

На правах рукописи



Загалаев Батраз Таймуразович

**РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ
В ПАТОГЕНЕЗЕ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ПАЦИЕНТОВ
ПРИЗЫВНОГО ВОЗРАСТА**

3.3.3. Патологическая физиология

(медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Чита – 2024

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Мироманова Наталья Анатольевна

Официальные оппоненты:

Шилов Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, доцент.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии

Попов Александр Федорович – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Школа медицины и наук о жизни, департамент ординатуры и дополнительного образования, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иркутск

Защита диссертации состоится «10» марта 2025 года в __⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 21.2.077.01 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а; <http://chitgma.ru>)

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.077.01

д.м.н., доцент



Мироманова Наталья Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Внебольничная пневмония (ВП) по-прежнему остается актуальной проблемой медицины, что объясняется высокой заболеваемостью, существенным вкладом в структуру смертности населения, значительными затратами на оказание медицинской помощи [А.Г. Чучалин, 2018; А.А. Зайцев, А.И. Синопальников, 2020; N. Saleem, 2023; E. Tsoumani, 2023]. Среди ведущих причин смерти пневмония занимает 3 место (www.unicef). Одним из контингентов, подверженных ВП, являются военнослужащие [М.А. Харитонов, 2018; А.А. Зайцев, 2019; Ю.Е. Рубцов, 2019]. Значимость ВП для военно-медицинской службы определяется более высоким уровнем заболеваемости военнослужащих по призыву относительно населения и военнослужащих по контракту, склонностью к эпидемическому распространению с охватом большого числа личного состава, прежде всего молодого пополнения, тяжелым течением, риском летальных исходов [С.Д. Жоголев, 2018; С.А. Парфенов и др., 2018; П.В. Куликов, 2019]. ВП среди военнослужащих отличается существенным уровнем трудопотерь, а тяжелые и осложнённые формы заболевания могут стать причиной увольнения из рядов Вооруженных Сил [С.А. Парфенов и др., 2018; Ю.В. Овчинников, 2019].

Степень разработанности темы исследования. Пневмония – многофакторное заболевание, течение и прогноз которого зависит не только от свойств возбудителя и средовых факторов, но и от генетических особенностей человека. Поиск предикторов тяжелого течения ВП показал, что дополнительные факторы риска часто остаются невыясненными [М.А. Карнаушкина, 2022]. В качестве предикторов тяжелой ВП могут рассматриваться однонуклеотидные полиморфизмы генов (SNP) цитокинов и эффекторных молекул иммунного ответа [И.Н. Гайворонский, 2016; Б.И. Кантемирова, В.В. Василькова, 2022]. Определены гены-кандидаты, ассоциированные с предрасположенностью, особенностями течения и исходами при пневмониях. Так, носители аллели *A* полиморфного варианта *G1082A* гена *IL-10* обладают повышенным риском тяжелой ВП, а наличие аллели *A* полиморфного варианта *G308A* гена *TNF α* повышает вероятность развития сепсиса при ВП в китайской популяции [Z.L. Mao et al., 2017; W. Song et al., 2019; Feng H., 2020]. Исследования в данном направлении не затронули лиц призывного возраста, хотя в условиях внешних стрессовых воздействий (призыв) вероятно клиническая реализация генетических факторов и влияние генов-кандидатов на развитие заболевания с риском тяжелого течения ВП.

Пневмония – наиболее характерный пример острого воспалительного ответа, который задействует большинство иммунных процессов [Е.П. Зинина и др., 2021]. Очевидна связь тяжести течения пневмонии с изменением концентрации провоспалительных (IL-1 β , -6, -8, TNF α , IFN- γ) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1RA). В патогенезе пневмонии выявлена роль других цитокинов (IL-12, IL-17), хемокинов, матриксных металлопротеиназ (ММП-2,-9), факторов клеточной пролиферации и дифференциации [Е.П. Зинина и др., 2021; А.Ф. Попов и др., 2022]. Показатели, характеризующие воспаление и имеющие значение для разрешения и исхода ВП, не включены в прогностические шкалы или

ограничиваются оценкой биомаркеров – прокальцитонина (ПКТ), С-реактивного белка (СРБ) [N. Johansson, 2014; A. Nouvenne, 2016; E. Chee, 2022]. Прогностическую ценность при ВП могут иметь концентрации свободного трийодтиронина [Ю.Е. Рубцов, 2019] и кортизола [Т. Тап, 2020].

Несмотря на очевидный интерес к исследованию маркеров, характеризующих воспалительную реакцию при внебольничных пневмониях в разных возрастных и социальных группах, патогенетические механизмы пневмоний, в том числе вызванных вирусом SARS-Cov-2 среди военнослужащих, особенно из числа молодого пополнения, остались недостаточно изученными.

Цель исследования: определить патогенетическую и прогностическую роль полиморфизма генов некоторых иммунорегуляторных молекул при внебольничных пневмониях различной этиологии у пациентов призывного возраста.

Задачи исследования

1. Установить содержание IL-1 β , TNF- α , IL-10, DEFB1, MMP-12, кортизола в сыворотке крови и оценить их вклад в развитие внебольничных пневмоний различной этиологии у пациентов призывного возраста.

2. Определить значение однонуклеотидных полиморфизмов генов *IL-1 β (T511C)*, *TNF α (G308A)*, *IL-10 (G1082A)*, *DEFB1 (G20A)*, *DEFB1 (G52A)*, *MMP12 (A82G)* в патогенезе внебольничных пневмоний различной этиологии и оценить их влияние на уровень кодируемых белков (IL-1 β , TNF- α , IL-10, DEFB1, MMP-12) у пациентов призывного возраста.

3. Выявить патогенетически значимые предикторы развития тяжелой пневмонии у пациентов призывного возраста на основе анализа изученных показателей.

Научная новизна

Впервые описаны некоторые патогенетические механизмы, лежащие в основе воспалительных реакций при внебольничных пневмониях у лиц призывного возраста. Показано, что воспаление при пневмонии у больных COVID-19 и вирусно-бактериальных пневмониях другой этиологии сопровождается однотипными проявлениями: повышенной продукцией общеизвестных биомаркеров воспаления (С-реактивный белок, прокальцитонин), про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-10), DEFB1, MMP-12 и кортизола. Доказано, что наибольший уровень биомаркеров воспаления у лиц призывного возраста свойственен для пневмонии при COVID-19 и определяет тяжесть течения патологического процесса.

Впервые показано, что увеличение содержания кортизола в сыворотке крови у лиц призывного возраста не зависит от этиологии внебольничной пневмонии и коррелирует с тяжестью заболевания.

Показано, что воспалительный ответ генетически детерминирован и предопределяется при пневмониях на фоне COVID-19 для геновариантов *C/C IL-1 β (T511C)*, *A/A DEFB1 (G20A)*, *A/A DEFB1 (G52A)* высоким содержанием в сыворотке крови интерлейкина-1 β , дефензина β 1, для геновариантов *A/A IL-10*

(*G1082A*), *G/G MMP12 (A82G)* – низким уровнем интерлейкина-10 и матриксной металлопротеиназы-12.

Впервые у лиц призывного возраста, исходя из этиологии заболевания, установлены генетические предикторы развития тяжелой пневмонии, в качестве которых определены полиморфные маркеры иммунорегуляторных молекул. Показано, что с тяжелым течением пневмонии, независимо от этиологии заболевания, ассоциированы минорная аллель *A* и генотип *A/A* гена *IL-10 (G1082A)*; аллель *A* и генотип *A/A* гена *MMP12 (A82G)*. Носительство *A* аллели, генотипов *A/A* гена *DEFB1 (G20A)*, *A/A* гена *DEFB1 (G52A)* предрасполагает к развитию тяжелой пневмонии при COVID-19-инфекции. Вероятность тяжелого течения пневмонии у больных при респираторных инфекциях, не связанных с COVID-19, ассоциирована с носительством *C* аллели и генотипа *C/C SNP IL-1β (T511C)*.

Доказано, что наибольшую значимость в развитии тяжелых форм пневмонии при COVID-19-инфекции имеют генотипы *-511C/C* гена *IL-1β*, *-1082A/A* гена *IL-10*, *-20A/A* гена *DEFB1*, *-52A/A* гена *DEFB1* и *-82A/A* гена *MMP12*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Ценность работы заключается в расширении знаний о генетических предикторах развития внебольничных пневмоний, позволяющих среди лиц призывного возраста в качестве генов-кандидатов предрасположенности к тяжелому течению пневмонии на фоне COVID-19 рассматривать полиморфные варианты *T511C* гена *IL-1β*, *G1082A* гена *IL-10*, *G20A* гена *DEFB1*, *G52A* гена *DEFB1*, *A82G* гена *MMP12*.

Выявление SNP генов иммунорегуляторных молекул и использование их в «Программе для оценки вероятности развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста» (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022684584) позволит осуществлять индивидуальное прогнозирование риска развития тяжелого течения заболевания, проводить своевременные лечебно-диагностические, противоэпидемические и профилактические мероприятия.

Методология и методы исследования. Проведенное исследование являлось одномоментным и включало сопоставление результатов, полученных при обследовании параллельных групп пациентов молодого призывного возраста с внебольничной пневмонией различной этиологии.

Протокол исследования утвержден локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (№ 104 от 11.11.2020 г.).

Положения, выносимые на защиту

1. У лиц призывного возраста воспалительная реакция, независимо от этиологического фактора пневмонии, сопровождается однотипными проявлениями: повышенной продукцией общеизвестных биомаркеров воспаления (С-реактивный белок, прокальцитонин), про- и противовоспалительных цитокинов (*IL-1β*, *TNF-α*, *IL-10*), дефензина- β 1, матриксной металлопротеиназы-12 и кортизола. Наибольший уровень

биомаркеров воспаления регистрируется при пневмонии на фоне COVID-19 и соответствует тяжести течения заболевания.

2. Прогностическими факторами тяжелой пневмонии при COVID-19-инфекции являются генотипы *-511C/C* гена *IL-1 β* , *-1082A/A* гена *IL-10*, *-20A/A* гена *DEFB1*, *-52A/A* гена *DEFB1* и *-82A/A* гена *MMP12*, а также их комбинации.
3. При пневмониях на фоне COVID-19 воспалительный ответ генетически детерминирован и предопределяется для геновариантов *C/C IL-1 β (T511C)*, *A/A DEFB1 (G20A)*, *A/A DEFB1 (G52A)* высоким содержанием в сыворотке крови интерлейкина-1 β , дефензина- β 1, для геновариантов *A/A IL-10 (G1082A)*, *G/G MMP12 (A82G)* – низким уровнем интерлейкина-10 и матриксной металлопротеиназы-12.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется достаточной выборкой обследуемых, оптимальным количеством проведенных лабораторных исследований, применением адекватных поставленным задачам методов статистического анализа.

Материалы исследований обсуждены и доложены на I Евразийском конгрессе по патофизиологии (Москва, 2024); Международной научно-практической конференции «Наука. Инновации. Будущее – 2024» (Петрозаводск, 2024); XXXV международной научно-практической конференции «Академическая наука – проблемы и достижения» (Bengaluru, India, 2024).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, 1 статья в журнале из перечня изданий, входящих в международную базу цитирования Scopus, 1 свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Структура и объем диссертации. Диссертация содержит 142 страницы машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, перспективы дальнейшей разработки темы исследования, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 56 отечественных и 141 зарубежный источник. Работа иллюстрирована 40 таблицами и 8 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование осуществлялось с 2020 г. по 2023 г. В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (1964, 2013 – поправки).

В исследование включено 160 неродственных пациентов одной этнической группы (европеиды) в возрасте 18–20 лет с ВП (рисунок 1).



Рисунок 1. Дизайн исследования

Критерии включения в исследование:

- отсутствие предшествующей госпитализации (≥ 48 ч);
- призывной возраст;
- мужской пол;
- рентгенологические или КТ-признаки пневмонии (для 1 группы объем КТ не более 50%, КТ 1-2);
- определение РНК вируса SARS-Cov-2 в носоглоточных мазках методом ПЦР (для 1 группы);
- отрицательный результат ПЦР-теста на РНК вирусов гриппа А и В (для 2 группы);

В зависимости от этиологии ВП пациенты разделены на группы:

- 1 группа представлена 80 пациентами призывного возраста (средний возраст $18,7 \pm 0,65$ лет) с COVID-19 с нетяжелой пневмонией (n=40) и тяжелой пневмонией (n=40);
- 2 группа – клинического сравнения (n=80) – пациенты призывного возраста (средний возраст $18,5 \pm 0,69$ лет) с ОРВИ негриппозной этиологии, осложненной нетяжелой пневмонией (n=40) и тяжелой пневмонией (n=40).

У пациентов при COVID-19 частота выявления *S. pneumoniae* варьировала от 83,7% у больных нетяжелой ВП до 86,1% у больных тяжелой ВП. Среди атипичных возбудителей выявлялись *M. pneumoniae* (при тяжелой и нетяжелой ВП – 8,9% и 7,4% соответственно), *Chl. pneumoniae* (при тяжелой и нетяжелой ВП – 1,7% и 2,2%

соответственно). В группе сравнения в 74% случаев обнаружена ДНК аденовируса, бактериальные находки не показали статистических значимых различий в этиологии ВП группы ($p > 0,05$).

Классификация, диагностика и лечение ВП, COVID-19 осуществлялись согласно клиническим рекомендациям Минздрава РФ (<https://cr.minzdrav.gov.ru>).

Включенные в исследование пациенты с ВП были сопоставимы по полу, возрасту, классификационным, диагностическим характеристикам и проводимому лечению.

Контрольную группу составили 86 практически здоровых мужчин аналогичного возраста (средний возраст $18,4 \pm 0,65$ лет), национальности и ареала проживания. Контрольная группа сформирована из контингента военнослужащих срочной службы и служащих по контракту.

Критерии невключения в исследование: пациенты с острыми и/или хроническими сопутствующими заболеваниями, лица женского пола, пациенты, получавшие глюкокортикоиды, антибактериальную, противовирусную, дезагрегационную и антикоагуляционную терапию перед госпитализацией, пациенты с другими клиническими формами и данными КТ, не попадающие под критерии включения.

Для исследования иммунологических показателей, биомаркеров воспаления и генетического тестирования использовалась периферическая кровь из локтевой вены. Забор материала проводили однократно.

Для определения *концентрации цитокинов* (IL-1 β , TNF- α , IL-10) в сыворотке крови использовали наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск); исследование выполняли методом ИФА.

Концентрацию DEFB1 и MMP-12 в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью набора реактивов ELISA Cloud-Clone Corp. (США).

Уровень кортизола в сыворотке определяли с помощью стандартного набора реактивов для метода ИХА (иммунохимический анализ) на анализаторе ACCESS 2 (США). Забор материала осуществляли в одно и то же время с учетом циркадного ритма до начала терапии в случае применения глюкокортикоидов.

Определение *прокальцитонина (ПКТ) и СРБ (С-реактивного белка)* осуществляли по стандартным методикам на иммунофлюоресцентном экспресс-анализаторе AQT90 FLEX (Дания).

Скрининговые показатели коагуляционного гемостаза и показатели фибринолитической активности оценивали у всех больных, т.к. одну из групп представляли пациенты с COVID-19. *Определение скрининговых показателей коагуляционного гемостаза* (МНО, АЧТВ) проводили стандартным способом. Количественное определение *D-димера* выполняли по стандартной методике (реагенты «D-dimer Test» фирмы Diagnostica Stado).

Молекулярно-генетические исследования. Этиологию ВП верифицировали с помощью ПЦР назофарингиальных мазков/ мокроты.

Определение полиморфизма генов IL1 β (T511C), TNF α (G308A), IL10 (G1082A), DEFB1(G20A), DEFB1 (G52A), MMP12 (A82G) осуществляли методом ПЦР с использованием праймеров ООО НПФ «Литех» (г. Москва). Анализ

подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с последующей амплификацией с двумя парами аллель-специфичных праймеров.

Статистическая обработка результатов осуществлена с помощью программы IBM SPSS Statistics Version 25.0. Характер распределения признаков оценивали с помощью критерия W-критерия Шапиро-Уилка, учитывая численность в подгруппах менее 50 человек. Интервальные данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей (Me [Q1; Q3]). Статистическую значимость различий показателей в группах оценивалась путем определения U-критерия Манна-Уитни и уровня значимости p. Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым. Оценка статистической значимости различий номинальных показателей проводили за счет построения четырехпольной таблицы сопряженности с использованием критерия χ^2 Пирсона. Зависимость относительных показателей оценивалась путем сравнения полученного значения критерия χ^2 с критическим. Учитывая наличие результативных и факторных признаков, ретроспективный характер исследования, оценка значимости различий показателей проводилась за счет определения отношения шансов (OR). Статистическая значимость относительного риска (p) оценивалась, исходя из значений 95% доверительного интервала (95% ДИ). Для измерения силы и направления связи между изучаемыми явлениями использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Диагностическая ценность прогностической модели определена путем построения ROC-кривой с последующим определением площади под ней.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Оценка некоторых показателей иммунитета и маркеров воспаления при внебольничных пневмониях у пациентов призывного возраста

Первоначально проведен анализ некоторых показателей иммунитета и параметров, отражающих воспалительную реакцию при ВП у пациентов призывного возраста, а также изучен уровень кортизола и MMP-12 в исследуемых группах (таблица 1).

Таблица 1

Содержание некоторых цитокинов, DEFB1, MMP-12, кортизола, маркеров воспаления (СРБ, ПКТ) в сыворотке крови у пациентов призывного возраста с ВП, Me [P25–P75]

Показатель	Группы		
	Контроль, n=86	ОРИ, n=80	COVID-19, n=80
IL-1 β , пг/мл	0,75 [0,01; 4,32]	3,71 [2,06; 7,78] p < 0,001	5,57 [2,72; 11,3] p < 0,001 p₁ < 0,001
TNF- α , пг/мл	0,59 [0,01; 4,01]	4,62 [2,83; 8,98] p < 0,001	5,81 [2,55; 10,9] p < 0,001 p₁ < 0,001

IL-10, пг/мл	0,17 [0,01; 3,43]	3,20 [1,04; 8,0] p < 0,001	8,72 [4,0; 14,82] p < 0,001 p₁ < 0,001
DEFB1, нг/мл	1,86 [0,85; 3,66]	2,46 [1,69; 3,95] p < 0,001	2,77 [2,04; 5,48] p < 0,001 p₁ < 0,001
MMP-12, нг/мл	0,16 [0,03; 0,81]	0,35 [0,14; 0,54] p < 0,001	0,58 [0,21; 0,94] p < 0,001 p₁ < 0,001
Кортизол, нмоль/л	199 [140; 583]	728 [443; 1100] p < 0,001	739 [448; 1186] p=0,597
ПКТ, нг/мл	0,01 [0,00; 0,09]	0,38 [0,09; 0,69] p < 0,001	0,54 [0,19; 0,98] p < 0,001 p₁ < 0,001
СРБ, мг/мл	0,19 [0,10; 1,16]	8,97 [6,11; 12,87] p < 0,001	11,97 [7,84; 18,93] p < 0,001 p₁ < 0,001

Примечание: p – статистическая значимость различий с контролем; p₁ – статистическая значимость различий между группами больных ВП при ОРВИ и COVID-19.

Выявлено, что содержание в сыворотке крови IL-1 β , TNF- α , IL-10, DEFB1, MMP-12 и таких маркеров воспаления, как ПКТ и СРБ у пациентов при ВП на фоне COVID-19 было выше соответствующих показателей группы контроля в 7,4; 9,9; 51,3; 1,5; 3,6; 54; 63 раза, а также значений в группе сравнения (соответственно в 1,5; 1,3; 2,7; 1,2; 1,7; 1,4 и 1,3 раза). Уровни кортизола в группах с ВП при различной этиологии заболевания не отличались, но были выше аналогичного параметра группы контроля в 3,6 раза.

Похожая тенденция изменений вышеуказанных показателей зарегистрирована при стратификации пациентов в зависимости от тяжести пневмонии как на фоне COVID-19, так и при ОРВИ иной этиологии (таблица 2).

Таблица 2

Содержание некоторых цитокинов, DEFB1, MMP-12, кортизола, маркеров воспаления (СРБ, ПКТ) в сыворотке крови у пациентов призывного возраста с тяжелой ВП различной этиологии, Me [P25–P75]

Показатель	Группы	
	Тяжелая ВП при ОРВИ, n=40	Тяжелая ВП при COVID-19, n=40
IL-1 β , пг/мл	5,67 [2,98; 7,78]	7,30 [4,27; 11,3] p < 0,001
TNF- α , пг/мл	6,21 [2,83; 8,98]	9,08 [4,33; 10,9] p < 0,001
IL-10, пг/мл	5,79 [2,41; 8,0]	11,46 [8,53; 14,82] p < 0,001
DEFB1, нг/мл	2,79 [2,25; 3,95]	4,01 [2,82; 5,48] p < 0,001
MMP-12, нг/мл	0,41 [0,14; 0,54]	0,75 [0,52; 0,94]

		p < 0,001
Кортизол, нмоль/л	853 [689; 1100]	880 [692; 1186] p = 0,441
ПКТ, нг/мл	0,53 [0,35; 0,69]	0,71 [0,51; 0,98] p < 0,001
СРБ, мг/мл	10,58 [8,30; 12,87]	13,84 [10,5; 18,9] p < 0,001

Примечание: p – статистическая значимость различий между группами пациентов с тяжелой ВП при ОРВИ и тяжелой ВП при COVID-19.

2. Полиморфизм генов иммунорегуляторных молекул при внебольничной пневмонии у лиц призывного возраста

Анализ полиморфного маркера *T511C* гена *IL1β* не выявил статистически значимых различий как по аллелям, так и по частотам распределения генотипов не только у пациентов с ВП разной этиологии, но и при COVID-19 в зависимости от тяжести течения инфекции. Напротив, в группе пациентов с ОРВИ в случае тяжелого течения ВП выявлено преобладание аллели *C* (OR 2,35 [1,35–4,06], p = 0,001) и генотипа *C/C* полиморфного маркера *T511C* гена *IL1β* (OR 2,91 [1,32–6,39], p = 0,01).

Зафиксировано преобладание минорной аллели *A* и *A/A* генотипа *IL-10* (*G1082A*) у больных с тяжелым течением ВП на фоне ОРВИ (OR 1,51 [0,85–2,67], p = 0,03, OR 1,87 [0,87–3,99], p = 0,002, соответственно). Подобное распределение обнаружено при тяжелой COVID-19–пневмонии с преобладанием *A*-аллели (OR 1,6 [0,9–2,86], p=0,001) и генотипа *A/A* (OR 1,87 [0,88–3,99], p = 0,001) *G1082A* гена *IL-10*. При сравнении распределения частоты носительства аллелей и генотипов данного полиморфизма при тяжелых формах ВП разной этиологии различий не выявлено.

При сравнении частоты носительства аллелей и генотипов гена *DEFB1* (*G20A*) в зависимости от этиологии тяжелой ВП отмечено наличие статистически значимых различий как по аллели *A* (OR 2,63 [1,21–4,36], p = 0,01), так и по *A/A* генотипу (OR 4,0 [1,48–10,8], p = 0,004) у больных при COVID-19. Подобных закономерностей при ВП в группе сравнения не обнаружено даже при тяжелом ее течении: частота носительства аллелей и генотипов гена *DEFB1* (*G20A*) не отличалась от здоровых резидентов. Похожие результаты по частотам распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *G52A* гена *DEFB1*: в группе с ВП на фоне COVID-19, в том числе исходя из тяжести течения, отмечено статистически значимое преобладание аллели *A* и *A/A* генотипа гена *DEFB1* (*G52A*).

При сравнении частоты носительства аллелей и генотипов SNP гена *MMP12* (*A82G*) отмечено статистически значимое различие как по аллели *A* (OR 3,0 [1,23–7,3], p = 0,01), так и по *A/A* генотипу (OR 2,67 [0,98–7,57], p = 0,02) у больных с тяжелым течением ВП при COVID-19.

Анализ полиморфного маркера *G308A* гена *TNFα* не выявил различий по аллелям и по частотам распределения генотипов при ВП.

3. Влияние генотипов исследуемых полиморфизмов генов иммунорегуляторных молекул на продукцию кодируемых белков

На следующем этапе определено влияние генотипов исследуемых полиморфизмов генов на продукцию кодируемых белков.

У носителей генотипов *C/C* полиморфного маркера *T511C* гена *IL1β* зарегистрирован более высокий уровень IL-1β в сыворотке крови в исследуемых группах относительно носителей генотипов *T/T*, *T/C* (таблица 3).

Таблица 3

Содержание IL-1β в сыворотке крови при ВП у носителей полиморфизма гена *IL1β (T511C)*, пг/мл (Ме [P25–P75])

Генотип	Контроль	COVID-19	ОРИ
T/T	0,24 [0,08; 0,76] (n=32)	4,41 [3,78; 6,05] (n=26)	3,02 [2,71; 3,45] (n=28)
T/C	0,58 [0,41; 0,76] (n=32) p=0,135	5,37 [4,69; 7,13] (n=38) p=0,084	3,32 [3,18; 4,44] (n=22) p = 0,035
C/C	1,71 [1,31; 2,68] (n=22) p < 0,001 p₁ < 0,001	10,43 [8,38; 11,11] (n=16) p < 0,001 p₁ < 0,001	6,37 [4,50; 7,06] (n=30) p < 0,001 p₁ < 0,001

Примечание: p – статистическая значимость различий с генотипом T/T; p₁ – статистическая значимость различий с генотипом T/C.

Носительство генотипов SNP гена *TNFα (G308A)* при ВП не оказывало статистически значимого влияния на продукцию кодируемого цитокина TNFα.

Носительство гетерозиготного генотипа *A/A* гена *IL-10 (G1082A)*, независимо от этиологии ВП, сопровождалось низкой продукцией IL10 относительно других генотипов (таблица 4).

Таблица 4

Содержание IL-10 в сыворотке крови при ВП у носителей полиморфизма гена *IL10 (G1082A)*, пг/мл (Ме [P25–P75])

Генотип	Контроль	COVID-19	ОРИ
G/G	1,33 [1,01; 2,01] (n=13)	13,15 [12,88; 13,59] (n=12)	7,68 [7,35; 7,96] (n=8)
G/A	0,33 [0,21; 0,48] (n=39) p = 0,001	9,41 [7,55; 10,82] (n=42) p < 0,001	3,29 [3,08; 5,32] (n=42) p < 0,001
A/A	0,01 [0,01; 0,03] (n=34) p < 0,001 p₁ < 0,001	6,0 [4,59; 7,3] (n=26) p < 0,001 p₁ < 0,001	2,23 [1,94; 2,78] (n=30) p < 0,001 p₁ < 0,001

Примечание: p – статистическая значимость различий с генотипом G/G; p₁ – статистическая значимость различий с генотипом G/A.

Более высокий уровень дефензина $\beta 1$ в сыворотке крови наблюдалось при ВП в случае носительства гетерозиготных вариантов *A/A* полиморфизма гена *DEFB1* (*G20A*), *A/A* гена *DEFB1* (*G52A*) (таблица 5).

Таблица 5

Содержание дефензина $\beta 1$ в сыворотке крови при ВП у носителей полиморфных маркеров гена *G20A* и *G52A* гена *DEFB1*, пг/мл (Ме [P25–P75])

Генотип	Контроль	COVID-19	ОРИ
<i>DEFB1 (G20A)</i>			
G/G	1,86 [1,43; 2,45] (n=37)	2,73 [2,31; 3,84] (n=36)	2,31 [2,13; 2,9] (n=38)
G/A	2,12 [1,62; 2,47] (n=30) p = 0,465	2,41 [2,16; 2,52] (n=16) p = 0,042	2,46 [2,34; 2,65] (n=24) p = 0,443
A/A	1,67 [1,12; 2,45] (n=19) p = 0,417 p ₁ = 0,139	3,96 [2,71; 4,91] (n=28) p = 0,001 p₁ < 0,001	3,32 [2,86; 3,41] (n=18) p = 0,002 p₁ < 0,001
<i>DEFB1(G52A)</i>			
G/G	1,63 [1,23; 2,13] (n=48)	2,62 [2,24; 3,81] (n=38)	2,37 [2,09; 2,92] (n=42)
G/A	1,86 [1,57; 2,13] (n=22) p = 0,136	2,52 [2,42; 4,9] (n=12) p = 0,356	2,35 [2,3; 2,75] (n=16) p = 0,638
A/A	2,61 [2,48; 2,66] (n=16) p < 0,001 p₁ < 0,001	3,84 [2,83; 4,71] (n=30) p < 0,001 p₁ < 0,001	2,93 [2,48; 3,21] (n=22) p = 0,01 p₁ = 0,003

Примечание: p – статистическая значимость различий с гомозиготным генотипом; p₁ – статистическая значимость различий с гетерозиготным генотипом.

Влияние полиморфного маркера *A82G* гена *MMP12* на продукцию фермента MMP-12 у пациентов с ВП на фоне COVID-19 и в группах сравнения показано в таблице 6.

Таблица 6

Содержание MMP-12 в сыворотке крови при ВП у носителей SNP гена *MMP12* (*A82G*), пг/мл (Ме [P25–P75])

Генотип	Контроль	COVID-19	ОРИ
A/A	0,19 [0,14; 0,29] (n=54)	0,72 [0,62; 0,81] (n=50)	0,35 [0,28; 0,4] (n=58)
A/G	0,15 [0,13; 0,21] (n=12)	0,42 [0,36; 0,52] (n=24) p < 0,001	0,38 [0,27; 0,46] (n=14) p = 0,716
G/G	0,13 [0,1; 0,16] (n=20) p = 0,02 p ₁ = 0,168	0,27 [0,23; 0,29] (n=6) p < 0,001 p₁ < 0,001	0,2 [0,16; 0,27] (n=8) p < 0,001 p₁ = 0,007

Примечание: p – статистическая значимость различий с генотипом A/A; p_1 – статистическая значимость различий с генотипом A/G.

У носителей генотипа G/G полиморфного варианта A82G MMP12 отмечен низкий уровень фермента MMP-12 при ВП, что может свидетельствовать о влиянии G/G генотипа и аллели G на снижение экспрессии MMP-12.

4. Оценка взаимосвязей исследуемых генетических факторов, параметров иммунитета у пациентов призывного возраста при внебольничных пневмониях

При анализе взаимосвязи исследуемых полиморфизмов генов у пациентов с тяжелым течением внебольничных пневмоний сильные связи выявлены для SNP: IL10 (G1082A), DEFB1(G20A), DEFB1 (G52A) (таблица 7).

Таблица 7

Сила взаимосвязи исследуемых полиморфизмов генов у пациентов с тяжелым течением ВП

Показатели	V-Крамера	p	Сила взаимосвязи
IL1 β (T511C)	0,26	0,035	средняя
TNF α (G308A)	0,12	0,26	слабая
IL10 (G1082A)	0,67	0,001	сильная
DEFB1(G20A)	0,62	0,001	сильная
DEFB1 (G52A)	0,68	<0,001	сильная
MMP12 (A82G)	0,40	0,002	относительно сильная

Примечание: интерпретация значений V-Крамера (сила взаимосвязи): менее 0,1 – несущественная; 0,1–0,2 – слабая; 0,2–0,4 – средняя; 0,4–0,6 – относительно сильная; 0,6–0,8 – сильная; 0,8–1,0 – очень сильная.

Анализ корреляционных взаимосвязей обнаружил статистически значимые связи разной силы между исследуемыми параметрами (таблица 8).

Таблица 8

Корреляционные взаимосвязи некоторых показателей системы иммунитета и гормонов стресса у пациентов призывного возраста с ВП при COVID-19

Показатели	IL-1 β	IL-10	TNF α	MMP12	DEFB1	Кортизол	ПКТ	СРБ
IL-1 β	1	0,838	0,8	0,402	0,523	0,539	0,765	0,966
IL-10		1	0,849	0,572	0,756	0,738	0,878	0,901
TNF α			1	0,378	0,522	0,553	0,755	0,860
MMP12				1	0,665	0,601	0,647	0,494
DEFB1					1	0,766	0,746	0,612
Кортизол						1	0,796	0,622
ПКТ							1	0,843
СРБ								1

Примечание: 0,3–0,5 – умеренная связь; 0,5–0,7 – заметная связь; 0,7–0,9 – высокая связь; 0,9–1 – весьма высокая связь.

Высокая связь отмечена между исследуемыми цитокинами, ПКТ, кортизолом, СРБ, DEFB1. Показана значимая связь заметной силы между MMP12

и ПКТ у пациентов при COVID-19, в тоже время подобные взаимосвязи были менее значимыми в группе сравнения. Значимые связи высокой и очень высокой силы обнаружены между кортизолом и такими участниками воспаления как ПКТ, IL-1 β , IL-10, DEF β 1 при ВП на фоне COVID-19. Данный факт свидетельствует о важном значении стресса в развитии ВП у лиц призывного возраста и подтверждает взаимодействие различных систем организма в компенсаторно-приспособительных реакциях в ответ на воспаление.

5. Математическая модель прогноза развития тяжелой пневмонии у пациентов призывного возраста

На этапе математического анализа определено, что наиболее информативными факторами тяжелого течения пневмонии при COVID-19 являются полиморфизм гена *IL10 (G1082A)* и гена *MMP12 (A82G)*, поэтому в уравнение на основании бинарной логистической регрессии нами включены данные показатели и определена их значимость в структуре модели (таблица 9).

Таблица 9

Значимость показателей бинарной логистической регрессии в структуре модели прогноза развития тяжелой ВП при COVID-19 у пациентов призывного возраста

Показатель	B	Exp (B)	p
Константа	-0,782	0,457	0,644
<i>IL10 (G1082A)</i>	1,184	3,268	0,045
<i>MMP12 (A82G)</i>	-1,247	0,287	0,045

Примечание: B – значение нестандартизованных коэффициентов регрессии, Exp (B) – критерий значимости коэффициента B, p – уровень статистической значимости.

Уравнение логистической регрессии имеет следующий вид:

$$K = \frac{1}{1 + \exp(0,782 - 1,184 \times IL10 + 1,247 \times MMP12)}$$

где K – вероятность развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста; 0,782 – константа (регрессионный коэффициент b_0); 1,184 и 1,247 – нестандартизованные коэффициенты b; IL10 – полиморфизм гена *IL10 (G1082A)*, MMP12 – полиморфизм гена *MMP12 (A82G)*, принимающие значение «0» при наличии нормальной гомозиготы, «1» – при наличии гетерозиготы и значение «2» – при наличии мутантной гомозиготы; e – основание натурального логарифма ($e \sim 2,72$).

При значении $K > 0,43$ имеется высокая вероятность развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста.

Чувствительность разработанной прогностической модели составляет 0,8, специфичность – 0,73, точность – 0,75; площадь под ROC-кривой составляет 0,79 (95% ДИ = 0,64-0,93); $p = 0,002$ (рисунок 2).

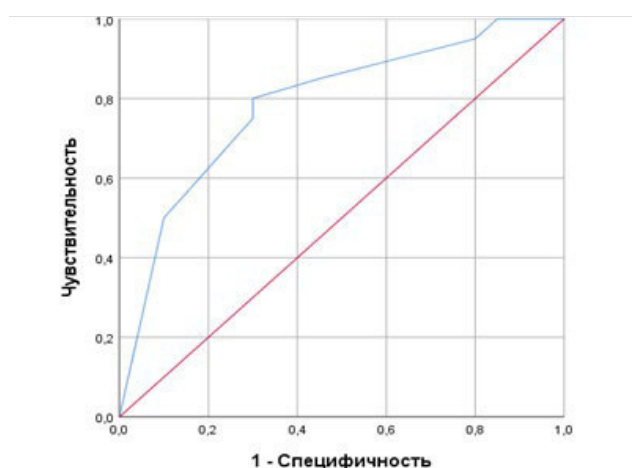


Рисунок 2. ROC-анализ информативности разработанной модели, позволяющей определить вероятность развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста по значению коэффициента К

Для увеличения информативности прогнозирования тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста использовался многослойный персептрон. Число входных нейронов составило 15 единиц, в качестве входных нейронов выступали SNP генов, имевшие статистически значимые различия при сравнении групп исследования. Архитектура разработанной нейронной сети представлена на рисунке 3.

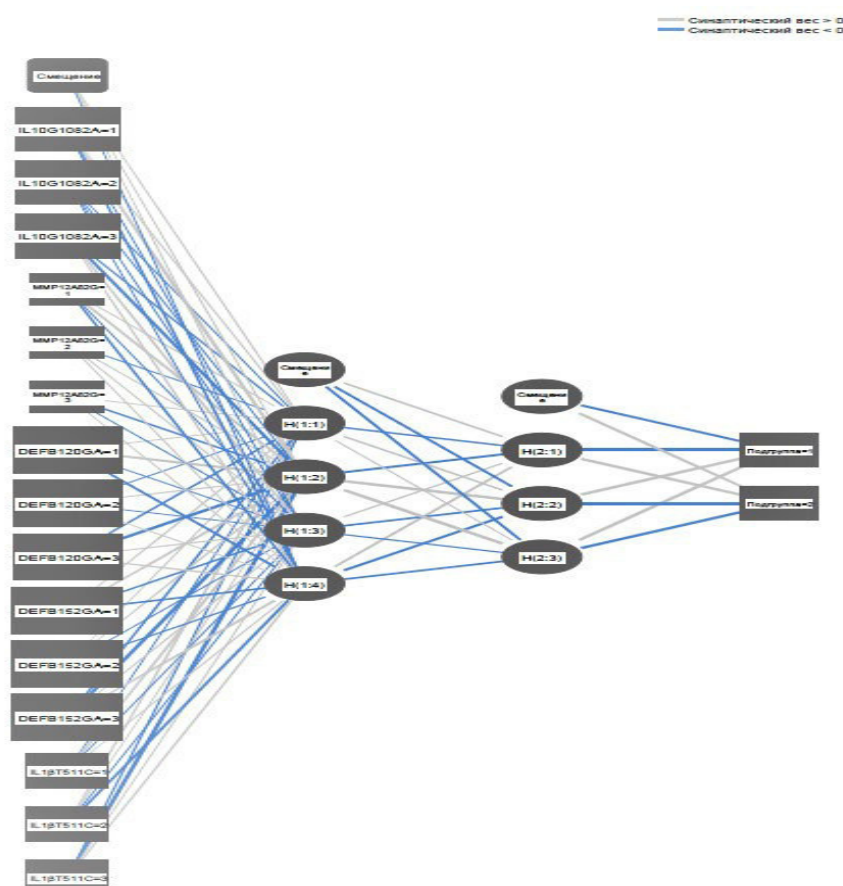


Рисунок 3. Структура многослойного персептрона, позволяющего прогнозировать развитие тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста

При определении важности независимых переменных в структуре нейронной сети отмечена следующая градация: SNP генов *DEFB1* (*G52A*), *IL10* (*G1082A*), *DEFB1* (*G20A*), *MMP12* (*A82G*), *IL1 β* (*T511C*) (рисунок 4).

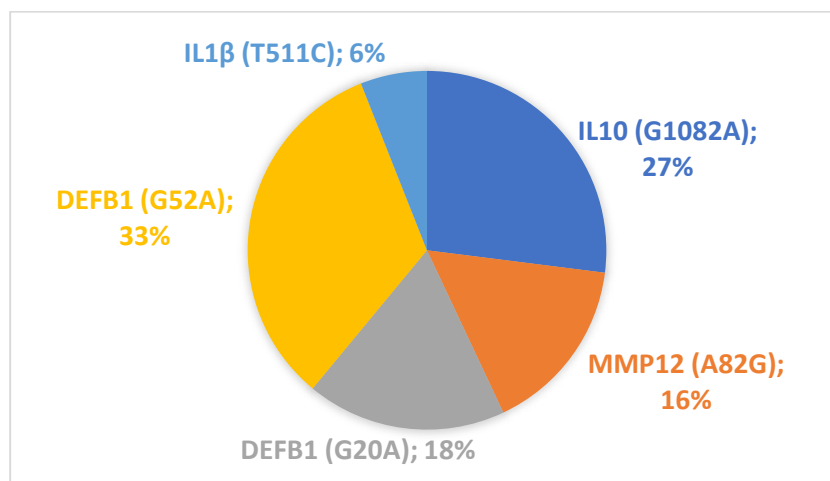


Рисунок 4. Важность независимых переменных в структуре нейронной сети

Полученная нейронная сеть обладает достаточной информативностью в оценке риска развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста: чувствительность прогностической модели составляет 95%, специфичность – 90%, процент неверных предсказаний – 10% ($AUC = 0,939$; $S_p = 0,95$; $S_e = 0,90$; $p < 0,001$) (рисунок 5).

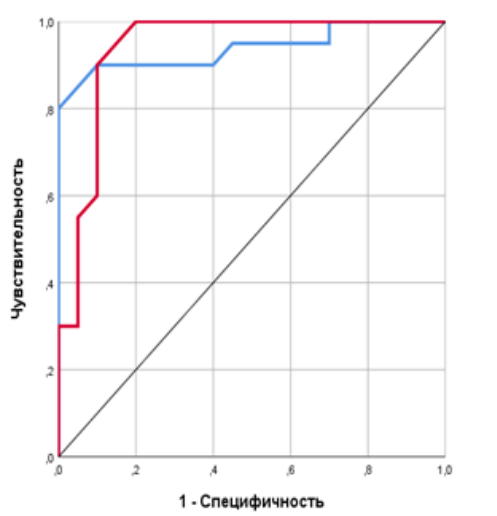


Рисунок 5. ROC-анализ информативности нейронной сети, позволяющей оценить вероятность развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста

Таким образом, нами подтверждается прогностическая ценность полиморфизма генов: *DEFB1* (G52A), *IL10* (G1082A), *DEFB1* (G20A), *MMP12* (A82G) и *IL1β* (T511C) в прогнозировании развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста.

Учитывая полученные результаты, нами предлагается модифицированная схема патогенеза тяжелой пневмонии у лиц призывного возраста (рисунок 6).

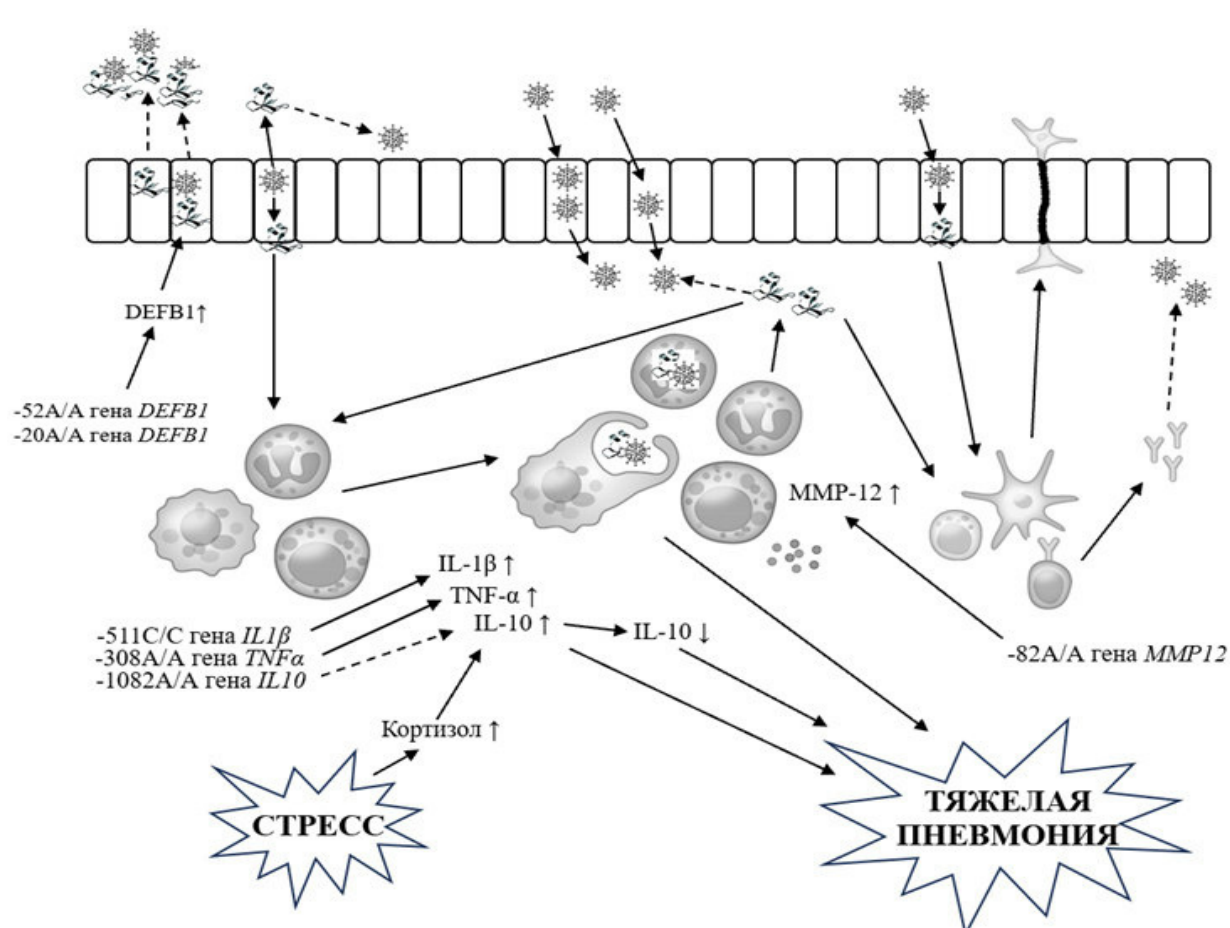


Рисунок 6. Модифицированная схема некоторых патогенетических механизмов развития тяжелой пневмонии при COVID-19-инфекции

Примечание: \longrightarrow - иницирование; \dashrightarrow - ингибирование.

Данное научное исследование соответствует концепции приоритетного направления стратегии науки и здравоохранения РФ, а полученные результаты могут быть использованы в ближайшей перспективе в практической работе врачей инфекционистов и пульмонологов с целью выявления индивидуальных рисков тяжелого течения пневмонии с учетом развития персонализированной медицины (Указ Президента РФ № 529 от 18.06.2024 г.).

ВЫВОДЫ

1. У пациентов призывного возраста при внебольничных пневмониях, независимо от этиологии, регистрируются в сыворотке крови более высокие концентрации IL-1β, TNF-α, IL-10, DEFB1, MMP-12, прокальцитонина, С-реактивного белка с наибольшими значениями в случаях тяжелого течения патологического

процесса при COVID-19. Уровень кортизола не отличается при тяжелой пневмонии, независимо от этиологии заболевания, превышая аналогичные параметры у пациентов как группы контроля, так и групп с нетяжелым течением заболевания.

2. При тяжелой пневмонии, не связанной с COVID-19, по сравнению с нетяжелым течением заболевания, у больных чаще выявляются: аллель *C* и генотип *C/C* полиморфизма *G1082A* гена *IL1 β* (в 1,7 и 2 раза соответственно); аллель *A* и генотип *A/A* полиморфизма *G1082A* гена *IL10* (в 1,3 и 2,7 раза соответственно). У больных тяжелой пневмонией при COVID-19, относительно нетяжелых форм заболевания, чаще обнаруживаются: аллель *A* и генотип *A/A* полиморфизма *G1082A* гена *IL10* (в 1,6 и 5,5 раза соответственно); аллель *A* и генотип *A/A* полиморфизма *G20A* гена *DEFB1* (в 1,4 и 2,5 раза соответственно); аллель *A* и генотип *A/A* полиморфизма *G52A* гена *DEFB1* (в 2,6 и 4 раза соответственно); аллель *A* и генотип *A/A* полиморфизма *A82G* гена *MMP12* (в 1,4 и 1,8 раза соответственно). Независимо от тяжести течения пневмонии у больных при COVID-19, аллель *A* и генотип *A/A* полиморфизма *G52A* гена *DEFB1* выявляются в 1,2 и 1,4 раза чаще, чем у пациентов при респираторных инфекциях другой этиологии.
3. При пневмонии у лиц призывного возраста носительство генотипа *A/A* гена *IL10* (*G1082A*) и генотипа *A/A* гена *MMP12* (*A82G*) сопровождается более низким содержанием в сыворотке крови IL-10 и MMP-12, соответственно. У обладателей генотипа *C/C* гена *IL1 β* (*T511C*), гомозиготных вариантов *A/A* полиморфных маркеров *G52A* и *G20A* гена *DEFB1* в случае развития пневмонии обнаруживаются более высокие уровни в сыворотке крови IL-1 β и DEFB1 по сравнению с носителями других генотипов.
4. Носительство аллели *A* и генотипа *A/A* промотора гена *IL10* (*G1082A*), аллели *A* и генотипа *A/A* гена *MMP12* (*A82G*) ассоциировано с тяжелым течением внебольничных пневмоний у пациентов призывного возраста, независимо от этиологии. Наличие *A* аллели и гомозиготных вариантов *A/A* полиморфных маркеров *G52A* и *G20A* гена *DEFB1* ассоциировано с тяжелым течением внебольничных пневмоний на фоне COVID-19; аллель *C* и *C/C* генотип SNP *IL1 β* (*T511C*) – с тяжелой пневмонией, не связанной с COVID-19. Носители генотипа *G/A* гена промотора *IL10* (*G1082A*) и гомозиготного варианта *G/G* полиморфного маркера *A82G* гена *MMP12* имеют более низкий риск развития тяжелой пневмонии.
5. У лиц призывного возраста с риском развития тяжелой пневмонии при COVID-19 ассоциировано носительство генотипов *-511C/C* гена *IL-1 β* , *-1082A/A* гена *IL-10*, *-20A/A* гена *DEFB1*, *-52A/A* гена *DEFB1* и *-82A/A* гена *MMP12*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, определенных ВАК Минобрнауки России:

1. Мироманова Н.А. Иммунологические и молекулярно-генетические аспекты COVID-19 / Н.А. Мироманова, Б.Т. Загалаев, А.М. Мироманов. – DOI 10.52485/19986173_2022_1_62 // Забайкальский медицинский вестник :

электронное научное издание. – 2022. – № 1. – С. 62-70. – URL: <https://zabmedvestnik.elpub.ru/jour/article/view/126/122> (дата обращения: 12.08.2024).

2. Загалаев Б.Т. Роль SNP гена металлопротеиназы-12-82 A>G в патогенезе внебольничных пневмоний у пациентов призывного возраста / Б.Т. Загалаев, Н.А. Мироманова, А.М. Мироманов. – DOI 10.52485/19986173_2024_1_31 // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2024. – № 1. – С. 31-40. – URL: <https://zabmedvestnik.elpub.ru/jour/article/view/6/6> (дата обращения: 12.08.2024).
3. Загалаев Б.Т. Полиморфизм гена интерлейкина-10-1082G>A и экспрессия интерлейкина-10 у пациентов призывного возраста с внебольничными пневмониями / Б.Т. Загалаев, Н.А. Мироманова, А.М. Мироманов. – DOI 10.17513/spno.33301 // Современные проблемы науки и образования : сетевое издание. – 2024. – № 2. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=33301> (дата обращения: 09.08.2024).

Статьи, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных базах данных (Scopus):

4. Загалаев Б.Т. Влияние полиморфизма генов DEFB1-20G>A и DEFB1-52G>A на уровень дефензина бета 1 (DEFB1) у пациентов призывного возраста с внебольничными пневмониями / Б.Т. Загалаев, Н.А. Мироманова, А.М. Мироманов. – DOI 10.15789/1563-0625-IOP-2961 // Медицинская иммунология. – URL: <https://www.mimmun.ru/mimmun/article/view/2961> (дата обращения: 12.09.2024).

Программа для ЭВМ:

5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022684584 Российская Федерация. Программа для оценки вероятности развития тяжелой пневмонии при COVID-19 у пациентов призывного возраста / Мироманова Н.А., Загалаев Б.Т., Мироманов А.М., Мудров В.А. ; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2022684162 ; дата поступления 06.12.2022 ; дата государственной регистрации в реестре программ для ЭВМ 15.12.2022. – 1 с.

Публикации в прочих изданиях:

6. Загалаев Б.Т. Молекулярно-генетические аспекты развития внебольничных пневмоний у пациентов призывного возраста / Б.Т. Загалаев, Н.А. Мироманова // Клиническая патофизиология. – 2024. – Т. 30, № 2 (прил.). – С. 45-46. (Материалы первого Евразийский конгресс по патофизиологии : материалы научно-практической конференции).
7. Загалаев Б.Т. Полиморфизм генов DEFB1-20G>A и DEFB1-52G>A в патогенезе внебольничных пневмоний у пациентов призывного возраста / Б.Т. Загалаев ; научный руководитель Н.А. Мироманова // Наука. Инновации. Будущее – 2024 : сборник статей Международной научно-практической конференции, состоявшейся 13 мая 2024 г. в г. Петрозаводске / под общей редакцией И.И.

Ивановской, М.В. Посновой. – Петрозаводск : Новая наука, 2024. – С. 272-278. – ISBN 978-5-00215-390-9.

8. Zagalaev B.T. Influence of metalloproteinase-12-82A>G gene polymorphism on metalloproteinase-12 content in contraction-age patients with community-acquired pneumonia due to COVID-19 infection / B.T. Zagalaev, N.A. Miromanova, A.M. Miromanov // Академическая наука – проблемы и достижения : материалы XXXV международной научно-практической конференции, 15-16 июля 2024 г., Bengaluru, India. – Bengaluru : Pothi.com, 2024. – С. 45-49. – ISBN 978-1-4452-4780-9.

Список сокращений

ВП	- внебольничная пневмония
ДИ	- доверительный интервал
ИФА	- иммуноферментный анализ
КТ	- компьютерная томография
ОР	- относительный риск
ОРИ	- острая респираторная инфекция
ПКТ	- прокальцитонин
СРБ	- С-реактивный белок
IL	- интерлейкин
MMP	- матриксные металлопротеиназы
OR	- отношение шансов
SNP	- однонуклеотидный полиморфизм
TNF	- фактор некроза опухолей