

На правах рукописи

Емельянов

Емельянов Артур Сергеевич

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ
В ПАТОГЕНЕЗЕ РОЖИ**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Чита – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Заслуженный работник высшей школы РФ, доктор медицинских наук, профессор **Витковский Юрий Антонович**

Официальные оппоненты:

Попов Александр Федорович – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры инфекционных болезней

Савченко Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск

Защита диссертации состоится “ 3 ” октября 2019 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.118.02 при ФГБОУ ВО “Читинская государственная медицинская академия” Министерства здравоохранения Российской Федерации (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а).

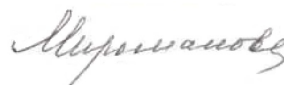
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО “Читинская государственная медицинская академия” Министерства здравоохранения Российской Федерации (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а) и на сайте: <http://chitgma.ru/nauka/zashchita-dissertatsij?task=item.view&id=32>

Автореферат разослан “ ” _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.118.02

доктор медицинских наук, доцент



Н.А. Мироманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рожа – актуальная проблема медицины (Пшеничная Н.Ю. и др., 2015; Еровиченков А.А. и др., 2015; Шип С.А. и др., 2016; Ратникова Л.И. и др., 2016). Высокая распространенность рожи в популяции, тенденция к формированию рецидивирующего течения после первичного эпизода заболевания, появление трофических, незаживающих язв, развитие гнойно-воспалительных осложнений, слоновости, некрозов и др. способствуют последующей утрате трудоспособности (Московская Т.В. и др., 2014; Емельянова А.Н. и др., 2015; Плавунов Н.Ф. и др., 2017). При этом учащается переход острых форм в хроническое течение с частыми рецидивами. Отмечается возросшая доля (до 50-80%) геморрагических форм рожи, в основе которых лежат нарушения системы гемостаза и расстройства микроциркуляции, что определяет более тяжелое и затяжное течение инфекционного процесса, медленную репарацию ткани в очаге воспаления, частые осложнения (Плавунов Н.Ф. и др., 2017; Ермакова Л.А., 2018).

Известно, что наряду со свойствами возбудителя и факторами внешней среды, уникальные свойства генома человека играют немалую роль в развитии инфекционной патологии, что подтверждает мультифакториальность заболеваний (Емельянова А.Н. и др., 2014; Бекенова Н.Б. и др., 2016). Особенности генотипа индивидуума влияют на восприимчивость и устойчивость к действию инфекционного агента.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время активно изучается патогенез рожи, в котором ведущими являются гемореологические и иммунологические звенья, определяя характер течения заболевания (Бекенова Н.Б. и др., 2016; Ратникова Л.И., 2016). Повышенная функциональная активность фагоцитов играет основную роль в развитии тяжелых форм рожи, тогда как снижение функциональной активности макрофагов, наоборот, приводит к последующим рецидивам заболевания (Пшеничная Н.Ю. и др., 2015; Ермакова Л.А., 2018).

Реагирование иммунитета при внедрении β -гемолитического стрептококка группы А характеризуется продукцией целого каскада цитокинов, важной функцией которых является регуляция взаимодействия иммунокомпетентных клеток и определение направления иммунного ответа (Мальцева Г.С. и др., 2014; Новосад Е.В. и др., 2018). Согласно последним данным, различия в генах влияют на уровень продукции кодируемых белков, вызывая нарушения контроля защитных реакции организма (Романова Е.Н. и др., 2015). Полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP) является наиболее частым изменением структуры генов, сведения о которых особенно важны для диагностики болезней на молекулярном уровне (Peddireddy V. et al., 2017).

Существенным фактором для определения как предрасположенности, так и резистентности к инфицированию, длительности, тяжести, развитию

осложнений заболеваний, в т.ч. и при роже, может являться генетическая информация о цитокинах (Серебренникова С.Н. и др., 2014; Пузырева Л.В. и др., 2016). Описаны полиморфизмы структурных генов, а также некодируемых участков, в том числе промоторов, мутации которых изменяют экспрессию и количество кодируемого белка (Байке Е.В. и др., 2015).

К настоящему времени в научной литературе отсутствуют сообщения о роли полиморфизма TLRs в патогенезе рожи. Их изучение в развитии патологического процесса является чрезвычайно важным, поскольку трансмембранные Toll-подобные рецепторы являются ключевыми сенсорами PAMP инфекционных агентов и DAMP макроорганизма, функционирование которых предопределяет развитие процесса воспаления и иммунного ответа (Бодиенкова Г.М. и др., 2015; Барбаш О.Л. и др., 2015).

Несмотря на то, что сведения о различных генетических маркерах в качестве предикторов многих заболеваний активно накапливаются, информация о них при роже немногочисленна. Исследование молекулярно-генетических механизмов реализации иммунологической защиты, реакций системы гемостаза позволило объяснить индивидуальные особенности патогенеза рожи и раскрыть условия тяжелого и рецидивирующего течения заболевания и формирование его осложнений.

Цель исследования

Изучение роли генетического полиморфизма иммунорегуляторных молекул *CD14*, *TLR4*, *IL-1 β* , *TNF α* , *TF* в патогенезе рожи.

Задачи исследования

1. Исследовать частоту встречаемости аллельных вариантов полиморфизмов *CD14 C159T*, *TLR4 Asp299Gly*, *TLR4 Thr399Ile*, *IL-1 β T31C*, *IL-1 β T511C*, *IL-1 β C3953T*, *IL-1 β G1473C*, *TNF α G308A*, *TF A603G*, *TF C1322T*, *TF G1442C*, *TF C1812T* при первичной и рецидивирующей роже среди резидентов Забайкальского края.

2. Оценить влияние SNP генов *IL-1 β G1473C*, *TNF α G308A* на содержание IL-1 β , TNF α в сыворотке крови больных рожей.

3. Изучить влияние носительства SNP изучаемых полиморфизмов на экспрессию тканевого фактора моноцитами периферической крови у больных рожей при разных формах заболевания.

4. Оценить прогностическую значимость изучаемых генетических полиморфизмов молекул в развитии рожи.

Научная новизна

Впервые описано первичное звено иммунопатогенеза рожи, включающее SNP генов *IL-1 β* , *TNF α* , *CD14*, *TLR4*, *TF*, экспрессию IL-1 β , TNF α и тканевого фактора.

Впервые установлено, что наличие аллели *C*, генотипа *CC* гена *IL-1β T31C*, аллели *C*, генотипа *CC* гена *IL-1β C3953T*, аллели *C*, генотипов *GC* и *CC* гена *IL-1β G1473C*, аллели *G*, генотипа *GG* гена *TNFα G308A*, аллели *T*, генотипа *TT* гена *CD14 C159T*, аллели *-299Asp*, генотипа *AspAsp* гена *TLR4 Asp299Gly*, аллели *-399Thr*, генотипа *ThrThr* гена *TLR4 Thr399Ile* ассоциировано с развитием рожи.

Впервые выявлено, что гомозиготный вариант *CC* промотора гена *IL-1β G1473C* сопряжен с возникновением рецидивов заболевания.

Впервые обнаружено, что SNP промоторных регионов генов *IL-1β G1473C* и *TNFα G308A* влияет на продукцию молекул одноименных цитокинов при роже.

Впервые доказано, что экспрессия тканевого фактора при роже зависит от концентрации провоспалительных цитокинов *IL-1β* и *TNFα*, а не от полиморфизма генов, кодирующих *TF*, что обуславливает вторичный характер гиперкоагуляции. При роже экспрессия тканевого фактора моноцитами периферической крови проявляется в зависимости от формы заболевания: минимальная у больных с эритематозной, максимальная – с буллезно-геморрагической.

Теоретическая и практическая значимость

В исследовании представлены новые данные о распространенности полиморфных вариантов *IL-1β (T31C, T511C, C3953T, G1473C)*, *TNFα (G308A)*, *CD14 (C159T)*, *TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile)*, *TF (A603G, C1322T, C1812T, G1442C)* среди здоровых резидентов Забайкальского края и у больных рожей.

SNP генов *IL-1β (T31C, T511C, C3953T, G1473C)*, *TNFα (G308A)*, *CD14 (C159T)*, *TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile)* ассоциированы с развитием рожи. Полиморфизм промотора гена *IL-1β (G1473C)* сопряжен с возникновением рецидивов заболевания. Носительство *IL-1β (G1473C)*, *TNFα (G308A)* оказывает влияние на продукцию соответствующих цитокинов и экспрессию тканевого фактора при роже.

На основании полученных данных об SNP генов *IL-1β G1473C*, *CD14 C159T*, *TLR4 Asp299Gly* разработан “Способ прогнозирования риска развития рожи” (патент на изобретение РФ № 2683314 от 28.03.2019).

Методология и методы исследования

Проведено комплексное исследование 104 пациентов с диагнозом рожи средней степени тяжести. В работе использовались лабораторные (генетические, иммунологические) и статистические методы исследований.

Объектом для исследования являлись цельная кровь и ее сыворотка/плазма, буккальные соскобы; забор материала осуществлялся однократно в 1-2 сутки госпитализации.

Группу здоровых лиц составили волонтеры, считающие себя здоровыми, не принимающие лекарственные препараты на момент

обследования. Все обследованные – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края.

Положения, выносимые на защиту

1. Полиморфизм генов *CD14*, *TLR4*, *IL-1 β* , *TNF α* , *TF* предрасполагает к роже. Развитие заболевания ассоциировано с аллелью *C*, генотипом *CC* гена *IL-1 β T31C*, аллелью *C*, генотипом *CC* гена *IL-1 β C3953T*, аллелью *C*, генотипами *GC* и *CC* промотора гена *IL-1 β G1473C*, аллелью *G*, генотипом *GG* промотора гена *TNF α G308A*, аллелью *T*, генотипом *TT* гена *CD14 C159T*, аллелью *-299Asp*, генотипом *AspAsp* гена *TLR4 Asp299Gly*, аллелью *-399Thr*, генотипом *ThrThr* гена *TLR4 Thr399Ile*. Гомозиготный вариант *CC* промотора гена *IL-1 β G1473C* предрасполагает к возникновению рецидивирующей рожи.

2. Полиморфизм генов *IL-1 β* и *TNF α* влияет на уровень одноименных цитокинов в крови больных рожей. При первичной и рецидивирующей роже у обладателей генотипа *GG* гена *IL-1 β G1473C* и *GG TNF α G308A* максимально увеличивается концентрация *IL-1 β* и *TNF α* . Присутствие *C*-аллели SNP гена *G1473C* у больных рожей сопровождается уменьшением продукции *IL-1 β* , а *G*-аллели – уменьшением продукции *TNF α* у больных рожей при гомозиготном носительстве *GG* полиморфизма гена *TNF α G308A*.

3. Экспрессия тканевого фактора при роже зависит от концентрации провоспалительных цитокинов *IL-1 β* и *TNF α* , а не от полиморфизма генов, кодирующих *TF*. При роже экспрессия тканевого фактора моноцитами периферической крови проявляется в зависимости от формы заболевания: минимальная у больных с эритематозной, максимальная – с буллезно-геморрагической.

4. В развитии рожи ведущее значение принадлежит патогенетической оси: «SNP генов *CD14*, *TLR4* – *IL-1 β* , *TNF α* – экспрессия *TF*».

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования по изучению генетического полиморфизма иммунорегуляторных молекул *CD14*, *TLR4*, *IL-1 β* , *TNF α* , *TF*, их влияния на содержание *IL-1 β* , *TNF α* и экспрессию тканевого фактора моноцитами периферической крови при роже внедрены в учебный процесс кафедр инфекционных болезней, нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», а также в лечебно-диагностическую работу ГУЗ «Краевая клиническая инфекционная больница» г. Читы.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности и обоснованности выводов, основных научных положений диссертации определяются достаточным объемом материала. Результаты, полученные автором вследствие анализа клинических, иммунологических и молекулярно-генетических данных,

свидетельствуют о решении поставленных задач. Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований.

Результаты работы доложены на научно-практической конференции “Избранные вопросы инфекционной патологии Урала и Западной Сибири” (Екатеринбург, 2017); IX, X Ежегодных Всероссийских конгрессах по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2017, 2018); IV Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием “Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания” (Сочи, 2017); XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Berlin, 2017).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, в т.ч. 1 статья в журнале, входящем в международную базу цитирования SCOPUS; 4 статьи в журналах, не входящих в перечень, рекомендованных ВАК; 1 патент на изобретение РФ, 16 тезисов в сборниках международных, российских научных конференций, конгрессов и съездов.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики методов исследования, главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 221 источник, из которых 131 отечественный и 90 зарубежных авторов; иллюстрирована 17 таблицами, 12 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования выполнены с информированного согласия испытуемых. В работе с обследуемыми соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2013 – поправки) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Клиническая характеристика пациентов с рожей. Верификацию диагноза проводили на основании клинико-anamnestических данных согласно классификации В.Л. Черкасова (1986). Данную группу составили 104 пациента с диагнозом рожи средней степени тяжести (средний возраст – $47,5 \pm 3,5$ года). Из них по кратности течения: больные с первичной формой рожи – 54 человека, с рецидивирующей формой рожи – 50 человек; по характеру местных проявлений: с эритематозной формой – 65 человек, с эритематозно-буллезной – 25 человек, буллезно-геморрагической – 14 человек. Критериями исключения служили: повторная форма рожи,

обострение хронических воспалительных процессов, пневмония, инфекционные заболевания другой этиологии, сахарный диабет 1 и 2 типов, наследственные и психические болезни, острые сердечно-сосудистые заболевания, осложненное течение рожи, эндокринные заболевания, алиментарно-конституциональное ожирение, у женщин – беременность и ранний послеродовой период.

Контрольную группу составили 94 практически здоровых донора с аналогичными характеристиками по полу и возрасту, не имеющих острых вирусных и бактериальных, хронических инфекционных, аллергических и аутоиммунных заболеваний. Все обследованные – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края.

Лабораторные методы исследований

Определение концентрации цитокинов. Для определения концентрации цитокинов (IL-1 β , TNF α) использовали наборы реагентов ООО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Измерение уровня цитокинов проводили методом твердофазного ИФА.

Исследование экспрессии тканевого фактора. Исследование экспрессии тканевого фактора моноцитами осуществляли по методу, предложенному R.A. Santucci et al. (2000) в собственной модификации.

Полимеразная цепная реакция. Определение полиморфизма генов (IL-1 β , CD14, TF, TNF α , TLR4) осуществлялось методом ПЦР с использованием праймеров ООО «Литех» (г. Москва). Анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови или буккального эпителия с помощью реагента «ДНК-экспресс», затем проводилась реакция амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров.

Способы статистической обработки полученных результатов. Статистическая обработка осуществлялась при помощи электронных программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США), MDR 3.0 (Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) с определением статистической значимости различий при $p < 0,05$. Для описания характера распределения количественных признаков определялись среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$), либо медиана (Me) с интерквартильным интервалом (25 и 75 перцентили). Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Для сравнения групп по качественному бинарному признаку применялся критерий χ^2 (Пирсона). Предсказания значений ряда зависимых переменных по известным значениям других переменных осуществлялось с помощью множественного регрессионного анализа. Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель отношения шансов (OR) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Исследование полиморфизмов генов *IL-1 β* , *TNF α* у больных рожей

1.1. Полиморфизм гена *IL-1 β* (*T31C*, *T511C*, *C3953T*)

В ходе молекулярно-генетического исследования обнаружены все искомые мутации с частотным подчинением эквilibриуму Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Общее распределение частоты полиморфных вариантов гена *IL-1 β* (*T31C*, *T511C*, *C3953T*) у больных рожей и здоровых лиц отражено в таблице 1.

Таблица 1

Встречаемость SNP *IL-1 β* (*T31C*, *T511C*, *C3953T*) у здоровых лиц и больных рожей

Группа	Аллель	Частота аллели, P	χ^2 ; p	Генотип	Частота генотипа, %	χ^2 ; p
<i>IL-1β T31C</i>						
Больные рожей (n=104)	<i>T</i>	0,55	24,31 p<0,00	<i>TT</i>	38,5	21,93 p<0,001
	<i>C</i>	0,45		<i>TC</i>	33,7	
				<i>CC</i>	27,8	
Группа контроля (n=94)	<i>T</i>	0,79	1	<i>TT</i>	47,9	
	<i>C</i>	0,21		<i>TC</i>	45,7	
				<i>CC</i>	6,4	
<i>IL-1β T511C</i>						
Больные рожей (n=104)	<i>T</i>	0,35	0,96 p=0,33	<i>TT</i>	11,5	3,10 p=0,21
	<i>C</i>	0,65		<i>TC</i>	46,2	
				<i>CC</i>	42,3	
Группа контроля (n=94)	<i>T</i>	0,39		<i>TT</i>	20,2	
	<i>C</i>	0,61		<i>TC</i>	38,3	
				<i>CC</i>	41,5	
<i>IL-1β C3953T</i>						
Больные рожей (n=104)	<i>C</i>	0,76	21,58 p<0,00	<i>CC</i>	56,7	22,67 p<0,001
	<i>T</i>	0,24		<i>CT</i>	38,5	
				<i>TT</i>	4,8	
Группа контроля (n=94)	<i>C</i>	0,54	1	<i>CC</i>	25,5	
	<i>T</i>	0,46		<i>CT</i>	56,4	
				<i>TT</i>	18,1	

Таким образом, шанс развития рожи повышается у носителей аллели *C* (OR=2,99 [1,92-4,66]), генотипа *CC* (OR=8,70 [2,93-25,86]) гена *IL-1 β T31C*, аллели *C* (OR=2,72 [1,77-4,18]), генотипа *CC* (OR=3,82 [2,09-7,00]) гена *IL-1 β C3953T*.

1.2. Полиморфизм промотора гена *IL-1 β G1473C* и его влияние на содержание *IL-1 β* в крови больных рожей

Распределение частоты полиморфных вариантов гена *IL-1 β (G1473C)* у здоровых лиц и больных рожей в зависимости от кратности процесса отражено в таблице 2.

Таблица 2

Встречаемость SNP *IL-1 β G1473C* у здоровых лиц и больных рожей

Генотипы (%) Аллели (P)	Группы			χ^2 (p)
	Контрольная группа (n=94)	Больные первичной рожей (n=54)	Больные рецидивирующей рожей (n=50)	
<i>GG</i>	59,6%	33,3%	10,0%	11,77 $p_1=0,003$ 40,90 $p_2=0,0009$ 9,66 $p_3=0,008$
<i>GC</i>	33,0%	44,4%	48,0%	
<i>CC</i>	7,4%	22,3%	42,0%	
<i>G</i>	0,761	0,556	0,340	13,39 $p_1=0,0003$ 48,76 $p_2=0,0001$ 9,74 $p_3=0,002$
<i>C</i>	0,239	0,444	0,660	

Примечание: p_1 , p_2 – значимость различий по сравнению со здоровыми; p_3 – значимость различий распределения частот генотипов и аллелей групп больных первичной и рецидивирующей рожей.

Шанс развития рожи возрастает у лиц, несущих аллель *C* (OR=3,93 [2,55-6,06]) ($\chi^2=40,31$; $p=0,0002$), генотипа *GC* (OR=1,81 [1,02-3,22]) и *CC* (OR=5,78 [2,41-13,84]) промотора гена *IL-1 β G1473C* ($\chi^2=35,36$; $p=0,0002$). При этом вероятность развития рецидивирующей формы заболевания выше у носителей гомозиготного варианта *CC* (OR=2,53 [1,08-5,95]) ($\chi^2=9,66$; $p=0,008$).

Выявлено, что у пациентов с первичной и рецидивирующей рожей вне зависимости от генотипа, повышается концентрация провоспалительного *IL-1 β* по сравнению со здоровыми резидентами ($p<0,05$) (рис. 1). Уровень цитокина у больных-носителей разных генотипов различается между собой (рис. 1).

Однако, при парном сравнении уровня *IL-1 β* у больных первичной и рецидивирующей рожей в зависимости от генотипа не обнаружено статистически значимых различий (критерий Манна-Уитни, $p>0,05$). Полученные данные показывают, что полиморфизм *G1473C* промотора гена *IL-1 β* влияет на уровень *IL-1 β* в крови больных рожей. При этом развитие рецидива заболевания не связано с концентрацией этого цитокина.

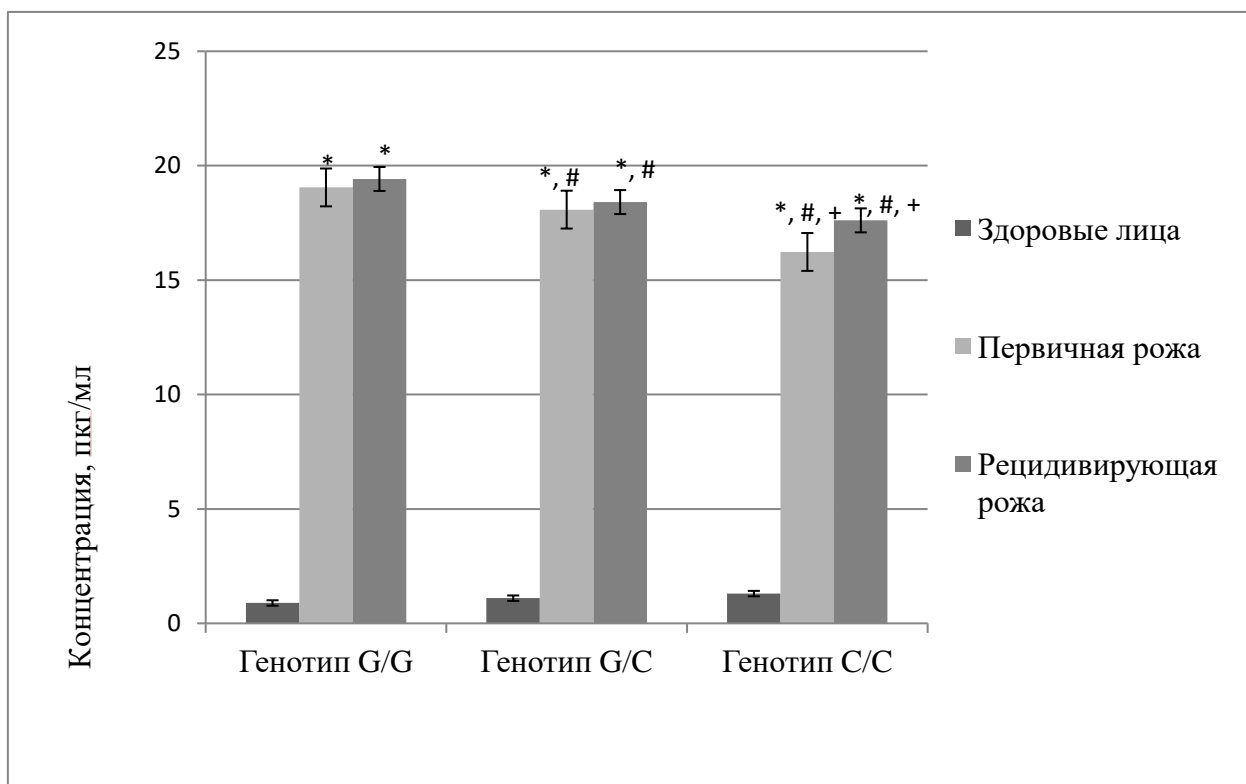


Рис. 1. Содержание IL-1 β в крови больных розеями в зависимости от SNP гена IL-1 β G1473C, пг/мл (Me, 25-75%).

Примечание: критерий Краскела-Уоллиса; * – статистическая значимость различий с контрольной группой; *, # – статистическая значимость различий по сравнению с гомозиготами GG; *, #, + – статистическая значимость различий по сравнению с гетерозиготами GC.

Таким образом, аллель C, генотипы GC и CC промотора гена IL-1 β G1473C предрасполагают к развитию рожи. Гомозиготный вариант CC увеличивает риск развития рецидивирующего течения заболевания. Присутствие C-аллели сопровождается уменьшением продукции IL-1 β у больных розеями при гетерозиготном GC и гомозиготном CC вариантах носительства полиморфизма гена IL-1 β G1473C.

1.3. Полиморфизм гена TNF α G308A и его влияние на содержание TNF α в крови здоровых лиц и больных розеями

В группе больных розеями чаще встречалась аллель G с по сравнению с группой здоровых ($\chi^2=11,42$; $p=0,0007$). В группе пациентов преобладал генотип GG ($\chi^2=13,03$; $p=0,001$). Распределение генотипов среди здоровых резидентов оказалось следующим: GG – 67,0%, GA – 33,0% ($\chi^2=13,03$; $p=0,001$). При этом в исследуемых группах не выявлено случаев носительства генотипов AA. Шанс развития рожи повышается у носителей генотипа GG (OR=3,85 [1,80-8,23]) ($p=0,001$) и аллели G (OR=3,28 [1,60-6,75]) ($p=0,0007$) гена TNF α G308A.

Обнаружено, что у пациентов с различной кратностью процесса вне зависимости от генотипа увеличивается концентрация цитокина TNF α по

сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). При этом его уровень у больных-носителей разных генотипов различается между собой (рис. 2). При парном сравнении уровня TNF α у больных первичной и рецидивирующей розей в зависимости от генотипа статистически значимых различий не обнаружено (критерий Манна-Уитни, $p > 0,05$).

Таким образом, полученные данные указывают, что полиморфизм G308A гена TNF α влияет на уровень TNF α в крови больных розей. Однако, изменение концентрации исследуемого цитокина не является прогностическим фактором развития рецидива заболевания, равно как и полиморфизм гена TNF α в регионе G308A.

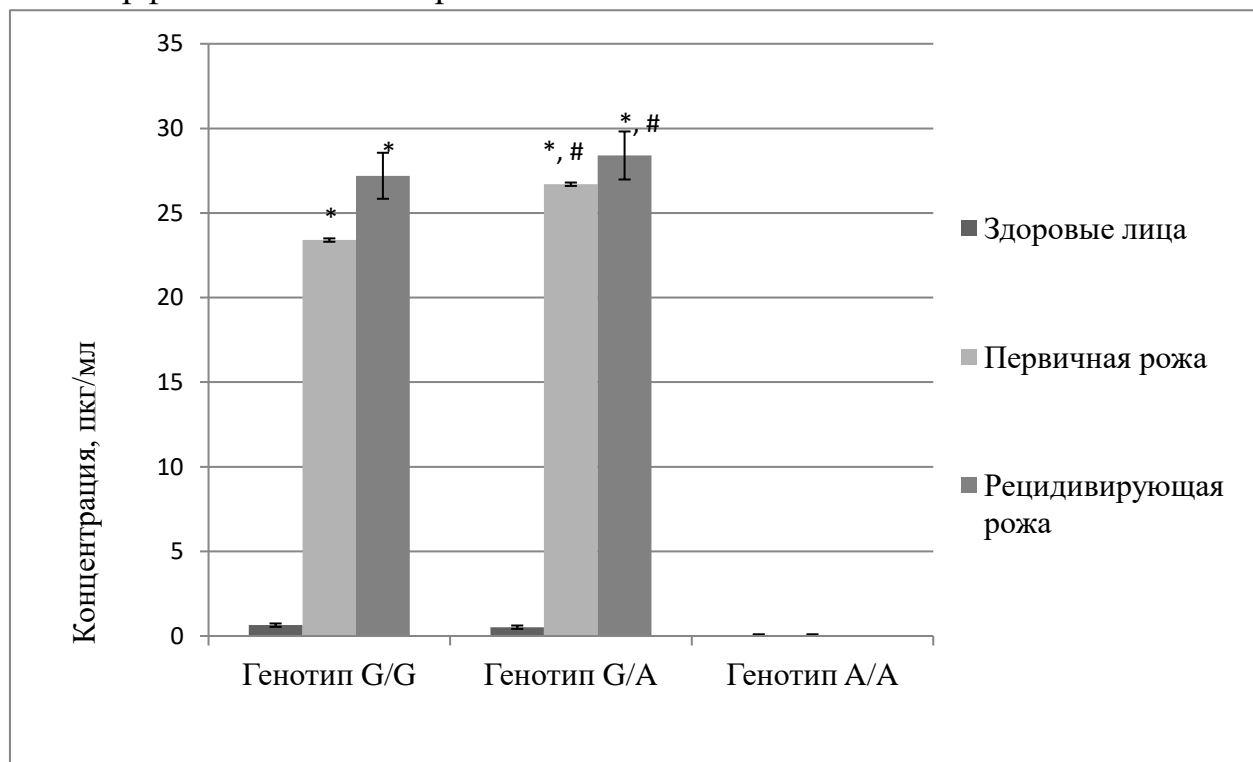


Рис. 2. Содержание TNF α в крови больных розей в зависимости от SNP гена TNF α G308A, пкг/мл (Me, 25-75%).

Примечание: критерий Краскела-Уоллиса; * – статистическая значимость различий с контрольной группой; *, # – статистическая значимость различий по сравнению с гомозиготами GG;

2. Исследование SNP сигнальных молекул CD14 (C159T), TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) у здоровых лиц и больных розей

Распределение частоты полиморфных вариантов генов CD14 (C159T), TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) среди здоровых лиц и больных розей отражено в таблице 3.

Шанс развития рози повышается у носителей аллели T (OR=2,22 [1,42-3,48]), генотипа CT (OR=1,83 [1,02-3,27]), генотипа TT (OR=3,33; [1,05-8,61]) гена CD14 C159T, аллели -299Asp (OR=7,41 [3,74-14,67]), генотипа 299AspAsp (OR=9,21 [4,37-19,38]) гена TLR4 Asp299Gly, аллели -399Thr (OR=8,23 [3,92-

17,27]), генотипа *-399ThrThr* (OR=10,56 [4,77-23,36]) гена *TLR4 Thr399Ile* (табл. 3).

Таблица 3

Встречаемость SNP *CD14 (C159T)*, *TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile)* у здоровых лиц и больных рожей

Группа	Аллель	Частота аллели, P	χ^2 ; p	Генотип	Частота генотипа, %	χ^2 ; p
<i>CD14 C159T</i>						
Больные рожей (n=104)	<i>C</i>	0,625	12,42 p<0,001	<i>CC</i>	39,4	11,92 p<0,001
	<i>T</i>	0,375		<i>CT</i>	46,2	
				<i>TT</i>	14,4	
Группа контроля (n=94)	<i>C</i>	0,787	p<0,001	<i>CC</i>	62,8	p<0,001
	<i>T</i>	0,213		<i>CT</i>	31,9	
				<i>TT</i>	5,3	
<i>TLR4 Asp299Gly</i>						
Больные рожей (n=104)	<i>-299Asp</i>	0,947	40,84 p<0,001	<i>Asp299Asp</i>	89,4	41,26 p<0,001
	<i>-299Gly</i>	0,053		<i>Asp299Gly</i>	10,6	
				<i>Gly299Gly</i>	0	
Группа контроля (n=94)	<i>-299Asp</i>	0,707	p<0,001	<i>Asp299Asp</i>	47,9	p<0,001
	<i>-299Gly</i>	0,293		<i>Asp299Gly</i>	45,7	
				<i>Gly299Gly</i>	6,4	
<i>TLR4 Thr399Ile</i>						
Больные рожей (n=104)	<i>-399Thr</i>	0,957	39,93 p<0,001	<i>Thr399Thr</i>	91,3	42,06 p<0,001
	<i>-399Ile</i>	0,043		<i>Thr399Ile</i>	8,7	
				<i>Ile399Ile</i>	0	
Группа контроля (n=94)	<i>-399Thr</i>	0,729	p<0,001	<i>Thr399Thr</i>	50	p<0,001
	<i>-399Ile</i>	0,271		<i>Thr399Ile</i>	45,7	
				<i>Ile399Ile</i>	4,3	

3. Исследование тканевого фактора у больных рожей

3.1. Полиморфизм гена *TF (A603G, C1322T, C1812T, G1442C)*

Выявлено, что распространенность полиморфных вариантов *TF (A603G, C1322T, C1812T, G1442C)* у пациентов с рожей не отличалась от распространенности среди лиц контрольной группы ($p>0,05$). Распределение генотипов соответствовало соотношению Харди-Вайнберга ($p>0,05$). Таким образом, полиморфизм гена *TF* не ассоциирован с развитием рожи.

3.2. Исследование экспрессии тканевого фактора у больных рожей и здоровых лиц

Установлено, что в контрольной группе наблюдается значительная разница между стимулированными бактериальным ЛПС и нестимулированными образцами крови – $44,1\pm 2,6\%$. Однако, у пациентов с рожей эта разница существенно уменьшилась: с эритематозной формой –

17,9±2,3%, с эритематозно-буллезной – до 9,4±1,8% (p<0,001), с буллезно-геморрагической – 5,8±1,6%, что свидетельствует о высокой экспрессии тканевого фактора с ее усилением при более тяжелых формах (табл. 4). Выявлено, что при повышении содержания IL-1β и TNFα происходит сокращение времени коагуляции крови больных рожей (табл. 5). Поскольку сокращение времени коагуляции крови указывает на высокую экспрессию тканевого фактора, индуцированную увеличением содержания изучаемых провоспалительных цитокинов, не ассоциированную с генетическим полиморфизмом одноименной молекулы, то справедливо предположить, что экспрессия тканевого фактора при роже зависит не от полиморфизма генов, кодирующих его, а от концентрации провоспалительных цитокинов IL-1β и TNFα. Это обуславливает вторичный характер гиперкоагуляции при роже.

Таблица 4

Время коагуляции крови больных рожей и здоровых лиц (M±SD)

Группы	Время коагуляции крови		Сокращение времени коагуляции, %
	реактивированной, с	активированной ЛПС, с	
Группа контроля (n=94)	169,5±10,1	94,8±1,2	44,1±2,6
Эритематозная форма (n=65)	115,3±7,6 p<0,001	94,5±4,1 p>0,05	17,9±2,3 p<0,001
Эритематозно-буллезная форма (n=25)	102,9±13,1 p<0,001	92,8±3,8 p>0,05	9,4±1,8 p<0,001
Буллезно-геморрагическая форма (n=14)	98,8±9,7 p<0,001	91,9±3,9 p>0,05	5,8±1,6 p<0,001

Таблица 5

Взаимосвязь сокращения времени коагуляции и концентрации IL-1β, TNFα

Ранговая корреляция Спирмена (R)		
Переменные	Концентрация IL-1β	Концентрация TNFα
Сокращение времени коагуляции, %	r = -0,73; p<0,05	r = -0,79; p<0,05

Примечание: связь слабая от 0 до 0,3; средняя – 0,3-0,7; сильная – 0,7-1; p – уровень значимости; «-» – наличие обратной связи, «+» – наличие прямой связи между переменными.

4. Регрессионная многофакторная модель влияния SNP полиморфизмов на экспрессию тканевого фактора и их значение в развитии рожи

Модель охватывала данные о распределении полиморфных вариантов генов *TNFα* (G308A), *IL-1β* (T31C, T511C, C3953T, G1473C), *CD14* (C159T), *TF* (A603G, C1322T, C1812T, G1442C), *TLR4* (Asp299Gly, Thr399Ile). Иммунологическая и коагулогическая составляющие в регрессионной модели включали содержание TNFα, IL-1β в плазме крови, а также данные об

экспрессии тканевого фактора моноцитами периферической крови. Результаты многофакторного пошагового регрессионного анализа показали, что наиболее близко связанным с развитием рожи оказалось определение мутации *-1473CC* гена *IL-1 β* . Точность предсказания увеличивалась при добавлении генотипа *-3953CC* гена *IL-1 β* , генотипа *-299AspAsp* гена *TLR4*, содержания TNF α , экспрессии тканевого фактора. При добавлении других показателей нарастания значимой прогностической мощности не отмечалось (табл. 6). Значение множественного коэффициента корреляции составило 0,839, коэффициент детерминации (R-квадрат) – 0,704, уровень значимости регрессионной модели <0,000001, что свидетельствует о высокой чувствительности и достоверности данной математической модели.

Таким образом, высокую прогностическую ценность имеет выявление генотипов *-1473CC* гена *IL-1 β* , *-3953CC* гена *IL-1 β* , *-299AspAsp* гена *TLR4*, содержания TNF α и экспрессии тканевого фактора у больных рожей.

Таблица 6

Значение показателей в многофакторной модели развития рожи

N=198	β	Std. Err. of β	B	Std. Err. B	p
Св. член			2,303245	0,166970	0,0000
<i>-1473CC</i> гена <i>IL-1β</i>	0,414892	0,041675	0,269652	0,027755	0,0001
<i>-3953CC</i> гена <i>IL-1β</i>	-0,292665	0,041219	-0,176079	0,031194	0,0003
<i>-299AspAsp</i> гена <i>TLR4</i>	-0,467545	0,043634	-0,439013	0,040971	0,0005
Концентрация TNF α	0,318041	0,044888	-0,300683	0,045286	0,007
Экспрессия тканевого фактора	0,394324	0,044319	0,205359	0,030922	0,004

Примечание: n – количество наблюдений; β – регрессионный коэффициент; Std. Err. of β – стандартная ошибка β ; B – свободный член (отрезок); Std. Err. B – стандартная ошибка B; p – уровень статистической значимости (достоверен при $p < 0,05$).

5. Модель индивидуального прогнозирования развития рожи у клинически здоровых лиц на основе анализа SNP генов *TNF α* , *IL-1 β* , *CD14*, *TF*, *TLR4*

Модель с максимальной сбалансированной точностью (Bal. Acc.=89%), чувствительностью (Se=84%), специфичностью (Sp=93%), воспроизводимостью результата 10/10 – комбинация полиморфных вариантов генов *IL-1 β* *G1473C*, *CD14* *C159T*, *TLR4* *Asp299Gly* ($\chi^2=12,11$, $p=0,0005$, OR=38,7), увеличивающая риск развития рожи, в среднем, в 38,7 раза (табл. 7). В результате моделирования взаимодействий исследуемых генов выявлены сочетания полиморфных вариантов, ассоциированные с риском развития рожи: *-1473GC* *IL-1 β* /*-159TT* *CD14*/*-299AspAsp* *TLR4*; *-1473GC* *IL-1 β* /*-159CC* *CD14*/*-299AspAsp* *TLR4*; *-1473GC* *IL-1 β* /*-159CC* *CD14*/*-299AspGly* *TLR4*; *-1473CC* *IL-1 β* /*-159TT* *CD14*/*-299AspAsp* *TLR4*;

-1473CC IL-1 β /-159CT CD14/-299AspAsp TLR4; -1473GG IL-1 β /-159TT CD14/-299AspAsp TLR4; -1473GG IL-1 β /-159CT CD14/-299AspAsp TLR4; -1473GG IL-1 β /-159CT CD14/-299AspGly TLR4. С риском развития рецидивирующего течения рожи связаны следующие сочетания генетических маркеров: -1473CC IL-1 β /-159TT CD14/-299AspAsp TLR4; -1473CC IL-1 β /-159CT CD14/-299AspAsp TLR4.

Таким образом, определение генов *IL-1 β G1473C*, *CD14 C159T*, *TLR4 Asp299Gly* может использоваться в диагностическом процессе на доклинической стадии заболевания для повышения достоверности прогнозирования развития рожи.

Таблица 7

Модель MDR для прогнозирования рожи

Модель	Баланс точности кросс-валидации подготовки	Баланс точности кросс-валидации тестирования	Взаимосогласованность кросс-валидации
<i>IL-1β G1473C</i> , <i>CD14 C159T</i> , <i>TLR4 Asp299Gly</i>	0,9082	0,8912	10/10

ВЫВОДЫ

1. У больных рожей минорная аллель *C* и гомозиготный генотип *CC* гена *IL-1 β T31C*, мажорная аллель *C* и гомозиготный генотип *CC* полиморфизма *IL-1 β C3953T* обнаруживаются чаще по сравнению с контрольной группой. Минорная аллель *C*, генотип *CC* гена *IL-1 β T31C*, мажорная аллель *C*, генотип *CC* гена *IL-1 β C3953T* повышают вероятность развития рожи.
2. При первичной и рецидивирующей роже превалирует минорная аллель *C* промотора гена *IL-1 β G1473C* по сравнению с группой здоровых лиц. Среди больных рожей преобладают гетерозиготные варианты *GC*. В группе с рецидивирующим течением гомозиготы *CC* обнаруживаются чаще, чем в группах больных первичной рожей и контрольной группой. Аллель *C*, генотипы *GC* и *CC* промотора гена *IL-1 β G1473C* увеличивают шанс развития рожи. Гомозиготный вариант *CC* промотора гена *IL-1 β G1473C* усиливает вероятность возникновения рецидивов заболевания.
3. В группе пациентов мажорная аллель *G* и гомозиготный вариант *GG* промотора гена *TNF α G308A* встречаются чаще по сравнению с группой контроля. Аллель *G* и генотип *GG* промотора гена *TNF α G308A* предрасполагают к развитию рожи.
4. При роже минорная аллель *T* гена *CD14 C159T* обнаруживается чаще по сравнению с контрольной группой. Среди больных рожей превалирует гетерозиготный *CT*, а у здоровых лиц – гомозиготный генотип *CC* полиморфизма *CD14 C159T*. Минорная аллель *T* и гомозиготный генотип *TT* повышают шанс возникновения рожи.

5. Среди больных рожей преобладают мажорные аллели *-299Asp* и *-399Thr* гена *TLR4*. В группе пациентов чаще регистрируются гомозиготные генотипы *299AspAsp* и *399ThrThr*, и отсутствуют их гомозиготные варианты *299GlyGly* и *399IleIle* гена *TLR4*. Аллель *-299Asp*, генотип *AspAsp* гена *TLR4 Asp299Gly*, аллель *-399Thr*, генотип *ThrThr* гена *TLR4 Thr399Ile* увеличивают возможность развития рожи.
6. У пациентов с первичной и рецидивирующей рожей повышение концентрации цитокинов *IL-1β* и *TNFα* зависит от генотипов полиморфизмов промоторов одноименных генов. При первичной и рецидивирующей роже у обладателей генотипа *GG* гена *IL-1β G1473C* и *GG TNFα G308A* максимально увеличивается концентрация *IL-1β* и *TNFα*. Присутствие *C*-аллели SNP гена *G1473C* у больных рожей сопровождается уменьшением продукции *IL-1β*, а *G*-аллели – уменьшением продукции *TNFα* у пациентов при гомозиготном носительстве *GG* полиморфизма гена *TNFα G308A*.
7. При роже экспрессия тканевого фактора моноцитами периферической крови проявляется в зависимости от формы заболевания: минимальная у больных с эритематозной, максимальная – с буллезно-геморрагической. Экспрессия тканевого фактора при роже зависит от концентрации провоспалительных цитокинов *IL-1β* и *TNFα*, а не от полиморфизма генов, кодирующих *TF*, что обуславливает вторичный характер гиперкоагуляции.
8. Комбинация полиморфных вариантов генов *IL-1β G1473C*, *CD14 C159T*, *TLR4 Asp299Gly* увеличивает риск развития рожи.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Генетический полиморфизм Toll-подобного рецептора-4 у больных рожей / А.С. Емельянов [и др.] // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 54-57.
2. Емельянов, А.С. Современные аспекты прогнозирования рожи [Электронный ресурс] / А.С. Емельянов, А.Н. Емельянова, Ю.А. Витковский // Забайкальский медицинский вестник. – 2018. – № 4. – С. 9-13. – Режим доступа: <http://zabmedvestnik.ru/journal/2018/4/2.pdf> (дата обращения: 18 мая 2019).
3. Полиморфизм промотора гена *IL1B (G1473C)* и его влияние на содержание интерлейкина 1 в крови больных рожей / А.С. Емельянов [и др.] // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16, № 8. – С. 32-35.
4. Полиморфизм промоторного региона *rs1800629* гена *TNFα* и его влияние на содержание фактора некроза опухолей альфа в крови здоровых лиц и больных рожей / А.С. Емельянов [и др.] // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 411-416.

Патент:

1. Патент № 2683314, РФ, МПК G01N 33/48. Способ прогнозирования риска развития рожи / А.С. Емельянов [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия. – № 2018117402; заявл. 10.05.2018; опубл. 28.03.2019, Бюллетень Изобретения. Полезные модели. – 2019. – № 10. – 9 с.

Прочие:

1. Влияние генетического полиморфизма TF (A603G, C1322T, C1812T, G1442C) на экспрессию тканевого фактора у больных первичной рожей / А.С. Емельянов [и др.] // Инфекционные болезни. – 2017. – Т. 15, Прил. 1. – С. 91.
2. Влияние полиморфизма гена IL-1B (G1473C) на содержание интерлейкина 1 в крови больных рожей / А.С. Емельянов [и др.] // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 9, Прил. 2. – С. 41-42.
3. Генетический полиморфизм TNFa (G308A) у больных рожей / А.С. Емельянов [и др.] // Актуальные проблемы инфектологии, эпидемиологии и ВИЧ - инфекции: современные технологии эпиднадзора, диагностики, лечения и профилактики : материалы межрегион. науч.-практ. конф., посвященная 60-летию кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ЧГМА (Чита, 7-8 сент. 2017 г.). – Чита : РИЦ ЧГМА, 2017. – С. 24-26.
4. Иммуногенетические маркеры предрасположенности при первичной роже / А.С. Емельянов [и др.] // Сб. тез., посвященный 165-летию образования ФГКУ “321 ВКГ” Минобороны РФ. – Чита, 2016. – С. 52-53.
5. Модель персонализированного генетического прогнозирования развития рожи на основе полиморфизма сигнальных молекул / А.С. Емельянов [и др.] // Медицинские технологии и оборудование : материалы Всеросс. науч.-практ. конф. (Чита, 16 нояб. 2018 г.). – Чита : РИЦ ЗабГУ, 2018 – С. 72-75.
6. Модель прогнозирования рожи у клинически здоровых лиц на основе анализа полиморфизма генов IL-1B, CD14, TF, TNFa, TLR4 / А.С. Емельянов [и др.] // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания : материалы IV Всеросс. междисциплин. науч.-практ. конф. с международным участием (Сочи, 1-4 нояб. 2017 г.). – Краснодар : Полиграф-ЮГ, 2017. – С. 88-89.
7. Некоторые аспекты иммунопатогенеза рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Неделя науки : материалы Всеросс. молодежного форума с междунар. участием (Ставрополь, 17-18 нояб. 2016 г.). – Ставрополь : РИЦ СтГМУ 2016. – С. 394-396.
8. Персонализированные аспекты развития рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Журн. инфектологии. – 2018. – Т. 10, Прил. 2-1. – С. 43.
9. Полиморфизм гена TNFa (G308A) и его влияние на содержание TNFa в крови больных рожей и здоровых лиц / А.С. Емельянов [и др.] // Студенческая наука-2018 : материалы Всеросс. науч. форума студентов и

- молодых учен. (Санкт-Петербург, 12-13 апр. 2018 г.). – СПб. : СПбГПМУ, 2018. – С. 604-605.
10. Роль генетического полиморфизма CD14 (C159T) в развитии рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Материалы XIII Междунар. (XXII Всеросс.) Пироговской науч. мед. конф. студентов и молодых учен. (Москва, 15 марта 2018 г.). – М. : РИЦ РНИМУ, 2018. – С. 69.
 11. Роль генетического полиморфизма IL-1 β (T31C, T511C) в развитии рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Забайкальский медицинский журнал. – 2017. – № 2 – С. 68.
 12. Роль генетического полиморфизма IL-1 β (C3953T) в развитии рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы : материалы X Ежегодного Всеросс. конгр. по инфекционным болезням с междунар. участием (Москва, 26-28 февр. 2018 г.). – М. : ММА, 2018. – С. 67-68.
 13. Роль генетического полиморфизма IL-1 β (T31C, T511C, C3953T) в развитии рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания : материалы V Всеросс. междисциплинарной науч.-практ. конф. с междунар. участием (Сочи, 2 нояб. 2018 г.). – Краснодар : Типография Б+, 2018. – С. 76-77.
 14. Роль генетического полиморфизма TLR4 (A896G) и TLR4 (C1196T) в развитии рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Молекулярная диагностика-2017 : сб. тр. IX Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Москва, 18-20 апр. 2017 г.). – Тамбов : Юлис, 2017 – С. 98-99.
 15. Роль генетического полиморфизма промоторных регионов TNF α (G308A) и IL-1 β (G1473C) в развитии рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Молекулярная диагностика-2018 : сб. тр. междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 27-28 сент. 2018 г.). – Минск : СтройМедиаПроект, 2018 – С. 120-121.
 16. Роль генетического полиморфизма сигнальных молекул CD14 (C159T) и TLR4 (ASP299GLY, THR399ILE) в развитии рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 65-летию образования ЧГМА (Чита, 26 окт. 2018 г.). – Чита : РИЦ ЧГМА, 2018. – С. 51-53.
 17. Роль полиморфизма промоторного региона G1473C гена IL-1 β в развитии рецидивирующей рожи / А.С. Емельянов [и др.] // Забайкальский медицинский журн. – 2019. – № 1. – С. 35-36.
 18. Genetic polymorphism IL-1 β in patients with erysipelas / A.S. Emelyanov [et al.] // ISJM. – 2017. – S. – P. 472-473.
 19. Genetic polymorphism tissue factor in patients with erysipelas and healthy individuals in Trans-baikal territory / A.S. Emelyanov [et al.] // Материалы объедин. междунар. конгр. "Congress on open issues in thrombosis and hemostasis" совместно с 9-ой Всеросс. конф. по клинической

- гемостазиологии и гемореологии (Санкт-Петербург, 4-6 окт. 2018 г.). – Barcelona: EMLTD, 2018. – С. 66.
20. Tissue Factor Gene Polymorphisms (A603G, C1322T, C1812T, G1442C) in Healthy Individuals and Patients with Erysipelas in Transbaikalian Region / A.S. Emelyanov [et al.] // Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. – 2017. – Vol. 1, S. 1. – P. 422.

Список сокращений

CD	– кластер дифференцировочных антигенов
DAMP	– молекулярные структуры, связанные с повреждением
IL	– интерлейкин
PAMP	– патоген-ассоциированные молекулярные структуры
SNP	– однонуклеотидный полиморфизм
TF	– тканевой фактор
TLR	– toll-like receptor - toll-подобные рецепторы
TNF	– фактор некроза опухолей