

Е.А.Байгозина¹, В.И.Совалкин², И.В.Куликов³, Т.А.Потапова⁴, М.И.Воевода³, А.Г.Ромашенко⁴

Роль полиморфизма C(–260)→Т гена CD14 в течении и исходе нозокомиальной пневмонии

1 – отделение пульмонологии ГУЗ Омской обл. "Областная клиническая больница": 644111, Омск, ул. Березовая, 3;

2 – кафедра госпитальной терапии № 2 ГОУ ВПО "Омская государственная медицинская академия": 644043, Омск, ул. Ленина, 12;

3 – ГУ НИИ терапии СО РАМН: 630089, Новосибирск, ул. Б.Богаткова, 175/1;

4 – Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН: 630090, Новосибирск, пр-т Ак. Лаврентьева, 10

E.A.Baygozina, V.I.Sovalkin, I.V.Kulikov, T.A.Potapova, M.I.Voevoda, A.G.Romashchenko

A role of C(–260)→T CD14 gene polymorphism for clinical course and outcomes of nosocomial pneumonia

Summary

The article has introduced analysis of a common functional C(–260)→T polymorphism within the promoter region of CD14 lipopolysaccharide receptor in patients with nosocomial pneumonia (NP). Associations between CD14 gene polymorphism and clinical course of NP were found in 75 patients: the TT genotype, but not T allele, correlated with increased risk of NP, its severity and prognosis. These genetic disorders require further investigation to explain metabolic and immunology disorders in patients with NP.

Key words: nosocomial pneumonia, CD14 gene polymorphism, outcomes.

Резюме

Изучена ассоциация полиморфизма гена рецептора CD14 в позиции C(–260)→T с частотой возникновения, тяжестью течения и исходом нозокомиальной пневмонии (НП). Установлены ассоциации между исследованным полиморфизмом гена CD14 и клиническими проявлениями НП у 75 пациентов: генотип TT (но не аллель T) коррелирует с повышенным риском развития НП, тяжестью ее проявлений и прогнозом. Выявленные ассоциации требуют дальнейшего изучения для объяснения метаболических и иммунологических нарушений у пациентов с НП.

Ключевые слова: нозокомиальная пневмония, полиморфизм гена CD14, исход.

Нозокомиальная пневмония (НП) занимает 2-е место среди всех нозокомиальных инфекций (13–18 %), является самой частой госпитальной инфекцией (46,9 %) в отделениях интенсивной терапии [1] и характеризуется высоким уровнем летальности – от 30 до 70 % [2].

Инициальный иммунный ответ при пневмонии заключается в первичном распознавании грамотрицательных бактерий клетками миеломоноцитарного ряда структур различных патогенов, называемых молекулярными паттернами, например липополисахаридов (ЛПС). Лейкоциты, в свою очередь, экспрессируют соответствующие паттерн-распознающие рецепторы (ПРР). К последним относится рецептор CD14 [3], функция которого заключается в активации начальных этапов неспецифических защитных реакций, повышении уровня фагоцитирующих клеток и удалении апоптотических клеток [4].

Регуляция уровня растворимого CD14 (sCD14) контролируется известным на сегодняшний день полиморфизмом промоторной области гена CD14 [5]. Данный полиморфизм локализуется внутри Sp1 транскрипционной фактор-связывающей области [4] и содержит единичную замену нуклеотида (C→T) в позиции –260 [6]. C(–260)→T полиморфизм гена CD14 ассоциируется с регуляцией плотности экспрессии рецепторов CD14 на моноцитах [7].

Цель данного исследования – изучить распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма C(–260)→T гена CD14 в контрольной выборке и в группе пациентов с НП и оценить ассоциацию полиморфизма промотора гена CD14 с особенностями возникновения, течения и исхода заболевания.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 75 больных НП, находившихся на стационарном лечении в Омской областной клинической больнице. Среди них было 40 мужчин (53,33 %) и 35 женщин (46,67 %). Средний возраст пациентов составил $43,96 \pm 0,94$ года. Диагноз НП был установлен на основании данных клинико-лабораторных исследований и рентгенографии органов грудной клетки. В качестве контроля использовали ДНК 409 здоровых, не находящихся в родстве жителей Новосибирска, обследованных в рамках международного проекта ВОЗ "МОНИКА", статистически значимо не различавшихся по полу, возрасту и этнической принадлежности (русские) с группой больных. Среди них было 204 мужчины (49,87 %) и 205 женщин (50,13 %), средний возраст – $48,58 \pm 0,32$ года.

Выделение ДНК из крови проводилось стандартным фенол-хлороформным методом. Выявление

полиморфного сайта гена CD14 C(–260)→T осуществлялось методом полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией ее фрагмента [8]. Статистическая обработка данных выполнялась с использованием критерия χ^2 по Пирсону с поправкой Йетса на непрерывность. Для сравнения частот аллелей дополнительно использовался 2-сторонний точный критерий Фишера. Расчеты проводились в статистической программе SPSS 11.5.

Результаты

Частоты генотипов полиморфизма C(–260)→T гена CD14 в контрольной группе в целом и в группе больных НП находились в равновесии Харди–Вайнберга. При сравнении частот генотипов полиморфизма гена CD14 между группами было выявлено статистически значимое повышение частоты генотипа TT у больных НП (33,33 %) по сравнению с контрольной группой (18,09 %; $p = 0,008$). Генотип СТ достоверно чаще встречался в контрольной группе (54,03 %), по сравнению с группой пациентов с НП (40,0 %; $p = 0,012$), как показано в таблице.

При сравнении частот аллелей гена CD14 между группами статистически значимых различий получено не было. Выявленная закономерность может свидетельствовать о том, что гомозиготы по Т-аллелю более восприимчивы к развитию НП. Обращают на себя внимание различия в тяжести течения НП у пациентов с генотипами CC, СТ и TT: в 1-м случае тяжесть пневмонии по шкале CPIS (*Clinical Pulmonary Infection Score*) составила $7,81 \pm 1,32$ балла, во 2-м – $8,93 \pm 1,48$ балла ($p < 0,05$). В исследовании прослеживалась позитивная корреляция между временем разрешения НП с генотипом гена CD14: наличие генотипа TT ассоциировалось с затяжным, осложненным течением пневмонии и необходимостью пролонгированной респираторной поддержки в случае НП, связанной с искусственной вентиляцией легких, по сравнению с течением заболевания у пациентов с генотипами CC и СТ ($r = 0,70$; $p = 0,01$). По-видимому, это объясняется более высокой концентрацией sCD14 у лиц с Т-аллелем и приводит к персистенции возбудителей НП [7]. Необходимо отметить, что количество неблагоприятных исходов НП было наибольшим среди пациентов с генотипом TT (27,9 % случаев).

Таблица
Частота аллелей и генотипов полиморфизма гена CD14 C(–260)→T у больных НП и в контрольной группе

Аллельный вариант	Пациенты с НП (n = 75)	Контрольная группа (n = 409)
Аллель С, n (%)	50 (47,62)	335 (53,17)
Аллель Т, n (%)	55 (52,38)	295 (46,83)
Генотип CC, n (%)	20 (26,67)	114 (27,87)
Генотип СТ, n (%)	30 (40,00)*	221 (54,03)*
Генотип TT, n (%)	25 (33,33)**	74 (18,09)**

Примечание: * – статистические различия по генотипу СТ между группами больных НП и здоровых ($\chi^2 = 8,87$; $p = 0,012$); ** – статистические различия по генотипу TT у пациентов в этих же группах ($\chi^2 = 9,63$; $p = 0,008$).

Обсуждение

Полученные данные подтверждаются результатами других исследований, согласно которым у больных с генотипом TT чаще развивалась пневмония, вызванная *Chlamydophila pneumoniae*, хотя отличия по полу отсутствовали [3]. При этом уровень sCD14 в сыворотке крови был выше у гомозигот по аллелю Т гена CD14. Можно предположить, что значительная часть случаев НП в обследованной популяции с генотипом TT связана с особенностями иммунного ответа, модулированного рецептором CD14. Генетически детерминированное повышение экспрессии гена CD14 ассоциируется с повышенной восприимчивостью к ЛПС у больных с НП, вызванной грамотрицательной микрофлорой. В настоящем исследовании косвенным доказательством отсутствия влияния генотипа CC на возникновение НП является почти одинаковая частота встречаемости данного генотипа у пациентов с НП (26,67 %) и в контрольной группе (27,87 %; $p > 0,05$).

Различия в тяжести НП по шкале CPIS у лиц с генотипом TT и CC или СТ, по-видимому, связаны с повышением синтеза провоспалительных цитокинов, кислородных радикалов и нитрита азота [9]. Увеличение секреции данных медиаторов приводит к цитокин-опосредованному повреждению легких при НП. Подтверждают это экспериментальные данные *S.J.Ebong et al.*, указавших на повышение уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у мышей с сепсисом при высоком содержании sCD14 [10].

Согласно данным литературы, ассоциация генотипа TT промоторного региона гена CD14 с возникновением бактериальных осложнений, в т. ч. НП, остается противоречивой. *S.Gibot et al.* продемонстрировали, что генотип TT гена CD14 существенно чаще встречался у больных с септическим шоком и достоверно чаще был связан с риском гибели от этого заболевания [5]. Напротив, *J.A.Hubacek* и *M.Heesen et al.* не выявили различий между аллелем Т гена CD14 и тяжестью инфекции [11, 12]. Возможно, одной из причин подобных разногласий является то, что мутация гена CD14 может происходить не только в регионе –260, но и в других локусах гена, что приводит к вариабельной экспрессии mCD14 и, следовательно, различной чувствительности к инфекционным агентам [8]. Кроме того, ЛПС грамотрицательных возбудителей НП могут стимулировать продукцию цитокинов путем активации не только CD14-, но и TLR-зависимого пути [13].

Заключение

Таким образом, установлены ассоциации между полиморфизмом гена регуляторной молекулы воспаления CD14 и клиническими проявлениями НП: генотип TT (но не аллель Т) коррелирует с повышенным риском развития НП, тяжестью ее проявлений и прогнозом заболевания. Выявленные генетические изменения требуют дальнейших исследований

для объяснения метаболических и иммунологических нарушений при НП.

Литература

1. Eggimann P., Pittet D. Infection control in the ICU. *Chest* 2001; 120: 2059–2093.
2. Синопальников А.И. Диагностика и антибактериальная терапия нозокомиальной пневмонии. *Рос. мед. вести* 2005; 3: 4–21.
3. Eng H.L., Chen C.H., Kuo C.C. et al. Association of CD14 promoter gene polymorphism and Chlamydia pneumoniae infection. *J. Infect. Dis.* 2003; 188: 90–97.
4. Lin S.M., Frevert C.W., Kajikawa O. et al. Differential regulation of membrane CD14 expression and endotoxin – tolerance in alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; 31: 162–170.
5. Gibot S., Cariou A., Drouet L. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit. Care Med.* 2002; 30: 969–973.
6. Hubacek J.A., Pit'ha J., Skodova Z. C(–260)→T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 3218–3220.
7. Karhukorpi J., Yan Y., Niemela S. et al. Effect of CD14 promoter polymorphism and H. pylori infection and its clinical outcomes on circulating CD14. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 128: 326–332.
8. Ito D., Murata M., Tanahashi N. et al. Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2000; 31: 2661–2664.
9. Da Silva Correia J., Soldau K., Christen U. et al. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the protein in its membrane receptor complex: transfer from CD14 to TLR4 and MD2. *J. Biol. Chem.* 2000; 276: 21129–21135.
10. Ebong S.J., Goyert S.M., Nemzek J.A. et al. Critical role of CD14 for production of proinflammatory cytokines and cytokine inhibitors during sepsis with failure to alter morbidity or mortality. *Infect. and Immun.* 2001: 2099–2106.
11. Hubacek J.A., Stuber F., Frohlich D. et al. The common functional C (–159)→T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated within sepsis development or mortality. *Genes Immun.* 2000; 1: 405–407.
12. Heesen M., Bloemeke B., Obertacke U. et al. The –260 C→T promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients. *Intensive Care Med.* 2002; 28: 1161–1163.
13. Netea M.G., Kullberg B.J., Galama J.M.D. et al. Non-LPS components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 1188–1195.

Информация об авторах

Байгозина Евгения Александровна – к. м. н., врач-пульмонолог ГУЗ Омской обл. "Областная клиническая больница"; тел.: (3812) 24-42-37; e-mail: pulmonology55@mail.ru
 Савалкин Валерий Иванович – д. м. н., проф., зав. кафедрой госпитальной терапии № 2 Омской государственной медицинской академии; тел.: (3812) 23-32-89; e-mail: rector@omsk-osma.ru
 Куликов Игорь Вячеславович – к. м. н., старший научный сотрудник НИИ терапии СО РАМН; тел.: (383) 264-25-16; e-mail: office@iimed.ru
 Ромащенко Аида Герасимовна – к. б. н., зав. лабораторией Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН; тел.: (383) 333-31-18; e-mail: vomasch@bionet.nsc.ru
 Потапова Татьяна Абрамовна – к. б. н., старший научный сотрудник Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН; тел.: (393) 333-31-18; e-mail: vomasch@bionet.nsc.ru
 Воевода Михаил Иванович – член-корр. РАМН, д. м. н., проф., директор НИИ терапии СО РАМН; тел.: (383) 264-25-16; e-mail: office@iimed.ru

Поступила 25.05.09
 © Коллектив авторов, 2009
 УДК 616.24-002-022.36-092