

Оригинальные работы

УДК 616.5-002

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Семерник О.Е.¹, Лебеденко А.А.¹, Шкурят Т.П.², Машкина Е.В.², Дрейзина Т.К.²

¹ Ростовский государственный медицинский университет; Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29

² Южный федеральный университет; Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42

Ключевые слова: атопический дерматит, дети, полиморфизм, матриксные металлопротеиназы

Обоснование. Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют особую роль в патогенезе атопического дерматита (АтД). Поэтому исследование особенностей наследования генов, отвечающих за синтез ММП у детей, страдающих АтД, представляет большой научный и практический интерес.

Цель. Изучить роль полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ (ММП9 и ММП20) в патогенезе АтД у детей.

Материалы и методы. Методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции проведено исследование аллельных вариантов 320A>C гена ММП20, 837T>C гена ММП20, -8202 A>G гена ММП9 у детей с АтД. Контрольную группу составили пациенты I и IIa групп здоровья соответствующего пола и возраста.

Результаты. Результаты проведенных генетических исследований показали, что частота встречаемости аллелей и генотипов по полиморфизмам 320A>C гена ММП20, 837T>C гена ММП20 среди больных не имела достоверных отличий от группы контроля ($p > 0,05$). При изучении полиморфизма -8202 A>G гена ММП9 установлено, что среди детей, страдающих АтД, преобладает A/A-генотип с частотой 69,2%, тогда как в группе здоровых детей частота данного генотипа в 3 раза ниже ($p = 0,003$). В группе контроля преобладающим является A/G-генотип (55,7%), а носителей G/G-генотипа в 2 раза меньше (21,3%). Важно отметить, что у детей с генотипом A/A риск развития АтД повышен в 7,55 раза ($OR = 7,55$ [95% CI – 2,97–19,21; $p = 0,001$]).

Заключение. Таким образом, можно предположить, что наиболее значимым полиморфизмом в патогенезе АтД у детей является 8202A>G гена ММП9, а именно у гомозигот по A-аллели риск развития кожных проявлений аллергии повышен более чем в 7 раз.

Атопический дерматит (АтД) является распространенным и нередко тяжело протекающим заболеванием кожных покровов, которое характеризуется хроническим аллергическим воспалением кожи, возникающим в раннем возрасте у детей с наследственной предрасположенностью. В патогенезе АтД главенствующую роль играет генетическая составляющая. Известно более 20 генов, ассоциируемых с атопической предрасположенностью (ADAM 33, SPINK-5, FLG и многие другие), а также выявлено несколько локусов, связанных непосред-

ственно с развитием АтД (3q21, 1q21, 16q, 17q25, 20p и 3p26). При этом отдельно выделяют гены, кодирующие белки, участвующие в формировании эпидермального барьера; гены, предрасполагающие к атопии; гены, влияющие на IgE-ответ; гены гиперреактивности кожи, независимой от атопии; гены, формирующие воспаление путем воздействия провоспалительных цитокинов независимо от IgE [1, 2]. В последнее время особое внимание привлекают гены, кодирующие белки-ферменты, отвечающие за биотрансформацию межклеточного матрикса [3]. Принимая во внимание тот факт, что экстрацеллюлярный матрикс не только представляет собой сложную многокомпонентную молекулярную структуру, обеспечивающую целостность тканей, но и способную к взаимодействию

Адрес для корреспонденции

Семерник Ольга Евгеньевна
E-mail: semernick@mail.ru

с окружающей средой, немаловажное значение играют факторы, способствующие поддержанию равновесия в данной системе [4]. Главенствующая роль в данных процессах принадлежит группе протеолитических ферментов – матриксным металлопротеиназам (ММП). Физиологическая функция ММП состоит в ремоделировании тканей, преобразовании компонентов экстрацеллюлярного матрикса, изменении структуры коллагеновых волокон, а также активации ангиогенеза. Данные процессы имеют огромное значение в патогенезе АтД. Доказано, что у пациентов, страдающих АтД, на фоне длительного аллергического воспаления отмечается стойкая, но обратимая морфофункциональная перестройка кожных покровов, сопровождающаяся изменением в иммунной системе и клинически проявляющаяся лихенизацией, повышенной сухостью, лимфоцитарно-макрофагической инфильтрацией и фиброзными изменениями дермы [5].

Однако ММП – это неоднородное мультигенное семейство структурно и функционально сходных Zn- и Ca-зависимых эндопептидаз, способных модифицировать все известные компоненты экстрацеллюлярного матрикса, а также многие нематриксные молекулы [6]. В настоящее время описано более 60 видов данных ферментов. Установлено, что повышенная экспрессия ММП способствует регенерации тканей, но при этом высокая концентрация ММП может привести к разрушению или изменению компонентов межклеточного матрикса, необходимых для реэпителизации кожных покровов при АтД. Показано, что особую роль в поддержании аллергического воспаления при АтД играет ММП-9 (желатиназа В) [7]. Данный фермент интенсивно гидролизует желатины, получаемые из различных типов коллагенов, а также ряд белков соединительнотканного матрикса, в том числе и эластин, коллаген V и IV типа [8, 9]. Кроме того, ММП-9, растворяя стромальные элементы, участвует в процессах неоангиогенеза [10]. Значение ММП-20 в патогенезе АтД еще не изучена, однако имеются данные о том, что экспрессия ММП-20 зависит от концентрации трансформирующего фактора роста β_1 , играющего ключевую роль в процессах ремоделирования тканей в ходе аллергического воспаления [11]. Поэтому особого внимания заслуживает исследование особенностей наследования генов, отвечающих за синтез данных ММП у детей, страдающих АтД.

Цель исследования: изучить роль полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ (ММП9 и ММП20) в патогенезе АтД у детей.

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели нами были обследованы больные, страдающие АтД (n=26),

а также дети I и IIa групп здоровья, вошедшие в группу контроля (n=61). В группу пациентов с АтД включены дети в возрасте от 5 до 15 лет. Верификация диагноза АтД проводилась на основании клинических рекомендаций «Атопический дерматит у детей» (2016).

Критерии включения: дети с диагнозом АтД, установленным не ранее чем за 6 мес до начала настоящего исследования; наличие подписанного пациентом (в возрасте старше 15 лет) или родителями (для детей младше 15 лет) информированного согласия на проведение исследования.

Критерии исключения: отсутствие подписанного информированного согласия; дети, имеющие сопутствующую патологию кожных покровов; указание в анамнезе на сопутствующие аллергические заболевания [бронхиальную астму (БА), крапивницу]; наличие близкородственных браков в семье; пациенты, имеющие подтвержденные генетические заболевания и врожденные пороки развития.

Всем детям, включенным в данное исследование, проведено комплексное клинико-лабораторное обследование на базе педиатрического отделения клиники Ростовского государственного медицинского университета. У всех детей из лейкоцитов периферической крови термокоагуляционным методом с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, Россия) были выделены образцы ДНК, а затем методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия) проведено определение полиморфных вариантов 320A>C гена *MMP20*, 837T>C гена *MMP20*, -8202A>G гена *MMP9*.

Исследование проводилось с соблюдением всех этических норм, изложенных в WAME (The World Association of Medical Editors), и одобрено Локальным этическим комитетом Ростовского государственного медицинского университета.

Статистическая обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR. Достоверность различий в распределении частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых лиц оценивали в соответствии с критерием χ^2 . Прежде чем приступить к анализу полученных результатов, все выборки пациентов, включенных в исследование, были проверены на соответствие равновесию Харди–Вайнберга [12]. Ассоциацию определенных генотипов изученных генов с развитием БА выявляли, сравнивая выборки больных и здоровых индивидов по частоте одного признака, с использованием критерия χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Все расчеты проводили с использованием программ «Statistica for Windows 6.0» и «Microsoft Excel XP».

Результаты

Исследование частот генотипов и аллелей полиморфизмов генов металлопротеиназ установило, что выборки детей во всех обследованных нами группах соответствуют равновесию Харди–Вайнберга, однако достоверно значимые отличия зарегистрированы только в отношении $-8202A>G$ гена *MMP9* (см. таблицу).

дающих АтД, достоверно чаще регистрировалась аллель *C* (73,1%), в то время как в группе контроля он встречался лишь у 58,2%. Также следует отметить, что среди больных детей преобладали носители *C/C*-генотипа (53,8%), гетерозигот (*A/C*) было 38,5%, а гомозиготы по *A*-аллелю составили всего 7,7%. При этом в группе контроля, наоборот, доминировали *A/C*-генотипы (50,8%), а частота встречаемости

Таблица. Частота встречаемости генотипов и аллелей генов металлопротеиназ среди больных атопическим дерматитом

Генотип, аллель	Больные	Здоровые	χ^2	P	OR	
	n=13	n=61			Знач.	95% CI
<i>837T>C</i> гена <i>MMP20</i>						
Аллель <i>T</i>	0,500	0,525	0,05	0,82	0,91	0,39–2,11
Аллель <i>C</i>	0,500	0,475			1,10	0,47–2,57
Генотип <i>T/T</i>	0,231	0,246	0,08	0,96	0,92	0,22–3,79
Генотип <i>T/C</i>	0,538	0,557			0,93	0,28–3,08
Генотип <i>C/C</i>	0,231	0,197			1,23	0,28–5,15
<i>PXB</i> (χ^2)	0,08	0,84				
<i>320A>C</i> гена <i>MMP20</i>						
Аллель <i>A</i>	0,269	0,418	1,99	0,16	0,51	0,20–1,31
Аллель <i>C</i>	0,731	0,582			1,95	0,76–4,98
Генотип <i>A/C</i>	0,077	0,164	2,18	0,34	0,43	0,05–2,06
Генотип <i>C/C</i>	0,538	0,328			0,60	0,18–3,65
<i>PXB</i> (χ^2)	0,01	0,12			2,39	0,71–8,06
$-8202A>G$ гена <i>MMP9</i>						
Аллель <i>A</i>	0,846	0,508	9,97	0,002	5,32	1,73–16,36
Аллель <i>G</i>	0,154	0,492			0,19	0,06–0,58
Генотип <i>A/A</i>	0,692	0,230	11,46	0,003	7,55	2,02–28,29
Генотип <i>A/G</i>	0,308	0,537			0,35	0,10–1,27
Генотип <i>G/G</i>	0,000	0,213			0,13	0,01–2,39
<i>PXB</i> (χ^2)	0,34	0,81				

Примечание. *PXB* – равновесие Харди–Вайнберга.

Из данных таблицы видно, что в группах здоровых детей и детей, страдающих АтД, с равной частотой встречаются носители *T*- и *C*-аллеля гена *MMP20*, при этом преобладают гетерозиготные носители данного полиморфизма (53,8 и 55,7% соответственно). Однако среди детей, страдающих АтД, частота мутантного генотипа *C/C* в 1,17 раза выше, чем в группе контроля. Частота гомозигот с генотипом *T/T* в группе здоровых детей в 1,06 раза выше, чем среди больных. Статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей между группой здоровых детей и группой детей, больных АтД, не выявлено.

При рассмотрении полиморфизма *320A>C* гена *MMP20* было установлено, что среди детей, стра-

гомозигот по *A*-аллелю была в 2 раза больше по сравнению с больными АтД (16,4%).

Анализ распределения аллелей и генотипов по $-8202A>G$ полиморфизму гена *MMP9* выявил достоверно значимые различия между группой контроля и пациентами, страдающими АтД ($p<0,001$). При этом преобладающей аллелью в обеих группах является *A*-аллель (среди больных АтД – 84,6%, в группе контроля – 50,8%). Установлено, что среди детей, страдающих АтД, преобладает *A/A*-генотип с частотой 69,2%, тогда как в группе здоровых детей частота данного генотипа в 3 раза ниже ($p<0,001$). Гетерозиготный *A/G*-вариант зарегистрирован у 30,8% больных АтД, при этом в данной группе отсутствуют гомозиготы по *G*-аллели. В то время

как в группе контроля преобладающим является *A/G*-генотип (55,7%), а носителей *G/G*-генотипа в 2 раза меньше (21,3%). Важно отметить, что у детей с генотипом *A/A* риск развития АтД повышен в 7,55 раза ($OR=7,55$ [95% CI – 2,97–19,21; $p<0,001$]).

Обсуждение

Результаты проведенного нами исследования согласуются с данными зарубежных коллег, установивших высокую значимость *MMP9* в патогенезе АтД [13]. Так, Devillers и соавт. показано, что у пациентов, страдающих АтД, уровни *MMP-9* в плазме крови достоверно выше по сравнению с контролем [12]. А в ряде работ установлено влияние полиморфизма гена данного цитокина на развитие и других атопических заболеваний, в том числе и БА [14, 15]. Однако следует отметить, что работы по изучению роли данных металлопротеиназ и полиморфизмов их генов в патогенезе аллергических заболеваний немногочисленны, что диктует необходимость продолжения исследований в данном научном направлении.

Таким образом, можно предположить, что наиболее значимым полиморфизмом в патогенезе АтД у детей является *8202A>G* гена *MMP9*, а именно у гомозигот по *A*-аллели риск развития кожных проявлений аллергии повышен более чем в 7 раз.

Информация об источниках финансирования

Финансовой поддержки в настоящей статье не было.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Белозоров АП, Зуева МИ. Генетические аспекты дерматозов аллергического генеза. *Дерматология и венерология*. 2009;4(46):17-22 [Belozorov AP, Zuyeva MI. Geneticheskiye aspekty dermatozov allergicheskogo geneza. *Dermatologiya i venerologiya*. 2009;4(46):17-22 (In Russ.)].
- Иванов ОЛ, Львов АН, Миченко АВ. Атопический дерматит: современные представления. *Дерматология*. 2007;5(19):1362-1366 [Ivanov OL, Lvov AN, Michenko AV. Atopicheskiy dermatit: sovremennyye predstavleniya. *Dermatologiya*. 2007;5(19):1362-1366 (In Russ.)].
- Лебеденко АА, Шкурат ТП, Машкина ЕВ и соавт. Изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов *arg25pro* гена трансформирующего фактора роста β_1 и *c634g* гена фактора роста эндотелия сосудов с риском развития атопического дерматита у детей. *Российский Аллергологический Журнал*. 2017;14(4-5):66-70 [Lebedenko AA, Shkurat TP, Mashkina EV i soavt. Izucheniye assotsiatsii odnonukleotidnykh polimorfizmov *arg25pro* gena transformiruyushchego faktora rosta β_1 i *c634g* gena faktora rosta endoteliya sosudov s riskom razvitiya atopicheskogo dermatita u detey. *Rossiyskiy Allergologicheskiy Zhurnal*. 2017;14(4-5):66-70 (In Russ.)].
- Lebedenko AA, Semernik OE, Ivanova DN et al. Transforming growth factor β_1 : clinical significance and peculiarities of inheritance in children with atopic dermatitis. *Online Journal of Health and Allied Sciences*. 2018;17(1):5.
- Герасимов АВ, Денисов АА, Логвинов СВ, Климов ВВ, Костюченко ВП. Морфологические маркеры ремоделирования кожи у пациентов с атопическим дерматитом. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;(6):67 [Gerasimov AV, Denisov AA, Logvinov SV, Klimov VV, Kostyuchenko VP. Morfologicheskiye markery remodelirovaniya kozhi u patsiyentov s atopicheskim dermatitom. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015;(6):67 (In Russ.)].
- Маркелова ЕВ, Здор ВВ, Романчук АЛ, Бирко ОН. Матриксные металлопротеиназы, их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2016;(2):1-22 [Markelova EV, Zdor VV, Romanchuk AL, Birko ON. Matriksnyye metalloproteinazy, ikh vzaimosvyaz s sistemoy tsitokinov. diagnosticheskiy i prognosticheskiy potentsial. *Immunopatologiya. allergologiya. infektologiya*. 2016;(2):1-22 (In Russ.)].
- Devillers AC, van Toorenenbergen AW, Klein Heerenbrink GJ et al. Elevated levels of plasma matrix metalloproteinase-9 in patients with atopic dermatitis: a pilot study. *Oranje AP Clin Exp Dermatol*. 2007;32(3):311-313.
- Соловьева НИ. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции (обзорная статья). *Биоорганическая химия*. 1998;24(4):245-255 [Solovyeva NI. Matriksnyye metalloproteinazy i ikh biologicheskiye funktsii (obzornaya statiya). *Bioorganicheskaya khimiya*. 1998;24(4):245-255 (In Russ.)].
- Трошин ИЮ, Громова ОА. Дисплазия соединительной ткани, магнии и нуклеотидные полиморфизмы. *Кардиология*. 2008;(10):14-21 [Troshin IYu, Gromova OA. Displaziya soyedinitelnoy tkani. magniy i nukleotidnyye polimorfizmy. *Kardiologiya*. 2008;(10):14-21 (In Russ.)].
- Клишо ЕВ, Кондакова ИВ, Чойнзонев ЕЛ. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе. *Сибирский онкологический журнал*. 2003;(2):62-71 [Klisho EV, Kondakova IV, Choynzonov EL. Matriksnyye metalloproteinazy v onkogeneze. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2003;(2):62-71 (In Russ.)].
- Ярмолинская МИ, Молотков АС, Денисова ВМ. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2012;LXI(1):113-125 [Yarmolinskaya MI, Molotkov AS, Denisova VM. Matriksnyye metalloproteinazy i ingibitory: klassifikatsiya. mekhanizm deystviya. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2012;LXI(1):113-125 (In Russ.)].
- Rodriguez S, Gaunt T, Day I. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epid Adv Acc*. 2009;24(1):91-92.
- Devillers AC, van Toorenenbergen AW, Klein Heerenbrink GJ et al. Elevated levels of plasma matrix metalloproteinase-9 in patients with atopic dermatitis: a pilot study. *Clin Exp Dermatol*. 2007;32(3):311-313.
- Nakashima K, Hirota T, Obara K et al. A functional polymorphism in MMP-9 is associated with childhood atopic asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(1):300-307.
- Pinto LA, Depner M, Klopp N et al. MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children. *Respir Res*. 2010;11:23. DOI: 10.1186/1465-9921-11-23.

Статья поступила 27.03.2019 г., принята к печати 20.05.2019 г.
Рекомендована к публикации Е.С. Феденко

Информационная страница

Лебеденко Александр Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой детских болезней № 2, Ростовский государственный медицинский университет.

Шкурят Татьяна Павловна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой генетики, Южный федеральный университет.

Машкина Елена Владимировна, доктор биологических наук, доцент, доцент кафедры генетики, Южный федеральный университет.

Семерник Ольга Евгеньевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры детских болезней № 2, Ростовский государственный медицинский университет.

Дрейзина Татьяна Константиновна, магистрант кафедры генетики, Южный федеральный университет.

Дополнительные утверждения

Авторы согласны на публикацию представленной работы.

Авторы подтверждают, что данная рукопись в настоящее время не представлена для публикации в другие издания и не была принята для публикации в других изданиях.

POLYMORPHIC VARIANTS OF MATRIX METALLOPROTEINASES GENES IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS

Semernik O.E.¹, Lebedenko A.A.¹, Shkurat T.P.², Mashkina E.V.², Dreyzina T.K.²

¹Rostov State Medical University; 29, The lane Nakhichevan, Rostov-on-Don, 344022, Russia

²Southern Federal University; 105/42, Bolshaya Sadovaya str., Rostov-on-Don, 344022, Russia

Key words: atopic dermatitis, children, polymorphism, matrix metalloproteinases

Matrix metalloproteinases (MMP) play a special role in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD). Therefore, the study of the features of genes responsible for the synthesis of MMP in children with AD is of great scientific and practical interest.

Background. To study the role of polymorphic variants of matrix metalloproteinase genes (MMP9 and MMP20) in the pathogenesis of AD in children.

Materials and methods. Allelic variants of 320A>C gene MMP20, 837T>C gene MMP20, -8202 A>G gene MMP9 in children with AD were studied using the method of allele-specific polymerase chain reaction. The control group consisted of I and IIa the health groups patients of the corresponding sex and age.

Results. The results of genetic studies showed that the incidence of alleles and genotypes in the polymorphisms 320A>C of the gene MMP20, 837T>C of the gene MMP20 in patients had no significant differences from the control group ($p>0.05$). It was established that the A/A-genotype of polymorphism -8202 A>G of the MMP9 gene, prevailed among children suffering from AD at a frequency of 69.2%, whereas in the group of healthy children the frequency of this genotype was 3 times lower ($p=0.003$). At the same time A/G-genotype (55.7%) was predominant in the control group, while G/G genotype was 2 times lower (21.3%). Thus the risk of AD increased by 7.55 times (OR=7.55 [95% CI – 2.97–19.21; $p<0.001$] in children with genotype A/A.

Conclusion. The most significant polymorphism in the pathogenesis of AD in children is 8202 A>G of the MMP9 gene, in particular the risk of developing of skin manifestations of allergy is increased by more than 7 times in A-allele homozygotes.