**УДК: 616.23/.24. – 007.17 – 092. – 07 – 053.31:575.174.015.3**

**Сенаторова Г.С., Логвінова О.Л., Омельченко О.В., Онікієнко О.Л.**

**Роль поліморфізму гену матриксної металопротеїнази-1 (1607insG) в формуванні бронхолегеневої дисплазії у новонароджених**

**Харківський національний медичний університет**

**Резюме:** На формування БЛД середовищні ( 0,54 ) та спадкові (0,46) фактори впливають рівноцінно, що обумовлює необхідність вивчення поліморфізму генів та їх регуляторної функції для можливості прогнозування цього хронічного захворювання протягом вагітності та в новонароджених. Поліморфізм гену ММП-1 (1607insG) впливає на схильність індивідуума до бронхолегеневої дисплазії (KW=H(n=58)=18,85; р = 0,0001). Для дітей з бронхолегеневою дисплазією характерне переважання домінантних гомозигот (*АА*) та гетерозигот (Аа) по інсерції гуаніну в 1607 положенні (р<0,001), що ймовірно, було підґрунтям до підвищеної експресії ММП-1, притаманної дітям з БЛД.

Визначена висока ймовірність неменделевського, полігенного наслідування схильності до бронхолегеневої дисплазії, що підтверджується помірним порушенням рівняння Харді-Вайнберга.

**Ключові слова:** діти, бронхолегенева дисплазія, спадкові фактори поліморфізм гену ММП-1

Питання високого рівня клінічної варіативності щодо бронхолегеневої дисплазії (БЛД) серед індивідуумів в популяції, які мають однаковий гестаційний вік і помірний ятрогенний вплив під час реанімації досі не вирішене [8]. Це ініціює дослідження ролі генетичних факторів та впливу поліморфізму тригерних генів в етіології даного захворювання [1,2,3,4,5]. В фізіологічному сенсі на етапі розвитку та при сформованій БЛД особливість ремоделювання легень і судин є атрибутом клітинних та позаклітинних регуляторних процесів, які забезпечуються молекулярними індукторами, регуляторами та сигнальними системами, що детермінують процеси кардіо-респіраторного ремоделювання. Клітинна та/або внутрішньоклітинна експресія цитокінів-індукторів, а також рівень презентації специфічних рецепторів визначається тонкими генетичними механізмами [2,3,5]. Вивчення цих механізмів важливе для запобігання гальмування росту та фіброзування легеневої тканини [7].

Розвиток бронхолегеневої дисплазії залежить від поєднаного впливу декількох факторів, які обумовлюють пневмофіброз та гальмування онтогенезу легень. В якості тригерного гену пригнічення онтогенезу легень та пневмофіброзу нами обраний ген матриксної металопротеїнази-1 [1,4,6]. Патогенетичну роль ММП-1 в розвитку БЛД доведено в попередніх дослідженнях [9]. ММП-1 сьогодні розглядається як особлива форма біологічного контролю при бронхолегеневїй дисплазії, займає центральне місце в реалізації різноманітних біохімічних процесів та швидкої фізіологічної відповіді на умови, що змінюються.

Мета: удосконалення діагностики формування бронхолегеневої дисплазії шляхом визначення ролі генетичних та середовищних факторів у формуванні бронхолегеневої дисплазії у новонароджених.

Матеріали та методи: дослідження проводилося на кафедрі педіатрії №1 та неонатології Харківського національного медичного університету (зав. кафедри - Г.С.Сенаторова) у Обласному центрі діагностики та лікування бронхолегеневої дисплазії у дітей Харківської обласної дитячої лікарні (головний лікар - Г.Р.Муратов). Під спостереженням знаходились 60 близнюків/ 30 пар (24,1±2,7%): 54 пацієнти (90,0±3,9%) з діагнозом бронхолегенева дисплазія (основна група) та 6 спостережених (10,0±3,9%), що народилися недоношеними, мали респіраторні розлади, але в яких не сформувалася бронхолегенева дисплазія (група порівняння). Діагноз бронхолегенева дисплазія був встановлений згідно міжнародній класифікації хвороб 10 перегляду (шифр Р27.0). Всі 6 близнюків групи порівняння були із пар, де одна дитина хворіла на БЛД. Для оцінки відносної ролі спадкових та середовищних факторів використовували близнюковий метод. Визначали парну конкордатність, обчислювалась частка спадковості в формування БЛД за формулою Хольцингера, оцінювалась роль середовищних факторів.

Поліморфізм гену матриксної металопротеїнази-1 визначався полімеразною ланцюговою реакцією діагностичними наборами «SNP-експрес» виробництва НПФ «Літех», методом алельної дискримінації. За допомогою реагенту «ДНК-ЕКСПРЕС» відділялась ДНК із букального епітелію. Розраховувались частоти алелей та частоти алельних сполучень та їх співвідношення рівновазі Харді – Вайнберга по критерію χ2.

Детекція поліморфізму проводилась методом горизонтального електрофорезу [12]. Статистична обробка даних здійснювалась за допомогою програми «Statistica-6».

**Результати та їх обговорення:** Розподіл обстежених за статтю та зигностінтю представлено в таблиці 1. Виявлена різниця в групах тільки серед монозиготних близнюків жіночої статі (р<0,05), що з нашої точки зору потребує подальших досліджень.

Таблиця 1.

Розподіл близнюків за статтю, зиготністю

(основна група та група порівняння)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Основна група n=54 | Група порівнянняn=6  | р о.г.-г.п. |
| абс. | M±m% | абс. | M±m% |
| Монозиготні близнюки:* діти чоловічої статі
* діти жіночої статі
 | 1012 | 18,5±5,3%22,2±5,7% | 10 | 16,6±16,6%- | 0,8230,039*1* |
| Загалом: | 22 | 30,1±6,7% | 1 | 16,6±16,6% | 0,317 |
| Дизиготні близнюки: * діти чоловічої статі
* діти жіночої статі
 | 1814 | 33,3±6,4%25,9±6,0% | 14 | 16,6±16,6%66,6±21,1% | 0,9130,213 |
| Загалом: | 32 | 59,1±6,4% | 5 | 83,2±25,7% | 0,754 |

Примітка: різниці достовірні (Х *1*– р<0,05).

Вагомий відсоток близнюків в генеральній сукупності (24,1+2,7%) дозволив використати близнюковий метод для оцінки спадковості за бронхолегеневою дисплазією, який включає вивчення закономірностей можливого наслідування БЛД в парах моно- та дизиготних близнюків. Метод оснований на високій частоті конкордатності за ознаками в монозиготний парах. Зіставлення парної конкордатності за даною ознакою у генетично ідентичних монозиготних та дизиготних близнюків дає можливість об’єктивно судити про роль генотипу в формуванні бронхолегеневої дисплазії.

Парна конкордатність за БЛД складала 0,8, що свідчить про вагомість спадкового впливу на розвиток захворювання (формула 1).

**С = с / (с+d) = 24 / (24+6) = 0,8 (1)**

Де, **С**- парна конкордатність; **с** та **d –** кількість конкордантних та дискордантних пар.

24 пари (80±7,4%) були конкордантні по БЛД, 6 пар (20±7,4%) а – дискордантні. Конкордантних пар по формуванню бронхолегеневої дисплазії було достовірно більше (р<0,0001), що свідчило про можливий вплив спадкових факторів на формування захворювання.

Виявлено, що із 16 пар монозиготних близнюків 9 пар були конкордантні по БЛД у неонатальному періоді (парна конкордатність – 0,562). Із 10 пар дизиготних близнюків 7 пар – конкордантні по БЛД (парна конкордатність – 0,7).

Частка спадковості (0,46) за формулою Хольцингера знаходилась в інтервалі від 0,3 до 0,7, а частка впливу факторів середовища складала 0,54, що свідчило рівну роль спадкових і середовищних факторів в формуванні БЛД (формули 2; 3).

**Н = (СMz- СDz) / 1 – СDz = (0,625-0,7) / 1 – 0,7 = 0,46(2)**

Де, **Н** – частка впливу спадковості на розвиток бронхолегеневої дисплазії;

 **СMz, СDz –**парна конкордатність монозіготних та дизіготних пар.

 **Е = 1 – Н = 1 – 0,46 = 0,54 (3)**

Де, **Е** – частка впливу факторів середовища; **Н** – частка впливу спадковості на розвиток бронхолегеневої дисплазії.

В ході дослідження доведений рівноцінний вплив середовищних та генетичних факторів на формування БЛД, що диктує необхідність вивчення алельних варіантів поліморфізму генів щодо можливості прогнозування цього хронічного захворювання під час вагітності та у новонароджених.

60 близнюків були обстежені на наявність тригерного поліморфізму (інерції) гену матриксної метлопротеїнази-1. Поліморфізм гену ММП-1 (1607insG) впливав на схильність індивідуума до бронхолегеневої дисплазії (KW=H(n=58)=18,85; р = 0,0001).

Частоти зустрічі алельних варіантів поліморфізму 1607insG гену ММП-1 в групах наведено в таблиці 2.

Таблиця 2.

Частоти алелей та алельних сполучень поліморфізму гену (1607insG ) ММП-1 у близнюків з БЛД (основна група) та близнюків, які народжені недоношеними, мали дихальні розлади в ранньому неонатальному періоді, але не сформували БЛД (група порівняння)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Алелі та алельні сполучення | Основна група n=54 | Група порівнянняn=6  | χ2о.г-г.п. |
| абс. | Частота алелі та алельних сполучень | абс. | Частота алелі та алельних сполучень |
| Алелі:*алель А**алель а*  | 6444 | 0,5920,407 | 111 | 0,0830,916 | 0,297*2*0,120*2* |
| Загалом: | 108 | 1,000 | 12 | 1,000 |  |
| Алельні сполучення: *АА**Аа**аа* | 251415 | 0,4620,2590,277 | 015 | -0,1660,833 | 0,388*2*0,01610,1852 |
| Загалом: | 54 | 1,000 | 6 | 1,000 |  |

Примітка: різниці достовірні (Х *1*– р<0,01; Х *1*– р<0,001).

Із даних таблиці видно, що в обстежених основної групи більш розповсюджена алель *А* (59,2±4,7%; р<0,05), в той час як алель *а* складала 40,7±4,7%. Виявлені достовірні різниці в частотах алельних сполучень із переважанням домінантних гомозигот (*АА*) у близнюків основної групи (р<0,001). Рецесивні гомозиготи (*аа*) по 1607insG гену ММП-1 частіше спостерігались в групі порівняння (р<0,001).

Для оцінки відповідності даних щодо частоти зустрічі зигот в популяції дітей з бронхолегеневою дисплазією проведено зіставлення частот алельних варіантів, що спостерігалися й очікувалися за рівнянням Харді-Вайнберга (табл. 3).

Таблиця 3.

Частоти алельних сполучень поліморфізму гену (1607insG ) ММП-1 у близнюків з БЛД (основна група; n=54)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Алельні сполучення | Частота, що спостерігається  | Частота, що очікується | χ2спостерігається/очікується |
|  | абс. | частота |
| АА | 25 | 0,462 | 0,321 | 0,018*1* |
| Аа | 14 | 0,259 | 0,424 | 0,029*2* |
| аа | 15 | 0,277 | 0,255 | 0,007*1* |
|  | 54 | 1,000 | 1,000 |  |

Примітка: різниці не достовірні Х *1*– р>0,05; різниці достовірні Х *2*–  р<0,01.

В групі хворих на БЛД в основному частоти алелей відповідали рівнянню Харді-Вайнберга. Достовірних різниць між спостереженими і очікуваними частотами за домінантними (*АА*) і рецесивними гомозиготами (*аа*) виявлено не було (χ2 0,007-0,018; р>0,05). Проте визначені різниці в частотах гетерозиготної алелі *Аа*, які спостерігалися і очікувалися (χ2 0,029; р<0,01). Гетерозиготний варіант алелі *Аа* зустрічався в 2 рази рідше ніж очікувалось (0,259/0,424), що порушувало рівняння Харді-Вайнберга.

Помірне порушення рівняння Харді-Вайнберга за рахунок рідкості гетерозиготних алелей можуть бути обумовлено полігенним наслідуванням схильності до бронхолегеневої дисплазії, зниженням життєздатності гетерозиготних носіїв, наявністю коморбідної патології, з тригерним впливом гену ММП-1 та популяційними відмінностями, що потребує подальших досліджень.

Отже, в ході дослідження виявлено переважання домінантних гомозігот (*АА*) та гетерозигот (Аа) по інсерції гуаніну у 1607 положенні у дітей з БЛД (р<0,001) та доведений вплив поліморфізму гену ММП-1 (1607insG) на формування бронхолегеневої дисплазії (KW=H(n=58)=18,85; р = 0,0001). Дані особливості ймовірно являлись підґрунтям до інтрацлюлярної, інтерстиціальної активації пневмофіброзу та підвищеної експресії ММП-1. Проте, нами визначена висока ймовірність неменделевського, полігенного наслідування схильності до бронхолегеневої дисплазії, що підтверджується помірним порушенням рівняння Харді-Вайнберга.

**Висновки:**

1. На формування БЛД середовищні (0,54 ) і спадкові (0,46) фактори оказують рівноцінний вплив що обумовлює необхідність вивчення поліморфізму генів та їх регуляторної функції щодо можливості прогнозування цього хронічного захворювання під час вагітності та у новонароджених.
2. Поліморфізм гену ММП-1 (1607insG) впливає на схильність індивідуума до бронхолегеневої дисплазії.
3. Для дітей з бронхолегеневою дисплазією характерне переважання домінантних гомозігот (*АА*) та гетерозигот (Аа) по інсерції гуаніну у 1607 положенні у дітей з БЛД (р<0,001), що ймовірно, являлись підґрунтям до підвищеної експресії ММП-1, притаманної дітям з БЛД.
4. Визначена висока ймовірність неменделевського, полігенного наслідування схильності до бронхолегеневої дисплазії, що підтверджується помірним порушенням рівняння Харді-Вайнберга.

Література:

1. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. / T. Van Haaften, R. Byrne, S. Bonnet, et al. // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2009. – № 180(11). – P. 1131-1142.
2. A genome-wide association study (GWAS) for bronchopulmonary dysplasia. / H. Wang, K. R. St Julien, D. K. Stevenson, et al. // Pediatrics. – 2013. – № 132. – P. 290.
3. Akogmalm A. Role of CXC chemokine receptor-2 in a murine of bronchopulmonary dysplasia. / A. Akogmalm // American Jornal of Respiratory Cell and Molecullar Biology. – 2012. – № 47(6). – P. 746-758.
4. Argandoña E.G. Harkaitz Bengoetxea Effects of Visual Experience on Vascular Endothelial Growth Factor Expression during the Postnatal Development of the Rat Visual Cortex / E.G. Argandoña, V. J. Lafuente // Cereb Cortex. – 2008. – № 18(7) – P. 1630–1639. Режим доступу до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals>
5. Association between bronchopulmonary dysplasia and MBL2 and IL1-RN polymorphisms. / B. C. Cakmak, S.Calkavur, F. Ozkinay, et al. // Pediatrics International. – 2012. – № 54. – P. 863-868.
6. Augello A. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. / A. Augello, C.De Bari // Hum. Gene Ther. – 2010. – № 21. – С.1226-1238.
7. Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells./ A. P. Popova, P. D. Bozyk, A.M. Goldsmith, et al.// Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol . – 2010. – № 298. – С.735-743.
8. Eber E. Рaediatric respiratory medicine. / Eber E., Midulla F. – Hermes, 2013. – 710c.
9. Frey U. Рaediatric ling function. / Frey U., Merkus P.J.F.M. – ERS Publication office, 2010. – 324c.
10. Черненко Л.М. Експресія протеїназ вазоконстрикторної дії в дітей із різними формами бронхолегеневої дисплазії / Г.С.Сенаторова, Л.М.Черненко, Л.М.Самохіна // Запорожский медицинский журнал. - №3 (72). – 2012. – С. 122-124.
11. Черненко Л.М. Рівень IL-1ß та ФНП-α в індукованій мокроті при бронхолегеневій дисплазії / Л.М.Черненко // Експериментальна та клінічна медицина. - №2 (55). – 2012. – С. 117-121.
12. Руководство по применению диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР – Москва, 2014. – 20c.