

Генетические особенности у больных гриппом А / H1N1 / 09, осложненным пневмонией

Е.Н.Романова, А.В.Говорин

ГБОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия" Минздрава России: 672020, Чита, ул. Горького 39А

Резюме

Целью исследования явилось выявление особенностей полиморфизмов генов цитокинов (фактор некроза опухоли – TNF G308A, интерлейкина – IL-10 C592A, IL-10 C819T, IL-10 G1082A), гена регуляторной молекулы воспаления (CD14 C159T) и регуляции сосудистого тонуса (eNOS C786T) у пациентов с гриппом А / H1N1, осложненным пневмонией. *Материалы и методы.* Обследованы пациенты, находившиеся на лечении по поводу пневмонии на фоне гриппа А / H1N1 / 09: 1-я группа ($n = 37$) – с тяжелыми пневмониями; 2-я ($n = 74$) – с нетяжелыми пневмониями; 3-я ($n = 115$) – здоровые лица. Молекулярно-генетическое исследование проводилось методом полимеразной цепной реакции. У больных гриппом А / H1N1, осложненным пневмонией, чаще встречалось гомозиготное носительство аллели G полиморфизма (308 G/A) гена TNF по сравнению с контрольной группой. У заболевших значительно преобладала G-аллель гена IL-10 (1082 G/A), преимущественно в виде гомозиготного носительства. У пациентов с гриппозными пневмониями превалировала C-аллель гена IL-10 (592 C/A), в большей степени в виде гомозиготного варианта. Гомозиготное носительство гена IL-10 (819 C/T) T/T и гена CD14 (159 C/T) T/T оказалось значительно ниже по сравнению с группой здоровых лиц. Установлено преобладание гомозиготы T/T полиморфизма (786 C/T) гена eNOS среди заболевших гриппозной пневмонией. *Результаты.* Прогностическими факторами риска развития пневмонии у больных гриппом А / H1N1 явились полиморфизмы гена IL-10 592 CC, 819 CC, 1082 GG. Наибольшее значение в прогнозировании тяжелого течения пневмонии при гриппе А / H1N1 имеют гаплотипы TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG). В качестве предикторов развития острого повреждения легких / острого респираторного дистресс-синдрома и летального исхода у больных гриппом А / H1N1 / 09 выявлены гаплотипы TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) и TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) соответственно. *Заключение.* Изучение генетического статуса пациента при гриппе А / H1N1 позволит оценивать тяжесть заболевания и прогнозировать возможные осложнения.

Ключевые слова: грипп А / H1N1, пневмония, полиморфизм генов, цитокины, эндотелиальная NO-синтаза.

DOI: 10.18093/0869-0189-2015-25-4-425-432

Genetic features of patients with influenza A / H1N1 / 09 complicated by pneumonia

E.N.Romanova, A.V.Govorin

State Institution "Chita State Medical Academy", Healthcare Ministry of Russia: 39A, Gor'kogo str., Chita, 672090, Russia

Summary

The *aim* of this study was to investigate polymorphisms of cytokine genes (TNF G308A, IL-10 C592A, IL-10 C819T, IL-10 G1082A), and molecular regulation of inflammation (CD14 C159T) and vascular tone (eNOS C786T) in patients with A / H1N1 flu complicated by pneumonia. *Methods.* Patients hospitalized for pneumonia complicating influenza A / H1N1 / 09 were involved in the study: 37 patients with severe pneumonia, 74 patients with non-severe pneumonia and 115 healthy subjects as controls. Polymerase chain reaction (PCR) was used for molecular investigations. *Results.* Patients with influenza A / H1N1 complicated by pneumonia carried the homozygous G allele of TNF gene polymorphism (308 G/A) and the homozygous G-allele of IL-10 gene polymorphism (1082 G/A) more often compared with controls. Patients with pneumonia more often carried IL-10 gene 592 C/A allele and largely as homozygous variant. Frequencies of homozygous IL-10 gene polymorphism (819 C/T) T/T and CD14 gene polymorphism (159 C/T) T/T were significantly lower compared with healthy subjects. On contrary, the homozygous T/T polymorphism (786 C/T) of eNOS gene was more common in patients with pneumonia. Prognostic risk factors for occurrence of pneumonia in patients with influenza A / H1N1 were IL-10 gene polymorphisms 592 CC, 819 CC, and 1082 GG. TNF (308 GG); IL-10 (819 CC) and (1082 GG) haplotypes had the highest prognostic value for severe pneumonia in patients with influenza A / H1N1. TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) and TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) and CD14 (159 CC) haplotypes predicted ARDS and death in patients with influenza A / H1N1 / 09, respectively. *Conclusion.* Identifying genetic status in a patient with influenza A / H1N1 could predict severity and complications of the disease.

Key words: influenza A / H1N1, pneumonia, polymorphism, cytokines, endothelial NO-synthase.

В 2009–2010 г. вследствие появления нового штамма вируса гриппа А / H1N1 наблюдалась пандемия гриппа. В марте 2010 г. опубликовано сообщение Всемирной организации здравоохранения о 17 700 летальных исходах среди пациентов с лабораторно подтвержденным гриппом А / H1N1 [1]. В России в числе первых пострадавших, в т. ч. с летальными исходами ($n = 57$), зарегистрированы лица, проживающие в Забайкальском крае [2]. Наиболее частыми причинами смерти были тяжелые поражения

легких – пневмонии и острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). Неблагоприятные исходы наблюдались не только среди лиц с сопутствующими хроническими заболеваниями, но и среди молодых людей без существенной предшествующей патологии [2–4]. Известно, что реализация воспалительного ответа у разных лиц может существенно отличаться по интенсивности и продолжительности. Различиями в генах, контролирующими защитные реакции организма, может определяться характер про-

текания воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций при внедрении патогенов.

Целью исследования явилось выявление особенностей полиморфизма генов цитокинов (фактор некроза опухоли – TNF G308A, интерлейкины – IL-10 C592A, IL-10 C819T, IL-10 G1082A), гена регуляторной молекулы воспаления (CD14 C159T) и регуляции сосудистого тонуса (eNOS C786T) у пациентов с гриппом А / H1N1 / 09, осложненным пневмонией.

Материалы и методы

Обследованы пациенты (средний возраст – $40,5 \pm 12,7$ года), находившиеся на лечении по поводу пневмонии на фоне высокопатогенного гриппа в стационарах Читы в период с октября по декабрь 2009 г. Грипп А / H1N1 верифицирован методом полимеразной цепной реакции и при реакции торможения геммагглютинации: 1-я группа ($n = 37$) – пациенты с тяжелыми пневмониями на фоне гриппа А / H1N1; 2-я ($n = 74$) – больные с нетяжелыми пневмониями на фоне гриппа А / H1N1; 3-я группа (контроль) ($n = 115$) – относительно здоровые лица. Все группы были сопоставимы по полу и возрасту. Оценка тяжести заболевания в стационаре основывалась на степени дыхательной недостаточности, выраженности интоксикации, объеме воспалительной инфильтрации, наличии осложнений, декомпенсации сопутствующих заболеваний [5].

Молекулярно-генетические исследования генов цитокинов (TNF G308A, IL-10 C592A, IL-10 C819T, IL-10 G1082A), гена регуляторной молекулы воспаления (CD14C159T) и регуляции сосудистого тонуса (eNOS C786T) проводились методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (НПФ "Литех", Россия). Выделение ДНК осуществлялось при помощи наборов "ДНК-экспресс кровь" (НПФ "Литех", Россия). Детекция продуктов амплификации проводилась электрофоретическим способом в 3%-ном агарозном геле.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ *Statistica*, версия 6.1 (*StatSoft*). Для сравнения групп по качественному бинарному признаку применялся критерий χ^2 (точный критерий Фишера). Для определения частоты аллельных вариантов генов использовался закон Харди–Вайнберга. Оценка ассоциаций рассчитывалась в значениях показателей относительного риска (ОР) = $A / (A + B) / C / (C + D)$ и отношения шансов (ОШ) = AD / BC . При проведении логистического регрессионного анализа в математическую модель включались лишь те показатели, которые продемонстрировали наличие статистически значимой корреляции с результирующим (зависимым) признаком.

Результаты и обсуждение

К настоящему времени имеются единичные сведения о роли полиморфизма генов цитокинов в иммуннопатогенезе пневмоний, однако эти данные широ-

ко варьируются. Практически не изучены особенности цитокинового профиля и роль полиморфизма генов цитокинов при пневмониях у больных на фоне гриппа А / H1N1. TNF- α является одним из наиболее значимых цитокинов при развитии патологии и генетически запрограммированный повышенный или пониженный синтез TNF сказывается на реактивности иммунной системы [6–9]. В промоторную зону гена TNF- α включены 8 полиморфных участков с единичными нуклеотидными заменами, важной для человека считается замещение гуанина на аденин в положении 308 G/A [8]. В ряде работ продемонстрировано, что полиморфизм –308A повышает транскрипционную активность гена TNF и, соответственно, продукцию цитокина. Так, высокопродуктивная аллель –308A была ассоциирована с ревматоидным артритом и системной красной волчанкой [6]. Вероятно, функциональный полиморфизм гена TNF (–308A), связанный с повышенной продукцией данного цитокина, служит фактором риска развития тяжелых проявлений инфекционных заболеваний и развития аутоиммунных расстройств. С другой стороны, нарушение механизмов иммунной защиты от патогенов больше ассоциируется с низкопродуктивным вариантом полиморфизма гена TNF (–308G) [8].

В работе *Е.А. Байгозиной* (2008) при изучении нозокомальных пневмоний риск развития заболевания оказался выше у носителей генотипов G/A + A/A. У больных при носительстве генотипа A/A гена TNF наблюдалась максимальная концентрация данного цитокина в сыворотке крови по сравнению с генотипами G/G и G/A, чем обусловлено патогенетическое действие данного полиморфизма [6]. Однако полученные данные, напротив, продемонстрировали, что гомозиготное носительство аллели G полиморфизма (308 G/A) гена TNF в 1,3 раза чаще наблюдалось у пациентов с гриппозными пневмониями ($p = 0,02$), в то время как гетерозиготы G/A встречались в 1,5 раза реже у больных, чем в контрольной группе ($p = 0,02$). ОШ того, что у носителей генотипа GG полиморфизма TNF 308 G/A разовьется гриппозная пневмония, к тому, что событие не произойдет, равно 2 (табл. 1). Кроме того, у обследованных с острым повреждением легких (ОПЛ) ($n = 6$) и ОРДС ($n = 5$) в 8 (73 %) случаях присутствует GG генотип TNF 308 G/A, в т. ч. у умерших ($n = 3$). Аналогичные данные при гриппе А / H1N1 / 09 получены в исследованиях *А.А. Петрова* и *Ю.А. Витковского* (2010) [10].

IL-10 – наиболее активный противовоспалительный цитокин. *В.М. Schaaf et al.* (2003) обнаружено, что концентрация IL-10 в сыворотке крови у больных с сепсисом с генотипом –1082 G/G была выше по сравнению с носителями генотипов A/A или A/G. Это ассоциировалось с высоким уровнем летальности [11]. *P.M. Gallagher et al.* (2003) выявлена ассоциация между генотипом –1082 G/G и степенью тяжести и уровнем летальности при пневмонии [12]. *M.N. Gong et al.* (2006) продемонстрирована взаимосвязь между генотипом –1082 G/G и развитием ОРДС [13]. В данном исследовании G-аллель гена

Таблица 1
Распределение частоты аллелей и генотипов полиморфизма гена TNF G308A у больных гриппом A / H1N1 / 09, осложненным пневмонией

Table 1
Frequency distribution of alleles and genotypes of TNF G308A gene polymorphism in patients with influenza A / H1N1 / 09 complicated by pneumonia

Генетический маркер	Пациенты с тяжелой пневмонией, n = 36	Пациенты с нетяжелой пневмонией, n = 74	Пациенты с пневмонией, всего, n = 110	Контрольная группа, n = 115
TNF G308A				
Алель G	30,5 (84,7 %) $p = 0,5$ $OR = 1,1$ $OШ = 1,4$	57,5 (78 %)	88 (80 %) $p_1 = 0,1$ $OR_1 = 1,1$ $OШ_1 = 1,5$	83,5 (72,6 %)
Алель A	5,5 (15,3 %) $p = 0,5$ $OR = 0,7$ $OШ = 0,7$	16,5 (22 %)	22 (20 %) $p_1 = 0,1$ $OR_1 = 0,7$ $OШ_1 = 0,7$	31,5 (27,4 %)
G/G	26 (72,2 %) $p = 0,3$ $OR = 1,2$ $OШ = 1,5$	45 (61 %)	71 (64,5 %) $p_1 = 0,02$ $OR_1 = 1,3$ $OШ_1 = 2,0$	57 (49,6 %)
G/A	9 (25 %) $p = 0,4$ $OR = 0,8$ $OШ = 0,7$	25 (34 %)	34 (31 %) $p_1 = 0,02$ $OR_1 = 0,7$ $OШ_1 = 0,5$	53 (46 %)
A/A	1 (2,8 %) $p = 0,5$ $OR = 0,5$ $OШ = 0,5$	4 (5 %)	5 (4,5 %) $p_1 = 1$ $OШ_1 = 1$ $OШ_1 = 1$	3 (5 %)

Примечание: статистическая значимость различий между: p – группами больных с различной степенью тяжести, p_1 – больными и контролем; риск развития: OR – тяжелой пневмонии при данном генетическом маркере по сравнению с группой нетяжелой пневмонии, OR_1 – пневмонии при данном генетическом маркере по сравнению с контрольной группой; отношение шансов: $OШ$ – того, что при данном генетическом маркере разовьется тяжелая пневмония, к тому, что разовьется нетяжелая пневмония, $OШ_1$ – того, что при данном генетическом маркере разовьется пневмония, к тому, что событие не произойдет.

Notes: p – statistically significant difference between patient groups with different severity of the disease; p_1 – statistically significant difference between patients and controls.

IL-10 (1082 G/A) значительно доминировала у пациентов с гриппозной пневмонией (84,5 %), преимущественно в виде гомозиготного носительства ($p = 0,006$; $OR = 1,3$; $OШ = 3$), в то время как гетерозиготы G/A встречались в 3,2 раза чаще среди здоровых лиц ($p = 0,00001$). $OШ$ того, что при генотипе GG полиморфизма IL-10 1082 G/A разовьется пневмония, к $OШ$ того, что событие не произойдет, равно 5 (табл. 2). В работе *О.Н.Сабитовой* (2010) [14] при изучении полиморфизма IL-10 1082 G/A у больных внебольничной пневмонией также выявлено, что GG-генотип ассоциирован с затяжным течением пневмонии и развитием осложнений.

При изучении полиморфизма (819 C/T) гена IL-10 выявлено, что встречаемость гомозиготного носительства C/C среди заболевших пневмонией на фоне гриппа A / H1N1 / 09 по сравнению с контрольной группой выше в 1,3 раза ($p = 0,03$). $OШ$ того, что у носителей данного генетического маркера разовьется гриппозная пневмония, равно 1,8 (см. табл. 2). Обращает на себя внимание, что у всех обследованных больных с ОПЛ / ОРДС ($n = 11$) выявлено носительство гаплотипа IL-10 (819 CC); (1082 GG).

Из немногочисленных данных о роли полиморфизма (592 C/A) гена IL-10 при инфекционных заболеваниях известно, что у больных туберкулезом преобладало гомозиготное носительство аллели A. При этом у пациентов выявлены максимальные

уровни IL-10, а у больных с генотипом C/C обнаружен наиболее низкий уровень изучаемого цитокина [15]. В данной работе частота C-аллели гена IL-10 (592 C/A) оказалась выше среди заболевших гриппом, при этом превалировал генотип C/C. $OШ$ развития пневмонии у носителей генотипа CC полиморфизма IL-10 592 C/A и того, что событие не произойдет, равно 3,5 (см. табл. 2).

Немаловажное значение в предрасположенности к инфекционному процессу имеет полиморфизм гена, кодирующего экспрессию регуляторной молекулы воспаления CD 14 как паттерн-распознающего рецептора. Примерами молекулярных паттернов служат липополисахариды грамотрицательных бактерий, пептидогликаны грамположительных микроорганизмов, вирусная двуспиральная РНК. В гене CD 14 обнаружен функциональный полиморфизм, связанный с заменой нуклеотидов C на T в положении -159, что приводит к повышению экспрессии CD 14 на моноцитах и параллельному увеличению уровня растворимого CD 14 [6, 10]. В работе *Е.А.Байгозиной* (2010) [6] при изучении нозокомиальной пневмонии выявлено, что в группе пациентов с тяжелым течением заболевания наличие аллели T ассоциировалось с риском инфицирования грамотрицательной микрофлорой. Однако в других исследованиях показано, что указанный функциональный полиморфизм не влияет на развитие сепсиса и смертность больных. Так, *F.F.Yuan* (2007) [16] уста-

*Таблица 2
Распределение частоты аллелей и генотипов полиморфизма генов IL-10 C592A, IL-10 C819T, IL-10 G1082A у больных гриппом А / H1N1 / 09, осложненным пневмонией*

*Table 2
Frequency distribution of alleles and genotypes of IL-10 C592A, IL-10 C819T, and IL-10 G1082A genes polymorphism in patients with influenza A / H1N1 / 09 complicated by pneumonia*

Генетический маркер	Пациенты с тяжелой пневмонией	Пациенты с нетяжелой пневмонией	Пациенты с пневмонией, всего	Контрольная группа
IL-10 C592A	n = 37	n = 73	n = 110	n = 115
Аллель С	26 (70 %) p = 0,7 ОР = 1,0 ОШ = 1,2	49 (66,5 %)	75 (68,2 %) p ₁ = 0,04 ОР ₁ = 1,2 ОШ ₁ = 1,7	63,5 (55,2 %)
Аллель А	11 (30 %) p = 0,7 ОР = 0,9 ОШ = 0,9	24 (33,5 %)	35 (31,8 %) p ₁ = 0,04 ОР ₁ = 0,7 ОШ ₁ = 0,6	51,5 (44,8 %)
С/С	20 (54 %) p = 0,9 ОР = 1,0 ОШ = 1,0	39 (53 %)	59 (53,6 %) p ₁ = 0,00001 ОР ₁ = 2,0 ОШ ₁ = 3,5	31 (27 %)
С/А	12 (32 %) p = 0,6 ОР = 1,2 ОШ = 1,3	20 (27 %)	32 (29,1 %) p ₁ = 0,00001 ОР ₁ = 0,5 ОШ ₁ = 0,3	65 (56,5 %)
А/А	5 (14 %) p = 0,5 ОР = 0,7 ОШ = 0,7	14 (20 %)	19 (17,2 %) p ₁ = 0,8 ОР ₁ = 0,8 ОШ ₁ = 0,8	19 (16,5 %)
IL-10 C819T	n = 34	n = 72	n = 106	n = 115
Аллель С	27 (79,4 %) p = 0,7 ОР = 1,0 ОШ = 1,2	55 (76,4 %)	82 (77,4 %) p ₁ = 0,08 ОР ₁ = 1,2 ОШ ₁ = 1,7	77 (67 %)
Аллель Т	7 (20,6 %) p = 0,7 ОР = 0,9 ОШ = 0,8	17 (23,6 %)	24 (22,6 %) p ₁ = 0,08 ОР ₁ = 0,7 ОШ ₁ = 0,6	38 (33 %)
С/С	24 (70,6 %) p = 0,4 ОР = 1,1 ОШ = 1,4	45 (62,5 %)	69 (65,1 %) p ₁ = 0,03 ОР ₁ = 1,3 ОШ ₁ = 1,8	59 (51,3 %)
С/Т	6 (17,6 %) p = 0,3 ОР = 0,6 ОШ = 0,6	20 (27,8 %)	26 (24,5 %) p ₁ = 0,3 ОР ₁ = 0,8 ОШ ₁ = 0,9	36 (31,3 %)
Т/Т	4 (11,8 %) p = 0,7 ОР = 1,2 ОШ = 1,2	7 (9,7 %)	11 (10,4 %) p ₁ = 0,1 ОР ₁ = 0,6 ОШ ₁ = 0,6	20 (17,4 %)
IL-10 G1082A	n = 34	n = 72	n = 106	n = 115
Аллель G	30 (88 %) p = 0,5 ОР = 1,1 ОШ = 1,6	59,5 (82,6 %)	89,5 (84,5 %) p ₁ = 0,0006 ОР ₁ = 1,3 ОШ ₁ = 3,0	74 (64,3 %)
Аллель А	4 (12 %) p = 0,5 ОР = 0,6 ОШ = 0,6	12,5 (17,4 %)	16,5 (15,5 %) p ₁ = 0,0006 ОР ₁ = 0,4 ОШ ₁ = 0,3	41 (35,7 %)
G/G	27 (79 %) p = 0,5 ОР = 1,1 ОШ = 1,4	54 (75 %)	81 (76,4 %) p ₁ = 0,0000 ОР ₁ = 2,0 ОШ ₁ = 5,0	45 (39,1 %)
G/A	6 (18 %) p = 0,8 ОР = 1,1 ОШ = 1,1	11 (15,3 %)	17 (16 %) p ₁ = 0,0000 ОР ₁ = 0,3 ОШ ₁ = 0,2	58 (50,4 %)
A/A	1 (3 %) p = 0,2 ОР = 0,3 ОШ = 0,3	7 (9,7 %)	8 (7,5 %) p ₁ = 0,5 ОР ₁ = 0,6 ОШ ₁ = 0,6	12 (10,4 %)

Таблица 3
Распределение частоты аллелей и генотипов полиморфизма гена CD14 C159T
у больных гриппом A / H1N1 / 09, осложненным пневмонией
Table 3
Frequency distribution of alleles and genotypes of CD14 C159T gene polymorphism
in patients with influenza A / H1N1 / 09 complicated by pneumonia

Генетический маркер	Пациенты с тяжелой пневмонией, n = 34	Пациенты с нетяжелой пневмонией, n = 72	Пациенты с пневмонией, всего, n = 106	Контрольная группа, n = 115
CD14 C159T				
Аллель С	21,5 (63,2 %) p = 0,9 OR = 1,0 ОШ = 1,0	45 (62,5 %)	66,5 (62,7 %) p ₁ = 0,1 OR ₁ = 1,2 ОШ ₁ = 1,5	60 (52,2 %)
Аллель Т	12,5 (36,8 %) p = 0,9 OR = 1,0 ОШ = 1,0	27 (37,5 %)	39,5 (37,3 %) p ₁ = 0,1 OR ₁ = 0,8 ОШ ₁ = 0,7	55 (47,8 %)
С/С	15 (44,2 %) p = 0,7 OR = 1,1 ОШ = 1,2	29 (40,3 %)	44 (41,5 %) p ₁ = 0,2 OR ₁ = 1,3 ОШ ₁ = 1,4	38 (33 %)
С/Т	13 (38,2 %) p = 0,5 OR = 0,8 ОШ = 0,7	32 (44,4 %)	45 (42,5 %) p ₁ = 0,5 OR ₁ = 1,2 ОШ ₁ = 1,3	44 (38,3 %)
Т/Т	6 (17,6 %) p = 0,8 OR = 1,1 ОШ = 1,1	11 (15,3 %)	17 (16 %) p ₁ = 0,02 OR ₁ = 0,5 ОШ ₁ = 0,5	33 (28,7 %)

новлено, что СС-аллель этого полиморфизма связан с осложненным течением ОРДС.

В данной работе при изучении полиморфизма (159 С/Т) гена CD14 не выявлено различий в распространенности генотипов С/С и С/Т в изучаемых группах. Однако встречаемость генотипа Т/Т среди заболевших пневмонией на фоне гриппа А / H1N1 / 09 была ниже в 2,2 раза по сравнению с контрольной группой (p = 0,03) (табл. 3). Обращает на себя внимание, что умершие (n = 3) являлись носителями гомозиготы С/С полиморфизма (159 СТ) гена CD14. Подобный факт в исследовании при гриппе А / H1N1 / 09 продемонстрированы А.А.Петровым и Ю.А.Витковским (2010) [10], которые высказали предположение, что склонность к более благоприятному протеканию гриппа у носителей генотипа ТТ связана с высокой промоторной активностью Т-аллели, что приводит к усилению экспрессии CD14 и повышению уровня sCD14.

С учетом того, что гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) ассоциирован с развитием ОПЛ /

ОРДС, а гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) – с летальным исходом у больных гриппом А / H1N1 / 09, проведен сравнительный анализ встречаемости данных генетических комбинаций в исследуемых группах. Оказалось, что гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) у заболевших по сравнению с контролем выявлялся в 4,8 раза чаще (p < 0,001). У пациентов с тяжелым течением пневмонии данная генетическая комбинация встречается в 50 % случаев, что в 2,6 раза чаще по сравнению с меньшей степенью тяжести (p = 0,001). ОШ, что при пневмонии на фоне высокопатогенного гриппа будет тяжелое течение заболевания, у носителей данного гаплотипа равно 4,1. Гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) также оказался в 6,1 раза более распространенным среди заболевших гриппозной пневмонией по сравнению с группой контроля (p = 0,006); у больных с тяжелыми пневмониями он выявлялся в 5,7 раз больше по сравнению с заболевшими нетяжелой формой (p = 0,004). ОШ, что у заболевших носите-

Таблица 4
Встречаемость генетических комбинаций у больных гриппом A / H1N1 / 09, осложненным пневмонией
Table 4
Frequency of gene combinations in patients with influenza A / H1N1 / 09 complicated by pneumonia

Гаплотип	Пациенты с тяжелой пневмонией, n = 34	Пациенты с нетяжелой пневмонией, n = 72	Пациенты с пневмонией, всего, n = 106	Контрольная группа, n = 115
TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); IL-10 (1082 GG)	17 (50 %) p = 0,001 OR = 2,6 ОШ = 4,1	14 (19,4 %)	31 (29,2 %) p ₁ = 0,0000 OR ₁ = 4,8 ОШ ₁ = 6,5	7 (6,1 %)
TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); IL-10 (1082 GG); CD14 (159 CC)	8 (23,5 %) p = 0,004 OR = 5,7 ОШ = 7,1	3 (4,2 %)	11 (10,4 %) p ₁ = 0,006 OR ₁ = 6,0 ОШ ₁ = 6,5	2 (1,7 %)

лей комбинации TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) течение пневмонии будет тяжелым, равно 7,1. ОШ того, что у носителей изучаемых гаплотипов разовьется пневмония и того, что событие не произойдет, равно 6,5 (табл. 4).

У 72,7 % обследованных с развившимся ОПЛ / ОРДС присутствует гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG), что в 3 раза превышает встречаемость данной комбинации у остальных больных гриппом А / H1N1 / 09. ОШ развития ОПЛ / ОРДС при гриппозной пневмонии у носителей гаплотипа TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) равно 8,4. У 3 из этих пациентов причиной летального исхода явился ОРДС. При этом у всех погибших больных также обнаружено носительство полиморфизма CD14 (159 CC). Примечательно, что гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) у пациентов с ОПЛ / ОРДС выявлялся в 5 раз чаще по сравнению с больными без этого осложнения (табл. 5).

Известно, что при гриппе в основе поражения различных органов и систем большую роль играют циркуляторные расстройства, в этой связи особый интерес представляет выявление предрасположенности к нарушениям в системе регуляции сосудистого тонуса. К эндотелиальным факторам дилатации относится и оксид азота (NO). Кроме того, при воздействии NO угнетается пролиферация клеток в гладкомышечном слое сосудов, ингибируется агрегация тромбоцитов и адгезия нейтрофилов к эндотелию сосудов, возможно также повреждение клеток, в частности эндотелия, путем генерации свободных радикалов [17]. В работе К.С. Marco (2011) [18] установлено, что к уменьшению концентрации NO в кровеносном русле предрасполагает вариант -786 С гена eNOS.

При исследовании полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтазы (786 С/Т) у заболевших пневмонией на фоне гриппа А / H1N1 выявлено преобладание аномальной гомозиготы Т/Т. ОШ развития пневмонии при гриппе А / H1N1 у носителей генотипа ТТ гена eNOS С786Т равно 3,6. Гетерозиготы С/Т у заболевших в 2,5 раза меньше наблюдались по сравнению с контрольной группой (табл. 6). Полу-

ченные факты согласуются с исследованиями Е.С. Кострюкова и соавт. [19] в которых продемонстрированы аналогичные данные на небольшой выборке тяжелых пациентов с гриппом А / H1N1, включая случаи с летальным исходом (n = 5).

Данными молекулярно-генетического исследования продемонстрирован вклад различных генотипов в развитие пневмонии на фоне гриппа А / H1N1 / 09. Для оценки степени влияния изученных генотипов на формирование осложнений при гриппе А / H1N1 / 09 проведена бинарная логистическая регрессия, изучалось влияние аллелей и полиморфизмов генов TNF G308A, IL-10 C592A, IL-10 C819T, IL-10 G1082A, CD14 C159T; eNOS C786T; а также гаплотипов TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) и TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) на развитие осложнений и исходы при гриппе А / H1N1 / 09. Установлено, что наиболее тесно связанными с наличием пневмонии на фоне гриппа А / H1N1 / 09 явились IL-10 592 CC, IL-10 819 CC, IL-10 1082 GG. При построении итогового уравнения бинарной логистической регрессии $\chi^2 = 55,12$ при уровне значимости $p < 0,0001$, что свидетельствует о высокой достоверности данной математической модели. Предсказательная ценность – 73 %.

Наиболее тесно связанным с тяжелым течением пневмонии на фоне гриппа А / H1N1 / 09 оказался гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG). При построении итогового уравнения бинарной логистической регрессии для гаплотипа TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) $\chi^2 = 7,8$ при уровне $p = 0,005$, что свидетельствует о высокой значимости данной модели. Предсказательная ценность – 71 %.

Наиболее тесно связанным с развитием ОПЛ / ОРДС при гриппе А / H1N1 / 09 также оказался гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG). При построении итогового уравнения бинарной логистической регрессии для гаплотипа TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) $\chi^2 = 11$ при уровне значимости $p = 0,0009$, что свидетельствует о высокой достоверности данной модели.

Таблица 5
Встречаемость генетических комбинаций у больных гриппом А / H1N1 / 09, осложненным пневмонией
Table 5
Frequency of gene combinations in patients with influenza A / H1N1/09 complicated by pneumonia

Гаплотип	Пациенты с ОПЛ / ОРДС, n = 11	Пациенты без ОПЛ / ОРДС, n = 95	Летальный исход, n = 3	Выздоровевшие пациенты, n = 103
TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); IL-10 (1082 GG)	8 (72,7 %) $p = 0,002$ ОР = 3,0 ОШ = 8,4	23 (24,2 %)	3 (100 %) $p_1 = 0,03$ ОР ₁ = 3,7 ОШ ₁ = 8,1	28 (27,2 %)
TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); IL-10 (1082 GG); CD14 (159 CC)	4 (36,4 %) $p = 0,01$ ОР = 5,0 ОШ = 7,2	7 (7,4 %)	3 (100 %) $p_1 = 0,0000$ ОР ₁ = 13,0 ОШ ₁ = 35,6	8 (7,7 %)

Примечание: p – статистическая значимость различий между группами больных с наличием и отсутствием ОПЛ / ОРДС; p₁ – статистическая значимость различий между пациентами с летальным исходом и выздоровлением; ОР – риск развития ОПЛ / ОРДС при данном гаплотипе по сравнению с группой пациентов без ОПЛ / ОРДС; ОР₁ – риск развития летального исхода при данном гаплотипе по сравнению с пациентами с выздоровлением; отношение шансов: ОШ – того, что при данном генетическом маркере разовьется ОПЛ / ОРДС и того, что событие не произойдет; ОШ₁ – того, что при данном генетическом маркере будет летальный исход и того, что событие не произойдет.

Notes: p – statistically significant difference between patient groups with or without ALI / ARDS; p₁ – statistically significant difference between died and survived patients.

Таблица 6
 Распределение частоты аллелей и генотипов полиморфизма гена eNOS C786T у больных гриппом А / H1N1 / 09, осложненным пневмонией
 Table 6
 Frequency distribution of alleles and genotypes of eNOS C786T gene polymorphism in patients with influenza A / H1N1/09 complicated by pneumonia

Генетический маркер	Пациенты с тяжелой пневмонией, n = 36	Пациенты с нетяжелой пневмонией, n = 74	Пациенты с пневмонией, всего, n = 110	Контрольная группа, n = 115
Аллель С	18 (50 %) p = 0,2 ОР = 1,3 ОШ = 1,7	27,5 (37 %)	45,5 (41,5 %) p ₁ = 0,2 ОР ₁ = 0,8 ОШ ₁ = 0,7	51 (51 %)
Аллель Т	18 (50 %) p = 0,2 ОР = 0,8 ОШ = 0,6	46,5 (63 %)	64,5 (58,5 %) p ₁ = 0,2 ОШ ₁ = 1,5 ОР ₁ = 1,2	49 (49 %)
С/С	13 (36 %) p = 0,3 ОР = 1,3 ОШ = 1,5	20 (27 %)	33 (30 %) p ₁ = 0,2 ОР ₁ = 1,4 ОШ ₁ = 1,5	22 (22 %)
С/Т	10 (28 %) p = 0,4 ОР = 1,4 ОШ = 1,5	15 (20 %)	25 (23 %) p ₁ = 0,0000 ОР ₁ = 0,4 ОШ ₁ = 0,2	58 (58 %)
Т/Т	13 (36 %) p = 0,1 ОР = 0,7 ОШ = 0,5	39 (53 %)	52 (47 %) p ₁ = 0,0000 ОР ₁ = 2,4 ОШ ₁ = 3,6	20 (20 %)

Наиболее тесно связанным с развитием летального исхода при гриппе А / H1N1 / 09 явился гаплотип TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC). При построении итогового уравнения бинарной логистической регрессии для гаплотипа TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) $\chi^2 = 14,9$ при уровне значимости $p = 0,0001$, что свидетельствует о высокой достоверности данной математической модели.

Заключение

Продемонстрировано, что у больных гриппом А / H1N1 / 09, осложненным пневмонией, чаще встречалось гомозиготное носительство аллели G полиморфизма (308 G/A) гена TNF по сравнению с контрольной группой. У заболевших значительно преобладала G-аллель гена IL-10 (1082 G/A), преимущественно в виде гомозиготного носительства. У пациентов с гриппозными пневмониями превалировала С-аллель гена IL-10 (592 С/A), в большей степени в виде гомозиготного варианта. Гомозиготное носительство гена IL-10 (819 С/Т) Т/Т и гена CD14 (159 С/Т) Т/Т оказалось значительно ниже по сравнению с группой здоровых лиц. Установлено преобладание гомозиготы Т/Т полиморфизма (786 С/Т) гена eNOS среди заболевших гриппозной пневмонией; напротив, в контрольной группе выявлены преимущественно носители гетерозиготы С/Т. Гаплотипы TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) и TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) были более распространены среди заболевших по сравнению с контролем и встречались преимущественно при тяжелом течении пневмонии.

При использовании бинарной логистической регрессии определены генотипы, наиболее тесно связанные с развитием осложнений при гриппе А / H1N1 / 09 [4]. Прогностическими факторами риска развития пневмонии у больных гриппом А / H1N1 / 09 явились полиморфизмы гена IL-10 592 CC, 819 CC, 1082 GG. Наибольшее значение в прогнозировании тяжелого течения пневмонии при гриппе А / H1N1 / 09 имеют гаплотипы TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG). В качестве предикторов развития ОПЛ / ОРДС и летального исхода у больных гриппом А / H1N1 / 09 выявлены гаплотипы TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG) и TNF (308 GG); IL-10 (819 CC); (1082 GG); CD14 (159 CC) соответственно. В дальнейшем изучение генетического статуса пациента при гриппе позволит оценивать тяжесть заболевания и прогнозировать возможные осложнения.

Литература

1. Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Шелканов М.Ю. и др. Пандемический грипп в России: отличительные особенности клинического течения и отсутствие ранней этиотропной терапии как фактор риска развития тяжелых форм заболевания. *Терапевтический архив*. 2011; 9: 48–53.
2. Онищенко Г.Г., ред. Организация и проведение противоэпидемических мероприятий в период эпидемии гриппа А (H1N1) / 09 в октябре – декабре 2009 г. в Забайкальском крае. Новосибирск: Наука; 2011.
3. Говорин А.В., Серебрякова О.М., Филев А.П., Романова Е.Н. Клинические особенности внебольничной пневмонии у больных гриппом А / H1N1. *Пульмонология*. 2010; 5: 27–29.
4. Романова Е.Н. Пневмонии у больных гриппом А / H1N1 / 09: клинико-патогенетические закономерности и исходы: Дисс. ... д-ра мед. наук. Чита; 2014.

5. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С. и др. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М.: РРО, МАКМАХ; 2010.
6. Байгозина Е.А., Совалкин В.И. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул и цитокинов при нозокомиальной пневмонии. *Пульмонология*. 2008; 1: 116–120.
7. Маркелова Е.В., Костюшко А.В., Красников В.Е. Патогенетическая роль нарушений в системе цитокинов при инфекционно-воспалительных заболеваниях. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2008; 3: 24–29.
8. Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология. *Цитокины и воспаление*. 2005; 3: 4–10.
9. Миронова Н.А. Ассоциация генетического полиморфизма гена TNF- α (G-308A) с формированием тяжелых и осложненных форм гриппа у детей. *Журнал инфектологии*. 2013; 4: 30–36.
10. Петров А.А., Страмбовская Н.Н., Говорин А.В., Витковский Ю.А. Генетический полиморфизм CD14, TNF α и FCGR2A у больных гриппом А / H1N1 в Забайкальском крае. *Медицинская иммунология*. 2011; 1: 83–86.
11. Schaaf B.M., Boehmke F., Esnaashari H. et al. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10 -1082 gene promoter polymorphism. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168: 476–480.
12. Gallagher P.M., Lowe G., Fitzgerald T. et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2003; 58: 154–156.
13. Gong M.N., Thompson B.T., Williams P.L. et al. Interleukin-10 polymorphism in position 1082 and acute respiratory distress syndrome. *Eur. Respir. J.* 2006; 27: 674–681.
14. Сабитова О.Н. Полиморфизм генов и продукция основных иммунорегуляторных цитокинов при внебольничной пневмонии. *Омский научный вестник*. 2009; 1: 42–45.
15. Наследникова И.О., Уразова О.И., Воронкова О.В. и др. Аллельный полиморфизм генов цитокинов при туберкулезе легких. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 8: 137–142.
16. Yuan F.F. High prevalence of the CD14-159CC genotype in patients infected with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 12: 1644–1645.
17. Петухов В.А. Эндотелиальная дисфункция: современное состояние вопроса. *Consilium Medicum*. 2008; 1: 3–11.
18. Marco K.C., Braga G.U., Barbosa F. Determination of the effects of eNOS gene polymorphisms (T-786C and Glu298Asp) on nitric oxide levels in a methylmercury-exposed population. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A*. 2011; 74 (20): 1323–1333.
19. Кострюкова Е.С., Захаржевская Н.Б., Костин П.А. и др. Генетический анализ вируса гриппа А / H1N1 "пандемический" в условиях эпидемии. *Терапевтический архив*. 2012; 3: 48–54.
5. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S. et al. Community-acquired pneumonia in adults. Clinical guidelines on diagnosis, treatment and prevention. Moscow: RRO, MAKMAH; 2010 (in Russian).
6. Baygozina E.A., Sovalkin V.I. Regulatory molecules and cytokines gene functional polymorphism in nosocomial pneumonia. *Pul'monologiya*. 2008; 1: 116–120 (in Russian).
7. Markelova E.V., Kostyushko A.V., Krasnikov V.E. Pathogenic role of cytokine disorders in infections and inflammation. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 3: 24–29 (in Russian).
8. Rydlovskaya A.V., Simbirtsev A.S. TNF α functional gene polymorphism and pathology. *Tsitokiny i vospalenie*. 2005; 3: 4–10 (in Russian).
9. Miromanova N.A. Association of TNF- α (G-308A) gene polymorphism with severe and complicated influenza course in children. *Zhurnal infektologii*. 2013; 4: 30–36 (in Russian).
10. Petrov A.A., Strambovskaya N.N., Govorin A.V., Vitkovskiy Yu.A. CD14, TNF- α and FCGR2A genes polymorphisms in patients with influenza H1N1 at the Zabaykal'skiy kray. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 1: 83–86 (in Russian).
11. Schaaf B.M., Boehmke F., Esnaashari H. et al. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10 -1082 gene promoter polymorphism. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168: 476–480.
12. Gallagher P.M., Lowe G., Fitzgerald T. et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2003; 58: 154–156.
13. Gong M.N., Thompson B.T., Williams P.L. et al. Interleukin-10 polymorphism in position 1082 and acute respiratory distress syndrome. *Eur. Respir. J.* 2006; 27: 674–681.
14. Sabitova O.N. Gene polymorphism and production of the key immunoregulatory cytokines in community-acquired pneumonia. *Omskiy nauchnyy vestnik*. 2009; 1: 42–45 (in Russian).
15. Naslednikova I.O., Urazova O.I., Voronkova O.V. et al. Cytokine allelic gene polymorphism in pulmonary tuberculosis. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2009; 8: 137–142 (in Russian).
16. Yuan F.F. High prevalence of the CD14-159CC genotype in patients infected with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 12: 1644–1645.
17. Petukhov V.A. Endothelial dysfunction: state-of-art. *Consilium Medicum*. 2008; 1: 3–11 (in Russian).
18. Marco K.C., Braga G.U., Barbosa F. Determination of the effects of eNOS gene polymorphisms (T-786C and Glu298Asp) on nitric oxide levels in a methylmercury-exposed population. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A*. 2011; 74 (20): 1323–1333.
19. Kostryukova E.S., Zakhazhevskaya N.B., Kostin P.A. et al. Genetic analysis of pandemic influenza A / H1N1 virus. *Tera-pevticheskiy arkhiv*. 2012; 3: 48–54 (in Russian).

Поступила 25.05.15

УДК [616.921.5-06:616.24-002]-056.7

Received May, 25, 2015

UDC [616.921.5-06:616.24-002]-056.7

References

1. Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Shchelkanov M.Yu. et al. Pandemic flu in Russia: specific clinical features and absence of early etiological therapy as a risk factor of severe course. *Tera-pevticheskiy arkhiv*. 2011; 9: 48–53 (in Russian).
2. Onishchenko G.G., ed. Organization and implementation of anti-epidemic measures during flu A (H1N1) / 09 pandemic in October – December, 2009, at the Zabaykal'skiy kray. Novosibirsk: *Nauka*; 2011 (in Russian).
3. Govorin A.V., Serebryakova O.M., Filev A.P., Romanova E.N. Clinical features of community-acquired pneumonia in patients with influenza A / H1N1 infection. *Pul'monologiya*. 2010; 5: 27–29 (in Russian).
4. Romanova E.N. Pneumonia in patients with influenza A / H1N1 / 09 infection: clinical and pathogenic patterns and outcomes. *Dis. Chita*; 2014 (in Russian).

Информация об авторах

Романова Елена Николаевна – д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии и эндокринологии ГБОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия" Минздрава России; тел.: (924) 576-02-99; e-mail: elena-r-chita@yandex.ru

Говорин Анатолий Васильевич – д. м. н., профессор, зав. кафедрой факультетской терапии ГБОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия" Минздрава России; тел.: (3022) 35-43-24, факс: (3022) 32-30-58; e-mail: pochta@medacadem.chita.ru

Authors information

Romanova Elena Nikolaevna, MD, Professor at Department of Hospital Internal Medicine and Endocrinology, Chita State Medical Academy, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (924) 576-02-99; e-mail: elena-r-chita@yandex.ru

Govorin Anatoliy Vasil'evich, MD, Professor, Head of Department of General Internal Medicine; Chita State Medical Academy, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (3022) 35-43-24, fax: (3022) 32-30-58; e-mail: pochta@medacadem.chita.ru