



## ИММУНОЛОГИЯ. ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-209-217

### ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ HBD-1 И HBD-2 В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СЛИЗИСТОЙ ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА У НОВОРОЖДЕННЫХ С ПНЕВМОНИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭТИОЛОГИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Н.Д. Рассказова<sup>1</sup>, А.И. Алиева<sup>2</sup>, Л.В. Ганковская<sup>3</sup>,  
П.В. Жигалкина<sup>1,4</sup>, О.А. Свитич<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

<sup>2</sup>Дагестанский государственный медицинский университет, Махачкала, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>4</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

$\beta$ -дефенсины играют важную роль в защите плода от инфекции, поэтому экспрессия этих антимикробных пептидов в респираторном тракте у новорожденных имеет особое значение. В связи с этим мы поставили перед собой задачу изучить экспрессию генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках слизистой верхних отделов респираторного тракта у новорожденных с пневмонией, а также у здоровых новорожденных в зависимости от этиологии возбудителя. Также была проведена ассоциация полиморфного маркера  $G(-20)A$  в гене *DEFB1* с инфекционной патологией новорожденных (в частности с пневмонией).

**Методы:** Было проведено исследование микрофлоры и факторов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у двух групп: новорожденные с ВУП и ВАП. Биологическим материалом послужили соскобы клеток эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей новорожденных и родильниц, а также кровь.

**Результаты:** Показано, что экспрессия гена HBD-2 увеличивается в 2,3 раза у детей, у которых определяется инфекционный возбудитель, но при этом отсутствуют клинические проявления пневмонии. Также показано достоверное снижение показателя HBD-2 (в 3,2 раза) у пациентов с пневмонией, вызванной *K. pneumoniae*. Частоты аллелей гена *DEFB1* в группе с внутриутробным инфицированием плода и в группе сравнения были следующими: аллель  $G$  — 0,66, 0,79, аллель  $A$  — 0,34, 0,21 соответственно. Частоты генотипов исследуемого маркера у матерей в группе ВАП, и группе сравнения были следующими:  $GG$  — 0,78, 0,58, 0,58;  $AA$  — 0, 0,25, 0;  $AG$  — 0,22, 0,17, 0,42 соответственно.

У новорожденных среди аллелей доминировал аллель  $G$  (частота была выше 0,73 во всех группах) и генотип  $GG$  (частота превышала 0,52).

**Вывод:** В ходе исследования подтвердилось, что  $\beta$ -дефенсины осуществляют защиту слизистых от инфекционных возбудителей. Полученные результаты указывают на то, что генетический маркер  $G(-20)A$  гена *DEFB1* ассоциирован с риском развития ВУИ ребенка.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, дефенсины, пневмония новорожденных

Ответственный за переписку:

Свитич Оксана Анатольевна, чл-корр. РАН, д.м.н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, 105064, Малый Казенный пер., 5 А, E-mail: svitichoa@yandex.ru.

**Для цитирования:**

Рассказова Н.Д., Алиева А.И., Ганковская Л.В., Жигалкина П.В., Свитич О.А. Изучение экспрессии генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках слизистой верхних отделов респираторного тракта у новорожденных с пневмонией в зависимости от этиологии возбудителя // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2018. Т. 22. No 2. С. 209—217. DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-209-217.

**For citation:**

Rasskazova N.D., Alieva A.I., Gankovskaya L.V., Zhigalkina P.V., Svitich O.A. (2018). Study of expression of HBD-1 and HBD-2 genes in epithelial cells of mucous upper airway in newborns with pneumonia depending on the causative agent. *RUDN Journal of Medicine*, 22 (2), 209—217. DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-209-217.

Патология дыхательной системы новорожденных является одной из самых распространенных причин детской смертности. Известно, что в последние годы одной из главных социальных проблем является пневмония новорожденных [1—3]. В 2015 году было зарегистрировано 921 000 случаев смерти детей в возрасте до пяти лет, причиной чего стала именно пневмония [4, 5]. М.Л. Фауон с соавторами показал, что к основным факторам риска развития пневмонии у детей, находящихся на ИВЛ, является инфекция [1, 6]. Также было высказано предположение, что среди факторов, которые могут привести к развитию пневмонии, немаловажное значение играет иммунодефицитное состояние [1, 7, 8].

Известно, что экспрессия  $\beta$ -дефензинов в респираторном тракте имеет особое значение у новорожденных, так как эти пептиды способствуют защите плода от инфекции. Имеются единичные работы по экспрессии гена HBD-1 и HBD-2 в респираторном тракте у детей [9—12].

Известно, что дефенсины осуществляют защиту слизистых от инфекционных возбудителей, при этом HBD-1 конститутивно вырабатывается на уровне слизистой верхних дыхательных путей, а HBD-2 — индуцибельно, т.е. под действием инфекционных патогенов [13—15]. В связи с этим мы поставили перед собой задачу

изучить экспрессию генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках слизистой верхних отделов респираторного тракта у новорожденных с пневмонией в зависимости от этиологии возбудителя, а также у здоровых новорожденных.

R.J. Jurevic с соавторами предположил, что изменения в экспрессии противомикробных пептидов (в частности дефензинов) могут быть связаны с различной восприимчивостью к инфекционным агентам и, как следствие, нарушением процессов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек [16]. Известно, что HBD-1 в основном экспрессируется конститутивно, и значит, полиморфизмы могут потенциально влиять на фоновый уровень экспрессии [17—18]. Однонуклеотидная замена может изменить эффективность транскрипции и трансляции, так же как изменить аминокислотную последовательность, последующую структуру белка и его функцию. До настоящего времени ассоциация полиморфного маркера  $G(-20)A$  в гене *DEFB1* с инфекционной патологией новорожденных (в частности с пневмонией) не исследовалась, поэтому в данном исследовании был выбран полиморфный маркер  $G(-20)A$  гена *DEFB1*, расположенный в нетранслируемой области. Предположительно этот SNP может влиять на уровень экспрессии гена дефенсина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было проведено изучение микрофлоры, а также факторов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных. Исследование было одобрено комиссией по вопросам этики ДГМУ. От родителей (опекунов) всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Пациенты были разделены на две группы: новорожденные с внутриутробной пневмонией (ВУП) и новорожденные с вентилятор-ассоциированной пневмонией (ВАП).

Биологическим материалом послужили соскобы клеток эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей новорожденных и родильниц, а также кровь.

Для определения уровня экспрессии генов в группе здоровых новорожденных забор эпителиальных клеток слизистой оболочки производился из верхних дыхательных путей. Образцы хранили при температуре минус 70 °С. Материал эпителиальных клеток в последующем использовался для определения уровня экспрессии интересующих нас генов.

Из клинического материала выделяли ДНК и РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор «Ампли ПРАЙМ Рибо-сорб» (Интер Лаб Сервис, РФ) строго в соответствии с протоколом. Концентрацию полученных нуклеиновых кислот и их чистоту оценивали с помощью микроспектрофотометра Nano Drop 2000. Полученная РНК служила матрицей для синтеза кДНК путем проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) с использованием фермента ревертазы. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя «Набор для про-

ведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени. Следующим этапом был определен уровень экспрессии исследуемых генов, используя метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили с использованием «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», РФ. Последовательности праймеров представлены в ранних работах коллектива [20]. Системы для определения экспрессии исследуемых генов были отработаны ранее на кафедре иммунологии МБФ [20]. Реакцию ПЦР-РВ проводили на ПЦР-амплификаторе (ДТ-96, «НПО ДНК-Технология», РФ) в температурно-временном режиме 95,0 °С — 4 мин, (94,0 °С — 20 сек, T<sub>m</sub> — 40 сек) 40 циклов. После проведения ПЦР-РВ получали зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов амплификации.

Определение количества копий исследуемых генов производился по калибровочным прямым, ранее разработанным на кафедре иммунологии МБФ [2]. Стандартизация результатов ПЦР-РВ, полученных в процессе исследования, проводили относительно уровня экспрессии гена *β-актина*. Для каждого образца получали значение логарифма числа копий исследуемого гена и числа копий гена *β-актина* для нормировки результатов. Количество копий определяемого гена в дальнейшем пересчитывалось относительно 1 млн копий гена *β-актина*. Для генетических исследований использовали ДНК, на которой непосредственно ставили реакцию ПЦР-РВ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

У большинства новорожденных были выделены грамотрицательные микроорганизмы (93%), среди которых преобладали энтеробактерии

(79%). Энтеробактерии, в свою очередь, были преимущественно представлены *K. pneumonia* (33%), *E. coli* (24%) и *P. aeruginosa* (22%). Среди грампозитивных возбудителей в основном были выявлены коагулазоотрицательные стафилококки, среди которых преобладали гемолитические *S. epidermidis*, обладающие гемолитическими свойствами (26%). При затяжном течении НП основным возбудителем являлась *Stenotrophomonas maltophilia*. Пневмония, обусловленная *K. pneumoniae*, у большинства имела острое течение. Проявления инфекционного токсикоза были менее выраженными, чем при НП другой этиологии.

У половины новорожденных в периферической крови наблюдался лейкоцитоз и редко сопровождался сдвигом формулы влево и наличием токсической зернистости нейтрофилов, тромбоцитопения отмечалась только у 2 детей. При НП, вызванной *P. aeruginosa*, чаще, чем при других, отмечался геморрагический синдром, который клинически проявлялся в виде легочного кровотечения (у 10 из 35 детей). В 2,5 раза чаще, чем в целом по всей группе, отмечалось развитие пневмоторакса. Именно при этих пневмониях была самая высокая летальность (умерло 10 детей).

У детей пневмония, возбудителем которой являлась *E. coli*, чаще протекала с выраженными проявлениями инфекционного токсикоза, чем в других группах детей. Отмечались значительные воспалительные сдвиги в периферической крови у 5 детей в виде лейкоцитоза (в среднем  $45,6 \pm 8,6 \times 10^9$  г/л), токсической зернистости нейтрофилов, повышение уровня С-реактивного белка и анемия. Именно при этих пневмониях осложнения в виде бронхолегочной дисплазии наблюдаются в 3 раза чаще, чем при НП другой этиологии. При данной этиологии пневмоний летальных исходов не было. При НП, вызванных *S. epidermidis*, более чем у двух третей детей наблюдались тяжелые формы и острое течение

(у 12 из 15 детей). Летальность в этой группе составила 20% (умерло 3 детей).

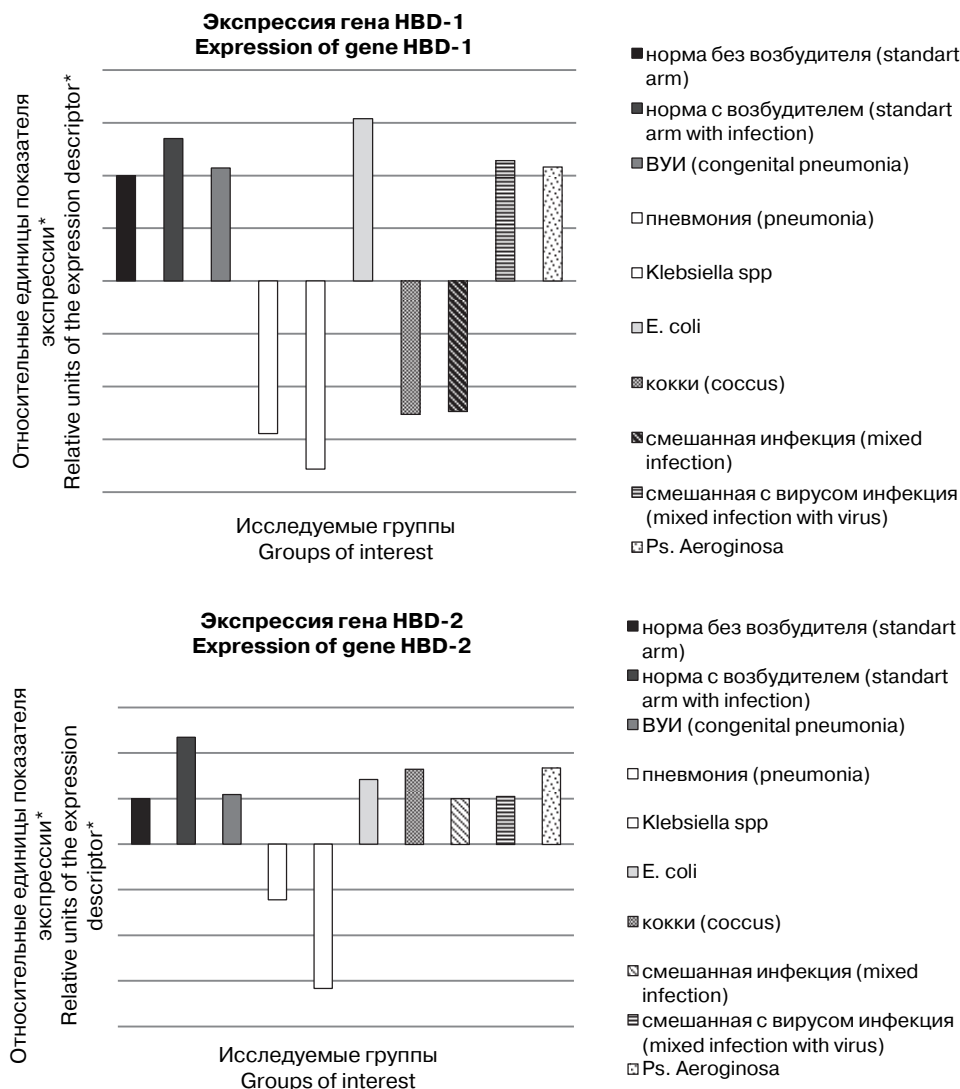
Показано, что экспрессия гена HBD-2 увеличивается в 2,3 раза у детей, у которых определяется инфекционный возбудитель, но при этом отсутствуют клинические проявления пневмонии. Также показано достоверное снижение показателя HBD-2 (в 3,2 раза) у пациентов с пневмонией, вызванной *K. pneumonia*. Показатели HBD-1 во всех исследуемых группах менялись недостоверно (рис. 1).

Анализ же частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G(-20)A* у матерей в исследуемых группах выявил некоторые достоверные различия. Так, частоты аллелей данного маркера в группе с внутриутробным инфицированием плода и в группе сравнения были следующими: аллель *G* — 0,66, 0,79, аллель *A* — 0,34, 0,21 соответственно. Частота аллелей у матерей, у которых родились дети с ВУП, достоверно не отличались от таковых в группе сравнения. Таким образом, аллель *A*, определяемая у матерей, является маркером ВУП.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G(-20)A* гена *DEFB1* у матерей и у новорожденных во всех исследуемых группах представлены в табл. 1.

Частоты генотипов исследуемого маркера у матерей в группе ВАП, ВУП и группе сравнения были следующими: *GG* — 0,78, 0,58, 0,58; *AA* — 0, 0,25, 0; *AG* — 0,22, 0,17, 0,42 соответственно (рис. 2А). Было выявлено, что риск развития внутриутробного инфицирования плода ассоциирован с генотипом *AA* у матерей, а генотип *AG* является «протективным».

У новорожденных также проводили исследование ассоциации маркера *G(-20)A* гена *DEFB1* с риском развития ВАП и ВУИ. Среди аллелей доминировал аллель *G* (частота была выше 0,73 во всех группах) и генотип *GG* (частота превышала 0,52). Такая же тенденция была определена и у матерей. Однако ассоциаций аллелей и генотипов маркера *G(-20)A* у новорожденных с патологией не было выявлено (табл. 1, рис. 2).



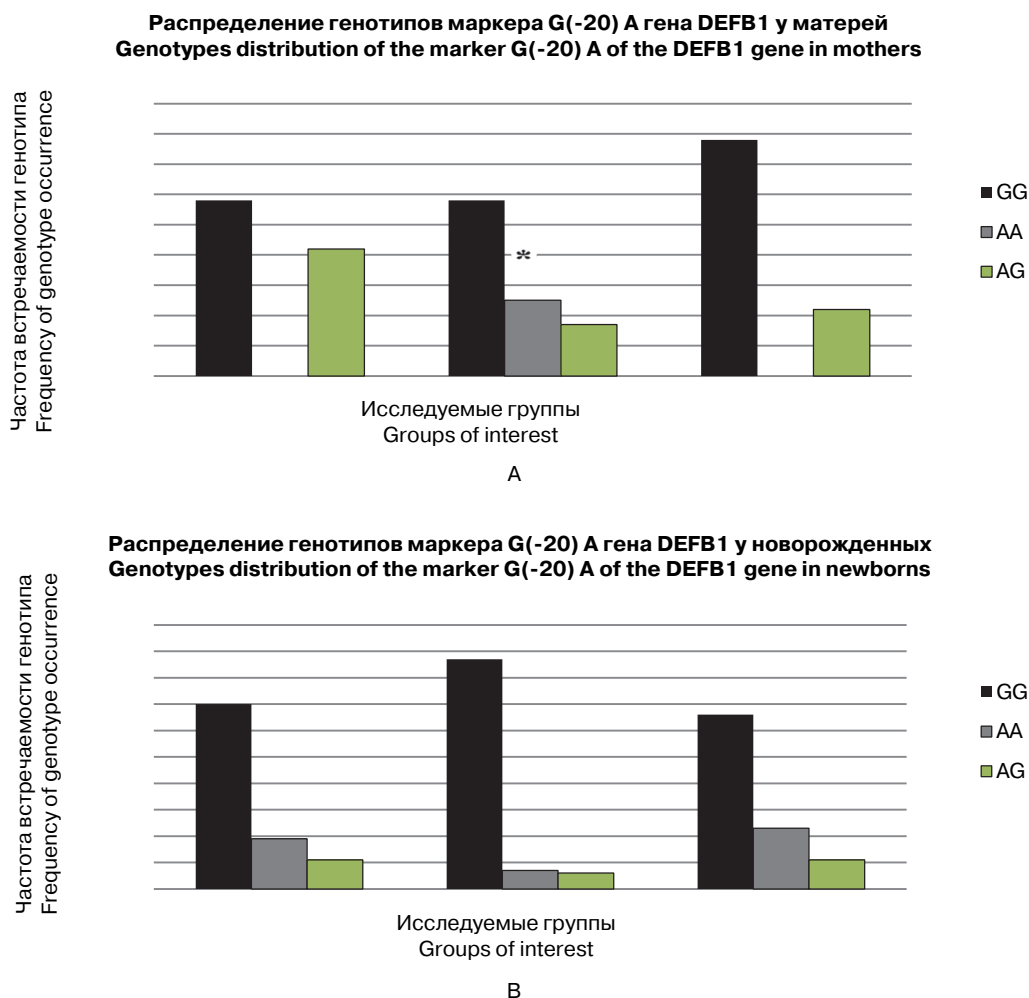
**Рис. 1.** Экспрессия генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей новорожденных с ВУП и ВАП / **Fig. 1.** Expression of genes HBD-1 and HBD-2 in epithelial cells of the upper airway in newborns with ventilator-associated and congenital pneumonia

Примечание: \*показатель в опытной группе относительно показателя в группе сравнения / Note: \*descriptor in the experimental group apropos the descriptor in the comparison group

Таблица 1 / Table 1

**Распределение аллелей и генотипов маркера G(-20)A гена DEFБ1 у матерей и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения / Alleles distribution and genotypes of the marker G (-20) A of the DEFБ1 gene in mothers and newborns in groups with congenital pneumonia, with early neonatal pneumonia and in the comparison group**

Матери / Mothers	G	A	p	GG	AA	AG	p
Норма / Control	0,79	0,21	—	0,58	0,00	0,42	—
ВУП / congenital pneumonia	0,66	0,34	<0,05	0,58	0,25	0,17	<0,05
РНП / early neonatal pneumonia	0,89	0,11	0,05	0,78	0,00	0,22	0,05
Новорожденные / Newborns	G	A	p	GG	AA	AG	p
Норма / Controle	0,73	0,27	—	0,52	0,05	0,43	—
ВУП / congenital pneumonia	0,75	0,25	0,05	0,55	0,06	0,39	0,05
РНП / early neonatal pneumonia	0,79	0,21	0,05	0,62	0,03	0,35	0,05



**Рис. 2.** Распределение генотипов маркера G(-20)A гена DEFБ1 у матерей (А) и новорожденных (В) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения / **Fig. 2.** Genotypes distribution of the marker G(-20)A of the DEFБ1 gene in mothers (A) and newborns (B) in groups with congenital pneumonia, with early neonatal pneumonia and in the comparison group  
 Примечание: \* — частота генотипа достоверно отличается от показателя в группе сравнения ( $p < 0,05$ ) /   
 Note: \* — the genotype frequency significantly differs from that in the comparison group ( $p < 0,05$ )

Полученные результаты указывают на то, что генетический маркер G(-20)A гена DEFБ1 ассоциирован с риском развития ВУИ ребенка. Это может быть связано с низкими показателями экспрессии этого гена и со сниженной защитой организма матери и, как следствие, происходит инфицирование плода. Ранее другими учеными было показано, что преждевременные роды связаны со сниженным уровнем экспрессии гена  $\beta$ -дефенсина-1. Исследуемые полиморфные маркеры не приводят к изменению структуры белка, одна-

ко существуют данные о том, что SNPs могут быть связаны с уровнем экспрессии гена дефенсина [20].

Известно, что индивидуальные реакции организма, обусловленные его генетическими особенностями, определяют развитие заболевания примерно на 20—40% [21]. В ходе данной работы были получены данные, которые являются основанием для прогнозирования и диагностики внутриутробной инфекции на ранних стадиях, что сделает возможным выявление групп риска, подверженных данной патологии, и проведение

клинико-лабораторного контроля. Внедрение алгоритма диагностики данной патологии в практику акушерских стационаров и перинатальных центров позволит снизить частоту осложнений беременности, перинатальной заболеваемости и смертности.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Fayon M.J. et al.* Nosocomial pneumonia and tracheitis in a pediatric intensive care unit: a prospective study // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997. V. 155. № 1.
2. *Wang Y.J., Liu J., Fang F. et al.* Microbiological etiology in children with community acquired pneumonia // *Zhongguo Dang Dai ErKeZaZhi*. 2010. Vol. 12, N 3. P. 184—187.
3. *Свитич О.А., Алиева А.И., Рассказова Н.Д., Семенова Е.А., Малушенко С.В., Ганковская Л.В.* Исследование ассоциации полиморфных маркеров в генах TLR9, TNF И DEFB1 с преждевременными родами инфекционного генеза и с развитием пневмонии у новорожденных // *Российский иммунологический журнал*. 2014. Т. 8(17). № 3. С. 871—873.
4. *Liu L., Oza S., Hogan D., Chu Y., Perin J., Zhu J., et al.* Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000—15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016; 388(10063): 3027—3035. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8.
5. *Becker-Dreps S., Blette B., Briceño R., Alema'n J., Hudgens M.G., Moreno G., et al.* (2017) Changes in the incidence of pneumonia, bacterial meningitis, and infant mortality 5 years following introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in a “3+0” schedule. *PLoS ONE* 12(8): e0183348.
6. *Алиева А.И., Свитич О.А., Рассказова Н.Д., Ганковская Л.В.* Клинико-микробиологические и иммунологические (TLR2, TLR4) особенности новорожденных, находящихся на искусственной вентиляции легких // *Ученые записки Орловского государственного университета*. 2014. № 7(63). С. 116—117.
7. *Хашукоева А.З., Свитич О.А., Маркова Э.А., Отдельнова О.Б., Хлынова С.А.* Фотодинамическая терапия — противовирусная терапия? История вопроса. Перспективы применения // *Лазерная медицина*. 2012. Т. 16. № 2. С. 63—67.
8. *Лабжин П.А., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Зверев В.В.* Оценка экспрессии генов компонентов врожденного иммунитета в лейкоцитах мышей при действии синтетических лигандов in vivo // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013. № 6. С. 76—80.
9. *Gankovskaya L.V., et al.* Innate immunity gene expression by epithelial cells of upper respiratory tract in children with adenoid hypertrophy // *AurisNasus Larynx* (2018).
10. *Ганковская Л.В., Ковальчук Л.В., Гусева М.Р., Ганковская О.А., Воробьева Ю.А., Джамбинова Н.С., Гаврилова Т.В.* Экспрессия генов tlr9 и hbd-2 клетками конъюнктивы и роговицы у детей с древоидным герпетическим кератитом // *Вестник офтальмологии*. 2010. Т. 126. № 5. С. 13—16.
11. *Алиева А.И., Свитич О.А., Омарова С.М., Касумова А.М.* Клинико-микробиологическое и иммунологическое обоснование вентилятор-ассоциированных пневмоний у новорожденных // *Российский иммунологический журнал*. 2015. Том 9 (18). № 2 (1). С. 184—185.
12. *Семенова Е.А., Свитич О.А., Алиева А.И., Ганковская Л.В.* Исследование ассоциации полиморфных маркеров в генах TNFA, IL-10 и IL-17 с развитием внутриутробного инфицирования плода и пневмонии у новорожденных // *Российский иммунологический журнал*. 2015. Т. 9 (18). № 1 (1). С. 169—171.
13. *Ганковская О.А., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В.* Ассоциация полиморфных маркеров G(-20)A, C(-44)G и G(-52)A гена DEFB1 с развитием преждевременных родов и внутриутробным инфицированием плода // *Российский иммунологический журнал*. 2011. Т. 5. № 1 (14). С. 26—33.
14. *Ганковская О.А., Ганковская Л.В., Лавров В.Ф., Ковальчук Л.В.* Экспрессия TLR-9 и выработка цитокинов мононуклеарными клетками больных генитальным герпесом // *Медицинская иммунология*. 2006. Т. 8. № 2—3. С. 255.
15. *Свитич О.А., Алиева А.И., Семенова Е.А., Малушенко С.В., Русанова К.В.* Ассоциация полиморфных маркеров в генах TLR9, TNF и DEFB1 с развитием пневмонии у новорожденных // *Ученые записки Орловского государственного университета*. 2014. № 7(63). С. 153—154.
16. *Jurevic R.J., Chrisman P., Mancl L. et al.* Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations // *Genet. Test*. 2002. 6(4). P. 261—9.
17. *Лавров В.Ф., Ганковская О.А., Кривцов Г.Г.* Перспективная модель для тестирования функций toll-подобных рецепторов in vitro // *Физиология и патология иммунной системы*. 2009. Т. 13. № 12. С. 3—6.
18. *Сомова О.Ю., Ганковская О.А., Лавров В.Ф., Ганковская Л.В., Зверев В.В.* Динамика экспрессии молекул tlr9-опосредованного сигнального пути эпителиальными клетками цервикального канала под действием вируса простого герпеса 2 типа in vitro // *Российский иммунологический журнал*. 2011. Т. 5. № 2 (14). С. 129—134.

19. Алиева А.И., Омарова С.М., Свитич О.А., Абсерханова Д.У. Эффективность современных критериев диагностики и рациональной антибиотикотерапии вентилятор-ассоциированных пневмоний у новорожденных // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18). № 2 (1). С. 120—122.
20. Ганковская О.А. Молекулярно-генетические механизмы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек при патологии инфекционного генеза: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.09. М., 2010. 300 с.
21. Симбирцев А.С., Громова А.Ю. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4. № 1.2. С. 3—10.

Поступила 09.05.2018

Принята 31.05.2018

DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-209-217

## STUDY OF EXPRESSION OF HBD-1 AND HBD-2 GENES IN EPITHELIAL CELLS OF MUCOUS UPPER AIRWAY IN NEWBORNS WITH PNEUMONIA DEPENDING ON THE CAUSATIVE AGENT

N.D. Rasskazova<sup>1</sup>, A.I. Alieva<sup>2</sup>, L.V. Gankovskaya<sup>3</sup>,  
P.V. Zhigalkina<sup>1,4</sup>, O.A. Svitich<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Dagestan State Medical University, Makhachkala, Russia

<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Sechenov Medical University, Moscow, Russia

**Abstract.**  $\beta$ -defensins play an important role in protecting the fetus from infection, so the expression of these antimicrobial peptides in the respiratory tract in newborns is really important. In this regard, we set a task of studying the expression of the HBD-1 and HBD-2 genes in the epithelial cells of the mucous of the upper airway in newborns with pneumonia and in healthy newborns, depending on the causative agent. Also, the polymorphic marker *G(-20) A* in the *DEFB1* gene was associated with infectious pathology of newborns (in particular pneumonia).

**Methods:** The microflora and the factors of congenital immunity on the mucous membranes of the upper airway have been studied in two groups: newborns with ventilator-associated and congenital pneumonia. The biological material was scrapings of epithelial cells of the mucous membrane of the upper airway of newborns and puerperas and blood.

**Results:** It was found that the expression of the HBD-2 gene increases 2.3-fold in children who have an infectious agent, but there are no clinical manifestations of pneumonia. A significant decrease in HBD-2 (3.2 times) in patients with pneumonia caused by *K. pneumonia* was shown. The frequencies of alleles of the *DEFB1* gene in the fetal infection group and in the comparison group: allele G — 0.66, 0.79, allele A — 0.34, 0.21, respectively. The frequencies of the genotypes of the test marker in mothers in the ventilator-associated, congenital pneumonia and the comparison group were as follows: GG — 0.78, 0.58, 0.58; AA is 0, 0.25, 0; AG — 0.22, 0.17, 0.42, respectively. In newborns allele G dominated among alleles (frequency was higher than 0.73 in all groups) and genotype GG (frequency exceeded 0.52).

**Conclusion:** In the course of the study, it was confirmed that  $\beta$ -defensins protect the mucous from infectious agents. The results indicate that the genetic marker *G(-20) A* of the *DEFB1* gene is associated with the risk of developing the child's UTI.

**Key words:** antimicrobial peptides, defensins, pneumonia of newborns

*Correspondence Author:*

Svitich Oxana Anatolievna, corresponding member RAS, MD., Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, Malii Kasennii pereulok, 5A, E-mail: svitichoa@yandex.ru

## REFERENCES

1. Fayon M.J. et al. Nosocomial pneumonia and tracheitis in a pediatric intensive care unit: a prospective study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997. V. 155. № 1.
2. Wang Y.J., Liu J., Fang F. et al. Microbiological etiology in children with community acquired pneumonia. *Zhong-guo Dang Dai ErKeZaZhi*. 2010. Vol. 12, No. 3. P. 184—187.
3. Svitich O.A., Alieva A.I., Rasskazova N.D., Semenova E.A., Malushenko S.V., Gankovskaya L.V. Study of



- association of polymorphic markers in the genes TLR9, TNF, and DEFB1 c premature birth of infectious genesis and with the development of pneumonia in newborns. *Russian Immunological Journal*. 2014. Vol. 8 (17). No 3. C. 871—873.
4. Liu L., Oza S., Hogan D., Chu Y., Perin J., Zhu J., et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000—15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016; 388 (10063): 3027—3035. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8.
  5. Becker-Dreps S., Blette B., Briceño R., Alema'n J., Hudgens M.G., Moreno G., et al. (2017) Changes in the incidence of pneumonia, bacterial meningitis, and infant mortality 5 years of the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in a “3 + 0” schedule. *PLoS ONE* 12 (8): e0183348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183348>.
  6. Alieva A.I., Svitich O.A., Rasskazova N.D., Gankovskaya L.V. Clinico-microbiological and immunological (TLR2, TLR4) features of newborns on artificial ventilation. *Uchenyeyapiski Orel State University*. 2014. No. 7 (63). C. 116—117.
  7. Khashukoyeva A.Z., Svitich O.A., Markova E.A., Otchitnova O.B., Khlynova S.A. Photodynamic therapy — antiviral therapy? Background of the issue. Prospects of application. *Laser medicine*. 2012. T. 16. № 2. P. 63—67.
  8. Labzhinov P.A., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. Evaluation of the expression of the genes of components of innate immunity in leukocytes of mice with the action of synthetic ligands in vivo. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2013. No. 6. P. 76—80.
  9. Gankovskaya L.V., et al. Innate immunity gene expression by epithelial cells of the upper respiratory tract in children with adenoid hypertrophy. *AurisNasus Larynx* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.anl.2017.11.011>.
  10. Gankovskaya L.V., Kovalchuk L.V., Guseva M.R., Gankovskaya O.A., Vorobyova J.A., Dzhambinova N.S., Gavrilova T.V. Expression of tlr9 and hbd-2 genes by conjunctival and corneal cells in children with arboreal herpetic keratitis. *Herald of Ophthalmology*. 2010. T. 126. № 5. P. 13—16.
  11. Alieva A.I., Svitich O.A., Omarova S.M., Kasumova A.M. Clinical microbiological and immunological justification of ventilator-associated pneumonias in newborns. *Russian Immunological Journal*. 2015. Vol. 9 (18), No. 2 (1). C. 184—185.
  12. Semenova E.A., Svitich O.A., Alieva A.I., Gankovskaya L.V. Study of the association of polymorphic markers in the TNFA, IL-10 and IL-17 genes with the development of intrauterine infection of the fetus and pneumonia in newborns. *Russian Journal of Immunology*. 2015. Vol. 9 (18), Number 1 (1). C. 169—171.
  13. Gankovskaya O.A., Bakhareva I.V., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. Association of polymorphic markers G (-20) A, C (-44) G and G (-52) A of the DEFB1 gene with the development of preterm birth and intrauterine infection of the fetus. *Russian Journal of Immunology*. 2011. T. 5. № 1 (14). P. 26—33.
  14. Gankovskaya O.A., Gankovskaya L.V., Lavrov V.F., Kovalchuk L.V. Expression of TLR-9 and production of cytokines by mononuclear cells of patients with genital herpes. *Medical immunology*. 2006. T. 8. № 2—3. C. 255.
  15. Svitich O.A., Alieva A.I., Semenova E.A., Malushenko S.V., Rusanova K.V. Association of polymorphic markers in the genes TLR9, TNF and DEFB1 with the development of pneumonia in newborns. *Uchenye zapiski Orel State University*. 2014. No. 7 (63). C. 153—154.
  16. Jurevic R.J., Chrisman P., Mancl L. et al. Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. *Genet. Test*. 2002. 6 (4). P. 261—9.
  17. Lavrov V.F., Gankovskaya O.A., Krivtsov G.G. A promising model for testing the functions of toll-like receptors in vitro. *Physiology and pathology of the immune system*. 2009. T. 13. № 12. P. 3—6.
  18. Somova O.J., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. Dynamics of expression of tlr9-mediated signaling by epithelial cells of the cervical canal under the influence of the herpes simplex virus type 2 in vitro. *Russian Immunological Journal*. 2011. T. 5. № 2 (14). P. 129—134.
  19. Alieva A.I., Omarova S.M., Svitich O.A., Absherkhanova D.U. Efficiency of modern criteria for diagnosis and rational antibiotic therapy of ventilator-associated pneumonias in newborns. *Russian Immunological Journal*. 2015. Vol. 9 (18). No. 2 (1). C. 120—122.
  20. Gankovskaya O.A. Molecular genetic mechanisms of congenital immunity at the level of mucous membranes in the pathology of infectious genesis: dis. Dr. med. sciences: 14.03.09. M., 2010. 300 p.
  21. Simbirtsev A.S., Gromov A.Yu. Polymorphism of genes of the human IL-1 family. *Cytokines and inflammation*. 2005. T. 4. № 1.2. P. 3—10.

Received 09.05.2018

Accepted 31.05.2018