CAC ATC ACT GCC ACC ACT-3' («Metabion», Німеччина).

Генотипування поліморфних локусів застосовано за методом рестрикційного аналізу продуктів полімеразної ланцюгової реакції [23]. Використано термостабільну Taq-полімеразу й ендонуклеази рестрикції – Tth1111 (PsyI), Alu I («Thermo Fisher Scientific», США) та агарозу («Amresco», США). Продукти після рестрикції аналізували шляхом проведення електрофору в 2,5 % агарозному гелі з додаванням бромистого етидію й сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі, використовуючи систему гель-документування («BioRad», США).

Дослідження виконано згідно з принципами Гельсінської декларації (2013 рік) про дотримання етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини. Протокол дослідження погоджено комісіями з біоетики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця й Луганського державного медичного університету.

Статистичний аналіз отриманих цифрових даних здійснено з використанням ліцензованої програми «IBM SPSS Statistics 28» (№ 3922/01/2021) на платформі «PS IMAGO PRO 8.0» (США) від компанії «Predictive Solutions» (Україна). Перевірку на відповідність нормальному закону розподілу значень усіх врахованих інтервальних показників у варіаційних рядах проведено шляхом проведення тесту Шапіро-Віллка. Оскільки розподіл цих показників у більшості випадків виявився відмінним від нормального, для опису варіаційних рядів використано такі непараметричні характеристики, як медіана (Me) або Q_2 (50 %) квантиль, Q_1 (25 %) і Q_3 (75 %) квантилі, відносний показник квантильної варіації (V_q), мінімальне (X_{min}) та максимальне (X_{max}) значення показника.

Стан парної взаємозалежності між двома інтервальними показниками або одним інтервальними і одним дихотомічним показником визначено шляхом розрахунку стандартного коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (ρ) з розрахунком для нього 95 % довірчого інтервалу (ДІ). Якісну оцінку сили кореляції здійснено за шкалою Чеддока. Дослідження кореляційних зв'язків між показниками з порядковою, номінальною або дихотомічною шкалою розподілу виконано в таблицях спряженості з розрахунком коефіцієнтів χ^2 -Пірсона

й ϕ_c -Крамера. При цьому для ідентифікації ознак, за якими відрізняється розподіл у підгрупах спостереження, використано z -критерій для порівняння пропорцій і коригування p -значень за методом Бонферроні. Визначення розміру ефекту незалежного фактора на залежну змінну в разі його вірогідності здійснено з урахуванням коефіцієнту ϕ_c -Крамера, ступенів свободи при розрахунку коефіцієнта χ^2 -Пірсона й відповідної стандартної таблиці для інтерпретації даних.

Розрахунок відношення шансів (ВШ) щодо можливості впливу досліджених генетичних варіантів ММП-1-1607 і ММП-3-1171 на частоту епізодів ГРІ в пацієнтів із групи спостереження проведено за допомогою кростабуляції. Вірогідність ВШ перевірялась як за його асимптотичною значущістю, що визначалась двома способами – за Кокреном (p_1) і за Хантелем-Менцелем (p_2), так і шляхом врахування меж його 95 % ДІ.

Під час вивчення кореляційних зв'язків також було задіяно модуль бутстрепінгу використаної статистичної програми. Бутстрепінг проведено насамперед для перевірки вірогідності отриманих результатів, враховуючи обмежену кількість обстежених дітей [24]. При цьому застосовано простий метод вибірки з однаковою кількістю ресемплінг-вбірок (1000). Для визначення 95 % ДІ в межах здійснення бутстрепінгу обране зміщене корегування з підсиленням – bias-correlated and accelerated.

Усі отримані результати прийнято як статистично вірогідні за їхньої асимптотичної значущості, що виявилася меншою за 0,05 ($p < 0,05$).

Дослідження проводилося в межах виконання ініціативної науково-дослідної роботи кафедри педіатрії з дитячими інфекціями Луганського державного медичного університету (м. Рубіжне, Україна) – «Актуальні аспекти впливу перинатальних чинників на формування соматичної патології у дітей віком 1-14 років» (2017-2021, № державної реєстрації 0117U003041).

Результати та їх обговорення.

Відомості щодо розподілу обстежених дітей за врахованими клінічними й генетичними ознаками представлені в табл. 1.

Як видно з представлених у таблиці даних, у групі спостереження кількість дітей із нижчою (1-6) й вищою (7 і більше) частотою епізодів ГРІ за попередній рік виявилася майже однаковою, складаючи відповідно 17 (51,5 %) і 16 (48,5 %) випадків. Серед пацієнтів найбільше було тих, у кого t_{max} під час захворювання перебувала в межах 38-38,9 °C – 15 (45,5 %). Встановлено, що за поліморфним локусом rs 1799750 гена ММП-1-1607 деяку перевагу мав 2G/2G генотип – 13 (39,4 %). При цьому алель 2G зареєстровано дещо частіше (56,1 %), аніж алель 1G (43,9 %). Щодо поліморфного локусу rs 1799750 гена ММП-3-1171, то переважав 5A/6A генотип – 18 (54,5 %), а алель 6A (54,5 %) мала незначну домінацію над алелем 5A (45,5 %).

Головні параметри описових статистик щодо врахованих у дітей клініко-анамнестичних показників відображено в табл. 2.

Таблиця 1

Стратифікація обстежених дітей за врахованими ознаками

№ з/п	Ознака	Категорія	Кількість дітей	
			абсолютна (n)	відносна (%)
1	Кількість епізодів ГРІ за попередній рік, n	1-6	17	51,5
		7 і більше	16	48,5
		усього	33	100
2	t_{\max} під час захворювання, °C	37,0-37,9	12	36,3
		38,0-38,9	15	45,5
		39,0 і більше	6	18,2
		усього	33	100
3	Генотипи за поліморфним локусом rs 1799750 гена ММП-1-1607, n	2G/2G	13	39,4
		1G/2G	11	33,3
		1G/1G	9	27,3
		усього	33	100
4	Алелі за поліморфним локусом rs 1799750 гена ММП-1-1607, n	2G	37	56,1
		1G	29	43,9
		усього	66	100
5	Генотипи за поліморфним локусом rs 35068180 гена ММП-3-1171, n	6A/6A	9	27,3
		5A/6A	18	54,5
		5A/5A	6	18,2
		усього	33	100
6	Алелі за поліморфним локусом rs 35068180 гена ММП-3-1171, n	6A	36	54,5
		5A	30	45,5
		усього	66	100

Таблиця 2

Описові статистики окремих показників в обстежених дітей (n=33)

Показник	Me	$Q_1; Q_3$	$V_q, \%$	X_{\min}	X_{\max}
Вік, місяці	43,0	27,5; 54,0	30,81	16	81
InI, у.о.*	0,130	0,075; 0,195	46,15	0,016	0,421
InP, у.о.*	0,500	0,333; 0,625	29,20	0,083	0,750
$t_{\max}, ^\circ\text{C}$	38,0	37,8; 38,6	1,05	37,2	40,2

Примітка. * – умовна одиниця.

Продемонстровано, що найнижчу квартильну варіацію мала t_{\max} під час захворювання – 1,05 %. Для InI вона виявилася вищою (46,15 %) порівняно з InP (29,20 %), що опосередковано свідчить про відносно більш значущу диференціацію пацієнтів за віком, аніж за кількість епізодів ГРІ протягом попереднього року їхнього життя. Це також підтверджено досить високими значеннями V_q окремо для вікового показника – 30,81 %.

У табл. 3 наведено результати рангового кореляційного аналізу – класичного та із застосуванням бутстрепінгу – щодо врахованих у дітей клініко-анамнестичних показників. Класичний кореляційний аналіз продемонстрував помірну зворотну залежність між статтю обстеже-

них пацієнтів і їхнім InI ($\rho = -0,364$; $p = 0,037$; ДІ: $(-0,635) - (-0,014)$), згідно з якою значення цього інтегрального показника частоти епізодів ГРІ в хлопчиків виявилися дещо вищими, аніж у дівчаток. Водночас не зафіксовано взаємозв'язку між статтевою ознакою й In P. Значущий ступінь кореляції зафіксовано в парі InI*InP ($\rho = 0,698$; $p < 0,001$; ДІ: $0,459-0,843$), що є цілком логічним. Проте ця взаємозалежність не була високою, адже алгоритми розрахунку зазначених індексів мають певну принципову відмінність. Крім того, t_{\max} під час захворювання не корелювала з вивченими інтегральними індексами рекурентності ГРІ. Здійснений бутстрепінг підтвердив вірогідність усіх результатів класичного кореляційного аналізу.

Таблиця 3

Основні результати рангового кореляційного аналізу між дослідженими показниками в обстежених дітей (n=33)

Кореляційна пара	ρ -Спірмена	p (ρ)	Межа 95 % ДІ (ρ), класичний		Межа 95 % ДІ (ρ), бутстрепінг	
			верхня	нижня	верхня	нижня
Стать*InI	-0,364*	0,037	-0,635	-0,014	-0,627	-0,039
Стать*InP	-0,094	0,603	-0,432	0,268	-0,459	0,260
InI*InP	0,698*	<0,001	0,459	0,843	0,450	0,842
InI* t_{\max}	-0,045	0,804	-0,391	0,313	-0,386	0,330
InP* t_{\max}	-0,247	0,165	-0,552	0,115	-0,559	0,108

Шляхом розрахунку ВШ у дітей встановлено залежність частоти епізодів ГРІ від окремих генотипів поліморфного локусу rs 1799750 ММП-1-1607 (табл. 4). Зокрема, встановлено суттєво більшу кількість таких епізодів (у 7,78 рази) серед пацієнтів, які мали 2G/2G генотип, порівняно з тими, у кого виявлено 2 інші варіанти генотипу – 1G/2G і 1G/1G (ВШ=7,778; $p_1=0,008$; $p_2=0,025$; ДІ: 1,561-38,756). Вірогідну відмінність між 2 підгрупами дітей із різною частотою епізодів ГРІ в анамнезі зафіксовано як за 2G/2G генотипом, так і за (1G/2G+1G/1G) поєднанням генотипів. При цьому сила ефекту генотипу на кількість перенесених епізодів ГРІ виявилася середньою. Водночас, у разі присутності 1G/2G генотипу, пацієнти з групи спостереження на 87,3 % рідше

хворіли на ГРІ проти тих, які мали 2 інші варіанти генотипу – 1G/1G і 2G/2G (ВШ=0,127; $p_1=0,014$; $p_2=0,039$; ДІ: 0,022-0,739). Підгрупи дітей, які рідше й частіше хворіли на ГРІ, також відрізнялися за обома незалежними факторами – 1G/2G генотипом і (1G/1G+2G/2G) поєднанням генотипів. Продемонстровано, що сила впливу генотипу на залежний клінічний параметр знову перебувала в діапазоні середніх значень. Бутстреп-визначення ДІ в обох наведених вище випадках підтвердило вірогідність отриманих результатів. Щодо 1G/1G генотипу й усіх вивчених генотипів за поліморфним локусом rs 35068180 гена ММП-3-1171, а саме: 5A/5A, 5A/6A, 6A/6A, то не зареєстровано їх асоціації з обраною стратифікацією обстежених дітей за кількістю епізодів ГРІ в анамнезі.

Таблиця 4

ВШ приналежності обстежених дітей до підгрупи з частішими епізодами ГРІ щодо варіантів генотипів досліджених ММП

№ з/п	Фактор ризику	ВШ (95 % ДІ)	Асимптотична значущість		ВШ (95 % ДІ) бутстрепінг
			p_1	p_2	
1	ММП-1, 2G/2G / інші ¹	7,778 (1,561-38,756)	0,008	0,025	7,778 (1,792-51,197)
2	ММП-1, 1G/2G / інші ¹	0,127 (0,022-0,739)	0,014	0,039	0,127 (0,028-0,591)
3	ММП-1, 1G/1G / інші ¹	0,800 (0,172-3,728)	0,776	0,916	0,127 (0,105-5,200)
4	ММП-3, 6A/6A / інші ²	0,423 (0,085-2,099)	0,286	0,506	0,423 (0,077-2,000)
5	ММП-3, 5A/6A / інші ²	0,700 (0,177-2,771)	0,611	0,876	0,700 (0,140-2,980)
6	ММП-3, 5A/5A / інші ²	7,273 (0,744-71,114)	0,059	0,157	7,273 (0,929-20,884)

Примітки: 1 – інші 2 генотипи ММП-1-1607 (rs 1799750); 2 – інші 2 генотипи ММП-3-1171 (rs 35068180).

Відповідно до даних, відображених в табл. 5, також зафіксовано залежність частоти епізодів ГРІ від розподілу алелів 1G і 2G за поліморфним локусом rs 1799750 гена ММП-1-1607 (ВШ=2,778; $p_1=0,044$; $p_2=0,080$; ДІ: 1,016-7,639). Значущу відмінність між ГРІ-частотними підгрупами спостереження встановлено за обома за-

значеними алелями, а сила їх впливу на приналежність дітей до підгруп із більшою й меншою кількістю епізодів ГРІ виявилася слабкою. При цьому алель 1G мав перевагу в дітей із рідшими епізодами ГРІ, тоді як алель 2G частіше був присутнім, коли діти мали більше таких епізодів.

Таблиця 5

ВШ приналежності обстежених дітей до підгрупи з частішими епізодами ГРІ щодо варіантів алелів досліджених ММП

№ з/п	Фактор ризику	ВШ (95 % ДІ)	Асимптотична значущість		ВШ (95 % ДІ) бутстрепінг
			p_1	p_2	
1	ММП-1; 1G,2G	2,778 (1,016-7,639)	0,044	0,080	2,778 (0,992-8,616)
2	ММП-3; 5A,6A	0,424 (0,157-1,143)	0,087	0,147	0,424 (0,138-1,194)

Варто зауважити, що асимптотична значущість встановленого ВШ за Мантелем-Хенцелем ($p_2=0,080$) і нижня межа його ДІ (0,992), яку розраховано за допомогою бутстрепінгу, обумовлюють певну контраверсійність щодо вірогідності визначеної залежності. Водночас продемонстровано, що кількість епізодів ГРІ в обстежених дітей не залежала від співвідношення алелів 5A і 6A за поліморфним локусом rs 35068180 гена ММП-3-1171 (ВШ=0,424; $p_1=0,087$; $p_2=0,147$; ДІ: 0,157-1,143).

В опрацьованих джерелах літератури нами не знайдено інформації щодо вже опублікованих результатів досліджень про присутність або відсутність взаємозв'язку між варіантами генів ММП-1-1607 (1G/2G) і ММП-3-1171 (5A/6A), з одного боку, і схильністю дітей дошкільного віку до РРІ, з іншого. Водночас заслуговують на увагу дані, що наведені Ільченко С. І. і Фіалковською А. О., згідно з якими в підлітків, хворих на хронічний бронхіт, вірогідно частіше виявлявся ге-

нотип 2G/2G порівняно з тими підлітками, які не мали проявів зазначеного захворювання [25]. Варто також додати, що дотепер представлено достатню кількість наукових робіт, де відображено результати вивчення генетичних варіантів окремих представників сімейства ММП у дітей і дорослих осіб на тлі різноманітних захворювань дихальної системи. Наприклад, є такі публікації щодо рекурентного гострого бронхіту [26], бронхіальної астми [27], пневмонії [28] тощо. Автори цих робіт продемонстрували значущий ступінь кореляції між клінічними проявами означених захворювань і врахованими генетичними варіантами окремих ММП. Тому отримані нами результати щодо залежності ГРІ-частотного показника в обстежених дітей від досліджених генотипів (2G/2G і 1G/2G) ММП-1-1607 гена виглядають достатньо логічними.

Обстежені діти дошкільного віку досить суттєво різнилися між собою за кількістю епізодів ГРІ протягом попереднього року їхнього життя. До того ж вони майже рівномірно розподілились у 2 сформованих підгрупах за меншою й більшою частотою епізодів ГРІ в анамнезі, а їх стратифікація за генотипами й алелями досліджених ММП-1-1607 і ММП-3-1171 також виявилася досить збалансованою. Застосовано також бутстреп-аналіз, за допомогою якого здійснена додаткова перевірка вірогідності розрахованих статистичних показників. Перераховані аргументи значною мірою підтверджують належний ступінь обґрунтованості отриманих результатів, незважаючи на відносно невелику кількість пацієнтів у групі спостереження. Слід зауважити, що доволі широкі межі ДІ для ВШ у деяких випадках, найімовірніше, були зумовлені саме такою кількістю обстежених дітей.

Водночас варто визнати наявність ще кількох обмежень проведеного дослідження. По-перше, у ньому були задіяні лише ті діти, які перебували на стаціонарному лікуванні, а амбулаторні пацієнти через організаційні обставини були поза увагою. По-друге, завжди залишаться певні сумніви щодо точності відомостей, отриманих від батьків або родичів дітей із групи спостереження, про частоту епізодів ГРІ. По-третє, ступінь значущості поєднання окремих варіацій генотипів й алелів досліджених ММП із частішими або рідшими епізодами ГРІ може змінитися в разі одночасного врахування присутності ще й інших численних факторів ризику РРІ [18, 20, 29]. Проте навіть за таких обмежень отримані дані варті того, аби бути врахованими при розробці комплексної моделі прогнозування приналежності дітей дошкільного віку до групи ризику щодо рекурент-

ного перебігу епізодів ГРІ. У перспективі доцільним виглядає поєднане генетичне дослідження ширшого спектру ММП, насамперед включно з ММП-2 і ММП-9, та збільшення кількості суб'єктів спостереження з їх стратифікацією за вужчими віковими проміжками.

Висновки:

1. Продемонстровано значущу залежність між приналежністю дітей дошкільного віку до підгрупи з частішими епізодами ГРІ та 2G/2G генотипом за поліморфним локусом rs 1799750 гена ММП-1-1607 (ВШ=7,778; $p_1=0,008$; $p_2=0,025$; ДІ: 1,561-38,756).

2. 1G/2G генотип за поліморфним локусом rs 1799750 гена ММП-1-1607 вірогідно частіше визначено в пацієнтів, які склали підгрупу з меншою кількістю епізодів ГРІ (ВШ=0,127; $p_1=0,014$; $p_2=0,039$; ДІ: 0,022-0,739).

3. У підгрупах із рідшими й частішими епізодами ГРІ зафіксовано різницю з межовим ступенем вірогідності між частотним представництвом алелів 1G і 2G, що були досліджені за поліморфним локусом rs 1799750 гена ММП-1-1607. При цьому алель 1G переважав серед дітей із меншою кількістю епізодів ГРІ, тоді як алель 2G частіше був присутнім серед тих, хто мав більшу кількість таких епізодів (ВШ=2,778; $p_1=0,044$; $p_2=0,080$; ДІ: 1,016-7,639).

4. Не встановлено жодного поєднання між алелями 5A і 6A, а також відповідними їм генотипами, що визначені за поліморфним локусом rs 35068180 гена ММП-3-1171, та підгрупами дітей із рідшими й частішими епізодами ГРІ в анамнезі.

5. Отримані результати обумовлюють доцільність подальшого вивчення генетичних варіантів ММП у дітей із РРІ, що насамперед має полягати в розширенні спектру цих ендопептидаз для аналізу та збільшенні кількості суб'єктів спостереження.

Перспективи подальших досліджень. Планується використати отримані результати при розробці моделі прогнозування ймовірності рекурентного перебігу епізодів ГРІ в дітей дошкільного віку.

Фінансування. Дослідження не мало зовнішніх джерел фінансування.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів і власної фінансової зацікавленості при підготовці цієї статті до публікації.

Література:

1. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9739. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>
2. Zakiyanov O, Kalousova M, Zima T, Tesar V. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in kidney disease. *Adv Clin Chem.* 2021;105:141-212. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2021.02.003>
3. Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* 2019;286(15):2830-69. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.14818>
4. Wątroba S, Wisniowski T, Bryda J, Kurzepak J. Characteristics of matrix metalloproteinases and their role in embryogenesis of the mammalian respiratory system. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2021;75(1):24-34. DOI: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.6933>
5. Wei C. The multifaceted roles of matrix metalloproteinases in lung cancer. *Front Oncol.* 2023;13:1195426. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1195426>

6. Zhang C, Jiang G, Gao X. Matrix Metalloproteinase-Responsive Drug Delivery Systems. *Bioconj Chem.* 2023;34(8):1349-65. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.3c00266>
7. Lee HS, Kim WJ. The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10546. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms231810546>
8. Bassiouni W, Ali MAM, Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J.* 2021;288(24):7162-82. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.15701>
9. Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Do LD, Hritz BG. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells.* 2020;9(5):1313. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9051313>
10. Zhang RF, Zhang B, Chang-Jiang W, Jin JY. Labelling Matrix Metalloproteinases. *Curr Med Chem.* 2023;30(40):4569-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867330666230113121728>
11. Vo HVT, Nguyen YT, Kim N, Lee HJ. Vitamin A, D, E, and K as Matrix Metalloproteinase-2/9 Regulators That Affect Expression and Enzymatic Activity. *Int J Mol Sci.* 2023;24(23):17038. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms242317038>
12. Nguyen YT, Kim N, Lee HJ. Metal Complexes as Promising Matrix Metalloproteinases Regulators. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1258. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24021258>
13. Gresele P, Falcinelli E, Momi S, Petito E, Sebastiano M. Platelets and Matrix Metalloproteinases: A Bidirectional Interaction with Multiple Pathophysiologic Implications. *Hamostaseologie.* 2021;41(2):136-45. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1393-8339>
14. Dai XY, Liu L, Song FH, Gao SJ, Wu JY, Li DY, et al. Matrix metalloproteinases as attractive therapeutic targets for chronic pain: A narrative review. *Int J Biol Macromol.* 2024;261(Pt 1):129619. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129619>
15. Pavan Kumar N, Venkataraman A, Varadarajan P, Nancy A, Rajamanickam A, Selladurai E, et al. Role of matrix metalloproteinases in multi-system inflammatory syndrome and acute COVID-19 in children. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:1050804. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1050804>
16. Giachelli CM, Donato M, Scatena M. Matrix metalloproteinase-3 joins a growing list of proteases that regulate vascular calcification. *Cardiovasc Res.* 2024;120(6):565-6. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvae064>
17. Chiappini E, Santamaria F, Marseglia GL, Marchisio P, Galli L, Cutrera R, et al. Prevention of recurrent respiratory infections: Inter-society Consensus. *Ital J Pediatr.* 2021;47(1):211. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13052-021-01150-0>
18. Zhang X, Dai X, Li X, Xie X, Chen Y, Chen Y, et al. Recurrent respiratory tract infections in children might be associated with vitamin A status: a case-control study. *Front Pediatr.* 2024;11:1165037. DOI: <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1165037>
19. Wang B, Zhou J, He B, Shi H, Liang X, Zhang Z, et al. Reveal the Patterns of Prescriptions for Recurrent Respiratory Tract Infections' Treatment Based on Multiple Illustrious Senior Traditional Chinese Medicine Practitioners. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2023;2023:7982927. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/7982927>
20. Cardinale F, Zuccarino F, Serio C, Bizzoco F, Tricarico LG, Verriello G, et al. Recurrent respiratory infections in children: new perspectives. *Global Pediatrics.* 2024;8:100105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gped.2023.100105>
21. Esposito S, Jones MH, Feleszko W, Martell JAO, Falup-Pecurariu O, Geppé N, et al. Prevention of new respiratory episodes in children with recurrent respiratory infections: an expert consensus statement from the world association of infectious diseases and immunological disorders (WAIID). *Microorganisms.* 2020;8(11):1810. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111810>
22. Makukh HV, Chorna LB, Tyrkus MYa, Akopyan HR, Shuvarska VI, Malakhova AY, et al. Analysis of the PAH Gene Mutations in the Ukrainian Population: A Report from the West Ukrainian Region. *Cytology and Genetics.* 2021;55(5):414-9. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452721050066>
23. Dai S, Long Y. Genotyping analysis using an RFLP assay. *Methods Mol Biol.* 2015;1245:91-9. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_7
24. Волошин АН, Марушко ЮВ, Савченко ІІІ. Бутстреп-анализ иммунного статуса у дітей дошкільного віку з рекуррентними респіраторними інфекціями. *Сучасна педіатрія. Україна.* 2023;3:13-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.15574/SP.2023.131.13>
25. Ільченко СІ, Фіалковська АО. Діагноз «хронічний бронхіт» в дитячій пульмонології: «за» та «проти». *Матеріали І Національного конгресу пульмонологів України; 2018 Жов 18-19; м. Київ. Український пульмонологічний журнал [Інтернет].* 2028 [цитовано 2024 Вер 5];4:32-4. Доступно: <http://www.ifp.kiev.ua/doc/journals/upj/18/pdf18-4/32.pdf>
26. Strelkova MI, Senatorova GS, Polyakov VV. The role of polymorphisms of matrix metalloproteinases' polymorphisms 1 and 12 in the formation of wheezing syndrome among children with recurrent bronchitis. *Wiad Lek.* 2021;74(7):1595-99. DOI: <http://dx.doi.org/10.36740/WLek.202107108>
27. Chen LH, Li CH, Wang SC, Chiu KL, Wu MF, Yang JS, et al. Association of Matrix Metalloproteinase-1 Promoter Polymorphisms With Asthma Risk. *In Vivo.* 2024;38(1):365-71. DOI: <https://doi.org/10.21873/invivo.13447>
28. Cai L, Zuo X, Ma L, Zhang Y, Xu F, Lu B. Associations of MMP9 polymorphism with the risk of severe pneumonia in a Southern Chinese children population. *BMC Infect Dis.* 2024;24(1):19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08931-4>
29. Nagaraju K, Shah R, Ganapathy S, Roy S, Bhatia R, Kumar PS, et al. Practical Approach for the Diagnosis, Prevention, and Management of Recurrent Upper Respiratory Tract Infection in Children: Report from an Expert Closed-group Discussion. *Pediatr Inf Dis.* 2021;3(3):105-12. DOI: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10081-1321>

ALLELIC VARIANTS OF MATRIX METALLOPROTEINASE TİPES 1 AND 3 GENES IN PRESCHOOL CHILDREN SUFFERING FROM RECURRENT RESPIRATORY INFECTIONS

O. Voloshyn^{1,4}, H. Makukh^{2,3}, Yu. Marushko¹, I. Savchenko⁴, L. Osychniuk⁴

Bogomolets National Medical University¹, Kyiv, Ukraine
Lviv Regional Clinical Perinatal Centre², Lviv, Ukraine
Scientific Medical Genetic Centre LeoGENE³, Lviv, Ukraine
Luhansk State Medical University⁴, Rivne, Ukraine

Summary.

Matrix metalloproteinases (MMPs) have numerous physiological and pathological effects. In particular, they are involved in extracellular matrix degradation and remodeling, cell differentiation and apoptosis, immune and inflammatory mechanisms, embryogenesis, etc.

Aim. To determine the state of interdependence between the allelic variants of the genes MMP-1-1607 (1G/2G) and MMP-3-1171 (5A/6A), on the one hand, and the different frequency of acute respiratory infections (ARI) in preschool children, on the other hand.

Materials and methods. A total of 33 children (15 boys and 18 girls), aged 1-6 years, undergoing inpatient treatment for ARI were included in the clinical trial. The number of ARI episodes during the previous year of life was regarded. The distribution of allelic variants was also studied, specifically: 1) 1G/2G of the MMP-1 gene at position 1607 (rs 1799750) and 2) 5A/6A of the MMP-3 gene at position 1171 (rs 35068180). Statistical processing of the obtained digital data was performed using IBM SPSS Statistics 28 licensed software (No. 3922/01/2021).

Results. The association between preschool children belonging to the subgroup with more frequent ARI episodes and the 2G/2G genotype for the rs 1799750 polymorphism locus of the MMP-1-1607 gene was demonstrated (OR=7.778; p1=0.008; p2=0.025; CI: 1.561-38.756). On the contrary, the 1G/2G genotype was significantly more frequent in patients forming a subgroup with fewer ARI episodes (OR=0.127; p1=0.014; p2=0.039; CI: 0.022-0.739). Furthermore, the 1G allele was more frequent in children with fewer ARI episodes, and the 2G allele was more frequent in those with a greater number of such episodes in their history (OR=2.778; p1=0.044; p2=0.080; CI: 1.016-7.639). At the same time, there was no association between alleles 5A and 6A and their corresponding genotypes, determined for the rs 35068180 polymorphism locus of the MMP-3 gene at position 1171, and subgroups of children with less frequent and more frequent ARI episodes.

Conclusions. The results obtained suggest a significant dependence of the frequency of ARI episodes in preschool children on the studied genotypes (2G/2G and 1G/2G) of the MMP-1 gene (rs 1799750). They should be considered in predicting whether such children are at risk for recurrent course of ARI.

The study was conducted within the framework of the initiative research work of the Department of Pediatrics with Childhood Infections of Luhansk State Medical University (Rubizhne, Ukraine) – «Current aspects of the influence of perinatal factors on the development of somatic pathology in children aged 1-14 years» (2017-2021, state registration number 0117U003041). No external funding was received for this study.

The study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

The study protocol was approved by the local ethics committees of Bogomolets National Medical University and Luhansk State Medical University. Informed parental consent was obtained for the study in children.

No conflict of interests was declared by the authors.

Key words: Preschool Children; Recurrent Respiratory Infections; Matrix Metalloproteinases of Types 1 and 3; Genetic Variants.

Контактна інформація:

Волошин Олександр Миколайович – к. мед. н., доцент, докторант кафедри педіатрії післядипломної освіти НМУ імені О. О. Богомольця (м. Київ, Україна); завідувач кафедри педіатрії з дитячими інфекціями Луганського державного медичного університету (м. Рівне, Україна).

e-mail: ditlikar@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7612-6521>

Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/KBD-4557-2024>

Макух Галина Василівна – д. біол. н., завідувачка регіонального центру неонатального скринінгу Львівського обласного клінічного перинатального центру (м. Львів, Україна); старший науковий співробітник наукового медико-генетичного центру «ЛеоГен» (м. Львів, Україна).

e-mail: makukh_halyna@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7749-5353>

Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/C-6624-2012>

Марушко Юрій Володимирович – д. мед. н., професор, завідувач кафедри педіатрії післядипломної освіти НМУ імені О. О. Богомольця (м. Київ, Україна).

e-mail: iurii.marushko@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8066-9369>

Савченко Ірина Іванівна – асистентка кафедри внутрішніх хвороб № 1 Луганського державного медичного університету.

e-mail: irene1969emerald@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0820-2152>

Осичнюк Лілія Михайлівна – к. мед. н., доцентка кафедри педіатрії з дитячими інфекціями Луганського державного медичного університету (м. Рівне, Україна).

e-mail: losycnuk@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6547-3023>

Contact information:

Oleksandr Voloshyn – MD, Medical Sciences Candidate; Associate Professor, Doctoral Researcher of the Pediatrics Department of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine); Head of the Department of Pediatrics with Childhood Infections, Luhansk State Medical University (Rivne, Ukraine).

e-mail: ditlikar@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7612-6521>

Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/KBD-4557-2024>

Halyna Makukh – Doctor of Biological Sciences, Head of Regional Centre of Neonatal Screening, Lviv Regional Clinical Perinatal Centre (Lviv, Ukraine); Senior Research Assistant, Scientific Medical Genetic Centre LeoGENE (Lviv, Ukraine).

e-mail: makukh_halyna@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7749-5353>

Researcher ID: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/C-6624-2012>

Yurii Marushko – MD, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Pediatrics Department of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine).

e-mail: iurii.marushko@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8066-9369>

Iryna Savchenko – MD, Assistant of the Department of Internal Medicine № 1, Luhansk State Medical University (Rivne, Ukraine).

e-mail: irene1969emerald@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0820-2152>

Liliya Osychniuk – MD, Medical Sciences Candidate; Associate Professor of the Department of Pediatrics with Childhood Infections, Luhansk State Medical University (Rivne, Ukraine).

e-mail: losycnuk@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6547-3023>



Надійшло до редакції 11.07.2024 р.
Підписано до друку 15.09.2024 р.