

# ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА TNF- $\alpha$ ПРИ ЛОКАЛІЗОВАНИХ І ГЕНЕРАЛІЗОВАНИХ ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ У ДІТЕЙ

Л.В. Пипа, М.М. Мургіна

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Україна

**Мета:** вивчити вплив одноалельного поліморфізму гена ФНО- $\alpha$  (308 G/A) на схильність до розвитку генералізованих форм гнійно-септичних захворювань у дітей.

**Пацієнти і методи.** Було обстежено 27 хворих з локалізованими та генералізованими гнійно-септичними захворюваннями віком від 8 місяців до 17 років. Визначення алельного поліморфізму промоторної ділянки гена ФНО- $\alpha$  (-308 $\rightarrow$ G A) проводили за допомогою методу рестриктивного аналізу продуктів ампліфікації (PCR-RFLP).

**Результати.** У групі локалізованих інфекцій у 14 (93,3%) дітей виявлений типовий варіант алелі ФНО- $\alpha$  (308 G) і в 1 (6,7%) дитини – атиповий варіант алелі ФНО- $\alpha$  (308A). У групі генералізованих форм типовий варіант гена (308 G) виявлено у 8 (66%) дітей, атиповий (308 A) – у 4 (34%).

**Висновки.** Наявність атипового варіанту гена TNF- $\alpha$  (308 A) є фактором ризику розвитку генералізованої форми інфекції. Носіям даного варіанту гена ФНО- $\alpha$  при появі локалізованої бактеріальної інфекції слід одразу призначати потужну антибактеріальну терапію.

**Ключові слова:** діти, фактор некрозу пухлин  $\alpha$ , одноалельний поліморфізм.

## Вступ

Досягнення фармакології та сучасні хірургічні методики дозволили значно покращити наслідки багатьох захворювань, однак кількість гнійно-септичних захворювань та їхнього крайнього прояву – сепсису постійно зростає [1,11,15]. Стабільно високий рівень летальності при септичних станах ставить їх у центр уваги спеціалістів різних спеціальностей [2,4]. Останніми десятиріччями значно змінилися погляди на патогенез розвитку генералізованої форми гнійно-септичних захворювань – сепсису. Стало очевидним, що в основі патогенезу сепсису лежить запуск цитокінового каскаду, який включає в себе продукцію як прозапальних, так і протизапальних цитокінів. Відомо, що ступінь продукції кожного з медіаторів запалення характеризується виразною варіабельністю, яка генетично детермінована та обумовлена, зокрема, алельним поліморфізмом генів цитокінів [16]. Алельний варіант генів цитокінів, особливо в його промоторній частині, може детермінувати рівень продукції білка, що має особливе значення в умовах патології [5,17]. Фактор некрозу пухлини альфа (ФНО- $\alpha$ ) є одним із найкраще вивчених цитокінів. Це білковий цитокін доімун-

ного запалення з виразною прозапальною активністю, що є пусковим медіатором системної запальної відповіді (СЗВ). Він стимулює вивільнення та синтез інших прозапальних медіаторів та має пряму цитотоксичну дію на ендотеліальні клітини органів та тканин, що обумовлює його генералізовану дію на організм [4,7].

У багатьох дослідженнях було виявлено, що певні патологічні стани супроводжуються високим вмістом ФНО- $\alpha$  в крові [13,16]. Ген ФНО- $\alpha$ , представлений однією копією в 6-тій хромосомі людини, розміщується у головному комплексі гістосумісності (ГКГ) біля локусу HLA-B на  $\approx$ 250 кілобаз центрометрично і на 850 кілобаз телеметрично від HLA-DR та належить до генів 3 класу (рис. 1).

Найбільше описаний поліморфізм у промоторній ділянці гена ФНО- $\alpha$  в позиції 308. При типовому варіанті алелі в позиції 308 розміщується гуанін (ФНО- $\alpha$  308 G) в атиповому (дикому) варіанті – аланін (ФНО- $\alpha$  308 A). Дикий варіант у людській популяції зустрічається у близько 30% осіб [11,17]. Дослідження показали, що атиповий варіант алелі ФНО- $\alpha$  (308 A) спричиняє підвищену транскрипцію гена порівняно із типовим варіантом алелі ФНО- $\alpha$  (308 G), що призводить до

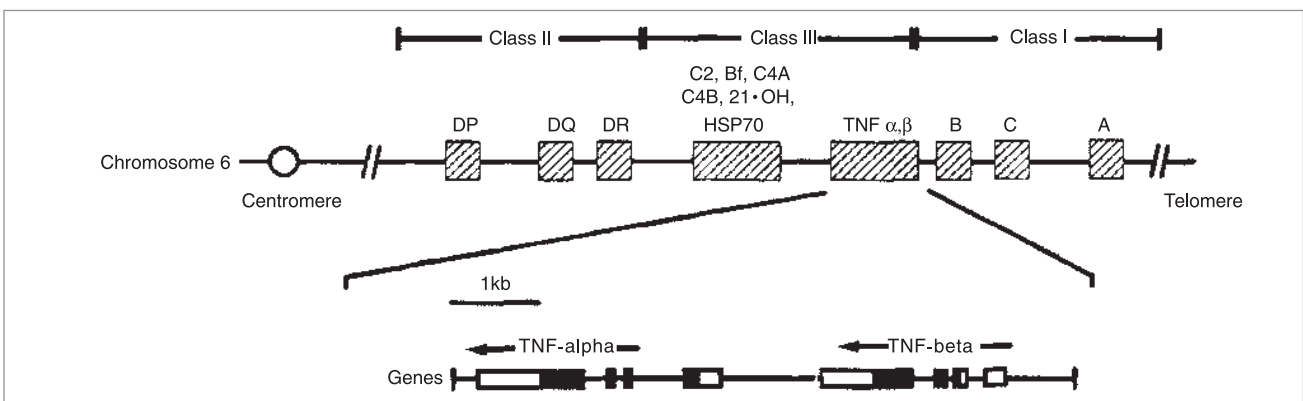


Рис. 1. Будова головного комплексу гістосумісності людини та гена ФНО- $\alpha$  [11]

Локалізовані форми гнійно-септичних захворювань у дітей

Клінічна форма	Кількість дітей	
	абс.	%
Абдомінальна порожнина	10	66,
Торакальна порожнина	2	13,3
ЛОР-органи	1	6,7
Остеомієліт	1	6,7
Менінгококова інфекція	1	6,7

підвищення секреції ФНО- $\alpha$  макрофагами *in vitro* та збільшення концентрації ФНО- $\alpha$  у сироватці крові *in vivo* [8,17].

Доведено, що атипичний варіант гена ФНО- $\alpha$  (308 A) асоційований із несприятливими наслідками різноманітних інфекційних та запальних захворювань, зокрема генералізованою формою менінгококової інфекції, церебральної форми малярії тощо [13,14]. Тому він може розглядатися як окремих фактор ризику розвитку генералізованих форм гнійно-септичних захворювань різної етіології.

**Мета** дослідження: вивчити вплив одноалельного поліморфізму гена ФНО- $\alpha$  (308 G/A) на схильність до розвитку генералізованих форм гнійно-септичних захворювань у дітей.

### Матеріал і методи дослідження

У роботі використано матеріали, отримані в ході обстеження 27 дітей (17 хлопчиків та 10 дівчаток, що складає 63% та 37%, відповідно) із локалізованими та генералізованими формами гнійно-септичних захворювань, які протягом 2010–2011 рр. знаходились на лікуванні у Хмельницькій міській дитячій та Хмельницькій міській інфекційній лікарнях. Середній вік хворих дітей становив  $8,3 \pm 1,5$  року (від 8 місяців до 17 років).

Дослідження здійснювалось після отримання висновку етичної комісії при Вінницькому національному медичному університеті та письмової згоди батьків хворих дітей.

Визначення алельного поліморфізму промоторної ділянки гена ФНО- $\alpha$  (-308 G $\rightarrow$ A) проводили за допомогою методу рестриктивного аналізу продуктів ампліфікації (PCR-RFLP). Дослідження проводилось в Центрі молекулярної генетики при Медико-генетичному науковому центрі Російської академії медичних наук. Геномну ДНК виділяли із сухої краплі за допомогою набору реагентів DIALom™ DNA PreplOO. Плями крові подрібнювались та розміщувались в лізуючий реагент. Пробірка із сумішшю ставилася в термостат на одну годину при температурі 65°C. Ділянки промоторних регіонів гена ФНО- $\alpha$  ампліфікували з використанням наступних пар праймерів: 5'-AGG-CAA-TAG-GTT-TTG-AGG-GCC-AT-3', 5'-ACA-CTC-CCC-ATC-CTC-CCG-GCT-3'.

Продукти ампліфікації піддавались рестрикції за допомогою ендонуклеази Sty I. Отримані продукти ампліфікації змішувались в пробірці із рестрикційним буфером та ферментом, суміш після перемішування центрифугували 2–3 с та ставили в термостат при температурі 37°C на 12 год. Електрофорез проводився в 7% аcriламідному гелі протягом години. Довжина ампліфікованого фрагменту 148 п.н. Після проведення рестрикції в гелі рееструються смуги у випадку алелі G – 128+20 п.н., а при алелі A – 148 п.н.

Статистичну обробку результатів дослідження виконували стандартними методами біометрії на персональному комп'ютері Pentium у рамках статистичних пакетів

Excei-2000, Statistica 6,0; графічне відображення результатів досліджень виконувалось у межах пакету Excel-2000. Різниця між показниками різних груп вважалась достовірною при  $p < 0,05$ .

### Результати дослідження та їх обговорення

На сьогодні в педіатричній практиці для визначення таких термінів, як синдром системної запальної відповіді (ССЗВ). інфекція, сепсис, важкий сепсис, септичний шок, користуються консенсусом, опублікованим у 2005 році за результатами міжнародної погоджувальної конференції з питань педіатричного сепсису (IPSSC) [6,10].

ССЗВ визначається за наявності 2-х із 4-х критеріїв, один з яких обов'язковий – аномальна температура або зміна кількості лейкоцитів у периферійній крові [1,10]. ССЗВ у дітей не може бути встановленим лише за наявності задишки та тахікардії, оскільки останні у дітей є частими симптомами інших патологічних станів. Критерії ССЗВ у дітей включають наступне:

1. Центральна температура вище 38,5°C або нижче 36,0°C.
2. Тахікардія з підвищенням ЧСС на понад два квадратичні відхилення від вікової норми, за відсутності зовнішніх стимулів, а у дітей до року – і брадикардія.
3. Середня ЧД, яка перевищує вікову норму на два квадратичні відхилення, або потреба у ШВЛ при гострому процесі.
4. Кількість лейкоцитів у периферичній крові підвищена або знижена відносно вікової норми, або вміст незрілих форм лейкоцитів більше 10%.

У світі на сьогоднішній день сепсис у дітей являє собою ССЗП, який розвинувся внаслідок доведеної або ймовірної інфекції [1,10].

У ході клініко-лабораторного обстеження оцінювалась динаміка основних ознак ССЗВ. Для оцінки розвитку поліорганної недостатності додатково моніторувались наступні клініко-лабораторні показники: оцінка стану ЦНС – оцінка за шкалою Глазго; стан серцево-судинної системи – артеріальний тиск, застосування препаратів з іонотропною дією; дихальної системи – участь в акті дихання допоміжних м'язів, SaO<sub>2</sub>, наявність самостійного ефективного дихання; видільна система – діурез, рівень сечовини, креатиніну та калію в сироватці крові; для оцінки функціональної активності печінки та запальних змін досліджували рівень загального білка, білкові фракції, загальний білірубін та його фракції, активність АЛТ і АСТ.

Залежно від локалізації вогнища інфекції діти розподілились наступним чином: абдомінальна порожнина – 12 (44,5%), торакальна порожнина – 4 (14,8%), гнійно-запальні процеси ЛОР-органів – 3 (11,1%), остеомієліт – 3 (11,1%), менінгококова інфекція – 5 (18,5%) дітей.

Серед локалізованих форм переважала локалізація у черевній порожнині – 10 (66,6%), грудній клітці – 2 (13,3%), остеомієліт – 1 (6,7%), патологія ЛОР-орга-

Таблиця 2

**Генералізовані форми гнійно-септичних захворювань у дітей**

Клінічна форма	Кількість дітей	
	абс.	%
Абдомінальна порожнина	2	16,7
Торакальна порожнина	2	16,7
ЛОР-органи	2	16,7
Остеомієліт	2	16,7
Менінгококова інфекція	4	33,2

Таблиця 3

**Поліморфізм ФНО-а при локалізованих і генералізованих формах гнійно-септичних захворювань у дітей**

Варіант алелі ФНО-α	Локалізована форма		Генералізована форма		p
	абс.	%	абс.	%	
ФНО-α (308A)	1	6,7	4	34	
ФНО-α (308G)	14	93,3	8	66	<0,05

нів – 1 (6,7%), менінгококова інфекція – 1 (6,7%) дитини (табл. 1).

Генералізовані форми діагностовано у 12 дітей, що склало 44,4%. Діагностика ґрунтувалася на ознаках ССЗВ – два і більше критеріїв у поєднанні з кількома вогнищами запалення. Серед генералізованих форм переважала генералізована менінгококова інфекція – 4 (33,2%), абдомінальна порожнина – 2 (16,7%), торакальна порожнина – 2 (16,7%), ЛОР-патологія – 2 (16,7%), остеомієліт – 2 (16,7%) дитини (табл. 2).

Усім дітям було проведено визначення алельного поліморфізму ФНО-α (308 G→A). У групі локалізованих інфекцій у 14 (93,3%) дітей виявлений типовий варіант алелі ФНО-α (308G) і в 1 (6,7%) дитини – атиповий

варіант алелі ФНО-α (308A). У групі генералізованих форм типовий варіант гена (308 G) виявлено у 8 (66%) дітей, атиповий (308 A) – у 4 (34%) (табл. 3).

Дані таблиці свідчать, що у дітей з генералізованими формами гнійно-септичних станів достовірно частіше спостерігався атиповий (дикий) варіант ФНО-α (308 A).

**Висновки**

Атиповий варіант гена ФНО-α (308 A) є предиктором розвитку генералізованих форм гнійно-септичних станів у дітей. Носіям даного варіанту гена ФНО-α при появі локалізованої бактеріальної інфекції слід одразу призначати потужну антибактеріальну терапію.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Александрович Ю. С. Интенсивная терапия инфекционных заболеваний у детей / Ю. С. Александрович, В. И. Гордеев, К. В. Пшениснов. – СПб.: Элби–СПб. 2010. – 311 с.
2. Волосовец О. П. Етіологія, патогенез, діагностика, лікування та профілактика сепсису новонароджених / О. П. Волосовец, С. П. Кривопустов // Клин. педиатрия. – 2006. – № 1. – С. 36–41.
3. Рекомендации по ведению пациентов с тяжелым сепсисом и септическим шоком / Джеллинджер Р. Ф., Карле Ж. М., Мазур Г. [и др.] // Клин. микробиол., антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 208–234.
4. Исаков Ю. Ф. Сепсис у детей / Ю. Ф. Исаков, Н. В. Белобородова. – М.: Издатель Мокеев, 2001. – 268 с.
5. Клинико-иммунологические особенности сепсиса и полиморфизм ненов TNF-α и IL-10 у больных гнойно-хирургической патологией / Курганова Е. В., Голованова О. В., Шевченко А. В. [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2007. – № 2. – С. 37–43.
6. Миронов П. И. Терминология педиатрического сепсиса: прошлое, настоящее и будущее / П. И. Миронов // Журнал интенсивная терапия. – 2006. – № 1. – С. 63–74.
7. Козлов В. К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии: [монография] / В. К. Козлов. – К.: АННА–Т, 2005. – 296 с.
8. Mechanisms and regulation of the gene-expression response to sepsis / Cornell T. T., Wynn J., Shanley T. P. [et al.] // Pediatrics. – 2010. – Vol. 125. – P. 1248–1258.
9. MD. Readmission and Late Mortality After Pediatric Severe Sepsis / Czaja A. S., Zimmerman J. J., Nathens A. B. // Pediatrics. – 2009. – № 3. – P. 849–857.
10. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics / Goldstein B., Giroir B., Randolph A. [et al.] // Pediatr. Crit. Care Med. – 2005. – Vol. 6. – P. 2–8.
11. Holmes C. L. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock Role in Prognosis and Potential for Therapy / C. L. Holmes, J. A. Russell, K. R. Walley // Chest. – 2003. – Vol. 124. – P. 1103–1115.
12. Hotchkiss R. S. The pathophysiology and treatment of sepsis / R. S. Hotchkiss, I. E. Karl // N. Engl. J. Med. – 2003. – Vol. 348, № 2. – P. 138–150.
13. Variation in the TNF-α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria / McGuire W., Hill A. V., Allsopp C. E. [et al.] // Nature. – 1994. – Vol. 371. – P. 508–510.
14. Variation in the tumor necrosis factor – a gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease / Nadel S., Newport M. J., Booy R. [et al.] // J. Infect. Dis. – 1996. – Vol. 174. – P. 878–880.
15. The increasing burden of severe sepsis in U.S. children / Watson R. S., Linde-Zwirble W. T., Lidicker J. [et al.] // Crit. Care Med. – 2001. – Vol. 29. – P. 8–13.
16. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease / Westendorp R. G. J., Langermans J. A. M., Huizinga T. W. J. [et al.] // Lancet. – 1997. – Vol. 349. – P. 170–173.
17. Effects of polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation / Wilson A. G., Symons J. A., McDowell T. L. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 3195–3199.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNF- $\alpha$  ПРИ ЛОКАЛИЗИРОВАННЫХ И ГЕНЕРАЛИЗИРОВАННЫХ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ**

*Л.В. Пыпа, М.М. Мургина*

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Украина

**Цель:** изучить влияние одноаллельного полиморфизма гена ФНО- $\alpha$  (308 G/A) на предрасположенность к развитию генерализованных форм гнойно-септических заболеваний у детей.

**Пациенты и методы.** Было обследовано 27 больных с локализованными и генерализованными гнойно-септическими заболеваниями в возрасте от 8 месяцев до 17 лет. Определение аллельного полиморфизма промоторного участка гена ФНО- $\alpha$  (-308 G→A) проводили при помощи метода рестриктивного анализа продуктов амплификации (PCR-RFLP).

**Результаты.** В группе локализованных инфекций у 14 (93,3%) детей определен типичный вариант аллели ФНО- $\alpha$  (308G) и у 1 (6,7%) ребенка — атипичный вариант аллели ФНО- $\alpha$  (308A). В группе генерализованных форм типичный вариант гена (308 G) определен у 8 (66%) детей, атипичный (308 A) — у 4 (34%).

**Выводы.** Наличие атипичного варианта гена TNF- $\alpha$  (308 A) является фактором риска развития генерализованной формы инфекции. Носителям данного варианта гена ФНО- $\alpha$  при возникновении локализованной бактериальной инфекции следует сразу назначать мощную антибактериальную терапию.

**Ключевые слова:** дети, фактор некроза опухоли  $\alpha$ , одноаллельный полиморфизм.

**TNF- $\alpha$  GENE POLYMORPHISM DURING THE LOCALIZED AND GENERALIZED PURULENT-SEPTIC DISEASES IN CHILDREN**

*L.V. Pypa, M.M. Murgina*

N.I. Pirogov Vinnitsa National Medical University, Ukraine

**Objective:** To study the effect of one allelic TNF- $\alpha$  gene polymorphism (308 G / A) on the susceptibility to the development of a generalized form of purulent-septic diseases in children.

**Patients and methods.** The 27 patients with localized and generalized purulent-septic diseases in the age from 8 months to 17 years were examined. Determination of allelic polymorphism of the promoter area of TNF- $\alpha$  gene (-308 G A) was performed using the method of restrictive analysis of the amplification products (PCR-RFLP).

**Results.** In the localized infection group in 14 (93.3%) children the typical variant of TNF- $\alpha$  alleles of (308G) is defined and in 1 (6.7%) child — an atypical variant TNF- $\alpha$  alleles (308A). In the group of generalized forms of the typical variant of the gene (308 G) is defined in 8 (66%) children, atypical (308 A) — in 4 (34%).

**Conclusions.** The presence of atypical variant of TNF- $\alpha$  gene (308 A) is a risk factor for generalized form of the infection. To the carriers of the present variant of TNF- $\alpha$  gene during the appearance of a localized bacterial infection should be immediately appointed a powerful antibiotic therapy.

**Key words:** children, tumor necrosis factor -  $\alpha$ , one allelic

**НОВОСТИ**

**Вирус папилломы человека отвечает за развитие детской эпилепсии**

Борьба с вирусом, возможно, поможет остановить развитие некоторых форм детской эпилепсии. Ученые из штата Пенсильвания нашли связь между вирусом папилломы человека-16 (ВПЧ-16) и детской эпилепсией.

ВПЧ-16 может проявлять активность в мозге человека. Ученые добавляли вирусный белок в мозг зародышей крыс и видели проблемы развития корковых структур, что характерно для эпилепсии.

«Это новый механизм заполняет пробел в нашем понимании врожденных пороков развития головного мозга», — говорит Питер Крино, профессор неврологии в Университете Темпл. По его словам таргетная терапия против ВПЧ-16 инфекции поможет вылечить эпилепсию.

Кора головного мозга играет ключевую роль в мышлении, восприятия и памяти. Именно в утробе матери во время раннего развития мозга происходит воздействие на данную область. Клеточная структура меняется из-за нарушения сигнала mTOR1, который является важным в развитии мозга. Он активируется онкобелками ВПЧ-16. Наличие белка было подтверждено изучением образцов мозговой ткани пациентов с корковой дисплазией.

Точный механизм влияния вируса папилломы человека на развитие эпилепсии еще предстоит открыть. Ученые полагают, что вирус проникает в мозг ребенка через плаценту. Также применение ингибиторов mTOR может остановить развитие болезни.

**Источник:** <http://medexpert.org.ua>