

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ IL-6 174 C/G (RS1800795), IL-10 G-1082A (RS1800896) И TNFA -308 G/A (RS1800629) У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ СЕПСИСЕ

Камалов З.С.<sup>1</sup>, Рузибакиева М.Р.<sup>1</sup>, Рахманкулова З.Ж.<sup>2</sup>, Тухтаева У.Д.<sup>2</sup>, Алимова М.Т.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт иммунологии и геномики человека АН РУз,

<sup>2</sup> Ташкентский государственный медицинский университет

### ХУЛОСА

**Таъқиқотнинг мақсади.** Эрта неонатал сепсисга чалинган чақалоқларда IL-6 174 C/G (rs1800795), IL-10 G-1082A (rs1800896) ва TNFα -308 G/A (rs1800629) аллеллари ва генотиплари тақсимотини аниқлаш.

**Материаллар ва усуллар.** Таъқиқотга неонатал сепсисга чалинган 74 нафар чақалоқ ва амалий соғлом 66 нафар бола киритилди. Иммуногенларнинг полиморф участкаларини генотиплаш аллел-специфик праймерлар («Литех» НПФ, Москва) ва агароза гелидаги реакция маҳсулотларининг электрофоретик детекцияси билан полимераз занжирли реакция (ПЗР) усули билан амалга оширилди. IL-6 174 C/G (rs1800795), IL-10 G-1082A (rs1800896) полиморфизмлари ва TNFα -308 G/A (rs1800629) генотиплари синаб кўрилди, SNP аввал тасдиқланган (NCBI dbSNP data base, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>).

**Олинган натижалар.** Шундай қилиб, олинган маълумотлар шуни кўрсатадики, IL-6 174 C/G (rs1800795) ва TNFα -308 G/A (rs1800629) ген полиморфизмлари янги туғилган чақалоқларда эрта неонатал сепсиснинг ривожланишига мойилликка ҳисса қўшади ва ушбу патология ривожланишининг прогностик омилларидан бири ҳисобланади.

**Калим сўзлар:** янги туғилган чақалоқ, эрта неонатал сепсис, цитокинлар генлари, ген полиморфизмлари, аллеллар, генотиплар.

Сепсис новорожденных (СН) – это заболевание, представляющее собой генерализованную гнойно-воспалительную инфекцию, вызванную условно-патогенной бактериальной микрофлорой, основой патогенеза которого является дисфункция иммунной системы организма ребенка с развитием неадекватной системной воспалительной реакции (СВР), очага (очагов) гнойного воспаления или бактериемии и полиорганной недостаточности. Таково последнее определение СН, которое было опубликовано в Национальном руководстве «Неонатология» в конце 2007 г. [1]. Такое же определение прозвучало и на III и IV Ежегодных конгрессах специалистов перинатальной медицины 2008 и 2009 гг. Как известно, у новорожденных детей выделяют ранний (РСН) и

### SUMMARY

**The aim of the study.** To determine the distribution of alleles and genotypes IL-6 174 C/G (rs1800795), IL-10 G-1082A (rs1800896) and TNF α -308 G/A (rs1800629) in newborns with early neonatal sepsis.

**Materials and methods.** The study included 74 newborns with early neonatal sepsis and 66 apparently healthy children. Genotyping of polymorph regions of immune response genes was carried out by polymerase chain reaction (PCR) with allele-specific primers (NPF Litekh, Moscow) and electrophoretic detection of reaction products in agarose gel. Polymorphisms of IL-6 174 C/G (rs1800795), IL-10 G-1082A (rs1800896) and genotypes of TNF α -308 G/A gene (rs1800629) were tested, SNP is previously confirmed (NCBI dbSNP data base, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>).

**Results.** Thus, the data obtained indicate that the polymorphisms of the IL-10 G-1082A (rs1800896) and TNF α -308G/A (rs1800629) genes contribute to the predisposition to the development of early neonatal sepsis in the newborn children of the Uzbek population and are one of the prognostic factors for the development of this pathology.

**Keywords:** newborn, early neonatal sepsis, cytokine genes, gene polymorphisms, alleles, genotypes.

поздний сепсис (ПСН). РСН клинически проявляется в первые 3–5 дней жизни, причем 85% детей с РСН разворачивают болезнь в первые 24 ч жизни, еще 5% – между 24 ч и 48 ч жизни и остальные 10% заболевают позже – на 3–5-й дни жизни [2]. Для РСН характерно внутриутробное инфицирование плода, трансплацентарное или за счет микроорганизмов, колонизирующих родовой (генитальный) тракт матери. В связи с этим у ребенка обычно отсутствует первичный гнойный очаг, зато часто выявляется внутриутробная пневмония или энтероколит.

Генетическая предрасположенность аллелей и генотипов IL-6 174 C/G (rs1800795), IL-10 G-1082A (rs1800896) и TNFα-308 G/A (rs1800629) играет важную роль в предрасположенности новорожденных к

раннему неонатальному сепсису. Метаанализ показал, что генотип IL-6-174 CC связан с более высоким риском сепсиса, а генотип IL-10-1082 AA и аллель TNF- $\alpha$ -308 A также повышают риск неонатального сепсиса, что позволяет предположить, что эти полиморфизмы могут быть потенциальными генетическими маркерами для идентификации новорожденных из группы риска [3]. Однако другое исследование не обнаружило существенной связи между полиморфизмами IL-6 rs1800795 G/C и неонатальным сепсисом, что указывает на необходимость дальнейших исследований для выяснения этих генетических связей [4]. Было показано, что использование интерлейкинов, включая IL-6, IL-8, IL-10 и IL-27, положительно влияет на выявление неонатального сепсиса, при этом IL-8 особенно точен для раннего выявления сепсиса [5]. Несмотря на потенциал этих биомаркеров, диагноз неонатального сепсиса не может быть основан на одном биомаркере из-за сложности заболевания и риска чрезмерного применения антибиотиков [6,7]. Напротив, сочетание нескольких биомаркеров или использование омических технологий может повысить точность диагностики и сократить ненужное применение антибиотиков [7,8]. Роль IL-6 в качестве диагностического маркера также подтверждается его высокой чувствительностью и отрицательной прогностической ценностью, хотя определенные пороговые значения для разных популяций новорожденных все еще необходимы [9]. Кроме того, иммунные сигналы, в том числе с участием генов, связанных с нетозом, открывают многообещающие возможности для повышения точности диагностики и разработки стратегий лечения неонатального сепсиса [10,11]. В целом, интеграция генетических данных и биомаркеров в клиническую практику может способствовать раннему выявлению и целенаправленному лечению неонатального сепсиса, улучшению исходов и снижению бремени этого состояния [3, 5,7].

#### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить распределение аллелей и генотипов IL-6 174 C/G (rs1800795), IL-10 G-1082A (rs1800896) и TNF $\alpha$  -308 G/A (rs1800629) у новорожденных с ранним неонатальным сепсисом.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 74 новорожденных с ранним неонатальным сепсисом, госпитализированных в отделение интенсивной терапии и проведен сравнительный анализ полученных результатов в сравнении с группой контроля – 66 практически здоровых детей. Иммунологические исследования проводились в отделении клеточной терапии Института иммунологии и геномики человека (д.м.н. Рузикаева М.Р.). У всех новорожденных на 3–5 сутки жизни производился забор венозной крови с последующим выделением сыворотки.

Материалом для выделения ДНК служила венозная кровь объемом 3-5 мл (для забора крови использовались вакуотайнеры Beckton-Dickinson) с анти-

коагулянт/консервант 15% трикалиевым EDTA (Ethendianin-tetraaceticacid). Кровь для дальнейшей обработки могла сохраняться до 24 часов при температуре не выше +4°C.

Для получения геномной ДНК использовали двухэтапный метод лизиса клеток крови. Дальнейшая очистка лизатов лейкоцитарной массы основана на методе спиртово-солевой обработки по S. Miller и соавт. (1988) в модификации, предложенной лабораторией Стенфордского Университета.

Генотипирование полиморфных участков генов иммунного ответа проведено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», Москва) и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Протестированы полиморфизмы IL-6 174 C/G (rs1800795), IL-10 G-1082A (rs1800896) и генотипов гена TNF $\alpha$  -308 G/A (rs1800629), SNP является ранее подтвержденными (NCBI dbSNP data base, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>).

Распределение генотипов в исследуемых полиморфных локусах было изучено с использованием логистического регрессионного анализа и с проверкой на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Учитывали соответствие больных и лиц контрольной группы по полу и возрасту. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Было проведено генотипирование IL-6 174 C/G (rs1800795) в группе при раннем сепсисе у новорожденных детей и проведен сравнительный анализ полученных результатов по сравнению с контрольной группой.

В таблице представлены полученные результаты исследований по распределению частот аллелей и генотипов гена IL-6 -174C/G у при раннем сепсисе у новорожденных детей. Как видно из таблицы 1, генотипа GG, который был выявлен в группе больных в 2,04 раза чаще, чем в контроле ( $OR = 3,254$ ;  $\chi^2 = 11,466$  ( $p = 0,000709$ ); 95% CI: 1.627 > 3.254 > 6.508), также как для аллеля G наблюдалась значимое увеличение частоты встречаемости в группе больных ( $OR = 2,321$ ;  $\chi^2 = 10,415$  ( $p = 0,00125$ ); 95% CI: 1.384 > 2.321 > 3.892). Генотип CG несет протективный эффект и встречался значимо чаще в группе контроля ( $OR = 0,394$ ;  $\chi^2 = 6,88$  ( $p = 0,008717$ ); 95% CI: 0.195 > 0.394 > 0.796). Полученные данные говорят о достаточно значимом вкладе IL-6 174 C/G (rs1800795) в развитие данной патологии, в особенности генотипа GG.

Ген IL-10 был картирован Eskdale с соавторами на длинном плече 1 хромосомы в регионе lq31-32 [14]. Ген IL-10 содержит 5 экзонов и занимает около 5,2 Кб геномной ДНК. Позже эти же исследователи обнаружили, что продукция IL-10 контролируется на транскрипционном уровне, и что полиморфизмы в 5' - фланкирующем регионе гена IL-10 могут оказывать влияние на изменение концентрации цитокинов в плазме.

Таблица 1

**Распределение аллелей и генотипов IL-6 174 C/G (rs1800795) у новорожденных детей при раннем неонатальном сепсисе**

Генотип	Больные, n=74	Больные, %	Генотип	Контроль, n=66	Контроль, %	$\chi^2$	OR (95% CI)
C	34	22,97	C	54	40,91	10.415 (p=0.00125)	0.257 >0.431> 0.722
G	114	77,03	G	78	59,09		1.384 >2.321> 3.892
CC	7	9,46	CC	11	16,67	1.617 (p=0.203461)	0.19 >0.522> 1.438
CG	20	27,03	CG	32	48,48	6.88 (p=0.008717)	0.195 >0.394> 0.796
GG	47	63,51	GG	23	34,85	11.466 (p=0.000709)	1.627 >3.254> 6.508

Примечание.  $\chi^2$  – показатель достоверности по Пирсону; OR – относительный риск

Таблица 2

**Распределение аллелей и генотипов гена IL-10 G-1082A (rs1800896) у новорожденных детей при раннем неонатальном сепсисе**

Генотип	Больные, n=74	Больные, %	Генотип	Контроль, n=66	Контроль, %	$\chi^2$	OR (95% CI)
G	90	60,81	G	88	66,67	1.033 (p=0.309425)	0.475 >0.776> 1.266
A	58	39,19	A	44	33,33		0.79 >1.289> 2.103
GG	18	24,32	GG	23	34,85	1.866 (p=0.17196)	0.289 >0.601> 1.252
GA	54	72,97	GA	42	63,64	1.411 (p=0.234874)	0.753 >1.543> 3.162
AA	2	2,70	AA	1	1,52	0.235 (p=0.628119)	0.049 >0.554> 6.252

Примечание.  $\chi^2$  – показатель достоверности по Пирсону; OR – относительный риск;

Как видно из данных таблицы 2, при исследовании распределения аллелей и генотипов IL-10 G-1082A (rs1800896) у больных в группе у новорожденных детей при раннем сепсисе и в контрольной группе не было обнаружено достоверно значимых различий в частоте встречаемости в данной выборке.

Таблица 3

**Распределение частот аллелей и генотипов гена TNF $\alpha$  -308G/A (rs1800629) у новорожденных детей при раннем неонатальном сепсисе**

SNP	Группа	Ал- лель	Частота аллеля, %	$\chi^2$	OR (95% CI)	Гено- тип	Частота геноти- па, %	$\chi^2$	OR (95% CI)
TNF $\alpha$ rs1800629	Группа боль- ных n=74	G	86,81	4.257 (p=0.039083)	0.204 >0.445> 0.975	GG	68,92	4.914 (p=0.026644)	0.172 >0.396> 0.911
		A	15,97		1.026 >2.245> 4.913	GA	31,08		1.097 >2.525> 5.813
						AA			
	Контрольная группа n=66	G	92,42			GG	84,85		
		A	7,58			GA	15,15		
						AA			

Примечание.  $\chi^2$  – показатель достоверности по Пирсону; OR – относительный риск;

Далее был проведен анализ аллельных вариантов и генотипов TNF $\alpha$  -308G/A по GG генотипу были выявлены достоверные различия между больными и контрольной группой (OR =0,396; 95% CI: 0.172 >0.396> 0.911;  $\chi^2=4.914$  (p=0.026644)). При анализе гетерозиготного генотипа GA были выявлены противоположные различия между частотой встречаемости у больных и контрольной группой (OR =2,525; 95% CI: 1.097 >2.525> 5.813;  $\chi^2=4.914$  (p=0.026644)).

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что полиморфизм -308(G/A) TNF $\alpha$  вносит вклад в предрасположенность к развитию в группе

у новорожденных детей при раннем сепсисе и также, как и IL-6 -174C/G генотип GG, играют значимую предрасполагающую роль в данной выборке.

#### ВЫВОДЫ

1. Анализ аллельных вариантов и генотипов IL-6 174 C/G (rs1800795) у новорожденных детей с ранним неонатальным сепсисом показало протективное значение аллель C и генотип CG и предрасполагающее значение имели аллель G и гомозиготный генотип GG.

2. Исследование распределения частоты встречаемости аллелей и генотипов гена IL-10 G-1082A

(rs1800896) при раннем неонатальном сепсисе у новорожденных детей узбекской популяции показало отсутствие какого-либо вклада в развитие раннего неонатального сепсиса.

3. Анализ аллельных вариантов и генотипов TNF $\alpha$  -308G/A (rs1800629) у новорожденных детей узбекской популяции при раннем неонатальном сепсисе показал predisposing значение аллель А и генотип G/A, которые встречались чаще, чем в группе контроля, в то время, генотип GG несет протекторное значение.

4. Таким образом, полученные данные говорят о том, что полиморфизмы генов IL-10 G-1082A (rs1800896) и TNF $\alpha$  -308G/A (rs1800629) вносят вклад в predisposition к развитию у новорожденных детей узбекской популяции раннего неонатального сепсиса и являются одним из прогностических факторов развития данной патологии. Полученные данные могут быть использованы в разработке прогностических маркеров патологии у детей и оптимизации тактики лечебно-профилактических мероприятий с индивидуальным подходом для каждого пациента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Самсыгина Г.А., Шабалов Н.П., Дегтярева М.В. Сепсис. Неонатология: национальное руководство. Под ред. Н.Н. Володина. М.: изд-во Геотар-Медиа, 2007: 673–687.
2. Bellid LL, Ohning BL. Neonatal sepsis. *Medicine. Neonatology. Com. Inc.*, 2006: 351–369.].
3. Liang, J., Yan, S., Wang, N., Wang, Q., Ling, H., & Ren, C. (2024). A meta-analysis of the association between inflammatory cytokine polymorphism and neonatal sepsis. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301859>
4. Zhao, X.-F., Yang, M.-F., Wu, Y., Zhao, P., Zhu, S.-Y., Xiong, F., Fan, M., & Li, Y. (2022). Erratum: Association between Interleukin-6 rs1800795 Polymorphism and Serum Interleukin-6 Levels and Full-Term Neonatal Sepsis. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1757882>
5. Xing, W., Wang, Y., Liu, J., Pei, J., & Yu, C. (2023). Role of interleukins in the detection of neonatal sepsis: a network meta-analysis. *Frontiers in Pediatrics*. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1267777>
6. Naser, M., Nasr, M. M., & Shehata, L. H. (2023). Biomarkers of Neonatal Sepsis: Review. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*. <https://doi.org/10.52155/ijpsat.v42.1.5821>
7. Boscarino, G., Migliorino, R., Carbone, G., Davino, G., Dell’Orto, V. G., Perrone, S., Principi, N., & Esposito, S. (2023). Biomarkers of Neonatal Sepsis: Where We Are and Where We Are Going. *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081233>
8. Gude, S. S., Peddi, N. C., Vuppapapati, S., Gopal, S. V., Ramesh, H. M., & Gude, S. S. (2022). Biomarkers of Neonatal Sepsis: From Being Mere Numbers to Becoming Guiding Diagnostics. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.23215>
9. Serum-Interleukin-6 zur Diagnose der Sepsis bei Früh- und Neugeborenen. (2023). *Neonatalogie Scan*. <https://doi.org/10.1055/a-2006-8485>
10. Das, A., Ariyakumar, G., Gupta, N., Kamdar, S., Barugahare, A., Deveson-Lucas, D., Gee, S., Costeloe, K., Davey, M. S., Fleming, P., & Gibbons, D. (2024). Identifying immune signatures of sepsis to increase diagnostic accuracy in very preterm babies. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44387-5>
11. Shaw, D., Santhanam, S., Som, T., Bhattacharjee, S., & Mohapatra, S. K. (2024). Decoding the Deadly Dance: NETosis Genes Predict Neonatal Sepsis Fate. <https://doi.org/10.1101/2024.09.10.24313397>