

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И АКТИВНОСТИ НЕТОЗА КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ПНЕВМОНИИ

DOI: 10.17691/stm2021.13.3.06

УДК 616.24–002+591.151.3

Поступила 9.10.2020 г.

© **М.А. Карнаушкина**, д.м.н., профессор кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. академика В.С. Моисеева¹;
А.С. Гурьев, PhD, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории²;
К.О. Миронов, д.м.н., руководитель научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов³;
Е.А. Дунаева, научный сотрудник научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов³;
В.И. Корчагин, к.б.н., научный сотрудник научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов³;
О.Ю. Бобкова, аспирант кафедры госпитальной терапии №2⁴;
И.С. Васильева, к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии №2⁴;
Д.В. Кассина, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории²;
М.М. Литвинова, к.м.н., доцент кафедры медицинской генетики⁴;
 врач-генетик Центра персонализированной медицины⁵

¹Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198;

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, ул. Щепкина, 61/2, кор. 1, Москва, 129110;

³Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Новогиреевская, 3а, Москва, 111123;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991;

⁵Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинава Департамента здравоохранения города Москвы, шоссе Энтузиастов, 86, Москва, 111123

Цель исследования — определение молекулярно-генетических прогностических критериев тяжести течения пневмонии на основании анализа ассоциации полиморфизма генов толл-подобных рецепторов и выраженности нетоза.

Материалы и методы. В исследование включено 38 пациентов с основным диагнозом «внебольничная пневмония, тяжелое течение». Всем пациентам проводили стандартные клинико-лабораторные исследования, компьютерную томографию органов грудной клетки, микробиологическое исследование крови и трахеобронхиального аспирата. Уровень нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в мазках крови определяли на 1–2-е и 5–7-е сутки госпитализации. Генотипирование полиморфных локусов rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*) выполняли методом пиросеквенирования.

Результаты. Уровень НВЛ в 1-е сутки госпитализации был статистически значимо ниже у гетерозиготных и гомозиготных носителей полиморфизма rs4986790 (*TLR4*) (генотипы AG и GG) по сравнению с пациентами, обладающими генотипом дикого типа (генотип AA) ($p < 0,05$). При сопоставлении количества НВЛ с генотипами по полиморфизмам rs5743708 (*TLR2*) и rs5743551 (*TLR1*) статистически значимых ассоциаций не выявлено ($p > 0,05$). Исследование уровня НВЛ в динамике продемонстрировало

Для контактов: Васильева Ирина Сергеевна, e-mail: emmans@rambler.ru

снижение нетозной активности нейтрофилов в течение первой недели госпитализации ($p < 0,05$). Наличие в генотипе пациента аллеля G по полиморфизму rs5743551 (*TLR1*) увеличивает риск неблагоприятного исхода заболевания ($p < 0,0001$) (ОШ=20,3; 95% CI (4,3–135,0)).

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что уровень НВЛ является маркером активности нейтрофилов, находящихся в тесной взаимосвязи с изучаемыми генетическими полиморфизмами, и влияет на прогноз исхода пневмонии.

Ключевые слова: полиморфизм генов; *TLR1*; *TLR2*; *TLR4*; нейтрофильные внеклеточные ловушки; пневмония.

Как цитировать: Karnaushkina M.A., Guryev A.S., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Korchagin V.I., Bobkova O.Yu., Vasilyeva I.S., Kassina D.V., Litvinova M.M. Associations of toll-like receptor gene polymorphisms with NETosis activity as prognostic criteria for the severity of pneumonia. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(3): 47–54, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.3.06>

English

Associations of Toll-like Receptor Gene Polymorphisms with NETosis Activity as Prognostic Criteria for the Severity of Pneumonia

M.A. Karnaushkina, MD, DSc, Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Cardiology and Functional Diagnostics named after Academician V.S. Moiseev¹;

A.S. Guryev, PhD, Senior Researcher, Research Laboratory²;

K.O. Mironov, MD, DSc, Head of the Research Group for the Development of New Methods for Identifying Genetic Polymorphisms³;

E.A. Dunaeva, Researcher, Research Group for the Development of New Methods for Identifying Genetic Polymorphisms³;

V.I. Korchagin, PhD, Researcher, Research Group for the Development of New Methods for Identifying Genetic Polymorphisms³;

O.Yu. Bobkova, PhD Student, Department of Hospital Therapy No.2⁴;

I.S. Vasilyeva, MD, PhD, Assistant, Department of Hospital Therapy No.2⁴;

D.V. Kassina, Researcher, Research Laboratory²;

M.M. Litvinova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Medical Genetics⁴; Geneticist, Center for Personalized Medicine⁵

¹Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198, Russia;

²Moscow Regional Research Clinical Institute named after M.F. Vladimirov, 61/2–1 Schepkina St., Moscow, 129110, Russia;

³Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 3a Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia;

⁵Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov, Moscow Healthcare Department, 86 Shosse Entuziastov, Moscow, 111123, Russia

The aim of the study was to determine the molecular genetic prognostic criteria for the severity of the course pneumonia based on the analysis of the association of genetic polymorphism in toll-like receptors with the severity of NETosis.

Materials and Methods. The study included 38 patients with the main diagnosis of community-acquired pneumonia with a severe course. All the patients underwent standard clinical laboratory examinations, computed tomography of the thoracic organs, microbiological examination of blood and tracheobronchial aspirate. The level of neutrophilic extracellular traps (NETs) in blood smears was determined on the 1st–2nd and 5th–7th days of hospitalization. Genotyping of rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*), and rs4986790 (*TLR4*) polymorphic loci was performed by pyrosequencing.

Results. The level of NETs on the 1st day of admission was statistically significantly lower in heterozygous and homozygous carriers of rs4986790 (*TLR4*) polymorphism (AG and GG genotypes) compared with patients with the wild-type genotype (AA genotype) ($p < 0.05$). When comparing the number of NETs with genotypes for rs5743708 (*TLR2*) and rs5743551 (*TLR1*) polymorphisms, no statistically significant correlation was found ($p > 0.05$). The study of the NET level in dynamics demonstrated a decrease in the NETosis activity of neutrophils during the first week of hospitalization ($p < 0.05$). The presence of the G allele in the patient's genotype for rs5743551 (*TLR1*) polymorphism increases the risk of a poor outcome of the disease ($p < 0.0001$) (OR=20.3; 95% CI (4.3–135.0)).

Conclusion. The obtained data suggest that level of NETs is a marker of the activity of neutrophils which are closely related to the studied genetic polymorphisms, and affects the prognosis of the pneumonia outcome.

Key words: gene polymorphism; *TLR1*; *TLR2*; *TLR4*; neutrophilic extracellular traps; pneumonia.

Введение

Пневмония — острое инфекционное заболевание, характеризующееся очаговым поражением респираторных отделов легких с внутриальвеолярной экссудацией. В настоящий момент пневмония является одной из основных причин смертности в мире, а в структуре смертности от болезней органов дыхания на нее приходится 41,5% [1, 2]. Выявление генетических факторов, ассоциированных с тяжелым и осложненным течением пневмоний, может способствовать открытию новых подходов к лечению данного заболевания и выявлению ранних предикторов его неблагоприятных исходов.

В 2004 г. была описана новая функция нейтрофилов — формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), ориентированных на внеклеточное подавление активности патогенов. НВЛ представляют собой нити ДНК с адсорбированными на них антимикробными факторами гранул нейтрофилов [3]. Этот механизм антимикробной защиты был назван термином «нетоз» (*англ.* NETosis) [4]. Нейтрофилы массово подвергаются нетозу при инфекционных, неинфекционных и аутоиммунных заболеваниях. При инфекционных заболеваниях значительная часть активных гранулоцитов мигрирует на поверхность слизистых оболочек, в том числе дыхательных путей, где они реализуют свои защитные функции [5–7]. При этом НВЛ и активированные нейтрофилы обнаруживаются не только в мукозальных секретах, но и в крови [7–9]. После взаимодействия с НВЛ основная часть микроорганизмов погибает под влиянием бактерицидных веществ, входящих в их состав. Также описан вариант нетоза, при котором после выброса НВЛ нейтрофил остается живым и продолжает выполнять свои функции [6].

Однако некоторые микроорганизмы могут выживать благодаря различным механизмам антибактериальной защиты, что приводит к прогрессированию заболевания [9]. В связи с этим изучение механизмов формирования и регуляции активности нейтрофилов и образования НВЛ является актуальной клинической задачей.

Поскольку активация врожденного иммунитета начинается с фазы распознавания антигенных структур, в настоящее время особое внимание уделяется изучению толл-подобных рецепторов, экспрессируемых клетками иммунной системы, в том числе нейтрофилами. Поскольку НВЛ могут формироваться только активированными нейтрофилами [4–6], а их активация происходит через толл-подобные рецепторы, внеклеточные домены которых осуществляют взаимодействие с микроорганизмом, большое значение имеет изучение роли полиморфизма генов данной группы рецепторов.

Согласно литературным данным [10, 11], наиболее изученными у пациентов с внебольничной пневмонией являются полиморфные локусы rs5743708 (ген *TLR2*), rs4986790 (ген *TLR4*).

Цель исследования — определение молекулярно-генетических прогностических критериев тяжести течения пневмонии на основании анализа ассоциации полиморфизмов генов толл-подобных рецепторов (локусы rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*)) и выраженности нетоза.

Материалы и методы

В период с 2018 по 2019 г. было спланировано и проведено проспективное исследование на базе Городской клинической больницы им. С.С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы и Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

Критериями включения в исследование являлись следующие: возраст пациента от 40 до 70 лет; подтвержденный клинико-лабораторным обследованием и КТ органов грудной клетки диагноз пневмонии; соответствие пневмонии критериям внебольничной; госпитализация пациента при поступлении в ОРИТ; отсутствие онкологических заболеваний, ВИЧ, гепатитов В и С, заболеваний крови, системных заболеваний соединительной ткани, васкулитов, хронической тяжелой бронхолегочной патологии и профессиональных заболеваний; отсутствие терапии иммуносупрессивными препаратами и системными глюкокортикоидами.

Из пациентов, поступающих в ОРИТ Городской клинической больницы им. С.С. Юдина, методом случайной выборки были отобраны 40 больных с внебольничными пневмониями, соответствующих критериям включения.

Согласно клиническим рекомендациям по диагностике, лечению и профилактике внебольничной пневмонии у взрослых [12], проведены стандартные клинико-лабораторные исследования, КТ органов грудной клетки, микробиологическое исследование крови и трахеобронхиального аспирата на аэробную и анаэробную флору. Тяжесть состояния больных оценивали с использованием валидизированных шкал PORT и SOFA [13, 14].

В исследование включено 38 из 40 пациентов, прошедших полное обследование (средний возраст — 44 (37–58) года), мужчин было 63%, женщин — 37%.

Определение уровня НВЛ в образцах венозной крови выполняли на 1–2-е сутки (визит 1) и 5–7-е сутки (визит 2) госпитализации пациента в стационар. Забор венозной крови осуществляли в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). В течение часа образцы использовали для приготовления стандартизованных мазков типа «монослой», которые затем окрашивали по Романовскому–Гимзе и исследовали на аппаратно-программном комплексе микроскопии «МЕКОС-Ц2» («МЕКОС», Россия) в соответствии с оригинальной авторской методикой [15] (рис. 1). За низкий уровень НВЛ принималось значение меньше или равно 12% в мазке, за высокий — более 12%.

Молекулярно-генетическое исследование проводили

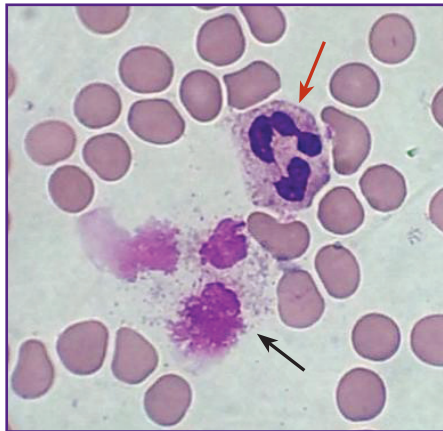


Рис. 1. Нейтрофил (красная стрелка) и нейтрофильная внеклеточная ловушка (черная стрелка), визуализируемые в мазке крови типа «монослой», окрашенном по Романовскому–Гимзе; $\times 5000$

на базе Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Генотипирование полиморфных локусов rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*) выполняли с применением реагентов для выделения ДНК («РИБО-преп»), амплификации и пробоподготовки («ПИРО-преп») производства Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора («АмплиСенс», Россия) методом пиросеквенирования с использованием реагентов PyroMark Q96 и системы генетического анализа PyroMark Q24 (QIAGEN, Германия) [16].

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации (2013) или сопоставимым нормам этики. От каждого участника получено информированное добровольное согласие.

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили при помощи программы Statistica 10.0. Для определения характера распределения данных использовали *W*-тест Шапиро–Уилка. Оценку различий показателей между группами выполняли при помощи непараметрических тестов — *U*-критерия Манна–Уитни и рангового критерия Краскела–Уоллиса. При сравнении частот признаков в группах использовали точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для анализа ассоциации аллелей/генотипов проводили расчет показателя «отношение шансов» (ОШ).

Результаты

Исследуемые распределились следующим образом: пациенты с пневмонией, не требующие вазопрессорной поддержки ($n=31$); пациенты с пневмонией, нуждающиеся в вазопрессорной поддержке ($n=7$). Участники исследования были стратифицированы по рискам неблагоприятного исхода (шкала PORT); по генотипу в отношении полиморфизмов rs5743551

(*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*); уровню НВЛ; исходу заболевания и характеру возбудителя.

По шкале PORT 29 пациентов (76%) относились к 3-му классу, 9 — к 4-му. Пациентов 1-го и 2-го классов, которые не имеют рисков неблагоприятного исхода и не проходят лечение в ОПИТ, в исследовании не было.

При проведении сравнительного межгруппового анализа пациентов в группах, стратифицированных по наличию и отсутствию осложнений, исходу заболевания, уровню лейкоцитов и СРБ, статистически значимых различий клинико-функциональных параметров и уровней НВЛ в мазках крови не получено.

На следующем этапе исследования была выдвинута гипотеза о том, что уровень образующихся НВЛ зависит не только от клинико-лабораторных особенностей течения пневмонии, но и от генетически детерминированной активности нейтрофилов. Для подтверждения данной гипотезы по результатам обзора литературы и геномных баз данных Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) (<https://omim.org/>); ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>); SNPedia (<https://snpedia.com/>); dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) были выбраны три полиморфизма генов толл-подобных рецепторов: rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*) [11, 17, 18].

При анализе ассоциации уровня НВЛ при первом заборе крови с генотипами локусов rs5743708 (*TLR2*) и rs5743551 (*TLR1*) статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$) (табл. 1). Статистически значи-

Т а б л и ц а 1

Результаты анализа ассоциации полиморфизмов rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*) с уровнем НВЛ, Ме [Q1; Q3]

Локус	Генотип	Первый забор крови (n=38)		Второй забор крови (n=35)	
		n	уровень НВЛ	n	уровень НВЛ
rs5743551 (<i>TLR1</i>)	AA	22	6,25 [4,40; 11,0]	22	2,80 [0,33; 6,60]
	AG	12	5,25 [3,10; 13,20]	9	2,0 [1,3; 6,4]
	GG	4	6,40 [5,70; 7,95]	4	2,75 [1,73; 4,50]
p* (тест Краскела–Уоллиса)			0,84		1,00
rs5743708 (<i>TLR2</i>)	GG	35	5,70 [3,95; 10,75]	33	2,6 [0,6; 6,4]
	AG	3	11,0 [8,20; 11,95]	2	4,0 [2,65; 5,35]
	AA	0	—	0	—
p* (тест Манна–Уитни)			0,33		0,89
rs4986790 (<i>TLR4</i>)	AA	30	6,8 [4,9; 11,3]	29	3,1 [1,9; 6,7]
	AG	6	5,0 [3,5; 5,7]	5	0 [0; 1,3]
	GG	2	1,8 [1,2; 2,3]	1	1,6 [1,2; 1,9]
p* (тест Краскела–Уоллиса)			0,027		0,09

* — статистическая значимость рассчитывалась с использованием таблиц сопряженности 3×2. Второй забор крови выполняли 35 пациентам в связи с летальным исходом у 3 человек на 5–7-е сутки.

мая ассоциация установлена лишь для полиморфизма rs4986790 гена *TLR4* ($p < 0,05$). Однако, несмотря на то, что по уровню НВЛ группы пациентов с разными генотипами локуса rs4986790 (*TLR4*) различались статистически значимо ($p < 0,05$), их попарное сравнение не обнаружило статистически значимой ассоциации (рис. 2).

При проведении сравнительного анализа уровня НВЛ у пациентов на 5–7-е сутки госпитализации при различных генотипах всех трех полиморфизмов статистически значимых различий не получено ($p > 0,05$) (см. табл. 1).

Наблюдалась общая тенденция к снижению уровня НВЛ в ходе течения пневмонии, что указывает на уменьшение нетозной активности нейтрофилов ($p < 0,05$).

Общее снижение уровня НВЛ от первого дня забора крови ко второму забору крови без учета генотипа составило в среднем 32,1% (рис. 3).

Результаты сравнительного анализа частот генотипов/аллелей локусов rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*) с уровнем НВЛ при поступлении пациента в стационар, т.е. на момент первого забора крови, представлены в табл. 2.

Статистически значимые различия уровня НВЛ получены только в отношении полиморфизма rs4986790 гена *TLR4*. Аллель G ассоциирован с низким уровнем НВЛ, аллель A — с высоким уровнем НВЛ в момент первого забора крови у пациентов ($p = 0,026$). Анализ полученных данных предполагает доминантную модель влияния аллеля G в генотипе пациента на снижение уровня НВЛ в его крови ($p = 0,039$).

При сравнительном анализе зависимости уровня НВЛ на момент первого забора крови от частот генотипов и аллелей локусов rs5743551 (*TLR1*) и rs5743708

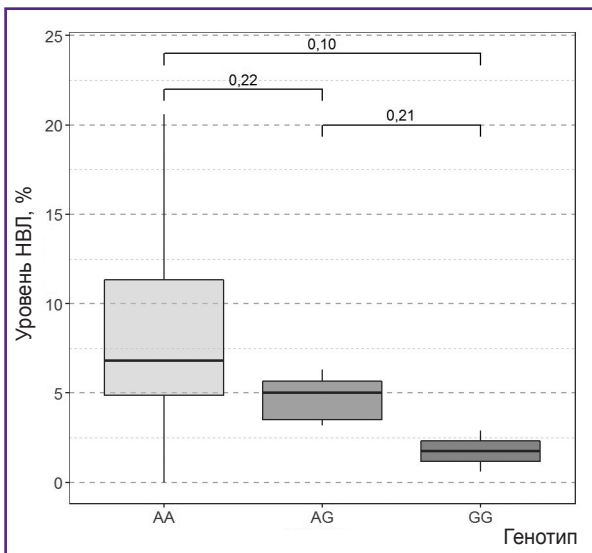


Рис. 2. Зависимость уровня НВЛ от генотипа локуса rs4986790 (*TLR4*) при первом заборе крови
Приведены значения p теста межгрупповых различий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони

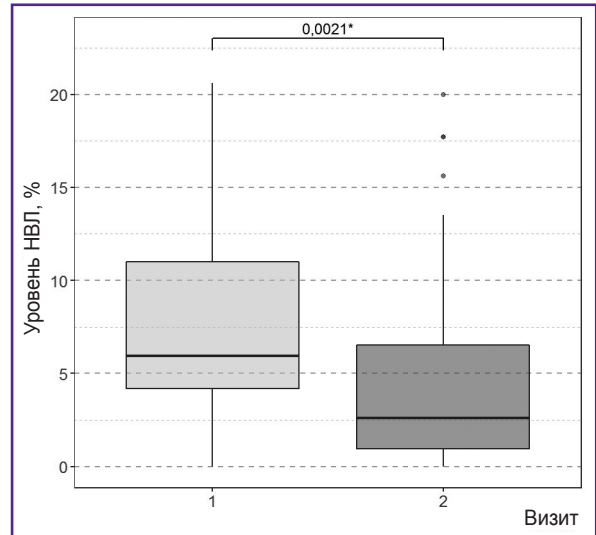


Рис. 3. Динамика изменения уровня НВЛ между первым и вторым забором крови у пациентов
* — значение p непараметрического критерия Вилкоксона для парных выборок

Т а б л и ц а 2

Сравнительный анализ частот генотипов/аллелей локусов rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*) и rs4986790 (*TLR4*) в группах с низким и высоким уровнем НВЛ при первом заборе крови, n (%)

Локус	Генотип	Уровень НВЛ		p^*
		низкий ($n=26$)	высокий ($n=12$)	
rs5743551 (<i>TLR1</i>)	AA	15	7	1,0
	AG	8	4	
	GG	3	1	
	аллель A	38 (73)	18 (75)	
	аллель G	14 (27)	6 (25)	
rs5743708 (<i>TLR2</i>)	GG	25	10	0,233**
	AG	1	2	
	AA	0	0	
	аллель G	51 (98)	22 (92)	
	аллель A	1 (2)	2 (8)	
rs4986790 (<i>TLR4</i>)	AA	18	12	0,123
	AG	6	0	
	GG	2	0	
	аллель A	42 (81)	24 (100)	
	аллель G	10 (19)	0	0,026
	Доминантная модель (AA vs AG+GG)	18/8	12/0	0,039

* — статистическая значимость рассчитывалась с использованием теста Фишера в таблицах сопряженности 3×2 для генотипов и 2×2 — для аллелей; ** — для локуса rs5743708 (*TLR2*) из-за отсутствия одного из генотипов для генотипов и аллелей использовалась таблица сопряженности 2×2 .

Таблица 3

Частота сочетания редких аллелей по полиморфным локусам rs5743551 (TLR1), rs5743708 (TLR2) и rs4986790 (TLR4) у больных в зависимости от уровня НВЛ в крови на момент первого забора крови

Уровень НВЛ	Наличие хотя бы одного редкого аллеля полиморфизмов генов TLR1, TLR2 и TLR4	Сочетание хотя бы двух редких аллелей полиморфизмов генов TLR1, TLR2 и TLR4 у одного пациента
Низкий (n=26)	16 (61,5%)	4 (15,4%)
Высокий (n=12)	6 (50%)	1 (8,3%)
p (точный тест Фишера)	0,725	1,0

Таблица 4

Сравнительный анализ частот генотипов/аллелей по полиморфизмам rs5743551 (TLR1), rs5743708 (TLR2) и rs4986790 (TLR4) в группах больных с разным исходом пневмонии

Локус	Генотип	Исход		p*	ОШ (95% CI)
		благоприятный (n=31)	летальный (n=7)		
rs5743551 (TLR1)	AA	22	0	<0,0001**	—
	AG	9	3		
	GG	0	4		
	аллель A	53	3	<0,0001***	20,3 (4,3–135,0)
	аллель G	9	11		
rs5743708 (TLR2)	GG	29	6	0,47	—
	AG	2	1		
	AA	0	0		
rs4986790 (TLR4)	AA	26	4	0,16	—
	AG	4	2		
	GG	1	1		
	аллель A	56	10	0,08	3,65 (0,64–18,90)
	аллель G	6	4		

* — статистическая значимость рассчитывалась с использованием теста Фишера в таблицах сопряженности 3×2 для генотипов и 2×2 — для аллелей; ** — $1,74 \cdot 10^{-5}$; *** — $7,06 \cdot 10^{-6}$.

(TLR2) статистически значимых различий между группами пациентов не получено (p>0,05).

С целью выявления возможного комбинированного действия нескольких полиморфизмов генов толл-системы был проведен дополнительный анализ зависимости уровня НВЛ от сочетания редких аллелей изучаемых полиморфизмов в генотипе пациентов (табл. 3).

Наблюдалась тенденция к преобладанию в группе пациентов с низким уровнем НВЛ лиц с сочетанием в генотипе хотя бы двух из трех изучаемых полиморфизмов генов TLR1, TLR2 и TLR4 (15,4% больных с низким уровнем НВЛ против 8,3% больных с высоким уровнем НВЛ) (p>0,05).

Проведен сравнительный анализ частот генотипов/аллелей по полиморфизмам rs5743551 (TLR1), rs5743708 (TLR2) и rs4986790 (TLR4) в зависимости от исхода пневмонии (выздоровление/смерть) (табл. 4).

Установлено, что наличие у пациента в генотипе локуса rs5743551 (TLR1) аллеля G увеличивает риск неблагоприятного исхода заболевания (p<0,0001) (ОШ=20,3; 95% CI (4,3–135,0)). Однако для получения более достоверных статистических данных необходимо проведение сравнительного анализа на более крупной выборке.

С учетом полученных данных о более низких уровнях НВЛ у пациентов с генотипами AG и GG по локусу rs4986790 (TLR4) и результатов исследований [8, 10], свидетельствующих о наличии у патогенных микроорганизмов различных способов защиты от НВЛ, взаимосвязи полиморфизма гена TLR4 (rs4986790) с повышенной восприимчивостью к пневмококковой инфекции, а также с учетом наличия ассоциаций rs4986790 (TLR4) с частотой выявления грамотрицательной флоры у больных с тяжелым и крайне тяжелым течением пневмонии [19, 20] можно выдвинуть предположение о наличии влияния вида клинически значимого бронхолегочного возбудителя на уровень НВЛ. Однако проведенный сравнительный межгрупповой анализ данных микробиологического исследования трахеобронхиального аспирата и крови с различными уровнями НВЛ не показал статистически значимых различий.

Обсуждение

В представленном исследовании была выявлена роль НВЛ в качестве маркера динамики воспалительного процесса при внебольничной пневмонии, что корреспондировалось с опубликованными данными [21]. Однако не получено данных, свидетельствующих о том, что у пациентов с внебольничной пневмонией, госпитализированных в ОРИТ, уровень НВЛ в мазках, изготовленных из венозной крови, связан с наличием инотропной поддержки, факторами риска неблагоприятного исхода, развитием осложнений, исходом заболевания, уровнем лейкоцитов и СРБ, а также с видом клинически значимого возбудителя пневмонии, хотя в доступной литературе мы нашли исследования, в которых было продемонстрировано наличие данной связи [22–26].

Так, в опубликованном в 2019 г. исследовании, в которое были включены 73 пациента с сепсисом различной этиологии, установлено, что уровень НВЛ в группе выживших и погибших статистически значимо различался, причем все пациенты с уровнем НВЛ более 23% погибли [27]. Полученные нами результаты могут иметь следующие объяснения. Первое — недостаточная выраженность системной воспалительной реакции у пациентов в набранной группе. Только 3 пациента в осложнении пневмонии имели сепсис, 9

из 38 больных были отнесены к 4-му классу по шкале PORT, не было пациентов 5-го, самого тяжелого, класса. Второе — ведущим этиологическим фактором развития внебольничной пневмонии является *Streptococcus pneumoniae*. В нашем исследовании он являлся возбудителем у 39% пациентов, что привело к низкой вариабельности выборки по этиологическому фактору и затруднило проведение сравнительного анализа. Кроме того, у пациентов с пневмониями летальность была значительно ниже, чем в исследовании A. Gur'ev с соавт. [27], и составила 18,4% (7 из 38). Вероятно, по этой причине мы не получили статистически значимого различия между группами выживших и погибших больных.

Отсутствие ассоциации характера возбудителя и уровня НВЛ в представленном исследовании может быть объяснено наличием механизмов защиты от нейтрофильных ловушек, выявленных у возбудителей бронхолегочной инфекции и обсуждаемых в литературе [21–23]. Однако метод определения уровня НВЛ [15], примененный в нашем исследовании, учитывает только способность активированных и циркулирующих в кровотоке нейтрофилов образовывать при своей гибели НВЛ в мазке крови. Именно по этой причине микробные факторы, разрушающие НВЛ, никак не влияют на результат анализа и полученные данные несут объективный характер.

Нами установлена отрицательная взаимосвязь средней силы между частотой встречаемости генотипов полиморфизмов генов *TLR1* и *TLR4*, их сочетаний и уровнем НВЛ. Также выявлена положительная взаимосвязь средней силы частоты летального исхода с наличием генотипов AG и GG в генах rs5743551 (*TLR1*) и rs4986790 (*TLR4*) соответственно. Сильная взаимосвязь установлена при сочетании этих полиморфизмов друг с другом. Вероятно, полученные данные можно объяснить тем, что низкий уровень активности нейтрофилов, ассоциированный с наличием генотипов AG rs5743551 (*TLR1*) и GG rs4986790 (*TLR4*), является маркером нарушения генетически детерминированного механизма врожденного иммунитета и может быть предиктором летального исхода пневмонии.

Такое предположение подтверждается данными, полученными другими исследователями. J.J. Hoogerwerf с соавт. [28] изучали влияние двух групп лиганд-возбудителей респираторных инфекций на *TLR*: лиганда *TLR2* (компонента грамположительных бактерий) и лиганда *TLR4* (компонента грамотрицательных бактерий). Авторы предположили, что стимуляция *TLR2* или *TLR4* приводит к различным патоморфологическим вариантам воспалительного процесса в легочной ткани.

В исследовании, проведенном J.N. Siebert и соавт. [10], показано, что пониженный уровень экспрессии *TLR4* может быть дополнительным фактором, лежащим в основе восприимчивости к пневмококковой инфекции. S.J. Skerrett и соавт. [29] также продемонстрировали вклад *TLR2* в респираторную защиту от бактериальной инфекции.

Заключение

В проведенном исследовании у пациентов с внебольничной пневмонией наблюдалось влияние полиморфизма rs4986790 гена *TLR4* на уровень НВЛ в 1–2-е сутки госпитализации. Генотипы AG и GG по данному локусу гена *TLR4* ассоциировались с более низким уровнем НВЛ по сравнению с носителями полиморфизма. С неблагоприятным исходом заболевания в настоящем исследовании был связан аллель G по полиморфизму rs5743551 гена *TLR1*. Полученные данные позволяют предположить, что НВЛ являются маркерами активности нейтрофилов, находящаяся в тесной взаимосвязи с изучаемыми генетическими полиморфизмами, и влияют на прогноз исхода пневмонии. Необходимо дальнейшее изучение роли полиморфизмов *TLR1* и *TLR4* в иммунологическом ответе при пневмонии.

Финансирование исследования. Работа не получила финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Литература/References

1. Dandachi D., Rodriguez-Barradas M.C. Viral pneumonia: etiologies and treatment. *J Investig Med* 2018; 66(6): 957–965, <https://doi.org/10.1136/jim-2018-000712>.
2. Биличенко Т.Н., Быстрицкая Е.В., Чучалин А.Г., Белевский А.С., Батын С.З. Смертность от болезней органов дыхания в 2014–2015 гг. и пути ее снижения. *Пульмонология* 2016; 26(4): 389–397, <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2016-26-4-389-397>.
3. Bilichenko T.N., Bystritskaya E.V., Chuchalin A.G., Belevsky A.S., Batyn S.Z. Mortality from respiratory diseases in 2014–2015 and ways to reduce it. *Pulmonologiya* 2016; 26(4): 389–397, <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2016-26-4-389-397>.
4. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663): 1532–1535, <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
5. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176(2): 231–241, <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>.
6. Sousa-Rocha D., Thomaz-Tobias M., Diniz L.F., Souza P.S., Pinge-Filho P., Toledo K.A. Trypanosoma cruzi and its soluble antigens induce NET release by stimulating toll-like receptors. *PLoS One* 2015; 10(10): e0139569, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139569>.
7. Yipp B.G., Petri B., Salina D., Jenne C.N., Scott B.N., Zbytnik L.D., Pittman K., Asaduzzaman M., Wu K., Meijndert H.C., Malawista S.E., de Boisfleury Chevance A., Zhang K., Conly J., Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 2012; 18(9): 1386–1393, <https://doi.org/10.1038/nm.2847>.
8. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* 2013; 122(16): 2784–2794, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>.

8. Rijkers G.T., Holzer L., Dusselier T. Genetics in community-acquired pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 2019; 25(3): 323–329, <https://doi.org/10.1097/mcp.0000000000000580>.
9. Pilszczek F.H., Salina D., Poon K.K., Fahey C., Yipp B.G., Sibley C.D., Robbins S.M., Green F.H., Surette M.G., Sugai M., Bowden M.G., Hussain M., Zhang K., Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010; 185(12): 7413–7425, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>.
10. Siebert J.N., Hamann L., Verolet C.M., Gameiro C., Grillet S., Siegrist C.A., Posfay-Barbe K.M. Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein 180L single-nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to recurrent pneumococcal lower respiratory tract infections in children. *Front Immunol* 2018; 9: 1780, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01780>.
11. Wurfel M.M., Gordon A.C., Holden T.D., Radella F., Strout J., Kajikawa O., Ruzinski J.T., Rona G., Black R.A., Stratton S., Jarvik G.P., Hajjar A.M., Nickerson D.A., Rieder M., Sevransky J., Maloney J.P., Moss M., Martin G., Shanholtz C., Garcia J.G., Gao L., Brower R., Barnes K.C., Walley K.R., Russell J.A., Martin T.R. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(7): 710–720, <https://doi.org/10.1164/rccm.200803-462oc>.
12. Министерство здравоохранения Российской Федерации. *Внебольничная пневмония у взрослых: клинические рекомендации*. М.; 2019; 97 с.
Ministry of Health of the Russian Federation. *Vnebol'nichnaya pnevmoniya u vzroslykh: klinicheskie rekomendatsii* [Community-acquired pneumonia in adults: clinical guidelines]. Moscow; 2019; 97 p.
13. Fine M.J., Auble T.E., Yealy D.M., Hanusa B.H., Weissfeld L.A., Singer D.E., Coley C.M., Marrie T.J., Kapoor W.N. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336(4): 243–250, <https://doi.org/10.1056/nejm199701233360402>.
14. Mukhopadhyay A., Tai B.C., See K.C., Ng W.Y., Lim T.K., Onsieng S., Ee S., Chua M.J., Lee P.R., Loh M.L., Phua J. Risk factors for hospital and long-term mortality of critically ill elderly patients admitted to an intensive care unit. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 960575, <https://doi.org/10.1155/2014/960575>.
15. Гурьев А.С., Мосальская Д.В., Волков А.Ю. *Способ определения относительного количества этотически трансформированных фагоцитов*. Патент РФ 2712179. 2019.
Gur'ev A.S., Mosal'skaya D.V., Volkov A.Yu. *Method for determining the relative amount of etiologically transformed phagocytes*. Patent RU 2712179. 2019.
16. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования. *Справочник заведующего КДЛ* 2016; 5: 33–42.
Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Experience in using genetic analysis systems based on pyrosequencing technology. *Spravochnik zaveduusego KDL* 2016; 5: 33–42.
17. Kloek A.T., Brouwer M.C., van de Beek D. Host genetic variability and pneumococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med Genomics* 2019; 12(1): 130, <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0572-x>.
18. Kumpf O., Giamarellos-Bourboulis E.J., Koch A., Hamann L., Moukhtaroudi M., Oh D.Y., Latz E., Lorenz E., Schwartz D.A., Ferwerda B., Routsis C., Skalioti C., Kullberg B.J., van der Meer J.W., Schlag P.M., Netea M.G., Zacharowski K., Schumann R.R. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care* 2010; 14(3): R103, <https://doi.org/10.1186/cc9047>.
19. Agnese D.M., Calvano J.E., Hahn S.J., Coyle S.M., Corbett S.A., Calvano S.E., Lowry S.F. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186(10): 1522–1525, <https://doi.org/10.1086/344893>.
20. Lorenz E., Mira J.P., Frees K.L., Schwartz D.A. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162(9): 1028–1032, <https://doi.org/10.1001/archinte.162.9.1028>.
21. Rahman S., Gadjeva M. Does NETosis contribute to the bacterial pathoadaptation in cystic fibrosis? *Front Immunol* 2014; 5: 378, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00378>.
22. Beiter K., Wartha F., Albiger B., Normark S., Zychlinsky A., Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 2006; 16(4): 401–407, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.056>.
23. Buchanan J.T., Simpson A.J., Aziz R.K., Liu G.Y., Kristian S.A., Kotb M., Feramisco J., Nizet V. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 2006; 16(4): 396–400, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.039>.
24. Thammavongsa V., Missiakas D.M., Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* 2013; 342(6160): 863–866, <https://doi.org/10.1126/science.1242255>.
25. van Strijp J.A., Rooijackers S.H. Entrapment exploited. *Trends Microbiol* 2014; 22(2): 55–57, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.010>.
26. Berends E.T.M., Horswill A.R., Haste N.M., Monestier M., Nizet V., von Köckritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 2010; 2(6): 576–586, <https://doi.org/10.1159/000319909>.
27. Gur'ev A., Mosalskaia D., Lopatin A., Volkov A. Prognostic value of cellular markers in sepsis: extracellular DNA traps and platelet count relation. Berlin, 32nd Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine ESICM LIVES 2019. *Intensive Care Med Exp* 2019; 000809: 237–238, <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0265-y>.
28. Hoogerwerf J.J., de Vos A.F., Bresser P., van der Zee J.S., Pater J.M., de Boer A., Tanck M., Lundell D.L., Her-Jenh C., Draing C., von Aulock S., van der Poll T. Lung inflammation induced by lipoteichoic acid or lipopolysaccharide in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(1): 34–41, <https://doi.org/10.1164/rccm.200708-1261oc>.
29. Skerrett S.J., Braff M.H., Liggitt H.D., Rubens C.E. Toll-like receptor 2 has a prominent but nonessential role in innate immunity to *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Physiol Rep* 2017; 5(21): e13491, <https://doi.org/10.14814/phy2.13491>.