

ОСОБЕННОСТИ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА ТРИГГЕРНОГО РЕЦЕПТОРА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ (*TREM-1*), СО СПОРАДИЧЕСКИМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА БЕЗ ХРОМОСОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Шабалдин А.В.¹, Цепочкина А.В.¹, Шмулевич С.А.^{1,2}, Деева Н.С.¹,
Понасенко А.В.¹, Антонова Л.В.¹, Шабалдина Е.В.³

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

² ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени
академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Проведено обследование 131 ребенка (основная группа) в возрасте 5-8 лет со спорадическими врожденными пороками сердца (ВПС) без хромосомных заболеваний по 8 полиморфным участкам *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237). Контрольную группу составили 103 условно здоровых ребенка, сопоставимых по возрасту и полу. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием TaqMan зондов (Thermo Fisher Scientific, США). Для проверки соответствия наблюдаемых частот генотипов равновесному распределению Харди-Вайнберга использовали <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>. Анализ межлокусных взаимодействий осуществляли при помощи метода сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Проведенное исследование показало, что сочетание четырех полиморфных локусов *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs2234246, rs7768162) определяет чувствительность и устойчивость к формированию спорадических ВПС без хромосомных заболеваний. Положительно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание полиморфных вариантов *TREM-1*: rs1817537*G/G – rs3804277*T/T (ОШ = 8,26), а для трехлокусной – rs2234246*C/T – rs1817537*C/G – rs7768162*A/G (ОШ = 13,76). Отрицательно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание rs1817537*C/C – rs3804277*T/T (ОШ = 0,03), а для трехлокусной – rs2234246*T/T – rs1817537*C/C – rs7768162*G/G (ОШ = 0,03).

Ключевые слова: *TREM-1*, врожденные пороки сердца, полиморфизм, межлокусные взаимодействия

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-46-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Address for correspondence:

Shabaldin Andrey V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-46-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Цепочкина, С.А. Шмулевич,
Н.С. Деева, А.В. Понасенко, Л.В. Антонова,
Е.В. Шабалдина «Особенности сочетаний полиморфных
локусов гена триггерного рецептора, экспрессируемого
миелоидными клетками (*TREM-1*), со спорадическими
врожденными пороками сердца без хромосомных
заболеваний» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,
№ 3. С. 507-518. doi: 10.15789/1563-0625-AOP-1948
© Шабалдин А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Tsepokina, S.A. Shmulevich,
N.S. Deeva, A.V. Ponasenko, L.V. Antonova, E.V. Shabaldina
“Association of polymorphisms the trigger receptor gene
expressed by myeloid cells (*TREM-1*) in sporadic congenital
heart defects without chromosome anomalies”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 3, pp. 507-518.
doi: 10.15789/1563-0625-AOP-1948
DOI: 10.15789/1563-0625-AOP-1948

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS THE TRIGGER RECEPTOR GENE EXPRESSED BY MYELOID CELLS (*TREM-1*) IN SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT CHROMOSOME ANOMALIES

Shabaldin A.V.^a, Tsepokina A.V.^a, Shmulevich S.A.^{a,b}, Deeva N.S.^a,
Ponassenko A.V.^a, Antonova L.V.^a, Shabaldina E.V.^c

^a Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

^b Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Eight polymorphic loci in the *TREM-1* gene (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535 and rs2234237) were genotyped in 131 children with congenital heart defects (CHD) without proven chromosomal anomalies, and 103 conditionally healthy children (control group) matched for age and gender. Genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) using TaqMan probes. The frequency of these genotypes was checked for Hardy–Weinberg equilibrium using a free tool (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Analysis of inter-locus interactions was performed by Multifactor Dimensionality Reduction method. It was shown that the combination of four loci, i.e., rs1817537, rs3804277, rs2234246 and rs7768162 may determine susceptibility and persistence for CHD without chromosomal diseases. Increased CHD risk is associated with two-locus model $rs1817537^*G/G - rs3804277^*T/T$ (OR = 8.26) and three-locus model $rs2234246^*C/T - rs1817537^*C/G - rs7768162^*A/G$ (OR = 13.76). The two-locus model $rs1817537^*C/C - rs3804277^*T/T$ (OR = 0.03) and three-locus model $rs2234246^*T/T - rs1817537^*C/C - rs7768162^*G/G$ (OR = 0.03) were associated with a decreased risk for CHD without detectable chromosomal anomalies.

Keywords: *TREM-1*, congenital heart defects, genetic polymorphism, inter-locus interactions

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Введение

Многочисленные исследования этиологии и патогенеза врожденных пороков сердца (ВПС) позволили выделить спорадические ВПС без хромосомных заболеваний в группу заболеваний с мультифакториальной природой [9]. Удельный вес этих пороков сердца составляет свыше 80% от всех ВПС [4, 9]. Более того, они определяют уровень перинатальной и младенческой смертности как в России, так и в мире [1, 3].

Тератогенез в формирующейся сердечно-сосудистой системе можно рассматривать с нескольких позиций. В частности, с позиции миссенс-мутаций в генах сердечно-сосудистого

континуума, определяющих формирование ВПС у эмбриона [14]. Так, для пороков межжелудочковой перегородки (ДМЖП) описаны мутации в генах *CRELD1* (rs9878047, rs3774207 и rs73118372), наследуемых и вносящих существенный вклад в формирование данной патологии в последующих поколениях [24]. Другой путь связан с мутациями в генах регуляции транскрипции и трансляции, что приводит к репрессии основных генов или их РНК-транскриптов. Наиболее описанными являются наследуемые и *de novo* мутации в генах транскрипционных факторов *GATA4*, *GATA5* и *GATA6*, которые ассоциированы с семейными ДМЖП [16, 28]. В настоящее время широко обсуждаются посттрансляционные нарушения в белках, которые ответственны за межклеточные взаимодействия в период развития сердечно-сосудистой системы [21, 22]. В этом пути можно выделить мутации в генах белков-шаперонов, ответственных за посттрансляционную модификацию пептида и фолдинг белка.

С другой стороны, формирование ВПС приходится на период активных иммунных процессов со стороны материнского микроокружения в отношении полуаллогенного зародыша [8]. Иммунные механизмы приживления бластоцисты

активно изучаются. Так, ведущим звеном данного процесса является экспрессия на трофобласте следующих молекул: HLA-G (передает ингибирующий сигнал на цитотоксические и киллерные лимфоциты через молекулу ILT-4), CD274 (PD-L1 или B7-H1, лиганд, активирующий запрограммированную смерть), FasL (лиганд, активирующий апоптоз), TRAIL (TNF-связанный, апоптоз-индуцирующий лиганд, активирующий TRAIL-R на макро- и микрофагах), CD46, CD55, CD59 (молекулы, ингибирующие компоненты комплемента C3b, C4b, C9), благодаря которым иммунный ответ на полуаллогенный зародыш трансформируется [10]. В то же время в эмбриональной области идут механизмы межклеточных взаимодействий, в том числе через молекулы HLA-DR (экспрессированные на большинстве прогениторных клеток) [18]. В данный период онтогенеза большое значение имеет внутриклеточный и внеклеточный сигналинг, направленный на контроль пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток эмбриона. Важными сигнальными рецепторами в таких процессах являются молекулы Toll-подобных рецепторов (TLR), триггерного рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках (TREM-1), а также внутриклеточные NOD-подобные рецепторы (NLR) [15].

Роль молекул TREM-1 в эмбриональном периоде не изучена, более того, нет данных о его экспрессии на раннем трофобласте и эмбриональной области. В то же время, учитывая взаимосвязь данного рецептора с синтезом β -хорионического гонадотропина человека, можно предположить его участие в регуляции прогениторных клеток. Изучение особенностей экспрессии TREM-1 при преэклампсии показало его существенное увеличение при наличии данной патологии [17]. Показано, что у новорожденных детей с пренатальным сепсисом уровень растворимого TREM-1 значительно выше, чем у здоровых новорожденных [2]. Выявлено, что у новорожденных детей с задержкой внутриутробного развития и патологией сердечно-сосудистой системы имеет место индуцированное через TREM-1, интермитирующее системное воспаление [19].

Таким образом, можно предположить, что часть спорадических ВПС без хромосомных заболеваний формируются в результате нарушения контроля межклеточных взаимодействий в период морфогенеза сердца. Данный процесс может быть связан с генетически детерминированной повышенной или пониженной восприимчивостью TREM-1 к лигандам, к которым можно отнести стресс-молекулы, которые образуются при иммунном конфликте в системе «мать — эмбрион».

Исходя из этого, поставлена цель исследования — изучение особенностей распределения сочетанных генотипов полиморфных вариантов rs2234246 и rs4711668 *TREM-1* у детей, которым выполнена хирургическая коррекция ВПС.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели проведено исследование на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша». Набор группы исследования проводился в период с 2016 по 2018 год включительно.

Основные критерии включения в основную группу (дети со спорадическими ВПС без хромосомных заболеваний) следующие: установленный диагноз «ВПС»; возраст детей от 1 месяца до 18 лет; отсутствие семейной истории по рождению детей с ВПС; отсутствие сопутствующих патологий, включая хромосомные аномалии и заболевания; подписанное добровольное информированное согласие от родителей на участие их детей в исследовании, включая забор крови для проведения молекулярно-генетического анализа. Дети находились на лечении в отделении детской кардиологии ГБУЗ КО «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша». Для подтверждения диагноза «ВПС» использовались электрокардиография, эхокардиография и другие методы объективной визуализации.

Критерии исключения из основной группы были представлены следующими позициями: наличие ВПС в сочетании с другими пороками и аномалиями развития ребенка, наличие семейной истории по ВПС, сопутствующие хромосомные аномалии или заболевания (болезнь Дауна и другие), возраст старше 18 лет, а также отказ от подписания информированного согласия на участие в исследовании.

На базе поликлинических отделений Кемеровского государственного медицинского университета была сформирована контрольная группа условно здоровых детей, сопоставимых по возрасту. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие установленного диагноза «ВПС», отсутствие хронических заболеваний, возраст не более 18 лет, а также подписание родителями информированного согласия на участие их детей в генетических исследованиях.

Основную группу составил 131 ребенок (70 девочек и 61 мальчик) от 5 до 8 лет (медиана воз-

раста составила 6 лет). Фенотипы ВПС в данной группе распределились следующим образом: дефект межпредсердной перегородки – у 42 детей (32%); дефект межжелудочковой перегородки – у 20 детей (13%); открытое овальное окно – у 20 детей (13%); тетрада Фалло – у 7 детей (4,5%); другие виды ВПС (единый желудочек сердца, транспозиция магистральных сосудов и другие) – у 42 (32%) детей.

В группу сравнения включено 103 условно здоровых ребенка возрастом от 4 до 8 лет (медиана возраста составила 5 лет). У всех участников исследования проводился сбор крови из локтевой вены в пробирку, содержащую этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА, Vecton Dickinson Vacutainer, США). У детей основной группы сбор крови выполнялся в отделении детской кардиологии на дооперационном этапе, а у детей контрольной группы при медицинском осмотре в поликлинике. Собранную кровь аликивировали по 700 мкл в пробирку объемом 1,5 мл типа «Эппендорф» (Ахуген, США) с плотно закрывающимися крышками. Образцы биологического материала маркировали соответствующим образом и хранили при -80°C до даты проведения исследования.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови обследуемых детей методом фенол-хлороформной экстракции.

Выбор однонуклеотидных полиморфных сайтов был обусловлен следующими критериями: локализация в генах, кодирующих *TREM-1*, распространенность минорного аллеля полиморфного сайта в популяции, по данным HarMap, более 5%, предполагаемые или доказанные последствия на молекулярном уровне, полное отсутствие исследований, оценивающих роль того или иного однонуклеотидного полиморфизма (single nucleotide polymorphism – SNP) в предрасположенности к развитию ВПС. Всего отобрано 8 полиморфных вариантов, характеристика которых представлена в таблице 1.

Генотипирование осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием TaqMan зондов (Thermo Fisher Scientific, США) по 8 выбранным локусам (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237) гена *TREM-1* на детектирующем амплификаторе ViiATM 7 RealTime PCR System (Life Technologies, США).

Для проверки соответствия наблюдаемых частот генотипов равновесному распределению Харди–Вайнберга использовали <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>.

Анализ межлокусных взаимодействий осуществляли при помощи метода сокращения

многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Данная программа обладает возможностью построения таблиц сопряженности, позволяющих оценивать генотипы высокого риска (темно-серые ячейки) и протективные генотипы (светло-серые ячейки) и их комбинации на основе оценки вклада каждого конкретного генотипа (или их комбинации). Кроме этого, метод MDR позволяет оценивать такие параметры моделей, как точность классификации (Acc. – отношение верно определенных групп «случай» и «контроль» к общему числу наблюдений), чувствительность модели (Se. – доля истинно положительных случаев), специфичность модели (Sp. – доля истинно отрицательных случаев), сбалансированная точность (Bal. Acc. = $[\text{Sp} + \text{Se}]/2$) и точность модели (число верно классифицированных положительных и отрицательных случаев).

Ассоциацию генетических вариантов с наличием ВПС оценивали путем вычисления отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Достоверность полученных данных оценивалась посредством повторного генотипирования 10% образцов из общей выборки. Воспроизводимость результатов составила 100%.

Проведенное исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (№ 16 от 29.09.2016 года).

Результаты

Распределение частот аллелей исследуемых полиморфных локусов гена *TREM-1* соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди–Вайнберга как в основной, так и в контрольной группе.

В дальнейшем провели анализ взаимодействий генотипов полиморфных локусов гена *TREM-1* при помощи программы MDR v. 3.0.2. В результате проведенного анализа выявлены две модели, обладающие высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью. Первая модель – двухлокусная: rs3804277 – rs1817537; вторая – трехлокусная: rs2234246 – rs1817537 – rs7768162. Характеристики моделей представлены в таблице 2.

Сравнительный анализ частоты встречаемости сочетаний генотипов полиморфных локусов *TREM-1* в основной и контрольной группах позволил выявить ряд рискованных и протективных сочетаний, статистически значимо ассоциированных с предрасположенностью к развитию спорадических ВПС без хромосомных заболева-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *TREM-1*

TABLE 1. THE CHARACTERISTIC OF SINGLE NUCLEOTIDE DNA VARIANTS IN THE GENE *TREM-1*

Однонуклеотидная замена SNP	Позиция по геномному справочному консорциуму человека, 38 пересмотра Genome Reference Consortium Human, GRCh38.p12	Участок гена <i>TREM-1</i> Gene region	Частота минорного аллеля Minor Allele Frequency (MAF)	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Аминокислотная замена Amino acid substitution
rs1817537	41276829	Интронный вариант Intron variant	0,37	CCTTT [C/G] TGTTT	–
rs3804277	41277434	Интронный вариант Intron variant	0,37	AGTGC[C/T] CCACC	–
rs6910730	41278895	Интронный вариант Intron variant	0,27	GCAAG[A/G] AATCT	–
rs7768162	41287773	Межгенный вариант, SNP расположен выше точки старта транскрипции на 2 Kb Gene-gene interaction 2 Kb Upstream variant	0,29	AAAAA[A/G] TAACT	–
rs2234246	41276002	Нетранслируемый вариант 3'UTR 3 prime UTR variant, Non Coding Transcript Variant	0,37	TCACC[C/T] GCTAT	–
rs4711668	41278735	Интронный вариант Intron variant	0,30	CTGGA[C/T] TTTGG	–
rs9471535	41287752	Межгенный вариант, SNP расположен выше точки старта транскрипции на 2 Kb Gene-gene interaction 2 Kb Upstream variant	0,16	ATTCC[C/T] ACTGC	–
rs2234237	41282728	Экзонный, миссенс вариант Exon missense variant	0,16	AATTA[A/T] CTGAG	Миссенс мутация Missense mutation Thr25Ser

Примечание. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> и http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/

Note. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> and http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/

ТАБЛИЦА 2. МОДЕЛЬ ДВУХЛОКУСНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ TREM-1

TABLE 2. MODEL OF TWO-LOCUS INTERACTION OF POLYMORPHIC LOCI TREM-1

Модель Model	Tr. Bal. Acc.	Test. Bal. Acc.	Se.	Sp.	Cons.	Pre.
rs3804277 – rs1817537	0,77	0,77	1,0	0,55	10/10	0,79
rs2234246 – rs1817537 – rs7768162	0,78	0,76	0,98	0,58	8/10	0,80

Примечание. Tr. Bal. Acc. – тренировочная сбалансированная точность, Test. Bal. Acc. – тестируемая сбалансированная точность, Se. – чувствительность, Sp. – специфичность, Cons. – повторяемость результата, Pre. – точность модели.

Note. Tr. Bal. Acc., training balanced accuracy; Test. Bal. Acc., tested balanced accuracy; Se., sensitivity; Sp., specificity; Cons., repeatability of the result; Pre., model accuracy.

rs7768162*A/A (ОШ = 0,11; $p < 0,05$); rs2234246*C/C – rs1817537*G/G – rs7768162*A/A (ОШ = 0,08; $p < 0,05$); rs2234246*C/C – rs1817537*C/G – rs7768162*A/G (ОШ = 0,08; $p < 0,05$); rs2234246*C/C – rs1817537*G/G – rs7768162*A/G (ОШ = 0,08; $p < 0,05$); rs2234246*C/T – rs1817537*C/C – rs7768162*A/G (ОШ = 0,06; $p < 0,01$); rs2234246*C/T – rs1817537*G/G – rs7768162*A/G (ОШ = 0,08; $p < 0,05$); rs2234246*C/T – rs1817537*C/C – rs7768162*G/G (ОШ = 0,06; $p < 0,01$); rs2234246*C/T – rs1817537*G/G – rs7768162*G/G (ОШ = 0,07; $p < 0,05$); rs2234246*T/T – rs1817537*C/G – rs7768162*G/G (ОШ = 0,13; $p < 0,01$); rs2234246*T/T – rs1817537*C/C – rs7768162*G/G (ОШ = 0,03; $p < 0,01$). Как показано на рисунке, сочетания генотипов полиморфных локусов TREM-1 чаще всего отрицательно ассоциированы с риском формирования ВПС. Наименьшее значение отношения шансов (0,03) получено для сочетания: rs2234246*T/T – rs1817537*C/C – rs7768162*G/G.

Положительные и отрицательные ассоциации со спорадическими ВПС без хромосомных заболеваний, полученные в результате сравнения, указывают на связь патологии с особенностями генетического детерминирования сигнальных путей, ответственных за жизненные стратегии клеток эмбриона.

Обсуждение

Современные исследования показали, что TREM-1 является важной молекулой активации внутриклеточных сигнальных путей [20]. Доказано, что TREM-1 усиливает сигнал с TLR и вовлекает NLR для активации воспалительных реакций с синтезом провоспалительных интерлейкинов, таких как интерлейкин 1 β (IL-1 β) и фактор некроза опухоли альфа (TNF α). Учитывая такие особенности, как высокая экспрессия TREM-1 на мембране микро- и макрофагов, значимое увеличение секреторной изоформы молекулы TREM-1 (sTREM-1) при системных

воспалительных реакциях, доказанные пути передачи сигнала с мембранной молекулы TREM-1 до универсального фактора транскрипции NF- κ B, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла, можно предположить, что TREM-1 является значимым сигнальным рецептором врожденного иммунитета [27].

С этих позиций в настоящее время основные исследования направлены на изучение роли TREM-1 при воспалительных и инфекционных заболеваниях [11]. На основании проведенных исследований высказано мнение о возможности блокирования TREM-1 как мишени при лечении заболеваний с воспалительным патогенезом [12]. К данной группе заболеваний можно отнести не только мультифокальный атеросклероз, но и инфаркт миокарда, ишемическую болезнь сердца, гипертоническую болезнь.

На сегодняшний день активно изучаются механизмы активации экспрессии TREM-1 на мембране клеток. Доказано, что подобную экспрессию можно отнести к лиганд-индуцированной [6]. Авторами исследования показано, что экспрессия TREM-1 связана с первичной активацией TLR соответствующими лигандами, в частности бактериальным липополисахаридом (LPS), но степень ее выраженности зависит от конституциональной базальной экспрессии TREM-1. Показано, что адаптерный белок DAP12 стабилизирует поверхностную экспрессию TREM-1 и его мультимеризацию. Кроме того, показано, что активация TREM-1 зависит и от межклеточных контактов. В частности, в модельном эксперименте на мышах продемонстрировано, что макрофагоподобные клетки могут усиливать базальную и LPS-индуцированную транскрипцию TREM-1 [13]. Принимая во внимание тесную связь TREM-1 с TLR и NLR как основных активаторов генной модуляции, можно думать и об их влиянии на эмбриогенез.

Основной путь генной модуляции через комплексы TLR/TREM-1, адаптерные белки

с TIR-доменами и каскадные киназные реакции, прежде всего, связан с активацией экспрессии генов провоспалительных интерлейкинов и пироптозом клеток [26]. Именно пироптоз и апоптоз эмбриональных клеток может быть основой тератогенеза в сердечно-сосудистой системе.

Полиморфизм *TREM-1* определяет конституциональную и индуцированную экспрессию данной молекулы на мембране клеток, соответственно, через этот механизм может быть реализован геномодулирующий эффект в отношении пироптоза и тератогенеза в сердечно-сосудистой системе.

Согласно данным базы NCBI, в настоящий момент в *TREM-1* описано более 10 полиморфных участков, с доминированием однонуклеотидных замен (SNP) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>], причем клинического значения для большинства полиморфизмов не выявлено. Полиморфные варианты *TREM-1*, включенные в настоящее исследование, расположены по всему гену, начиная с межгенных участков, расположенных выше точки инициации транскрипции и заканчивая нетранслируемой 3' UTR областью. Сочетание полиморфных участков в *TREM-1* может влиять на все этапы экспрессии гена *TREM-1* (транскрипция, трансляция, сплайсинг и посттрансляционная модификация белка). В частности, интронные однонуклеотидные замены могут быть участками прикрепления сплайсом, экзонные snp могут быть миссенс-мутациями, однонуклеотидные последовательности (ОНП) в нетранслируемой 3' области определяют устойчивости матричной РНК к РНКазам, а точковые мутации в межгенной области влияют на экспрессию через эпигенетические механизмы. Тем самым собранные у индивидуума в одном гене разные ОНП будут определять в целом выраженность синтеза белка и его функциональную активность (способность связываться с лигандом с одной стороны и активации молекулы DAP12 с другой). Как уже говорилось выше, в проведенных исследованиях рассматривались только одиночные полиморфные варианты *TREM-1* с инфекционными и иммуновоспалительными заболеваниями. В настоящем исследовании рассмотрены сочетания вариантов у индивидуумов, имеющих спорадические ВПС без хромосомных заболеваний. В данном исследовании, с одной стороны, впервые показана роль уникальных полиморфных сочетаний *TREM-1* в детерминировании спорадических ВПС без хромосомных заболеваний, а с другой – впервые выдвигается предположение о значимости *TREM-1* в генной модуляции на этапах эмбриогенеза, в том числе через индукцию пироптоза.

Высокозначимые ассоциации сочетанных ДНК вариантов *TREM-1* со спорадическими ВПС без хромосомных заболеваний необходимо рассматривать с позиции ранее выявленных одиночных ассоциаций однонуклеотидных замен *TREM-1* с инфекционной и иммуновоспалительной патологией.

Проведенное исследование показало роль сочетания двух и трех ОНП *TREM-1* в потенцировании и протектировании спорадических ВПС без хромосомных заболеваний. Интересен тот факт, что как для двухлокусной модели, так и для трехлокусной модели потенцирующие и протективные сочетания представлены одинаковыми полиморфными вариантами. Причем только для двухлокусной модели потенцирующее сочетание содержало два гомозиготных минорных генотипа по rs1817537 и rs3804277.

Полиморфный вариант rs1817537 *TREM-1*, находящийся в интронной области гена, исследовался как одиночный маркер атеросклероза, инфекционного эндокардита и в мультилокусных ассоциациях с другими кандидатными генами при репродуктивных потерях. Значимые отрицательные ассоциации с риском развития ишемической болезни сердца получены только для минорного аллеля G при доминантной модели наследования [22]. В то же время нет данных о влиянии этого полиморфного варианта на экспрессию *TREM-1*.

Также показаны ассоциации интронного варианта rs3804277 *TREM-1* с патологией сердечно-сосудистого континуума и репродуктивных потерь. Выявлена отрицательная ассоциация минорного аллеля T rs3804277 *TREM-1* с ишемической болезнью сердца. Соответственно, минорные аллели полиморфных вариантов rs1817537 и rs3804277 по отдельности протектируют ишемическую болезнь сердца. При сочетании гомозиготных генотипов вариантов G/G (rs1817537) и T/T (rs3804277) у эмбриона возникает высокий риск (ОШ = 8,26) формирования спорадического ВПС без хромосомных заболеваний. Сочетание же генотипа C/C варианта rs1817537 с генотипом G/G (rs1817537) снижает риск тератогенеза в сердечно-сосудистой системе. Механизм участия интронных полиморфизмов в детерминировании экспрессии гена и в синтезе белка можно рассматривать с позиции ограничения или, напротив, усиления связи между интроном и сплайсомой при созревании первичного транскрипта. Исследования в этой области могут выявить мишень, используемую как объект в прегравидарной иммунной профилактике риска формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний.

В трехлокусных потенцирующих и протективных сочетаниях также присутствовал полиморф-

ный вариант rs1817537, но к нему добавились rs2234246 и rs7768162.

Нетранслируемый вариант в 3'UTR *TREM-1* (rs2234246) описан с позиции его участия в регуляции трансляции с матричной РНК на синтез белка [29]. Авторы провели сравнения уровней матричной РНК и секреторной формы *TREM-1* (sTREM) в сыворотке крови у 30 индивидуумов по десяти ОНП *TREM-1*. Выявлено, что только минорный аллель Т (rs2234246) ассоциирован с повышенным уровнем мРНК и sTREM-1 в сыворотке крови. Авторы впервые показали, что полиморфный вариант rs2234246 влияет на экспрессию гена и синтез белка. Используя биоинформатические методы, авторы доказали, что генетическая область, в которой расположен rs2234246, подвержена более высоким уровням экспрессии *TREM-1*. В частности, этот локус потенциально способен связываться с различными факторами транскрипции. Аллельный вариант С>Т является дискриминирующим по связыванию различных транскрипционных факторов. Именно через этот механизм реализуется ограничение синтеза sTREM-1. Исследование связи данного полиморфизма с инфекционной патологией и заболеваниями сердечно-сосудистого континуума (ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, инфекционный эндокардит) статистически значимых ассоциаций не выявило [27]. В то же время уровень sTREM-1 является значимым для прогноза сепсиса – в частности, высокий уровень этого белка в сыворотке крови ассоциирован с неблагоприятным исходом заболевания [13]. Проведенное исследование показало, что риск формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний связан с сочетанием трех гетерозиготных генотипов *TREM-1* rs2234246, rs 1817537 и rs 7768162. Учитывая выше представленные данные, можно говорить, что особенности экспрессии гена *TREM-1* и синтеза *TREM-1* могут определять патогенез спорадических ВПС без хромосомных заболеваний.

Полиморфный вариант rs7768162 *TREM-1* также исследовался у пациентов с ишемической болезнью сердца, атеросклерозом, инфекционным эндокардитом в российской популяции и сепсисом в китайской популяции, в результате которых статистически значимых ассоциаций не получено [7]. Кроме того, исследовался уровень sTREM

в сыворотке крови в разных популяциях мира, однако, достоверных различий не обнаружено [5, 25]. Тем самым можно предположить, что данный полиморфизм вносит свой вклад в чувствительность и устойчивость к формированию спорадического ВПС без хромосомных заболеваний через эпигенетические механизмы.

Сочетание полиморфных локусов в *TREM-1* будут определять экспрессию гена, в том числе через транскрипцию, трансляцию и синтез белка. Не исключено, что усиление сигнала от мембранных *TREM-1* в эмбриональном периоде происходит за счет лигандов, к которым можно отнести и стресс-ассоциированные молекулы (DAMP), образующиеся при декомпенсации иммунного конфликта в системе «мать – эмбрион». Выявленные в настоящем исследовании положительные и отрицательные ассоциации с сочетанием полиморфных локусов *TREM-1* указывают на механизмы формирования ВПС, схожие с воспалением. Этот факт необходимо учитывать при хирургическом лечении ВПС в неонатальном и раннем постнатальном периоде, так как эти конституционально закрепленные через *TREM-1* реакции могут определять интраоперационные и постоперационные осложнения.

Выводы

1. Положительно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание *TREM-1*: rs1817537*G/G – rs3804277*T/T (ОШ = 8,26), а для трехлокусной – сочетание rs2234246*C/T – rs1817537*C/G – rs7768162*A/G (ОШ = 13,76).

2. Отрицательно ассоциированным с риском формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний для двухлокусной модели было сочетание *TREM-1*: rs1817537*C/C – rs3804277*T/T (ОШ = 0,03), а для трехлокусной – rs2234246*T/T – rs1817537*C/C – rs7768162*G/G (ОШ = 0,03).

3. Генетическое детерминирование риска формирования спорадических ВПС без хромосомных заболеваний связано с сочетанием в большей степени минорных аллелей четырех локусов *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs2234246, rs7768162).

Список литературы / References

1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия – 2016. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М., 2015. 226 с. [Bockeria L.A., Gudkova R.G. Cardiovascular Surgery – 2016. Diseases and congenital malformations of the circulatory system]. Moscow, 2015. 226 p.
2. Крючкова О.Г., Голомидов А.В., Великанова Е.А., Григорьев Е.В. С-реактивный белок и *TREM-1* как ранние маркеры осложненного системного воспалительного ответа у недоношенных новорожденных // Медицина в Кузбассе, 2016. Т. 15, № 3. С. 27-33. [Kruchkova O.G., Golomidov A.V., Velikanova E.A.,

Grigoryev E.V. Crp and trem-1 as early markers of noninfectious systemic inflammatory response in preterm neonates. *Meditsina v Kuzbasse = Medicine in the Kuzbass*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 27-33. (In Russ.)]

3. Чепурных Е.Е., Григорьев Е.Г. Врожденные пороки сердца // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2014. Т. 126, № 3. С. 121-127. [Cherurnykh E.E., Grigoryev E.G. Congenital heart disease. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2014, Vol. 126, no. 3, pp. 121-127. (In Russ.)]

4. Швецов Я.Д., Полоников А.В. Молекулярно-генетические аспекты врожденных пороков сердца // Научное сообщество студентов XXI столетия естественные науки, 2012. № 5. С. 130-132. [Shvetsov Ya.D., Polonikov A.V. Molecular genetic aspects of congenital heart diseases. *Nauchnoe soobshchestvo studentov XXI stoletiya estestvennye nauki = Scientific Community of Students of the XXI century Natural Sciences*, 2012, no. 5, pp. 130-132. (In Russ.)]

5. Aldasoro Arguinano A.A., Dadé S., Stathopoulou M., Derive M., Coumba Ndiaye N., Xie T., Masson C., Gibot S., Visvikis-Siest S. TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 8, e0182226. doi:10.1371/journal.pone.0182226.

6. Carrasco K., Boufenzler A., Jolly L., le Cordier H., Wang G., Heck A.J., Cerwenka A., Vinolo E., Nazabal A., Kriznik A., Launay P., Gibot S., Derive M. TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. *Cell. Mol. Immunol.*, 2019, Vol. 16, no. 5, pp. 460-472.

7. Chen Q., Zhou H., Wu S., Wang H., Lv C., Cheng B., Xie G., Fang X. Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. *Hum. Immunol.*, 2008, Vol. 69, no. 3, pp. 220-226.

8. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 387-411.

9. Fahed A.C., Gelb B.D., Seidman J.G., Seidman C.E. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ. Res.*, 2013, Vol. 112, no. 4, pp. 707-720.

10. Fan W., Li S., Huang Z., Chen Q. Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: a meta-analysis of non-family based studies. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2014, Vol. 31, no. 2, pp. 173-184.

11. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Salakhov R.R., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene*, 2014, Vol. 550, no. 1, pp. 101-109.

12. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Yuzhalin A.E., Salakhov R.R., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Rutkovskaya N.V., Savostyanova Y.Y., Barbarash L.S. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. *Cytokine*, 2015, Vol. 71, no. 1, pp. 16-21.

13. Hosoda H., Tamura H., Kida S., Nagaoka I. Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264.7 macrophage-like cells. *Life Sci.*, 2011, Vol. 89, no. 3-4, pp. 115-122.

14. Kusuma L., Dinesh S.M., Savitha M.R., Krishnamurthy B., Narayanappa D., Ramachandra N.B. A maiden report on CRELD1 single-nucleotide polymorphism association in congenital heart disease patients of Mysore, South India. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, 2011, Vol. 15, no. 7-8, pp. 483-487.

15. Kutikhin A.G., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Salakhov R.R., Golovkin A.S., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene*, 2016, Vol. 9, pp. 76-89.

16. Li C., Li X., Pang S., Chen W., Qin X., Huang W., Yan B. Novel and functional DNA sequence variants within the GATA6 gene promoter in ventricular septal defects. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 7, pp. 12677-12687.

17. Lim R., Barker G., Lappas M. TREM-1 expression is increased in human placentas from severe early-onset preeclamptic pregnancies where it may be involved in syncytialization. *Reprod. Sci.*, 2014, Vol. 21, no. 5, pp. 562-572.

18. Meuleman T., Lashley L.E., Dekkers O.M., Lith J.M., Claas F.H., Bloemenkamp K.W. HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Immunol.*, 2015, Vol. 76, no. 5, pp. 362-373.

19. Mullins E.W.S. The maternal and fetal inflammatory response in normal pregnancy and fetal growth restriction: An ultrasound, flow-cytometry and immunoassay study. Imperial College London, 2014. Available at: <https://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/25517>.

20. Nguyen-Lefebvre A.T., Ajith A., Portik-Dobos V., Horuzsko D.D., Arbab A.S., Dzutsev A., Sadek R., Trinchieri G., Horuzsko A. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. *J. Clin. Investig.*, 2018, Vol. 128, no. 11, pp. 4870-4883.

21. Oyama K., El-Nachef D., Zhang Y., Sdek P., MacLellan W.R. Epigenetic regulation of cardiac myocyte differentiation. *Front. Genet.*, 2014, Vol. 5, 375. doi: 10.3389/fgene.2014.00375.

22. Richards A.A., Garg V. Genetics of congenital heart disease. *Curr. Cardiol. Rev.*, 2010, Vol. 6, no. 2, pp. 91-97.

23. Robertson S.A., Prins J.R., Sharkey D.J., Moldenhauer L.M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 315-330.

24. Robinson S.W., Morris C.D., Goldmuntz E., Reller M.D., Jones M.A., Steiner R.D., Maslen C.L. Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *Am. J. Hum. Genet.*, 2003, Vol. 72, no. 4, pp. 1047-1052.

25. Su L., Liu C, Li C., Jiang Z., Xiao K., Zhang X., Li M., Yan P., Feng D., Xie L. Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis. *Inflammation*, 2012, Vol. 35, no. 6, pp. 1833-1843.
26. Vanden Berghe T., Linkermann A., Jouan-Lanhouet S., Walczak H., Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2014, Vol. 15, no. 2, pp. 135-147.
27. Vandestienne M., Joffre J., Giraud A., Potteaux S., Laurans L., Tedgui A., Derive M., Mallat Z., Ait Oufella H. Exploring the role of TREM-1 receptor in experimental abdominal aortic aneurysm. *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.*, 2018. Vol. 10, Iss. 2, pp. 177-179.
28. Wang J., Luo X.-J., Xin Y.-F., Liu Y., Liu Z.-M., Wang Q., Yang Y.-Q. Novel GATA6 mutations associated with congenital ventricular septal defect or tetralogy of Fallot. *DNA Cell Biol.*, 2012, Vol. 31, no. 11, pp. 1610-1617.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Цепочкина А.В. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмулевич С.А. — к.м.н., заведующая детским отделением ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша»; научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Tsepokina A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., PhD (Medicine), Head, Pediatric Department, Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary; Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Деева Н.С. — лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Понасенко А.В. — к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Антонова Л.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шабалдина Е.В. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой оториноларингологии и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Deeva N.S., Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Ponassenko A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Antonova L.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shabal'dina E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Otolaryngology and Clinical Immunology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 13.02.2020
Принята к печати 06.03.2020

Received 13.02.2020
Accepted 06.03.2020