

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ИНТРОННОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА АКВАПОРИНА *AQP5* И РАЗВИТИЕ ОТЕКА ЛЕГКИХ ПРИ ЛЕГОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ, ОСЛОЖНЕННОЙ СЕПТИЧЕСКИМ ШОКОМ

А. Е. Мязин<sup>1,2</sup>, А. Г. Чумаченко<sup>1,3</sup>, А. Н. Кузовлев<sup>1</sup>, А. М. Голубев<sup>1</sup>,  
В. В. Мороз<sup>1</sup>, А. М. Гапонов<sup>1,2</sup>, А. В. Тутельян<sup>2,3</sup>, М. А. Голубев<sup>4</sup>, В. М. Писарев<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Минздрава России,  
Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1

<sup>3</sup> Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,  
Россия, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

<sup>4</sup> ООО «Корпорация «Медицинские электронные данные»,  
Россия, 107045, г. Москва, Сретенский тупик, д. 4

<sup>5</sup> Университет штата Небраска, медицинский центр, отделение хирургии,  
США, штат Небраска, Омаха

## Genetic Variants of Intron Region of Aquaporin *AQP5* Gene and Development of Pulmonary Edema in Lung Infection Complicated by Septic Shock

A. E. Myazin<sup>1,2</sup>, A. G. Chumachenko<sup>1,3</sup>, A. N. Kuzovlev<sup>1</sup>, A. M. Golubev<sup>1</sup>,  
V.V. Moroz<sup>1</sup>, A. M. Gaponov<sup>1,2</sup>, A.V. Tutelian<sup>2,3</sup>, M. A. Golubev<sup>4</sup>, V. M. Pisarev<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
25, Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia

<sup>2</sup> D. Rogachev Federal scientific clinical centre of pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia,  
1, Samora Mashela Str., GSP-7, Moscow 117997, Russia

<sup>3</sup> Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor,  
3a, Novogireevskaya Str., Moscow 111123, Russia

<sup>4</sup> «Corporation «Medical electronic data», Ltd.,  
4, Sretensky tupik, Moscow 107045, Russia

<sup>5</sup> Department of Surgery, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

**Цель исследования.** Определить значение генетических вариантов сайта однонуклеотидного полиморфизма rs3736309 интрона 3 гена аквапорина-5 (*AQP5*) в течении критических состояний у больных с документированной инфекцией легких.

**Материалы и методы.** Обследована группа больных реанимационных отделений при развитии критических состояний ( $n=86$ , возраст — от 27 до 82 лет, средний возраст —  $53,20 \pm 14,34$  года). В выборке преобладали больные со злокачественными новообразованиями (15%), перитонитом (16%) и панкреонекрозом (37%). У 55% больных развилась нозокомиальная пневмония, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — у 54% больных, септический шок — у 48% больных и у 33% ОРДС сочетался с септическим шоком. В лаважной жидкости всех больных были выявлены бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* изолированно или в ассоциации, в т.ч. с *Proteus mirabilis*. Генотипирование ДНК проводили с использованием тетра-праймерной полимеразной цепной реакции. Статистическую обработку осуществляли при помощи программы GraphPad InStat (GraphPad, USA).

**Результаты.** Распределение частот генотипов AA, GA и GG *AQP5* rs3736309) среди всей выборки подчинялось закону Харди-Вайнберга ( $p=0,923$ ) и соответствовало данным исследований условно-здоровых индивидумов в европеоидной популяции ( $p>0,05$ ). Показано, что в подгруппе больных с септическим шоком генотипа *AQP5* AA (rs3736309), начиная уже с 1-го дня обследования, были выявлены более низкие значения

Адрес для корреспонденции:

Владимир Писарев  
E-mail: vpisarev@gmail.com

Correspondence to:

Mr. Vladimir Pisarev  
E-mail: vpisarev@gmail.com

ИВСВЛ по сравнению с больными генотипов GG и GA с септическим шоком, несмотря на одинаковые подходы к лечению критического состояния. Различия между генетически разными подгруппами больных с септическим шоком сохранялись на протяжении всего срока обследования ( $p < 0,05$ , дни 1, 3, 5 и 7). Генетический вариант G+ *AQP5* (rs3736309), таким образом, являлся неблагоприятным фактором, способствующим развитию отека легких, устойчивого к лечению (соотношение шансов, OR=6,75;  $p=0,032$ ). Только в подгруппе больных с септическим шоком генотипа G+ (но не во всей группе больных или в подгруппе больных без септического шока с тем же генотипом) было отмечено значительно более высокий уровень сурфактантного белка SP-D в плазме по сравнению с больными генотипа *AQP5* AA аналогичной подгруппы ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** При септическом шоке наличие гомозиготного варианта аллеля A (AA) сайта полиморфизма гена *AQP5* rs3736309 является благоприятным фактором при развитии отека легких. Наличие аллеля G *AQP5* rs3736309 является фактором риска большей выраженности отека легких и его устойчивости к лечению.

**Ключевые слова:** SNP; полиморфизм *AQP5*; аквапорины; полиморфизм генов; отек легких; септический шок

**Purpose of the study.** Determine the value of genetic variants of a single nucleotide polymorphic site rs3736309 of intron 3 of aquaporin-5 (*AQP5*) gene in the course of critical illness in patients with documented pulmonary infection. Materials and methods. Patients with critical illness admitted to the intensive care units were examined during the course of treatment ( $n=86$ , age 27 to 82 years, mean age  $53.20 \pm 14.34$  years). Main diagnosis included malignancies (15%), peritonitis (16%) and necrotizing pancreatitis (37%). Patients developed nosocomial pneumonia (55%), acute respiratory distress syndrome (ARDS) (54%), septic shock (48%), ARDS combined with septic shock (33%). Bacterial species of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and/or *Proteus mirabilis* alone or in association were revealed in lavage fluid. DNA genotyping DNA was carried out using tetra-primer polymerase chain reaction (PCR). Statistical processing was performed using GraphPad InStat program (GraphPad, USA).

**Results.** The distribution of frequencies of genotypes AA, GA and GG (*AQP5*, rs3736309) in cohort of patients corresponded to Hardy-Weinberg equilibrium ( $P=0.923$ ) and was similar to frequencies of same alleles determined in a conditionally healthy Caucasian individuals (literature data) ( $P > 0.05$ ). In a subgroup of patients with septic shock and *AQP5* AA (rs3736309) genotype the lower EVLWI values were found compared to patients with genotypes GG and GA with septic shock in spite of the same approach to treatment. The differences between genetically different subgroups of patients with septic shock were maintained throughout the life of the survey ( $P < 0.05$ , days 1, 3, 5 and 7). Genetic variant *AQP5* G+ (rs3736309) contributed to the development of pulmonary edema resistant to treatment (odds ratio, OR = 6,75;  $P=0.032$ ). Only the subgroup of patients with septic shock and genotype G+ (but not all patients or the subgroup of patients without septic shock of the same genotype) were characterized by significantly elevated levels of surfactant protein SP-D in plasma compared to patients of genotype *AQP5* AA with septic shock ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion.** In septic shock, the presence of homozygous variant allele A (AA) of *AQP5* rs3736309 is a favorable factor for patients developing the pulmonary edema. The presence of allele *AQP5* G (rs3736309) is a risk factor for developing severe pulmonary edema and unfavorable prognosis in spite of treatment.

**Key words:** SNP polymorphism; *AQP5*; aquaporins; gene polymorphism; pulmonary edema; septic shock

DOI:10.15360/1813-9779-2016-3-8-23

## Введение

Генетический полиморфизм является одним из источников поиска потенциальных биомаркеров прогнозирования течения и исхода критических состояний (КС). Для сайтов однонуклеотидных замен (single nucleotide polymorphism, SNP) некоторых генов (гены цитохромов, врожденного иммунитета и др.) показана ассоциация с развитием и течением КС [1–4]. Однако далеко не все из исследованных потенциальных маркеров имеют очевидное патогенетическое значение для развития КС, что ограничивает их использование для познания механизмов развития КС. Одним из перспективных аллельных полиморфизмов, которые могут иметь отношение к патогенезу разных КС, является малоизученный ге-

## Introduction

Genetic polymorphism is a valuable source of potential biomarkers predicting the course and outcomes of critical illness (CI). Sites of single nucleotide substitutions (single nucleotide polymorphism, SNP) of various genes (genes of cytochrome P450s, innate immunity, and others) have been shown to be associated with the development and course of the CI [1–4]. However, not all potential biomarkers studied so far evidently relate to CI pathogenesis that limit their use for clarifying the genetic base of heterogeneity of CI development. One of promising allelic polymorphisms, which potentially pathogenetically contribute to various CI development, is understudied polymorphism of *AQP5*. The product(s) of *AQP5* gene has been demonstrated to

нетический полиморфизм *AQP5*. Показано, что продукт(ы) *AQP5* имеет патогенетическое значение для ряда тяжелых заболеваний и состояний.

Продукт гена *AQP5* принадлежит к семейству аквапоринов (AQP) — мембранных белков, ответственных за избирательный трансмембранный транспорт воды. Эксперименты на лабораторных животных и клетках *in vitro* выявили функциональную значимость аквапоринов в регуляции объема клеток и клеточной миграции [5, 6]. Снижение экспрессии *AQP5* у мышей ассоциировалось с воспалительными реакциями в легких [7]. Показано что аквапорины играют значительную роль в развитии отека легких у экспериментальных животных и отека мозга у человека [8, 9]. Клинические исследования в китайской популяции выявили, что носители генотипа +2254 A *AQP5* (rs3736309) обладали большим риском неблагоприятного течения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) по сравнению с больными других вариантных генотипов *AQP5* (GG и AG) [10]. Для другого SNP, 1364A/C (сайт промоторной области *AQP5*), показана ассоциация генотипа AA с повышением выживаемости при тяжелом сепсисе [11]. Однако значение полиморфных вариантов *AQP5* в развитии и течении отека легких при документированной тяжелой инфекции легких не исследовалось.

Поэтому целью нашего исследования явилось определение прогностической значимости вариантных генотипов SNP +2254 A>G гена аквапорина-5 (интрон 3 *AQP5*, rs3736309) в отношении развития отека легких у больных с сепсисом.

## Материал и методы

**Клинико-лабораторные исследования.** Исследование было одобрено локальным Этическим комитетом и проведено в соответствии с принципами Хельсинской Декларации и регуляторными рекомендациями НИИ общей реаниматологии им. В. И. Неговского. Больные были включены в исследование в соответствии с критериями включения и исключения.

**Критерии включения:** возраст от 23 до 82 лет; больные, перенесшие хирургическое вмешательство, находившиеся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ) более двух суток и с признаками инфекции в легких, доказанной бактериологическим исследованием бронхальвеолярного содержимого.

**Критерии исключения:** тяжесть состояния по АРАСНЕ II>26 баллов; травма; наличие беременности; тяжелый иммунодефицит; противопоказания к катетеризации бедренной артерии (тяжелое атеросклеротическое поражение магистральных артерий, гипокоагуляция (значения АЧТВ и МНО, превышающие нормальные значения в 2 раза), тромбоцитопения менее  $50 \times 10^9$ /л); недостаточность левого желудочка (по клиническим данным и оценке показателей объемной преднагрузки); одновременное участие в других клинических исследованиях.

Была обследована группа больных (мужчины и женщины,  $n=86$ ) в возрасте от 27 до 82 лет (средний воз-

раст 53,20±14,34 года) с документированной тяжелой инфекцией легких, которая патогенетически способствует развитию большого количества серьезных заболеваний и состояний.

Продукт гена *AQP5* принадлежит к семейству аквапоринов (AQP), мембранных белков, ответственных за селективный трансмембранный транспорт воды. Эксперименты на лабораторных животных и клетках *in vitro* выявили функциональную значимость аквапоринов в регуляции объема клеток и клеточной миграции [5, 6]. Снижение экспрессии *AQP5* у мышей ассоциировалось с воспалительными реакциями в легких [7]. Показано что аквапорины играют значительную роль в развитии отека легких у экспериментальных животных и отека мозга у человека [8, 9]. Клинические исследования в китайской популяции выявили, что носители генотипа +2254 A *AQP5* (rs3736309) обладали большим риском неблагоприятного течения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) по сравнению с больными других вариантных генотипов *AQP5*, GG и AG [10]. Для другого SNP, 1364A/C (сайт промоторной области *AQP5*), показана ассоциация генотипа AA с повышением выживаемости при тяжелом сепсисе [11]. Однако значение полиморфных вариантов *AQP5* в развитии и течении отека легких при документированной тяжелой инфекции легких не исследовалось.

Поэтому целью нашего исследования явилось определение прогностической значимости вариантных генотипов SNP +2254 A>G гена аквапорина-5 (интрон 3 *AQP5*, rs3736309) в отношении развития отека легких у больных с сепсисом.

## Materials and Methods

**Clinical and laboratory studies.** The study was approved by the local Ethics Committee and conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration and regulatory recommendations of V. A. Negovsky Institute of General Reanimatology. Patients were included in the study according to the inclusion and exclusion criteria.

**Inclusion criteria were:** age between 23 and 82 years; patients who undergone surgery, patients on mechanical ventilation (MV) for more than two days, with symptoms of infection in the lungs proven by bacteriological examination of broncho-alveolar lavage content.

**Exclusion criteria:** severity of the condition by APACHE II> 26 points; trauma; pregnancy; severe immunodeficiency; contraindication to the femoral artery catheterization (severe atherosclerotic lesion of major arteries, hypocoagulation (APTT values and INR greater than normal values in 2 times), thrombocytopenia less than  $50 \times 10^9$ /L; failure of the left ventricle according to the clinical data and evaluation of a volumetric preload; simultaneous participation in other clinical trials.

Patients included male and female,  $n=86$ , aged 27 to 82 years (mean age 53.20±14.34 years) who underwent surgery, with bacteriologically proven infection in the lungs (Table 1). Patients were investigated for the development of septic shock, acute respiratory distress syndrome (ARDS), nosocomial pneumonia, pulmonary

раст  $53,20 \pm 14,34$  года), перенесших хирургическое вмешательство, с бактериологически доказанным инфекционным процессом в легких (табл. 1). У больных выявляли развитие септического шока, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и нозокомиальной пневмонии, отека легких. Больных подразделяли на группы в зависимости от категории критического состояния. Внутри каждой группы или всех больных подразделяли на подгруппы в соответствии с генотипами AA или GA + GG *AQP5* rs3736309. Диагностика септического шока осуществлялась ретроспективно в соответствии с критериями the Surviving Sepsis Campaign 2012 [12]. Развитие и тяжесть ОРДС оценивали в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными в НИИ Общей реаниматологии им. В.А. Неговского [13–15]. Параметры центральной гемодинамики, индекс внутригрудного объема крови (ИВГОК) и индекс внесосудистой воды легких (ИВСВЛ) измерялись по методике транспульмональной термодилуции с использованием модуля инвазивного мониторинга M1012A#C10 «Pulsion PiCCO Plus» (Pulsion Medical Systems, Германия), интегрированного в монитор Philips IntelliVue серии CMS2001 (Philips Medizin Systeme, Германия). Рентгенография органов грудной клетки выполнялась портативным рентгеновским аппаратом Siemens Polymobil 10 (Siemens, Германия), КТ — на аппарате Somatom Sensation 16 (Siemens, Германия).

Больных, устойчивых к лечению отека легких, характеризовали по динамике ИВСВЛ в течение недели:

1. Отрицательная динамика: увеличение значения ИВСВЛ более, чем на 2 мл/кг за семь суток, несмотря на проводимое лечение;
2. Без существенной динамики: отсутствие снижения ИВСВЛ до уровня менее 10 мл/кг в течение семи суток, несмотря на проводимое лечение;
3. Без существенной динамики: в группе больных с наиболее выраженным отеком легких (начальный уровень 10 мл/кг и более) отсутствовало снижение значений ИВСВЛ на 2 мл/кг и более на 7-е сутки лечения [16, 17].

Устойчивыми к лечению (неблагоприятный прогноз развития отека легких) признавали больных, относящихся к одной из трех перечисленных категорий.

Тяжесть состояния больных, степень повреждения легких, развитие нозокомиальной пневмонии, воспалительных процессов оценивали по соответствующим шкалам (APACHE II, Murray, CPIS) согласно рекомендованным критериям [14–16]. Диагностика нозокомиальной пневмонии проводилась с использованием Российских национальных рекомендаций «Нозокомиальная пневмония у взрослых» [17].

У всех больных, включенных в исследование, в день включения в исследование, а так же на 5 и 7 сутки лечения производился забор бронхоальвеолярного содержимого (лаважа) и венозной крови для микробиологического исследования. Взятие материала осуществляли в соответствии с правилами забора, хранения, транспортировки и работы с микробиологическими образцами (Приказ №535 МЗ СССР, 1985 г.) Для доставки потенциально инфекционного материала в лабораторию использовали транспортные среды «MEUS S.r.l.» (Pieve di Sacco, Италия). Бактериологическое исследование включало в себя микроскопию препарата, окрашенного по Граму, оценку роста культуры и идентификацию возбудителя.

edema, and divided into groups depending on the category of the critical illness. All patients and groups were subdivided into subgroups according to genotype AA or GA+GG *AQP5* rs3736309. Diagnosis of septic shock was performed retrospectively in accordance with the criteria of the Surviving Sepsis Campaign 2012 [12]. The development and severity of ARDS were evaluated in accordance with the methodological recommendations developed in the V.A. Negovsky Institute of General Reanimatology [13–15]. The parameters of central hemodynamics, intrathoracic blood volume index (ITBVI) and pulmonary extravascular water index (EVLWI) were measured by transpulmonary thermodilution using module invasive monitoring M1012A # C10 «Pulsion PiCCO Plus» (Pulsion Medical Systems DMC GmbH, Germany), integrated into Philips IntelliVue monitor series CMS2001 (Philips Medicine Systems DMC GmbH, Germany). Chest X-ray was performed by a portable X-ray machine Siemens Polymobil 10 (Siemens, Germany), computer tomography (CT) was performed with the aid of Somatom Sensation 16 (Siemens, Germany).

Patients with no or limited efficacy (resistant to treatment) of the treatment of pulmonary edema were characterized by the dynamics of EVLWI during the week:

1. Negative dynamics: increasing the value of EVLWI more than 2 mL / kg after seven days of treatment;
2. No significant dynamics: EVLWI showed no reduction less than 10 mL / kg following seven days of treatment;
3. No significant dynamics in a group of patients with the most severe pulmonary edema (initial level of 10 ml/kg and more): no reduction in EVLWI values for 2 ml/kg or more on day 7 of treatment [16, 17].

Patients belonged to one of three above categories were considered as those resistant to treatment (with poor prognosis of lung edema dynamics).

The severity of the disease, degree of lung injury, development of nosocomial pneumonia, inflammation were assessed by the relevant scales (APACHE II, Murray, CPIS) according to the recommended criteria [14–16]. Diagnosis of nosocomial pneumonia was conducted using the Russian National Guidelines «Nosocomial pneumonia in adults» [17].

All patients included in the study, on the day of entry into the study, as well as on day 5 and 7 of treatment were investigated for infection using bacterial investigation of broncho-alveolar lavage (BAL) and venous blood. Harvesting the material was carried out in accordance to the rules of sampling, storage, transportation and working with microbiological samples (Order №535 of the USSR Ministry of Health, 1985). For the delivery of potentially infectious material in the laboratory the transport media «MEUS S.r.l.» (Pieve di Sacco, Italy) was used. Bacteriological examination included evaluation of microscopy preparations stained by Gram, estimating growth of bacteria in specific media followed by the pathogen identification.

Treatment of patients in each group was carried out using standardized methods of complex causal, pathogenetic and symptomatic intensive treatment accompanied by dynamic monitoring. Complex methods include antibiotics, infusion of inotropic and vasopressor drugs (noradrenaline), as well as methods of infusion (crystalloid solutions), transfusion (packed red blood cells, fresh frozen



Лечение больных каждой группы осуществляли с помощью стандартизированных методов комплексной этиотропной, патогенетической и симптоматической интенсивной терапии с сопутствующим динамическим мониторингом. Комплекс методов включал антибиотикотерапию, инфузию инотропных и вазопрессорных препаратов (норадреналин), а также методы инфузионной (кристаллоидные растворы), трансфузионной (эритроцитная масса, свежезамороженная плазма, альбумин), антисекреторной (блокаторы протонной помпы, сандостатин), седативной и анальгетической (гипнотики, опиоиды, нестероидные противовоспалительные препараты, парацетамол, эпидуральное обезболивание), антикоагулянтной терапии. Больные получали парентеральное и энтеральное питание с добавлением комплексов витаминов и микроэлементов. Всем больным осуществляли респираторную поддержку в соответствии с концепцией безопасной ИВЛ. Респираторная поддержка проводилась на аппаратах Engstrom Carestation (GE Healthcare, США) в режиме SIMV (Synchronized Intermittent Mandatory Ventilation с контролем по давлению), синхронизированной перемежающейся принудительной вентиляцией.

Для исследования содержания сурфактантного белка SP-D производился забор 8 мл венозной крови в пробирки с ЭДТА на 1, 3, 5 и 7 сутки. Кровь центрифугировали в течение 10 мин. со скоростью 2000 об/мин. Плазму крови в количестве 3-4 мл отделяли и замораживали в отдельных пробирках без консерванта при температуре -200С. Измерение содержания в образцах плазмы проводилось сотрудником, не владеющим информацией о больных, включенных в исследование. Содержание белка определяли с помощью иммуоферментного метода с использованием набора специфичного для SP-D (BioVendor, США) [18].

Генотипирование. ДНК для генотипирования выделяли из цельной венозной крови с помощью наборов Diatom DNA Prep 200, согласно прилагаемой инструкции (ООО «Лаборатория Изоген»). Информация о полиморфизме и распределений частот генотипов в европейской популяции SNP +2254 A>G взята из публично доступной базы данных сайта NCBI [19]. На основании этой информации были синтезированы и использовались для амплификации следующие праймеры:

1. Прямой внешний (F<sub>1</sub>) –  
5'-ATTTCATTCAGCCTTCACTCAGA-3';
2. Обратный внешний (R<sub>1</sub>) –  
5'-ATGTCTCTGCTCCCATGTCA-3';
3. Прямой внутренний (F<sub>2</sub>) –  
5'-GCAGATAAAAAGATCACTGCCCTC-3';
4. Обратный внутренний (R<sub>2</sub>) –  
5'-CTGCTGGAATGTCAGCTTCTTA-3'.

Генотипирование ДНК осуществлялось методом тетра-праймерной ПЦР с использованием программируемого термостата C1000 Touch™ (BioRad, США) [20–22]. Программа амплификации состояла из 32 циклов: Td – 95°C, 30 сек, Tm<sub>1</sub> – 64,5°C, 30 сек (16 циклов), Tm<sub>2</sub> – 64,2°C (16 циклов), Ts – 72°C с последующей пролонгацией при 72°C, 7 мин. Продукты амплификации разделялись электрофоретически с последующей визуализацией результатов в проходящем УФ-свете (рис. 1).

**Статистическая обработка данных.** Распределение частот аллелей проверяли на соответствие закону

plasma, albumin), and antisecretory (blockers, proton pump, Sandostatin) drugs, sedative and analgesic drugs (hypnotics, opioids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, paracetamol, epidural anesthesia), anticoagulants. The patients received parenteral and enteral nutrition supplemented with a complex of vitamins and microelements. All patients were receiving the respiratory support in accordance with the concept of safe ventilation. Respiratory support was carried out on devices Engstrom Carestation (GE Healthcare, USA) in the SIMV mode, the control pressure (Synchronized Intermittent Mandatory Ventilation), synchronized intermittent mandatory ventilation.

To determine the surfactant protein SP-D in blood, the eight-milliliter specimens of venous blood were harvested into tubes with EDTA on days 1, 3, 5 and 7 following admittance to the ICU. The blood was centrifuged for 10 min at 2000 rpm and blood plasma in an amount of 3.4 ml was separated and frozen in separate tubes without preservative at -20 oC. Measurement of plasma samples was conducted by an independent technician with no knowledge on the particular patients. Concentration of SP-D was determined by enzyme-linked immunosorbent assay using a kit specific for SP-D (BioVendor, USA) [18].

Genotyping. DNA for genotyping was isolated from venous whole blood using Diatom DNA Prep 200 kit (Isogene, Moscow, Russia) according to manufacturer's protocol. Control data on polymorphism and genotype frequency distributions in European population (SNP +2254 A>G) were taken from publicly available NSBI database [19]. Following primers were synthesized to run tetraprimer set:

1. Forward external (F<sub>1</sub>) –  
5'-ATTTCATTCAGCCTTCACTCAGA-3'
2. Reverse external (R<sub>1</sub>) –  
5'-ATGTCTCTGCTCCCATGTCA-3'
3. Forward internal (F<sub>2</sub>) –  
5'-GCAGATAAAAAGATCACTGCCCTC-3'
4. Reverse internal (R<sub>2</sub>) –  
5'-CTGCTGGAATGTCAGCTTCTTA-3'.

Tetra-primer PCR was run using C1000 Touch™ cyclor (BioRad, USA) [20–22]. Amplification program consisted of 32 cycles Td – 95°C, 30 seconds, Tm<sub>1</sub> – 64,5°C, 30 seconds (16 cycles), Tm<sub>2</sub> – 64,2°C (16 cycles), Ts – 72°C with subsequent prolongation at 72°C, 7 min. The products of amplification were separated by electrophoresis followed by visualization of the results in transmitted UV light (Fig. 1).

**Statistical data processing.** Allele frequency distribution was tested for compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium using the  $\chi^2$  test. The study was based on a comparison of the frequency of homozygotes with other genotypes in groups of patients. Statistical processing was performed using the program GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The degree of association of genotypes and critical conditions were characterized by the indicator odds ratio (OR, odds ratio), sensitivity and specificity of the method. Kolmogorov-Smirnov method was employed to determine the character of distribution of variables to select adequate statistics. For binary indicators, the Fisher's exact test was employed, whereas for quantitative indicators Mann-Whitney test was used. Differences between groups or subgroups were considered significant at  $P<0.05$ .

Харди-Вайнберга с помощью теста  $\chi^2$ . Исследование строилось на сравнении частот гомозигот с остальными генотипами в группах больных. Статистическую обработку осуществляли при помощи программы GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Степень ассоциации генотипов и критических состояний характеризовали с помощью показателя соотношения шансов (OR, odds ratio), чувствительности и специфичности метода. Для бинарных показателей применяли точный критерий Фишера, для количественных показателей — критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

**Генотипирование.** Были проанализированы образцы ДНК от 86 больных. Распределение частот в группе генотипированных больных (табл. 1) составило (в скобках — число больных): AA — 71% (61), AG — 27% (23) и GG — 2% (2), что соответствовало закону Харди-Вайнберга ( $\chi^2=0,009$ ,  $p=0,923$ ) для всей группы; для подгрупп: с ОРДС —  $\chi^2=0,984$ ,  $p=0,321$ ; с септическим шоком —  $\chi^2=1,065$ ,  $p=0,302$ ; с ОРДС и септическим шоком —  $\chi^2=1,589$ ,  $p=0,208$ . Распределение генотипов для всей группы ( $n=86$ ,  $P=0,923$ ) и подгрупп больных с септическим шоком ( $n=45$ ,  $P=0,876$ ) и без септического шока ( $n=41$ ,  $P=0,974$ ), соответствовало результатам популяционных исследований частот встречаемости генотипов для данного SNP [19].

Нозологическая характеристика группы. В общей выборке преобладали больные с инфекционными осложнениями онкологических заболеваний, панкреонекрозом и перитонитом. У 55 % больных была диагностирована нозокомиальная пневмония, ОРДС — у 54% больных и септический шок — у 48 %. Отличий в нозологической структуре когорты больных, разделенных на группы по генотипам AA и GG+GA *AQP5* не обнаружено (табл. 2).

В образцах бронхоальвеолярной жидкости больных были обнаружены грамотрицательные бактерии — потенциальные возбудители нозокомиальной пневмонии и других инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [23]. В таблице 3 представлен видовой состав выделенных бактерий и распределение их среди больных различных генотипов. Достоверных различий по составу выделенных возбудителей между группа-

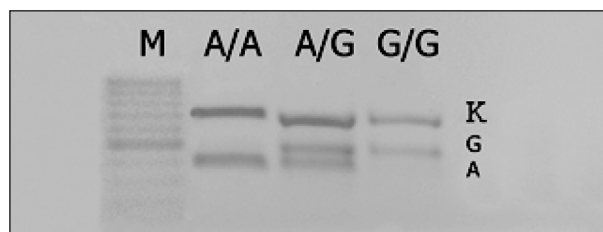


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации, выявляющая все варианты генотипа *AQP5*.

Fig. 1. Electropherogram of amplification products to determine genetic variants of the *AQP5*.

Note: K — amplification control, 370 bp.; G — G allele, 232 bp; A — allele A, 178 bp; M — DNA ladder.

Примечание: K — контроль амплификации, 370 п.н.; G — аллель G, 232 п.н., A — аллель A, 178 п.н., M — маркер длины фрагментов ДНК.

## Results and Discussion

**Genotyping.** 86 patients were genotyped for *AQP5* polymorphism. Allocation of frequencies in a cohort of genotyped patients (Table 1) was as follows ( $n$  — number of patients): AA — 71% ( $n=61$ ), AG — 27% ( $n=23$ ) and the GG — 2% ( $n=2$ ), which corresponded to Hardy-Weinberg equilibrium ( $\chi^2=0.009$ ,  $P=0.923$ ); for subgroups with ARDS:  $\chi^2=0.984$ ,  $P=0.321$ ; with septic shock:  $\chi^2=1,065$ ,  $P=0.302$ ; with ARDS and septic shock:  $\chi^2=1.589$ ,  $P=0.208$ . The distribution of genotypes were as follows: for the entire group ( $n=86$ ,  $P=0.923$ ) and sub-groups of patients with septic shock ( $n=45$ ,  $P=0.876$ ); with no septic shock ( $n=41$ ,  $P=0.974$ ) that consistent with the results of population studies in which the genotype frequencies for the SNP were estimated [19].

Nosological characteristics of groups. Infectious complications of cancer, pancreatic necrosis and peritonitis were dominated in the whole group of patients. In 55% of patients nosocomial pneumonia was diagnosed, acute respiratory distress syndrome was found in 54% of patients, septic shock was diagnosed in 48% of patients. Differences diagnosis or complication in group of patients subdivided into groups depending on genotypes AA and GG + GA of *AQP5* were not detected (Table 2).

Gram-negative bacteria, potential pathogens of nosocomial pneumonia [23] and other infections associated with healthcare, were detected in all BAL

Таблица 1. Распределение генотипов *AQP5* rs3736309 в обследованной выборке больных.

Table 1. Distribution of *AQP5* rs3736309 genotypes in critically ill patients.

Genotypes <i>AQP5</i> rs3736309	The number of patients of different genotypes <i>AQP5</i> rs3736309, n (%)		
	Whole group	No septic shock	Septic shock
+2254 AA	61 (70.93)	31 (68.89)	30 (73.17)
+2254 GG	2 (2.33)	2 (4.44)	0 (0)
+2254 AG	23 (26.74)	12 (26.67)	11 (26.83%)

Примечание. Здесь и в табл. 2–5: number of patients (n) — число больных; different — различные; genotype(s) — генотип(ы); whole group — вся группа; no septic shock — септического шока не было; septic shock — септический шок.

**Таблица 2. Характеристика тяжелых состояний (диагноз и/или осложнение) больных разных генотипов *AQP5* с критическими состояниями.****Table 2. Characteristics of severe conditions (diagnosis and/or severe complication) in critically ill patients with different *AQP5* genotypes.**

Diagnosis and/or complication	The number of patients of different genotypes <i>AQP5</i> rs3736309, n (%)	
	Genotype +2254 AA	Genotypes +2254 AG and +2254 GG
Pancreatonecrosis	10 (16)	3 (12)
Common purulent fibrinous peritonitis (post-surgery complication)	11 (18)	3 (12)
Empyema of pleura (parapneumonic)	3 (5)	1 (4)
Community-acquired pneumonia	4 (7)	2 (8)
Malignancies:	20 (33)	12 (48)
Colon Cancer	4 (6)	4 (16)
Stomach cancer	1 (2)	3 (12)
Cancer of the bile duct	3 (5)	1 (4)
Esophageal carcinoma	5 (8)	1 (4)
Bladder Cancer	5 (8)	—
Prostate cancer	—	2 (8)
Lung cancer	2 (3)	1 (4)
Suppuration of postoperative wound	2 (3)	—
Acute appendicitis	2 (3)	1 (4)
Hepatophyema	2 (3)	2 (8)
Abscess of soft tissues	2 (3)	—
Mediastinitis (after cardiac surgery)	2 (3)	—
Acute pyelonephritis	2 (3)	1 (4)
Acute adhesive obstruction of small bowel	2 (3)	2 (8)
Phlegmona of soft tissue	2 (3)	—
Post-surgery bleeding	2 (3)	—

**Примечание.** Diagnosis and/or complication — диагноз и/или осложнение; Pancreatonecrosis — панкреонекроз; Common purulent fibrinous peritonitis (post-surgery complication) — распространенный гнойно-фибринозный перитонит (как осложнение в послеоперационном периоде); Empyema of pleura (parapneumonic) — эмпиема плевры (параневмоническая); Community-acquired pneumonia — внебольничная пневмония; Malignancies — злокачественные новообразования, Colon Cancer — рак кишечника; Stomach cancer — рак желудка; Cancer of the bile duct — Рак желчных протоков; Esophageal carcinoma — рак пищевода; Bladder Cancer — рак мочевого пузыря; Prostate cancer — рак предстательной железы; Lung cancer — рак легкого; Suppuration of postoperative wound — гнойное осложнение раны; Acute appendicitis — острый аппендицит; Hepatophyema — абсцесс печени; Abscess of soft tissues — абсцесс мягких тканей; Mediastinitis (after cardiac surgery) — медиастинит (после кардиохирургической операции); Acute pyelonephritis — острый пиелонефрит; Acute adhesive obstruction of small bowel — острая спаечная тонкокишечная непроходимость; Phlegmona of soft tissue — флегмона мягких тканей; Post-surgery bleeding — кровотечение (в послеоперационном периоде).

**Таблица 3. Состав возбудителей внутрибольничной пневмонии среди больных различных генотипов *AQP5* rs3736309 (+2254A>G).****Table 3. Composition of nosocomial pneumonia pathogens in patients of different genotypes *AQP5* rs3736309 (+2254A>G).**

Bacteria	All group, n	The number of patients of different genotypes <i>AQP5</i> rs3736309, n			
		Genotype +2254 AA		Genotypes +2254 AG and +2254 GG	
		Septic shock	No septic shock	Septic shock	No septic shock
<i>Proteus mirabilis</i>	33	12	14	2	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57	23	17	6	9
<i>Klebsiella</i> spp.	37	15	12	2	8
<i>Acinetobacter</i> spp.	55	15	23	6	9
All patients	86	30	31	11	14

**Примечание.** Bacteria — бактерии.

ми больных разных генотипов *AQP5* не обнаружено (табл. 3).

**Клинико-лабораторные показатели.** В таблице 4 представлены клинические и лабораторные показатели групп больных (вся группа, больные с септическим шоком и без него) генотипа *AQP5* AA по сравнению с больными других генотипов (GG и AG). В изученной выборке нами не было обнаружено различий в летальности между группами больных с различными генотипами.

fluid samples of patients. Table 3 shows the species composition of the isolated bacteria and their distribution among patients with different genotypes. No significant differences in isolated pathogens between groups were found when compared patients of different *AQP5* genotypes (Table 3).

**Clinical and laboratory parameters.** Table 4 shows data on clinical and laboratory parameters of patients in groups of interest (whole group, patients with septic shock and without it): genotype AA

**Таблица 4. Клинические показатели больных различных генотипов AQP5.**  
**Table 4. Clinical scores of patients with different genotypes AQP5.**

Indicators	Days	Quantitative values of the indicators of patients with different genotypes AQP5					
		+2254 AA			+2254 AG and +2254 GG		
		All group	No septic shock	Septic shock	All group	No septic shock	Septic shock
Number of patients, n	—	61	30	31	25	14	11
Average age, $\pm$ SD, years	—	51.80 $\pm$ 14.37	52.26 $\pm$ 14.62	51.33 $\pm$ 14.34	56.64 $\pm$ 13.13	56.29 $\pm$ 14.10	57.09 $\pm$ 12.44
Mortality, n (%)	—	24 (39)	8 (13)	16 (26)	9 (36)	4 (16)	5 (20)
ARDS, n (%)	—	31 (51)	13 (21)	18 (30)	15 (60)	5 (20)	10 (40)
Nosocomial pneumonia, n	—	33 (54)	14 (23)	19 (31)	14 (50)	7 (28)	7 (28)
APACHE II	—	14.39 $\pm$ 4.60	14.71 $\pm$ 5.41	14.46 $\pm$ 3.53	13.27 $\pm$ 3.82	14.41 $\pm$ 3.82	13.40 $\pm$ 4.00
SOFA	1	5.89 $\pm$ 3.16	4.76 $\pm$ 2.40	5.00 $\pm$ 2.89	7.20 $\pm$ 1.69	6.58 $\pm$ 1.93	7.11 $\pm$ 1.76
	3	5.93 $\pm$ 2.61	5.04 $\pm$ 2.16	5.17 $\pm$ 2.33	7.00 $\pm$ 1.70	6.08 $\pm$ 1.51	6.89 $\pm$ 1.77
	5	6.80 $\pm$ 2.70	5.95 $\pm$ 2.58	6.17 $\pm$ 2.62	7.20 $\pm$ 1.93	7.07 $\pm$ 2.02	7.11 $\pm$ 2.02
	7	7.60 $\pm$ 2.52	6.50 $\pm$ 2.79	7.17 $\pm$ 2.62	7.20 $\pm$ 1.93	6.67 $\pm$ 1.97	7.11 $\pm$ 2.02
Murray	1	1.65 $\pm$ 1.10	2.24 $\pm$ 0.77	2.40 $\pm$ 0.71	2.59 $\pm$ 0.84	2.31 $\pm$ 0.94	2.56 $\pm$ 0.88
	3	1.73 $\pm$ 0.95	2.12 $\pm$ 0.84	2.26 $\pm$ 0.80	2.55 $\pm$ 0.87	2.11 $\pm$ 0.83	2.60 $\pm$ 0.80
	5	1.91 $\pm$ 0.84	2.22 $\pm$ 0.82	2.31 $\pm$ 0.75	2.65 $\pm$ 0.86	2.22 $\pm$ 0.82	2.65 $\pm$ 0.86
	7	2.03 $\pm$ 0.95	2.07 $\pm$ 0.79	2.47 $\pm$ 0.81	2.84 $\pm$ 0.70	2.40 $\pm$ 0.93	2.83 $\pm$ 0.74
CPIS	1	7.20 $\pm$ 3.53	7.10 $\pm$ 3.61	7.17 $\pm$ 3.95	8.36 $\pm$ 2.77	7.09 $\pm$ 3.80	8.80 $\pm$ 2.49
	3	7.03 $\pm$ 2.91	7.03 $\pm$ 3.34	6.78 $\pm$ 3.41	8.27 $\pm$ 3.10	8.80 $\pm$ 2.57	8.70 $\pm$ 2.91
	5	6.80 $\pm$ 3.03	6.53 $\pm$ 3.40	6.44 $\pm$ 3.40	8.18 $\pm$ 3.46	8.44 $\pm$ 3.56	8.70 $\pm$ 3.16
	7	6.60 $\pm$ 3.23	6.30 $\pm$ 3.56	6.22 $\pm$ 3.48	8.18 $\pm$ 3.16	8.36 $\pm$ 2.85	8.80 $\pm$ 2.53
ITBWI, мл/м <sup>2</sup> (25–75 IQR)	1	770 (737–787)	777.5 (750–1027)	737 (702–777.5)	903.5 (750–1185)	780 (736.5–1235.25)	1027 (750–1131)
	3	776 (689–823)	775.5 (689–960)	799.5 (689–823)	960 (775–1326)	823 (746.5–1326)	960 (775–1275.5)
	5	810 (767–1351)	799 (760–1100)	788 (720–799)	788 (720–882)	812 (775–1404)	1100 (783–1357.25)
	7	772.5 (734–840)*	789 (759–998)**	759 (734–782.5)	899 (783–1119)*	899 (783–1119)**	998 (789–1177.5)

**Note.** Presents the average values and standard deviation ( $M\pm SD$ ) or median indicating percentile + 25–75 (25–75 IQR) – for ITBWI values. For clinical assessment scales presented averages in points. When comparing the groups of patients, marked (\*) and (\*\*) were found significant differences (\* –  $P=0.024$ ; \*\* –  $P=0.013$ , respectively, Mann-Whitney test).

**Примечание.** Quantitative values of the indicators – количественные значения показателей. Average age $\pm$ SD, years – возрастной диапазон + стандартное отклонение, годы; Mortality – смертность; ARDS – ОРДС; Nosocomial pneumonia – нозокомиальная пневмония. Представлены средние значения показателей и стандартное отклонение ( $M\pm SD$ ) или медианы с указанием 25–75 перцентелей (25–75 IQR) – для значений ИВГОК. Для шкал клинических оценок представлены средние значения в баллах. При сравнении групп больных, отмеченных (\*) и (\*\*) были обнаружены достоверные отличия (\* –  $p=0,024$  и \*\* –  $p=0,013$ , соответственно, критерий Манна-Уитни).

При сравнении летальности среди больных генотипов AA и GA+GG с септическим шоком и без септического шока, различий также не обнаружено ( $p>0,05$ ). При сравнении групп разных генотипов AQP5 по возрастному составу, показателям шкал Murray, APACHE II, CPIS и SOFA достоверных отличий не обнаружили.

Начиная с первого дня наблюдения, значения ИВГОК у всех больных в течение первых пяти дней не превышали физиологические значения (800–1000 мл/м<sup>2</sup>, [24]). Только на 7-й день исследования во всей группе больных значения ИВГОК достоверно снижались; при этом это снижение было обусловлено вкладом больных с септическим шоком генотипа AA AQP5, но не генотипов G+ (табл. 4).

Изучение изменения уровней ИВСВЛ в группах больных генотипов AA и GA+GG, показало, что значения ИВСВЛ, начиная уже со дня поступления в отделение реаниматологии и на протяжении 7 суток лечения, у больных генотипа AA были достоверно ниже, чем у больных группы

AQP5 versus other genotypes (GG and AG). First, no difference in mortality between the groups of patients (with septic shock and without septic shock) of different genotypes were not observed ( $P>0.05$ ). Second, groups of different genotypes AQP5 were not differed at age composition, performance scales Murray, APACHE II, CPIS and SOFA.

Beginning from the first day of observation, ITBWI values in all patients during the first five days did not exceed the physiological value (800–1000 ml/m<sup>2</sup>, [24]). Only on the 7<sup>th</sup> day of the study in all patients ITBWI values significantly decreased; interestingly, that this decrease was due to contribution of septic shock patients of genotype AA AQP5, but not G+genotypes (Table 4).

Evaluation of changes in EVLWI in patients of genotypes AA and GA + GG, showed that the EVLWI values, starting from the date of admission to the ICU and during 7 days of treatment, in patients with genotype AA was significantly lower than that of patients in a combined group of patients with GA or GG genotypes (Figure 2). Based on



## Original Observation

GA+GG (рис. 2). На основании анализа динамики значений ИВСВЛ в течение 7 дней лечения были выделены группы больных, отличающиеся по характеру развития отека легких в ходе проводимого лечения. Критерии оценки эффективности лечения были обозначены как чувствительность к лечению (см. Материалы и методы). При сравнении групп больных различных генотипов, оказалось, что среди больных генотипа AA *AQP5* с септическим шоком было достоверно больше больных, у которых в течение 7 дней лечения снижались или оставались по-прежнему относительно низкими (менее 10 мл/кг) показатели отека легких, что характеризует таких больных как чувствительных к лечению, т.е. для которых оно было более эффективным в отношении динамики развития отека легких (табл. 5).

Следует отметить, что у 53% больных в нашем исследовании был диагностирован ОРДС, а у 33% развивались и ОРДС, и септический шок. При этом в группе больных с септическим шоком, несущих аллель G (генотипы GG и GA, неблагоприятные для развития отека легких) наблюдалась тенденция к увеличению числа больных и с ОРДС, и с септическим шоком — до 90%, тогда как в группе с генотипом AA больных с ОРДС было в полтора раза меньше — 60% ( $p>0,05$ ). Несмотря на отсутствие достоверности этих различий, имеющаяся тенденция накопления большего числа больных с ОРДС генотипа G+ при септическом шоке может объяснить повышенные значения ИВСВЛ именно у больных данного генотипа.

В пользу этого предположения свидетельствует обнаружение различий по уровню SP-D в плазме у больных с разными генотипами *AQP5* с септическим шоком. Так, данные рис. 3 свидетельствуют о том, что у больных с генотипом GG и септическим шоком содержание сурфактантного белка SP-D было достоверно выше, чем у больных генотипа AA. Известно, что более высокий уровень содержания сурфактанта является неблагоприятным прогностическим фактором в отношении исхода септических состояний, а содержание SP-D в диапазоне 115,8–253,0 нг/мл в первые сутки исследования соответствует первой стадии ОРДС [18].

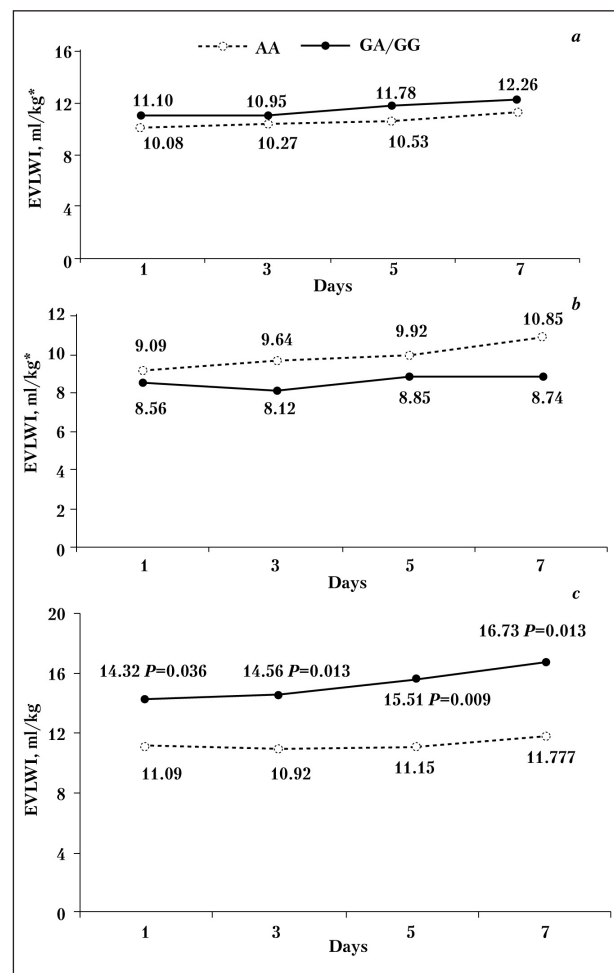


Рис. 2. Динамика индекса внесосудистой воды легких у больных генотипов AA и GA+GG в течение 7 суток лечения. Fig. 2. Dynamics pulmonary extravascular water index patients of genotypes AA and GA + GG during 7 days of treatment

Note: a — All group; b — no septic shock; c — patients with septic shock. The average values of EVLWI, ml/kg, are presented. \* —  $P>0,05$  (Mann-Whitney test).

Примечание: а — All group — вся группа; b — no septic shock — без септического шока; c — patients with septic shock — больные с септическим шоком. EVLWI, ml/kg — представлены средние значения ИВСВЛ, мл/кг. \* —  $p>0,05$  (Манна-Уитни). Days — дни.

analysis of the dynamics of EVLWI values during 7 days of treatment, the differences in lung edema dynamics in a course of the treatment were revealed.

Таблица 5. Эффективность лечения отека легких у больных различных генотипов +2254 A>G *AQP5*.

Table 5. Efficiency of treatment of pulmonary edema in patients with different genotypes +2254 A>G *AQP5*.

Genotypes	Number of patients, n (%)					
	All group		No septic shock		Septic shock	
	Sensitive to treatment	Resistant to treatment	Sensitive to treatment	Resistant to treatment	Sensitive to treatment	Resistant to treatment
+2254 AA	36 (59)	25 (41)	18 (58)	13 (42)	18 (59)	12 (41)
+2254 AG и +2254 GG	12 (48)	13 (52)	10 (71)	4 (29)	2 (18)	9 (82)
P (EMF)	>0,05		>0,05		0,032	
OR	—		—		6,75	

Примечание. Sensitive to treatment — чувствительные к лечению; resistant to treatment — резистентные к лечению.

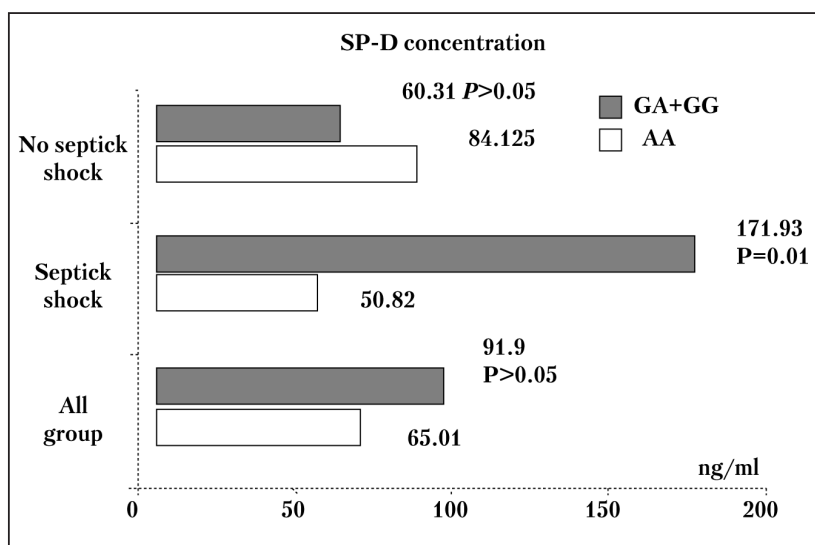


Рис. 3. Содержание сурфактантного белка SP-D в плазме больных, отличающихся по генотипу AQP5.

Fig. 3. Concentration of SP-D surfactant protein in plasma of patients differed in AQP5 allelic variants.

Note. Averages for SP-D in plasma are presented, ng/ml. P was evaluated by Mann-Whitney test.

Примечание. Представлены средние значения SP-D в плазме, нг/мл. Значение p оценивали по критерию Манна-Уитни.

Полученные данные указывают на то, что генотип AA AQP5 (rs3736309) ассоциируется с защитой от отека легких при септическом шоке, тогда как аллель G является неблагоприятным фактором в отношении развития отека легких, устойчивого к лечению в течение первой недели нахождения больного в ОРИТ.

Изучение генетических полиморфизмов при инфекционных осложнениях критических состояний привлекает в последние годы все большее число исследователей. По данным базы Scopus, только за последние 5 лет в этой области опубликовано более 300 работ. Растущая популярность этой области объясняется, с одной стороны, необходимостью познания механизмов развития сепсиса — особенно в случае исследования функционально значимых генетических маркеров, которые могут иметь патогенетическое значение для развития опасных для жизни критических состояний (ОРДС, септический шок). Такие исследования могут помочь выявить новые молекулярные мишени для лечения и/или предупреждения развития таких состояний. С другой стороны, они несут потенциал разработки прогностических маркеров с целью персонализации лечения с учетом дополнительных, генетических по своей природе, рисков неблагоприятного течения заболевания.

Исследования в области генетического полиморфизма AQP5 при септической легочной инфекции важны с обеих отмеченных позиций. Прежде всего, потому, что молекулы AQP5 участвуют в транспорте воды в клетку и участвуют в формировании отеков в тканях [25, 26]. При этом

Criteria for evaluating the efficacy of treatment was designated as sensitivity/resistance to the treatment (Materials and Methods). When comparing the groups of patients with different genotypes, it was found that the proportion of patients with decreased edema was significantly increased in patients with septic shock and genotype AA AQP5 during 7 days of treatment but not in G+ genotypes (Table 5). Table 5 shows that no differences exist in patients' groups with same genetic differences and no septic shock.

It should be noted that 53% of patients in this study were diagnosed with ARDS, and 33% patients developed both ARDS and septic shock. In group of patients with septic shock carrying allele G (genotypes GG and GA, unfavorable genotypes for the development of pulmonary edema)

there was a trend of accumulation of more patients with both ARDS and septic shock — 90%, while in the group of patients of AA genotype accumulation of patients with ARDS was less — 60% (P>0.05). Despite the lack of significance of these differences, current tendency of accumulation of a increased number of more severely ill patients (ARDS+septic shock) among patients of G+ genotype may partly explain the increased values of EVLWI in patients of a given genotype.

This assumption is supported by the detection of differences in the level of SP-D in plasma of patients with AQP5 different genotypes and septic shock. Figure 3 demonstrates that in patients of G+ genotype and septic shock the concentration of circulating SP-D is significantly higher than in similar group of patients of AA genotype. Higher levels of surfactant have been shown to be a poor prognostic factor for outcome of sepsis, and SP-D within the range of 115.8–253.0 ng/ml on day 1 at admittance to the ICU corresponds to the first stage of ARDS [18].

These data indicate that the AQP5 AA genotype (rs3736309) is associated with protection against pulmonary edema in septic shock, whereas the G allele is an unfavorable factor that positively contributes to development of pulmonary edema in septic shock patients and to relative resistance (decreased efficacy) to treatment during the first week of admittance to the ICU.

Recent years, the studies of genetic polymorphisms in infectious complications of critical illness have attracted an increasing number of researchers. According to the Scopus database, only in the last 5

бактериальный липополисахарид (ЛПС) значительно снижает экспрессию именно *AQP5*, но не аквапоринов-3 и -4 в клетках эпителия бронхов человека [27], и поэтому инфекционный процесс в легких может привести к снижению *AQP5*-опосредованного транспорта воды из внеклеточного пространства в сосудистое русло через клетки эпителия легких, прилегающие к стенкам капиллярной сети. Эти данные являются основой для предположения о патогенетической роли *AQP5* в формировании и развитии отека легких при легочной инфекции, в ходе которой высвобождаемые бактериальные эндотоксины и, возможно, другие лиганды рецепторов врожденного иммунитета — толл-подобных рецепторов (toll-like receptors, TLRs) — нарушают экспрессию *AQP5* на поверхности легочного эпителия и способствуют накоплению воды в интерстиции легких. С другой стороны, имеются данные о том, что неблагоприятные исходы сепсиса ассоциируются с аллельными вариантами промоторной области *AQP5*. Так, для промоторного SNP-1364 A/C показана ассоциация генотипа AA и сниженной смертностью при тяжелом сепсисе [11]. Наше исследование, впервые установившее ассоциацию интронного полиморфного варианта *AQP5* с развитием отека легких при наиболее тяжелой форме сепсиса — септическом шоке, подтверждает информативную ценность использования генетического полиморфизма *AQP5* для прогноза развития этого опасного для жизни состояния и, возможно, для последующей персонализации жизнеобеспечения больных с септическим шоком.

Более чем у 50% больных сепсисом развивается отек легких [13]. Отек легких проявляется избыточным накоплением внесосудистой воды в интерстициальном и/или альвеолярном пространствах легких и объективно выражается в виде увеличения значений ИВСВЛ. В здоровых легких баланс между поступлением и удалением свободной воды поддерживается альвеолоцитами I типа. При септическом шоке повреждения эпителиальных клеток легочной ткани наиболее выражены вследствие и токсических бактериальных продуктов, и повышенной миграции клеток врожденного иммунитета, в первую очередь — лейкоцитов. Поврежденный в результате прооксидантной деятельности последних коллаген-мукополисахаридный матрикс межклеточного пространства является фактором, способствующим задержке воды, а высокая проницаемость сосудов в результате инфекционного воспаления способствует переходу белков из капилляров в интерстициальную ткань. Это может приводить к увеличению осмотического давления в интерстиции. Известно, что аквапорины способны обеспечивать разнонаправленный транспорт воды — как внутрь клетки, так и из нее. Так, молекулы *AQP1* мембраны эритро-

years more than 300 papers directly related to this field were published. The growing popularity of this area of research is due, on the one hand, to still understudied mechanisms of sepsis, especially those that reflect the genetic base of sepsis heterogeneity and pathogenetically contribute to development of life-threatening critical illness (acute respiratory distress syndrome, septic shock). These studies may help to identify new molecular targets for treatment and/or prevention of such dangerous conditions. On the other hand, these studies might result in development of potential prognostic markers to personalize the treatment with the aid of knowledge of extended list of risk factors for unfavorable course of the illness.

Studies in the area of intersection of a genetic polymorphism of *AQP5* and septic lung infection are important because of both above mentioned positions. This is primarily due to *AQP5* water molecules are involved in transport into the cell and significantly contribute to the edema formation in tissues [25, 26]. Interestingly, that bacterial lipopolysaccharide (LPS) significantly reduces *AQP5* expression, but not aquaporin-3 and -4 in human bronchial epithelial cells [27]. Therefore, the infection process in the lungs may lead to decreased *AQP5*-mediated water transport from the extracellular space into the vascular direction through the lung epithelial cells adjacent to the walls of the capillary network. This data seem to provide a rationale for the assumption on the pathogenetic role of *AQP5* in the formation and development of pulmonary edema in lung infection, during which bacterial endotoxins and other ligands of innate immunity receptors (Toll-like receptors, TLRs) might alter *AQP5* expression on the surface of the lung epithelium and contribute to the accumulation of extracellular water in the interstitial area of the lungs. On the other hand, there is an evidence that the adverse outcomes of sepsis associated with the allelic variants of the promoter region *AQP5*. Thus, for the promoter SNP -1364 A/C, the association of genotype AA and reduced mortality in severe sepsis has been demonstrated [11].

Our study is the first in establishing an association of intronic polymorphic variant *AQP5* with pulmonary edema development in patients affected by the most severe form of sepsis — septic shock. This study also provided new data to support the informative value of the use of genetic polymorphism *AQP5* for predicting the development of this life-threatening condition, with a potential for further personalization of a life support in patients with septic shock.

More than 50% of septic patients develop pulmonary edema [13]. Pulmonary edema is manifested by an excessive accumulation of water in the extravascular interstitial and/or alveolar spaces of the lungs and objectively expressed as increased

роцитов мышей активизируют вывод воды из клетки в гиперосмолярных растворах, тогда как в условиях сниженной осмолярности эти же молекулы обеспечивают транспорт воды в клетку [28]. Можно полагать, что и для *AQP5* характерны подобные закономерности. Эксперименты на крысах показали, что при повышении экспрессии *AQP5* под воздействием эмода отек легких при сепсисе уменьшался быстрее [29]. В экспериментальных моделях сепсиса было показано, что снижение уровня экспрессии *AQP5* в клетках легочной ткани способствовало развитию отека [30], а его повышение — снижает выраженность отека [31]. Возможно, что генотип AA rs3736309 *AQP5* ассоциирован с относительно более высоким уровнем экспрессии этого белка в клетках эпителия легких, поэтому больные данного генотипа в большей степени компенсированы в отношении развития отека легких, чем больные других генотипов.

Интересно, что эта закономерность была выявлена в данной работе только у больных с септическим шоком, т.е. при критическом состоянии, сопровождающимся мощной воспалительной активностью непосредственно в легочной ткани. Не исключено, что такому ограничению эффекта генетического полиморфизма *AQP5* при отеке легких могло способствовать вовлечение в процесс образования отека продуктов клеток иммунной системы, мигрирующих из кровотока в легочную ткань. Известно, что различные клетки иммунной системы экспрессируют *AQP5* на своей поверхности [32]. Более того, *AQP5* имеет непосредственное отношение к функциональной активности клеток иммунной системы, участвуя в воспалительных реакциях, фагоцитарной функции и миграции иммунокомпетентных клеток [33, 34]. Гипотетически, генетически полиморфные варианты *AQP5* могли бы быть ассоциированы с разным уровнем локального накопления провоспалительных или противовоспалительных клеток иммунной системы при инфекционном процессе в легких.

Интересно, что значения ИВГОК, косвенно отражающие волевический статус больных, были достоверно ниже в группе больных генотипа AA по сравнению с группой генотипов G+. Такой характер распределения значений показателя среди групп больных разных генотипов был обусловлен исключительно благодаря подгруппе больных с септическим шоком (табл. 4). Небольшое, хотя и достоверное снижение значений данного показателя только в группе больных с септическим шоком генотипа AA могло быть отражением генетической гетерогенности адаптационных механизмов при развитии отека легких. Действительно, анализ данных выявил средний характер связи обоих показателей — достоверные уровни обратной корреляции между показателями ИВСВЛ и ИВГОК ( $r=-0,594$  и  $r=-0,610$  для дней 3 и 5 исследования,  $p=0,039$  и

EVLWI values. In healthy lungs balance between supply and removal of free water is maintained by I type alveolocytes. In septic shock damage to the epithelial cells of the lung tissue is due to toxic bacterial products, migrated inflammatory cells, primarily, leukocytes. Damaged collagen-mucopolysaccharide matrix of extracellular space is a factor contributing to water retention, and high vascular permeability (as a result of infectious inflammation) promotes the protein transfer from the capillaries into the interstitial tissue. This may result in an increase of osmotic pressure in the interstitium. It is known that aquaporins can provide multidirectional transport of water, inside the cells and from the cells. Membrane molecule AQP1 in mice erythrocytes was shown to activate withdrawal of water from the cells into hyperosmolar solution, whereas under the reduced osmolality AQP molecules mediate transport of water molecules into the cell [28]. It is believed that *AQP5* follows similar rules. Experiments in rats have shown that an emodin-stimulated increase in the expression of *AQP5* led to decreasing pulmonary edema in experimental sepsis [29]. In experimental models of sepsis it has been shown that reducing the expression level of *AQP5* in lung tissue cells contribute to the development of edema [30], whereas increased expression reduced edema intensity [31]. It is possible that AA genotype of rs3736309 *AQP5* is associated with relatively higher levels of protein expression in lung epithelial cells, and patients of given genotype are largely compensated in respect of lung edema compared to patients of other genotypes.

Interestingly, this pattern has been identified in our study only in patients with septic shock and lung infection, i.e. in critical illness accompanied by a strong inflammatory activity in the lung tissue. It is possible that such a limitation of the effect of genetic polymorphism *AQP5* with pulmonary edema was due to the involvement of products of immune cells migrating from the bloodstream into the lung tissue. It is known that various cells of the immune system express *AQP5* on cell surface [32]. Moreover, *AQP5* is directly related to the functional activity of immune system cells, participating in inflammatory responses, phagocytic function, and migration of immune cells [33, 34]. Hypothetically, genetically polymorphic variants of *AQP5* could be associated with different levels of proinflammatory or local accumulation of inflammatory cells in the immune system during lung infection.

Interestingly, the values of ITBWI that indirectly reflect volemic status of patients were significantly lower in the group of patients with genotype AA in comparison with genotype group G+. This pattern of distribution of index values among the groups of patients with different genotypes was solely due to the subgroup of patients with septic shock



$p=0,039$ , соответственно) определялись только в группе больных с септическим шоком генотипа AA *AQP5*, тогда как в группе больных генотипов GA и GG значения коэффициентов корреляции (Спирмен) варьировали в пределах 0,1–0,3 и были недостоверны в любой из дней исследования. Эти данные требуют подтверждения в большей по размеру выборке больных.

Сопоставление обнаруженных нами отличий больных разных генотипов (AA против AG+GG) rs3736309 *AQP5* (уровни ИВСВЛ и чувствительность к лечению) позволяет полагать, что генотип AA rs3736309 защищает от развития отека легких. Механизмом такого эффекта может являться более высокий уровень экспрессии *AQP5* у больных данного генотипа. Последующие исследования необходимы, чтобы проверить эту гипотезу.

Протективный эффект генотипа AA *AQP5* в отношении развития отека легких на фоне септического шока и при соответствующем лечении может быть обусловлен внутрилокусным неравновесным сцеплением данного интронного сайта с другими полиморфными сайтами гена (например, в промоторной области *AQP5*), непосредственно контролирующими экспрессию аквапорина-5. Внутрилокусное неравновесное сцепления описывается как неслучайное распределение частот аллелей полиморфных сайтов внутри локуса, встречающееся чаще, чем при случайном распределении. Возможно, что повышение частоты такой комбинации в популяции имеет адаптивное значение [35]. Для rs3736309 *AQP5* показано внутрилокусное неравновесное сцепление с сайтами rs2878771 и rs296763, функциональная значимость которых не ясна. Мы не обнаружили в литературе данных о наличии неравновесного сцепления сайтов полиморфизма интрона rs3736309 и промотора *AQP5* rs3759129. Однако, в литературе имеются данные о наличии неравновесного сцепления несинонимичного SNP, расположенного в экзоне 4 гена *AQP5* и ассоциированного с устойчивостью молекулы аквапорина-5, с несколькими другими SNP, в том числе и с rs3736309. Анализ гаплотипов SNP *AQP5* показал, что гаплотип CGCT для SNP rs2878771 (аллель А), rs3736309 (аллель G), rs296763 (аллель С) и rs2849266 (аллель Т) был ассоциирован с наиболее выраженной скоростью снижения функции легких ( $p=0,0007$ ) у больных ХОБЛ [36]. Можно предположить, что внутрилокусное неравновесное сцепление аллеля G *AQP5* rs3736309 и аллеля SNP экзона, контролирующего структурные особенности молекулы *AQP5*, вносит вклад и в обнаруженный нами негативный эффект аллеля G при септическом шоке.

Другой механизм, объясняющий влияние генотипа *AQP5* на развитие отека легких при легочной инфекции, может быть связан с учас-

(Table 4). A small, but statistically significant decrease of the values of this parameter only in patients with septic shock of AA genotype presumably might result from genetic heterogeneity of adaptive mechanisms contributing to the development of pulmonary edema. Indeed, the analysis of the data revealed the negative relationship of both indicators: there was a significant inverse Spearman correlation between the levels EVLWI and ITBWI ( $r=-0.594$  and  $r=-0.610$  for days 3 and 5 of the study,  $P=0.039$ ) in patients with septic shock of AA genotype, whereas in patients of GA and GG genotypes the correlation coefficients varied between 0.1–0.3 and were not significant at any of the days of the study. These findings need to be confirmed in a larger cohort of patients.

Comparison of the differences that were found in patients with different rs3736309 *AQP5* genotypes (AA vs. AG + GG) (in EVLWI levels and sensitivity to treatment) suggests that rs3736309 AA genotype protects against the development of pulmonary edema. The mechanism of this effect may be a higher level of *AQP5* expression in patients with this genotype; further studies should explore this hypothesis.

The protective effect of AA *AQP5* against development of pulmonary edema in septic shock and under the appropriate treatment may be due to intralocus linkage disequilibrium of the intronic polymorphic site and other sites of this gene (e.g., promoter region of *AQP5*), directly controlling the expression of aquaporin-5. Intragenic linkage disequilibrium has been described as a non-random distribution of the frequencies of alleles of polymorphic sites within one locus, occurring more frequently than in a random distribution. It is possible that such combinations with increased frequency in a population has an adaptive value [35]. For rs3736309 *AQP5* intralocus linkage disequilibrium was shown for rs2878771 and rs296763 SNP sites, however, the functional significance of data is unclear. We did not find any data demonstrating a linkage disequilibrium of intronic site of rs3736309 SNP and *AQP5* promoter rs3759129 site. However, there are available data on the linkage disequilibrium of a nonsynonymous SNP, located in exon 4 of *AQP5* gene, which was associated with increased resistance of an aquaporin-5 molecule to degradation, and several other *AQP5* SNPs including intronic rs3736309. Haplotype analysis of SNP *AQP5* showed that haplotype CGCT (includes SNP rs2878771 – A allele, rs3736309 – allele G, rs296763 – allele C, and rs2849266 – T allele) was associated with an increased rate of decline in lung function ( $P = 0.0007$ ) in patients with COPD [36]. We can assume that intralocus linkage disequilibrium of intronic allele G (*AQP5* rs3736309) and exon encoding structural features of *AQP5* molecule contributing to resistance to degradation of the protein, contributes to a negative effect

тием вариантной интронной области в регуляции экспрессии генов. Известно, что интронные области могут участвовать в сплайсинге мРНК и в формировании вторичных структур пре-мРНК, влияя тем самым на экспрессию генов [37]. Предполагается, что такой механизм существует и в отношении регуляции экспрессии аквапорина-5 [10].

Независимо от механизма, лежащего в основе установленных фактов, представляется целесообразным изучение зависимости уровней экспрессии *AQP5* от генотипа rs3736309. больных при септическом шоке. Результаты такого исследования позволят лучше понять вклад *AQP5* в развитии отека легких и приблизиться к персонализации лечения больных с легочной инфекцией и септическим шоком.

## Выводы

Полученные данные свидетельствуют, что полиморфные варианты rs3736309 *AQP5* оказывают влияние на течение и исход отека легких при септическом шоке. У больных генотипа *AQP5* AA (rs3736309) с септическим шоком значения ИВСВЛ, а также содержание сурфактантового белка SP-D в плазме были ниже, чем у больных других генотипов (табл. 4, рис. 2 и 3). Больные генотипа AA были более чувствительны к лечению отека легких при развитии септического шока (табл. 5). Аллель G rs3736309 является неблагоприятным фактором при развитии отека легких в обследованной выборке больных с септическим шоком. Предполагается, что генотипирование больных по сайту полиморфизма rs3736309 гена *AQP5* позволит стратифицировать риски развития отека легких у больных с септическим шоком с целью наибольшей персонализации лечения.

**Благодарности.** Коллектив авторов выражает признательность Малаховой С.В. за проведение лабораторных исследований.

## Литература

1. Смелая Т.В., Кузовлев А.Н., Мороз В.В., Голубев А.М., Белопольская О.Б., Сальникова Л.Е. Молекулярно-генетические маркеры нозокомиальной пневмонии острого респираторного дистресс-синдрома. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (3): 24–38. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-24-38>
2. Cardoso C.P., Oliveira A.J., Botoni F.A., Rezende I.C., Alves-Filho J.C., Cunha F.Q., Estanislau J.A., Magno L.A., Rios-Santos F. Interleukin-10 rs2227307 and CXCR2 rs1126579 polymorphisms modulate the predisposition to septic shock. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015; 110 (4): 453–460. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150003>. PMID: 26038959
3. Sotos-Prieto M., Peñalvo J.L. Genetic variation of apolipoproteins, diet and other environmental interactions; an updated review. *Nutr. Hosp.* 2013; 28 (4): 999–1009. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.4.6475>. PMID: 23889614
4. Perez-Martinez P., Garcia-Rios A., Delgado-Lista J., Perez-Jimenez F., Lopez-Miranda J. Nutrigenetics of the postprandial lipoprotein metabolism: evidences from human intervention studies. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2011; 9 (3): 287–291. <http://dx.doi.org/10.2174/157016111795495495>. PMID: 21314629

of the G allele in edema development in patients diagnosed with septic shock.

Another mechanism to explain the effect of *AQP5* genotype on the development of pulmonary edema in pulmonary infections may be associated with a role of variant intron region in the regulation of gene expression. It is known that the intron regions are involved in splicing of mRNAs and secondary structures formation of pre-mRNA, thereby affecting gene expression [37]. It has been proposed that a similar mechanism might regulate expression of *AQP5* molecules [10].

Regardless of the mechanism underlying the established facts, it seems appropriate to study the expression levels of *AQP5* depending on the genotype of rs3736309 in patients with septic shock. The results of this study will enable a better understanding of the contribution of *AQP5* in the development of pulmonary edema in critical illness and personalize the treatment of patients with lung infection and septic shock.

## Conclusion

The findings suggest that polymorphic variants rs3736309 *AQP5* affect the course and outcome of lung edema in septic shock. Patients with genotype AA *AQP5* (rs3736309) with septic shock exhibit lower EVLWI values and decreased concentration of surfactant SP-D protein in plasma compared to patients of other genotypes (Table 4, Figs. 2 and 3). Treatment of pulmonary edema in patients with septic shock was more effective in patients of AA genotype of *AQP5* (rs3736309) (Table 5). Allele G rs3736309 is an unfavorable factor for the development of pulmonary edema in patients with septic shock. It is suggested that genotyping of patients for rs3736309 *AQP5* genotype might contribute to risk stratification for patients with septic shock and lung edema to personalize the treatment.

**Acknowledgements.** Authors are grateful to Mss. Svetlana V. Malakhova for the conduct of laboratory tests.

## References

1. Smelaya T.V., Kuzovlev A.N., Moroz V.V., Golubev A.M., Belopolskaya O.B., Salmnikova L.E. Molekulyarno-geneticheskie markery nozokomialnoi pnevmonii ostrogo respiratornogo distress-sindroma. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Search for common molecular genetic markers of nosocomial pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *General Reanimatology*]. 2015; 11 (3): 24–38. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-24-38>. [In Russ.]
2. Cardoso C.P., Oliveira A.J., Botoni F.A., Rezende I.C., Alves-Filho J.C., Cunha F.Q., Estanislau J.A., Magno L.A., Rios-Santos F. Interleukin-10 rs2227307 and CXCR2 rs1126579 polymorphisms modulate the predisposition to septic shock. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015; 110 (4): 453–460. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150003>. PMID: 26038959
3. Sotos-Prieto M., Peñalvo J.L. Genetic variation of apolipoproteins, diet and other environmental interactions; an updated review. *Nutr. Hosp.* 2013; 28 (4): 999–1009. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.4.6475>. PMID: 23889614
4. Perez-Martinez P., Garcia-Rios A., Delgado-Lista J., Perez-Jimenez F., Lopez-Miranda J. Nutrigenetics of the postprandial lipoprotein metabolism: evidences from human intervention studies. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2011; 9 (3): 287–291. <http://dx.doi.org/10.2174/157016111795495495>. PMID: 21314629

## Original Observation

5. Day R.E., Kitchen P., Owen D.S., Bland C., Marshall L., Conner A.C., Bill R.M., Conner M.T. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1840 (5): 1492–1506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.033>. PMID: 24090884
6. Verkman A.S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 2005; 118 (Pt 15): 3225–3232. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02519>. PMID: 16079275
7. Mezzasoma L., Cagini L., Antognelli C., Puma F., Pacifico E., Talesa V.N. TNF- $\alpha$  regulates natriuretic peptides and aquaporins in human bronchial epithelial cells BEAS-2B. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 159349. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/159349>. PMID: 24369440
8. Bloch O., Manley G.T. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema. *Neurosurg. Focus.* 2007; 22 (5): E3. <http://dx.doi.org/10.3171/foc.2007.22.5.4>. PMID: 17613234
9. Li J., Xu M., Fan Q., Xie X., Zhang Y., Mu D., Zhao P., Zhang B., Cao F., Wang Y., Jin F., Li Z. Tanshinone IIA ameliorates seawater exposure-induced lung injury by inhibiting aquaporins (AQP) 1 and AQP5 expression in lung. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011; 176 (1–2): 39–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2011.01.005>. PMID: 21244858
10. Ning Y., Ying B., Han S., Wang B., Wang X., Wen F. Polymorphisms of aquaporin5 gene in chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese population. *Swiss Med. Wkly.* 2008; 138 (39–40): 573–578. <http://dx.doi.org/10.2008/39/smw-12240>. PMID: 18853286
11. Adamzik M., Frey U.H., Möhlenkamp S., Scherag A., Waydhas C., Marggraf G., Dammann M., Steinmann J., Siffert W., Peters J. Aquaporin 5 gene promoter -1364A/C polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. *Anesthesiology.* 2011; 114 (4): 912–917. <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e31820ca911>. PMID: 21427539
12. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S.M., Sevransky J.E., Sprung C.L., Douglas I.S., Jaeschke R., Osborn T.M., Nunnally M.E., Townsend S.R., Reinhart K., Kleinpell R.M., Angus D.C., Deutschman C.S., Machado F.R., Rubenfeld G.D., Webb S.A., Beale R.J., Vincent J.L., Moreno R.; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* 2013; 41 (2): 580–637. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-012-2769-8>. PMID: 23353941
13. Мороз В.В., Голубев А.М., Кузовлев А.Н. Отек легких: классификация, механизмы развития, диагностика. *Общая реаниматология.* 2009; 5 (1): 83–88. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2009-1-83>
14. Tablan O.C., Anderson L.J., Besser R., Bridges C., Hajjeh R.; CDC; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep.* 2004; 53 (RR-3): 1–36. PMID: 15048056
15. Гельфанд Б.Р., Яковлев С.В., Проценко Д.Н., Белоцерковский Б.З. Нозокомиальная пневмония, связанная с искусственной вентиляцией легких: возможна ли стандартизация терапии? *Consilium Medicum.* 2004; 6 (4): 245–248.
16. Pugin J., Auckenthaler R., Mili N., Janssens J.P., Lew P.D., Suter P.M. Diagnosis of ventilator associated pneumonia by bacteriological analysis of bronchoscopic and non bronchoscopic «blind» bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143 (5Pt 1): 1121–1129. [http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/143.5\\_Pt\\_1.1121](http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/143.5_Pt_1.1121). PMID: 2024824
17. Чучалин А.Г., Гельфанд Б.Р. (ред.). Нозокомиальная пневмония у взрослых. Российские национальные рекомендации. М.; 2009: 92.
18. Мороз В.В., Голубев А.М., Кузовлев А.Н., Писарев В.М. Новые диагностические кандидатные молекулярные биомаркеры острого респираторного дистресс-синдрома. *Общая реаниматология.* 2014; 10 (4): 6–10. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-4-6-10>
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>
20. Newton C.R., Heptinstall L.E., Summers C., Super M., Schwarz M., Anwar R., Graham A., Smith J.C., Markham A.F. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet.* 1989; 2 (8678–8679): 1481–1483. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)92931-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(89)92931-0). PMID: 2574768
21. Hamajima N., Katsuda N., Matsuo K., Saito T., Ito L.S., Ando M., Inoue M., Takezaki T., Tajima K. Smoking habit and interleukin 1B C-31T polymorphism. *J. Epidemiol.* 2001; 11 (3): 120–125. PMID: 11434423
22. Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г., Веснина И.Н., Лантеева Н.Ш., Кузнецова Г.И., Абилов С.К., Рубанович А.В. Полиморфизм генов репарации и цитогенетические эффекты облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2010; 50 (6): 656–662. PMID: 21434392
23. Егорова И.Н., Власенко А.В., Мороз В.В., Яковлев В.Н., Алексеев В.Г. Вентилятор-ассоциированная пневмония: диагностика, профилактика, лечение (современное состояние вопроса). *Общая реаниматология.* 2010; 6 (1): 79–88. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2010-1-79>
24. Pretto E.A. (ed.). Oxford textbook of transplant anaesthesia and critical care. USA: Oxford University Press; 450.
5. Day R.E., Kitchen P., Owen D.S., Bland C., Marshall L., Conner A.C., Bill R.M., Conner M.T. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1840 (5): 1492–1506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.033>. PMID: 24090884
6. Verkman A.S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 2005; 118 (Pt 15): 3225–3232. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02519>. PMID: 16079275
7. Mezzasoma L., Cagini L., Antognelli C., Puma F., Pacifico E., Talesa V.N. TNF- $\alpha$  regulates natriuretic peptides and aquaporins in human bronchial epithelial cells BEAS-2B. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 159349. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/159349>. PMID: 24369440
8. Bloch O., Manley G.T. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema. *Neurosurg. Focus.* 2007; 22 (5): E3. <http://dx.doi.org/10.3171/foc.2007.22.5.4>. PMID: 17613234
9. Li J., Xu M., Fan Q., Xie X., Zhang Y., Mu D., Zhao P., Zhang B., Cao F., Wang Y., Jin F., Li Z. Tanshinone IIA ameliorates seawater exposure-induced lung injury by inhibiting aquaporins (AQP) 1 and AQP5 expression in lung. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011; 176 (1–2): 39–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2011.01.005>. PMID: 21244858
10. Ning Y., Ying B., Han S., Wang B., Wang X., Wen F. Polymorphisms of aquaporin5 gene in chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese population. *Swiss Med. Wkly.* 2008; 138 (39–40): 573–578. <http://dx.doi.org/10.2008/39/smw-12240>. PMID: 18853286
11. Adamzik M., Frey U.H., Möhlenkamp S., Scherag A., Waydhas C., Marggraf G., Dammann M., Steinmann J., Siffert W., Peters J. Aquaporin 5 gene promoter -1364A/C polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. *Anesthesiology.* 2011; 114 (4): 912–917. <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e31820ca911>. PMID: 21427539
12. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S.M., Sevransky J.E., Sprung C.L., Douglas I.S., Jaeschke R., Osborn T.M., Nunnally M.E., Townsend S.R., Reinhart K., Kleinpell R.M., Angus D.C., Deutschman C.S., Machado F.R., Rubenfeld G.D., Webb S.A., Beale R.J., Vincent J.L., Moreno R.; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* 2013; 41 (2): 580–637. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-012-2769-8>. PMID: 23353941
13. Мороз В.В., Голубев А.М., Кузовлев А.Н. Отек легких: классификация, механизмы развития, диагностика. *Общая реаниматология.* 2009; 5 (1): 83–88. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2009-1-83>
14. Tablan O.C., Anderson L.J., Besser R., Bridges C., Hajjeh R.; CDC; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep.* 2004; 53 (RR-3): 1–36. PMID: 15048056
15. Гельфанд Б.Р., Яковлев С.В., Проценко Д.Н., Белоцерковский Б.З. Нозокомиальная пневмония, связанная с искусственной вентиляцией легких: возможна ли стандартизация терапии? *Consilium Medicum.* 2004; 6 (4): 245–248.
16. Pugin J., Auckenthaler R., Mili N., Janssens J.P., Lew P.D., Suter P.M. Diagnosis of ventilator associated pneumonia by bacteriological analysis of bronchoscopic and non bronchoscopic «blind» bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143 (5Pt 1): 1121–1129. [http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/143.5\\_Pt\\_1.1121](http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/143.5_Pt_1.1121). PMID: 2024824
17. Чучалин А.Г., Гельфанд Б.Р. (ред.). Нозокомиальная пневмония у взрослых. Российские национальные рекомендации. М.; 2009: 92.
18. Мороз В.В., Голубев А.М., Кузовлев А.Н., Писарев В.М. Новые диагностические кандидатные молекулярные биомаркеры острого респираторного дистресс-синдрома. *Общая реаниматология.* 2014; 10 (4): 6–10. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-4-6-10>
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>
20. Newton C.R., Heptinstall L.E., Summers C., Super M., Schwarz M., Anwar R., Graham A., Smith J.C., Markham A.F. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet.* 1989; 2 (8678–8679): 1481–1483. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)92931-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(89)92931-0). PMID: 2574768
21. Hamajima N., Katsuda N., Matsuo K., Saito T., Ito L.S., Ando M., Inoue M., Takezaki T., Tajima K. Smoking habit and interleukin 1B C-31T polymorphism. *J. Epidemiol.* 2001; 11 (3): 120–125. PMID: 11434423
22. Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г., Веснина И.Н., Лантеева Н.Ш., Кузнецова Г.И., Абилов С.К., Рубанович А.В. Полиморфизм генов репарации и цитогенетические эффекты облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2010; 50 (6): 656–662. PMID: 21434392
23. Егорова И.Н., Власенко А.В., Мороз В.В., Яковлев В.Н., Алексеев В.Г. Вентилятор-ассоциированная пневмония: диагностика, профилактика, лечение (современное состояние вопроса). *Общая реаниматология.* 2010; 6 (1): 79–88. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2010-1-79>
24. Pretto E.A. (ed.). Oxford textbook of transplant anaesthesia and critical care. USA: Oxford University Press; 450.



25. Agre P., King L.S., Yasui M., Guggino W.B., Ottersen O.P., Fujiyoshi Y., Engel A., Nielsen S. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 2002; 542 (Pt 1): 3–16. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020818>. PMID: 12096044
26. Agre P., Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 2003; 555 (1): 72–78. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01083-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01083-4). PMID: 14630322
27. Shen Y., Wang X., Wang Y., Wang X., Chen Z., Jin M., Bai C. Lipopolysaccharide decreases aquaporin 5, but not aquaporin 3 or aquaporin 4, expression in human primary bronchial epithelial cells. *Respirology.* 2012; 17 (7): 1144–1149. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02228.x>. PMID: 22809117
28. Yang B., Verkman A.S. Analysis of double knockout mice lacking aquaporin-1 and urea transporter UT-B. Evidence for UT-B-facilitated water transport in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (39): 36782–36786. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206948200>. PMID: 12133842
29. Sun Y., Sun L., Liu S., Song J., Cheng J., Liu J. Effect of emodin on Aquaporin 5 expression in rats with sepsis-induced acute lung injury. *J. Tradit. Chin. Med.* 2015; 35 (6): 679–684. PMID: 26742314
30. Jin Y., Yu G., Peng P., Zhang Y., Xin X. Down-regulated expression of AQP5 on lung in rat DIC model induced by LPS and its effect on the development of pulmonary edema. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2013; 26 (6): 661–665. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2013.03.013>. PMID: 23538169
31. Jiang Y.X., Dai Z.L., Zhang X.P., Zhao W., Huang Q., Gao L.K. Dexmedetomidine alleviates pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2015; 35 (5): 684–688. <http://dx.doi.org/10.1007/s11596-015-1490-6>. PMID: 26489622
32. Moon C., Rousseau R., Soria J.C., Hoque M.O., Lee J., Jang S.J., Trink B., Sidransky D., Mao L. Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells. *Am. J. Hematol.* 2004; 75 (3): 128–133. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.10476>. PMID: 14978691
33. Shen Y., Wang Y., Chen Z., Wang D., Wang X., Jin M., Bai C. Role of aquaporin 5 in antigen-induced airway inflammation and mucous hyperproduction in mice. *J. Cell Mol. Med.* 2011; 15 (6): 1355–1363. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01103.x>. PMID: 20550619
34. Wang G.F., Dong C.L., Tang G.S., Shen Q., Bai C.X. Membrane water permeability related to antigen-presenting function of dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 153 (3): 410–419. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03702.x>. PMID: 18647319
35. Mueller J.C. Linkage disequilibrium for different scales and applications. *Brief Bioinform.* 2004; 5 (4): 355–364. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/5.4.355>. PMID: 15606972
36. Hansel N.N., Sidhaye V., Rafaels N.M., Gao L., Gao P., Williams R., Connett J.E., Beaty T.H., Mathias R.A., Wise R.A., King L.S., Barnes K.C. Aquaporin 5 polymorphisms and rate of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2010; 5 (12): e14226. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014226>. PMID: 21151978
37. Llopert A., Comeron J.M., Brunet F.G., Lachaise D., Long M. Intron presence-absence polymorphism in *Drosophila* driven by positive Darwinian selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002; 99 (12): 8121–8126. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.122570299>. PMID: 12060758
- Поступила 22.01.16**
- Biologiya. Radioekologiya.* 2010; 50 (6): 656–662. PMID: 21434392. [In Russ.]
23. Egorova I.N., Vlasenko A.V., Moroz V.V., Yakovlev V.N., Alekseyev V.G. Ventilator-assotsirovannaya pnevmoniya: diagnostika, profilaktika, lechenie (sovremennoe sostoyanie voprosa). *Obshchaya Reanimatologiya*. [Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, prevention, treatment (state-of-the-art of the problem)]. *General Reanimatology*. 2010; 6 (1): 79–88. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2010-1-79>. [In Russ.]
24. Pretto E.A. (ed.). Oxford textbook of transplant anaesthesia and critical care. USA: *Oxford University Press*; 450.
25. Agre P., King L.S., Yasui M., Guggino W.B., Ottersen O.P., Fujiyoshi Y., Engel A., Nielsen S. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 2002; 542 (Pt 1): 3–16. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020818>. PMID: 12096044
26. Agre P., Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 2003; 555 (1): 72–78. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01083-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01083-4). PMID: 14630322
27. Shen Y., Wang X., Wang Y., Wang X., Chen Z., Jin M., Bai C. Lipopolysaccharide decreases aquaporin 5, but not aquaporin 3 or aquaporin 4, expression in human primary bronchial epithelial cells. *Respirology.* 2012; 17 (7): 1144–1149. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02228.x>. PMID: 22809117
28. Yang B., Verkman A.S. Analysis of double knockout mice lacking aquaporin-1 and urea transporter UT-B. Evidence for UT-B-facilitated water transport in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (39): 36782–36786. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206948200>. PMID: 12133842
29. Sun Y., Sun L., Liu S., Song J., Cheng J., Liu J. Effect of emodin on Aquaporin 5 expression in rats with sepsis-induced acute lung injury. *J. Tradit. Chin. Med.* 2015; 35 (6): 679–684. PMID: 26742314
30. Jin Y., Yu G., Peng P., Zhang Y., Xin X. Down-regulated expression of AQP5 on lung in rat DIC model induced by LPS and its effect on the development of pulmonary edema. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2013; 26 (6): 661–665. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2013.03.013>. PMID: 23538169
31. Jiang Y.X., Dai Z.L., Zhang X.P., Zhao W., Huang Q., Gao L.K. Dexmedetomidine alleviates pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2015; 35 (5): 684–688. <http://dx.doi.org/10.1007/s11596-015-1490-6>. PMID: 26489622
32. Moon C., Rousseau R., Soria J.C., Hoque M.O., Lee J., Jang S.J., Trink B., Sidransky D., Mao L. Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells. *Am. J. Hematol.* 2004; 75 (3): 128–133. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.10476>. PMID: 14978691
33. Shen Y., Wang Y., Chen Z., Wang D., Wang X., Jin M., Bai C. Role of aquaporin 5 in antigen-induced airway inflammation and mucous hyperproduction in mice. *J. Cell Mol. Med.* 2011; 15 (6): 1355–1363. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01103.x>. PMID: 20550619
34. Wang G.F., Dong C.L., Tang G.S., Shen Q., Bai C.X. Membrane water permeability related to antigen-presenting function of dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 153 (3): 410–419. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03702.x>. PMID: 18647319
35. Mueller J.C. Linkage disequilibrium for different scales and applications. *Brief Bioinform.* 2004; 5 (4): 355–364. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/5.4.355>. PMID: 15606972
36. Hansel N.N., Sidhaye V., Rafaels N.M., Gao L., Gao P., Williams R., Connett J.E., Beaty T.H., Mathias R.A., Wise R.A., King L.S., Barnes K.C. Aquaporin 5 polymorphisms and rate of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2010; 5 (12): e14226. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014226>. PMID: 21151978
37. Llopert A., Comeron J.M., Brunet F.G., Lachaise D., Long M. Intron presence-absence polymorphism in *Drosophila* driven by positive Darwinian selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002; 99 (12): 8121–8126. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.122570299>. PMID: 12060758

Submitted 22.01.16