

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА МАННОЗОСВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛЕКТИНА У НОВОРОЖДЕННЫХ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ КРАЙНЕГО СЕВЕРА РОССИИ КАК ФАКТОР ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ТЯЖЕЛОМУ ТЕЧЕНИЮ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Смольникова М.В., Зобова С.Н., Терещенко С.Ю.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, e-mail: smarinv@ya.ru

Проведена оценка распределения частот генотипов, предрасполагающих к тяжелому течению бактериальных инфекций в различных этнических популяциях новорожденных коренных национальностей Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края на основе анализа полиморфизма гена маннозосвязывающего лектина (MBL2). Для оценки распределения частот однонуклеотидных полиморфизмов (использованы 586 проб сухой капли крови новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска). Для выделения ДНК использован набор DIAtom™ DNAPrep. Генотипирование аллельных вариантов генов MBL2 осуществлено методом рестриктоного анализа продуктов амплификации. Установлено, что у новорожденных ненецкой и долгано-нганасанской популяций статистически значимо реже встречаются генотипы, ассоциированные с дефектной структурой маннозосвязывающего лектина (AB и BB генотипы полиморфного участка rs1800450 гена MBL2) в сравнении с новорожденными-европеоидами г. Красноярска.

Ключевые слова: новорожденные, маннозосвязывающий лектин (MBL2), полиморфизм генов, этнические особенности, Арктика.

MANNOSE-BINDING LECTIN GENE POLYMORPHISM IN RUSSIAN FAR NORTH ABORIGINAL NEWBORNS AS FACTOR PREDISPOSING TO SEVERE COURSE OF BACTERIAL INFECTIONS

Smolnikova M.V., Zobova S.N., Tereshchenko S.Yu.

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, e-mail: smarinv@ya.ru

We have done the estimation of the genotypes frequency predisposing to severe course of bacterial infections in different ethnic populations of indigenous newborns in Russian Arctic region on the basis of analysis of mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphism. We studied the prevalence of the two common deleterious variants (rs1800451 and rs1800450) in aboriginal and alien populations of the Taymyr-Dolgan-Nenets Region of Krasnoyarskiy Kray, East Siberia, Russia (Nenets, Dolgans, Nganasans, Russians) using 586 dry blood spots. DNA was extracted using DIAtom™ DNAPrep kits. Genotyping was carried out using restriction fragment lengths polymorphism (RFLP) approach. It was found that Dolgan-Nenets and Nenets newborns have significantly less common genotypes associated with defective structure mannose-binding lectin (AB and BB genotypes in rs1800450 MBL2 gene) compared with newborns-Caucasians (Krasnoyarsk).

Keywords: newborns, mannose-binding lectin (MBL2), gene polymorphism, ethnic characteristics, the Arctic.

Младенческая смертность детей коренного населения северных регионов остается крайне высокой, несмотря на значительные положительные изменения в организации медицинской помощи и финансовые вложения. Такая ситуация характерна не только для России, но и для других стран арктического присутствия (США, Канада, Норвегия). В последние годы усилия отдельных исследовательских центров привлекли генетически обусловленные особенности метаболизма и иммунного реагирования у детей коренного населения северных территорий, которые могут способствовать тяжелому течению распространенных инфекционных заболеваний, с повышенным риском летального исхода [4].

В 2014 году нами в рамках выполнения научно-исследовательского проекта по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации» была установлена высокая распространённость гена СРТ1А дефицита (мутации с.1436С/Т), позволяющая предположить распространённость метаболического дефекта, как 1 на 1000 новорожденных в популяции долган и нганасан. Для органов практического здравоохранения была предложена специально разработанная программа выявления новорождённых и разработан комплекс профилактических мероприятий, позволяющий предупредить развитие метаболических кризов [10].

В то же время метаболические дефекты, по всей вероятности, не являются единственным наследуемым этнически-ассоциированными факторами, повышающими риск ранней младенческой смертности у детей коренного населения Арктических регионов. Вполне обоснованным выглядит предположение о наличии наследуемых дефектов иммунного реагирования, также предрасполагающих к тяжелому течению инфекционных заболеваний [1].

Маннозосвязывающий лектин (Mannose-binding lectin, MBL) – паттерн-распознающий острофазовый белок, относящийся к системе врожденного иммунитета и активно участвующий в элиминации широкого круга патогенных микроорганизмов посредством активации системы комплемента и опсонизации. Значительная часть человеческой популяции имеет врожденно низкий уровень продукции и/или низкую функциональную активность MBL вследствие носительства различных вариантов гена MBL2, что потенциально увеличивает предрасположенность к более тяжелому течению самых разнообразных инфекционных заболеваний.

Основная часть MBL образуется в печени и с током крови попадает в очаг бактериальной инсеминации, однако очень небольшая его часть также может продуцироваться и непосредственно некоторыми локальными тканевыми структурами. В плазме крови и в тканях отдельные молекулы MBL образуют олигомерные комплексы, что необходимо для оптимального функционирования протеина. К настоящему времени нет доказательств продукции MBL тканями лёгких и считается, что весь пул легочного MBL имеет плазменное происхождение. Концентрация MBL в плазме крови варьирует от 0 до 7.9 мкг/мл, в жидкости бронхоальвеолярного лаважа – 0.015-0.019 мкг/мл. Условным критерием дефицита MBL в настоящее время принято считать его плазменный уровень ниже 0.5 мкг/мл или, что считается надежнее, ниже 0.2 мкг/мл в депозитах комплемента, что отражает непосредственную функциональную активность белка. Важно отметить, что функция MBL может быть нарушена и при его условно нормальных плазменных уровнях вследствие

генетически детерминированных нарушений молекулярной конформации белковых субъединиц.

Было показано, что отдельные полиморфизмы структурной части гена MBL2 (дикий аллель – А, с вариантами В, С, D, суммарно, О) ассоциированы с низкой функциональной способностью MBL активировать комплемент, а полиморфизмы промоторной части гена (Н/Л и Х/У) ассоциированы с низким плазменным уровнем MBL.

Единой точки зрения на однозначный лабораторный критерий врожденного дефицита MBL в настоящее время нет: разные авторы используют различные точки разделения. Если за точку разделения принять упомянутый уровень MBL в плазме крови 0.5 мкг/мл, то около 20–25 % населения будут признаны дефицитными, причем у 8 % MBL в плазме крови вообще не определяется [2].

В экспериментах было убедительно показано накопление MBL в депозитах комплемента (что доказывает его активную элиминационную роль) при инфекциях вызванных такими возбудителями, как *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium complex*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* и др. В то же время, результаты изучения защитной роли MBL для таких актуальных для респираторного тракта возбудителей, как *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, довольно противоречивы [2]. Считается, что наличие капсулы у *Streptococcus pneumoniae* препятствует связыванию MBL с бактерией и резко снижает его комплемент-активирующий эффект.

Значительное число исследований было посвящено вопросу ассоциативной связи MBL дефицита и внебольничной пневмонии. Так, в мета-анализе D.P. Eisen et al. [3] было показано увеличение риска летального исхода у пациентов с пневмококковым сепсисом, имевших плазменный уровень MBL < 0.5 мкг/мл. Такая зависимость сохранялась после поправки на пневмококковую бактериемию и коморбидные заболевания. Определенные гаплотипы промотора гена MBL2 были ассоциированы с высоким риском заболеваний нижних дыхательных путей у финских военнослужащих [7]. В то же время, недавнее исследование L.F. Lundbo et al. не показало наличие ассоциативной связи полиморфизма гена MBL2 с инвазивными пневмококковыми инфекциями у детей [6].

Есть некоторое количество экспериментальных данных, доказывающих распознающую функцию MBL в отношении вирусов [2]. Отдельные наблюдения показывают, что MBL дефицит предрасполагает к более тяжелому течению респираторно-синцитиальной инфекции у детей [9]. Иранские авторы недавно показали связь дефицита MBL с рецидивирующими инфекциями респираторного тракта [8]. Такая связь была подтверждена и английскими исследователями в 2016 году [5].

К настоящему времени исследований, посвященных изучению распространенности генетического дефекта продукции и функциональной активности MBL у детей коренных национальностей Российских арктических территорий, не проведено, несмотря на повышенный уровень младенческой смертности в этих популяциях и значительную вероятность выявления высокой распространенности указанных иммунодефицитных состояний.

Цель исследования: Выявить распределение частот генотипов, предрасполагающих к тяжелому течению бактериальных инфекций в различных этнических популяциях новорожденных коренных национальностей Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края на основе анализа полиморфизма генов маннозосвязывающего лектина.

Материал и методы исследования

Для оценки распределения частот однонуклеотидных полиморфизмов использованы 582 проб сухой капли крови новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска из банка КГУЗ «Красноярский краевой консультативно-диагностический центр медицинской генетики». Для выделения ДНК использован набор D1Atom™ DNA Prep, позволяющий выделять ДНК из различных материалов, в том числе из пятен крови («Центр молекулярной генетики», Москва).

Для анализа этнических различий было сформировано 4 группы новорожденных: 1 – арктический регион проживания матери, из поселков с преимущественно ненецким населением (125 новорожденных; поселки Носок, Тухард; 85 % коренных жителей – ненцы); 2 – арктический регион проживания матери, из поселков с преимущественным долгано-нганасанским населением (90 новорожденных; поселки Сындаско, Катарык, Новая, Левинские пески; 91 % коренных жителей – долган-нганасан); 3 – арктический регион проживания матери, из поселков со смешанным населением с различным сочетанием коренных и пришлых жителей (165 новорожденных; поселки Новорыбная, Усть-Авам, Волочанка, Жданиха, Попигай, Воронцово, Хантайское озеро, Кресты, Хатанга, Усть-Порт, Байкаловск, Караул, Усть-Енисейск); 4 – новорожденные города Красноярска, преимущественно европеоиды, этническая принадлежность определена по паттерну фамилии матери (202 новорожденных).

Генотипирование аллельных вариантов гена MBL2 осуществлено методом рестриктового анализа продуктов амплификации (ПДРФ – анализ) специфических участков генома. Амплификация фрагмента ДНК генов проводилась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими олигонуклеотидными праймерами, фланкирующими участок гена, содержащий полиморфизм. Гидролиз полученного фрагмента ДНК осуществлен с помощью специфических эндонуклеаз рестрикции.

Исследуемые мутации в гене MBL2: codon 57 (rs11800451), codon 54 (rs1800450), находятся в 1 экзоне и амплифицировались с использованием пары праймеров 5'-TAGGACAGAGGGCATGCTC-3' и 5'-CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3', температура отжига составляла 60С, амплифицируемый фрагмент составлял 349 пар оснований. Для гидролиза использовались эндонуклеазы рестрикции *Mbo II* (rs11800451) и *AccBI I* (rs1800450). Далее проводилось электрофоретическое разделение продуктов рестрикции и визуализация генотипов в ультрафиолетовом свете.

Статистический анализ проведен с помощью теста хи-квадрат и формулы Hardy-Weinberg. Данные представлены в виде относительных частот распространенности мутации и их 95 % доверительных интервалов (ДИ).

Результаты исследования и их обсуждение

В отношении полиморфного участка rs1800451 гена MBL2 вариантный аллель был выявлен только в одном случае среди всех обследованных: у одного новорожденного в популяции г. Красноярска был выявлен генотип СС, во всех остальных образцах ДНК новорожденных арктического региона и г. Красноярска был установлен генотип АА. Согласно имеющимся у нас данным литературного поиска, крайне редкая встречаемость аллеля С в 57 кодоне гена MBL2 (1 гомозигота на 582 обследованных, частота встречаемости аллеля С – 0.0034) впервые на эпидемиологическом уровне описана нами в настоящем исследовании для различных Российских популяций: коренных жителей арктических регионов и европеоидов Центральной Сибири.

При анализе частот распределения генотипов полиморфного участка rs1800450 гена MBL2 нами установлено, что в обеих популяциях коренных жителей Арктики статистически значимо реже, чем в европеоидной популяции г. Красноярска, встречался вариантный аллель В, ассоциированный с дефектной структурой протеина MBL2 (таблица). При этом частота В аллеля в смешанной (коренные/пришлые) популяции новорожденных от матерей, проживающих в арктическом регионе, занимает промежуточное положение между аборигенной и европеоидной популяциями.

Так, частота гомозиготного генотипа ВВ у новорожденных ненцев составила 1.6 % (OR=0.13, CI=0.03-0.58, p=0.002 в сравнении с европеоидами), долган-нганосан – 1.1 % (OR=0.09, CI=0.01-0.69, p=0.004 в сравнении с европеоидами), смешанной арктической популяции – 6.1 %, а у европеоидов г. Красноярска – 10.9 %. При анализе частоты встречаемости вариантного аллеля В обращает на себя внимание, что в популяции ненцев были зарегистрированы меньшие значения в сравнении с долган-нганосанами, что, однако, не достигало уровня статистической значимости.

Распределение MBL2 генотипов у новорожденных различных национальностей Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска, абс. (%)

MBL2 генотип		Ненцы (n=125)	Долганы- нганасаны (n=90)	Смешанная арктическая популяция (коренные/ пришлые) (n=165)	Европеоиды (Красноярск) (n=202)	p*
		1	2	3	4	
rs1800450 (g.1052G>A) (p.Gly54Asp)	AA	108 (86.4%)	72 (80.0%)	126 (76.3%)	145 (71.8%)	1,2-4=0.007 1-3<0.001
	AB	15 (12.0%)	17 (18.9%)	29 (17.6%)	35 (17.3%)	1,3-4=0.001 2-4=0.005
	BB	2 (1.6%)	1 (1.1%)	10 (6.1%)	22 (10.9%)	1-4=0.002 2-4=0.004
	B**	0.15	0.21	0.30	0.39	1-3=0.004 1-4<0.001 2-4=0.007

Примечание: * – представлены только данные с $p \leq 0.05$; ** – в строке представлены частоты вариантного аллеля В в изученных популяциях.

Таким образом, проведенное исследование показало, что распределение частот генотипов гена MBL2 различается у детей коренных национальностей Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и европеоидов г. Красноярска. Установлено, что у новорожденных ненецкой и долгано-нганосанской популяций статистически значимо реже встречаются генотипы, ассоциированные с дефектной структурой маннозосвязывающего лектина (AB и BB генотипы полиморфного участка rs1800450 гена MBL2).

Хотелось бы отметить, что ранее нами впервые в России была проведена оценка распространенности мутации гена карнитин пальмитоилтрансферазы CPT1A, с.1436C/T (P479L, известная как «арктический вариант») у новорожденных коренного населения Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска (изученные национальности – долганы, нганасаны, ненцы, русские). Реализация проекта позволила впервые определить частоту «арктического варианта» гена CPT1A дефицита: было установлено, что не менее 7 % новорожденных, относящихся к популяции долган-нганасан, являются носителями дефектного гена CPT1A дефицита [10]. В популяции ненцев не было выявлено случаев носительства мутации P479L. Поскольку носители мутации P479L

предрасположены к более тяжелому течению инфекционных заболеваний в раннем возрасте и принимая во внимания результаты настоящего исследования можно уверенно предполагать, что долгано-нганосанская популяция в большей степени подвержена тяжелому и прогностически неблагоприятному течению инфекционных заболеваний в раннем детском возрасте, что может напрямую влиять на показатели младенческой смертности в этой этнической группе.

Выводы

1. Установлено, что у новорожденных ненецкой и долгано-нганосанской популяций статистически значимо реже встречаются генотипы, ассоциированные с дефектной структурой маннозосвязывающего лектина (AB и BB генотипы полиморфного участка rs1800450 гена MBL2) в сравнении с новорожденными-европеоидами г. Красноярск.
2. Впервые на эпидемиологическом уровне описана крайне редкая встречаемость аллеля C в 57 кодоне гена MBL2 (rs1800451) для различных Российских популяций: коренных жителей арктических регионов и европеоидов Центральной Сибири.

Список литературы

1. Baker C., Antonovics J. Evolutionary determinants of genetic variation in susceptibility to infectious diseases in humans // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. e29089.
2. Eisen D.P. Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection // J Innate Immun. – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 114-122.
3. Eisen D.P., Dean M.M., Boermeester M.A. et al. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection // Clin Infect Dis. – 2008. – Vol. 47, № 4. – P. 510-516.
4. Gessner B.D., Wood T., Johnson M.A. et al. Evidence for an association between infant mortality and homozygosity for the arctic variant of carnitine palmitoyltransferase 1A // Genet Med. – 2016. – Vol. 18, № 9. – P. 933-939.
5. Holdaway J., Deacock S., Williams P., Karim Y. Mannose-binding lectin deficiency and predisposition to recurrent infection in adults // J Clin Pathol. – 2016. Published Online First: 02 February 2016. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203065.
6. Lundbo L. F., Harboe Z. B., Clausen L. N. et al. Mannose-binding lectin gene, MBL2, polymorphisms are not associated with susceptibility to invasive pneumococcal disease in children // Clin Infect Dis. – 2014. – Vol. 59, № 4. – P. e66-71.
7. Rantala A., Lajunen T., Juvonen R. et al. Mannose-binding lectin concentrations, MBL2 polymorphisms, and susceptibility to respiratory tract infections in young men // J Infect Dis. –

2008. – Vol. 198, № 8. – P. 1247-1253.

8. Rashidi E., Fazlollahi M.R., Zahedifard S. et al. Mannose-binding Lectin Deficiency in Patients with a History of Recurrent Infections // Iran J Allergy Asthma Immunol. – 2016. – Vol. 15, № 1. – P. 69-74.

9. Ribeiro L.Z., Tripp R.A., Rossi L.M. et al. Serum mannose-binding lectin levels are linked with respiratory syncytial virus (RSV) disease // J Clin Immunol. – 2008. – Vol. 28, № 2. – P. 166-173.

10. Tereshchenko S.Y., Smolnikova M.V. A Pilot Study of Inherited Carnitine Palmitoyltransferase Deficiency as an Ethnogenetic Risk Factor of Infant Mortality in Indigenous Populations of the Far North // Human Physiology. – 2016. – Vol. 42, № 2. – P. 145-149.