

# ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ TNF-АЛЬФА ПРИ ЛОКАЛІЗОВАНИХ І ГЕНЕРАЛІЗОВАНИХ ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ У ДІТЕЙ

Мургіна М.М., Пипа Л.В.

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

**Ключові слова:** діти, фактор некрозу пухлин б, 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 центрі уваги спеціалістів самих різних спеціальностей [2,4]. За останні десятиріччя 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 вираженою 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 білку, що має особливе значення в умовах патології [5,17]. Фактор некрозу пухлини альфа (ФНП-альфа) є одним із найкраще вивчених цитокінів. Це білковий цитокін доїмунного запалення із вираженою прозапальною активністю і є пусковим медіатором системної запальної відповіді (СЗВ). Він стимулює вивільнення та синтез інших прозапальних медіаторів та володіє прямою цитотоксичною дією на ендотеліальні клітини органів та тканин, що обумовлює його генералізовану дію на організм [4,7].

В багатьох дослідженнях було виявлено, що певні патологічні стани супроводжуються високим вмістом ФНП-альфа в крові [13,16]. Ген ФНП-альфа, представлений однією

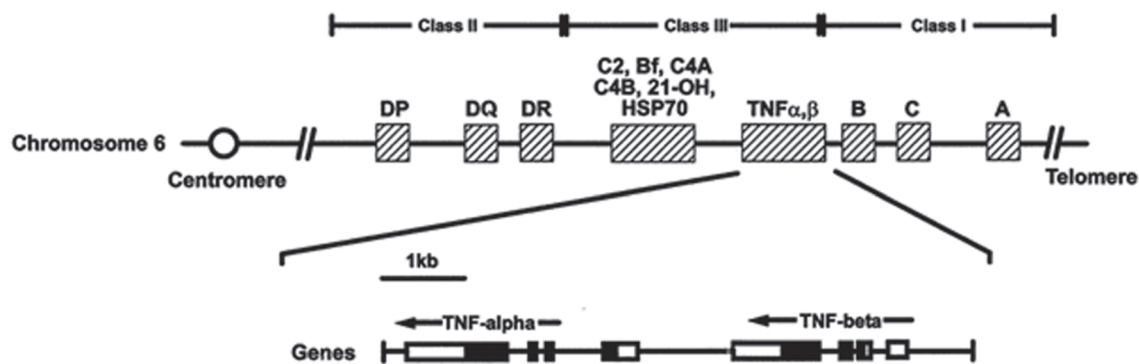
копією в 6-й хромосомі людини, розміщується в головному комплексі гістосумісності (ГКГ) біля локусу HLA-B на 250 кілобаз центрометрично і на 850 кілобаз телеметрично від HLA-DR та належить до генів 3 класу (мал. 1).

Найбільше описаний поліморфізм в промоторній ділянці гену ФНП-альфа в позиції 308. При типовому варіанті алелі в позиції 308 розміщується гуанін (ФНП-альфа 308 G), в атиповому (дикому) варіанті – аланін (ФНП-альфа 308 A). Дикий варіант в людській популяції зустрічається у близько 30% осіб [11,17]. Дослідження показали, що атиповий варіант алелі ФНП-альфа (308 A) спричиняє підвищену транскрипцію гену, у порівнянні із типовим варіантом алелі ФНП-альфа (308 G), що призводить до підвищення секреції ФНП-альфа макрофагами *in vitro* та збільшення концентрації ФНП-альфа в сироватці крові *in vivo* [8,17].

Доведено, що атиповий варіант алелі ФНП-альфа (308 A) асоційований із несприятливими наслідками різноманітних інфекційних та запальних захворювань, зокрема генералізованою формою менінгококової інфекції, церебральною формою малярії тощо [13,14]. Тому атиповий варіант промоторної частини гену ФНП-альфа (308 A) може розглядатися як окремий фактор ризику розвитку генералізованих форм гнійно-септичних захворювань різної етіології.

**Мета дослідження:** вивчити вплив одноалельного поліморфізму гену ФНП-альфа (308 G/A, 308 G/G) на схильність до розвитку генералізованих форм гнійно-септичних захворювань у дітей.

**Матеріали і методи.** В роботі використано матеріали, отримані в ході обстеження 27 дітей (17 хлопчиків та 10



Мал. 1 Будова головного комплексу гістосумісності людини та гену ФНП [11]

дівчаток, що складає 63% та 37%, відповідно) із локалізованими та генералізованими формами гнійно-септичних захворювань, які протягом 2010-2011 років знаходились на лікуванні в Хмельницькій міській дитячій та Хмельницькій міській інфекційній лікарнях. Середній вік хворих дітей складає  $8,3 \pm 1,5$  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 гену ФНП-альфа (308 G→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 D1Atom™ DNA Prep100. Плями крові подрібнювались та розміщувались в лізуючий реагент. Пробірка із сумішшю розміщувалась в термостат на 1 годину при температурі 65°C. Ділянки промоторних регіонів гену ФНП-альфа 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 піддавалися рестрикції за допомогою ендонуклеази Sty I. Отримані продукти ампліфікації змішувалися в пробірці із рестрикційним буфером та ферментом, суміш після перемішування центрифугували 2-3 сек. та розміщували в термостат при температурі 37°C протягом 12 год. Електрофорез проводився в 7% акріламідному 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 Excel-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 при наявності 2-х із 4-х критеріїв, один з яких обов'язковий – аномальна температура або зміна кількості лейкоцитів в периферійній крові [1,10]. ССЗВ у дітей не може бути встановленим лише при наявності задишки та тахікардії, оскільки останні у дітей є часто присутніми симптомами інших патологічних станів. Критерії ССЗВ у дітей включають:

1. Центральна температура вище 38,5°C або нижче 36,0°C.
2. Тахікардія з підвищенням ЧСС більше ніж на 2 квадратичних відхилення від вікової норми при відсутності зовнішніх стимулів, а у дітей до року і брадикардія.
3. Середня ЧД, яка перевищує вікову норму на 2 квадратичних відхилення, або необхідність в ШВЛ при гострому процесі.

4. Кількість лейкоцитів в периферичній крові, яка підвищена або знижена відповідно до вікової норми, або вміст незрілих форм лейкоцитів більше 10%.

У світі на сьогоднішній день сепсис у дітей являє собою синдром системної запальної відповіді, який розвився 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,  $SpO_2$ , 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 білку, білкові фракції, загальний білірубін та його фракції, активність АЛТ і АСТ.

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

Серед локалізованих форм переважала локалізація в черевній порожнині – 10 дітей (66,6%); грудній клітині – 2 дітей (13,3%), остеомієліт – 1 дитина (6,7%), патологія ЛОР органів – 1 дитина (6,7%); менінгококова інфекція – 1 дитина (6,7%), що відображено в табл. 1.

Генералізовані форми діагностовано у 12 дітей, що склало 44,4%. Діагностика базувалась на основі ознак ССЗВ – 2 і більше критеріїв у поєднанні з декількома 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%), що відображено в табл. 2.

Всім дітям було проведено визначення алельного поліморфізму ФНП-альфа (308 G→A). У групі локалізованих інфекцій у 14 (93,3%) дітей був виявлений типовий варіант алелі ФНП-альфа із генотипом (308G/G) і в 1 (6,7%) дитини був атипичний варіант алелі ФНП-альфа із генотипом (308A/G). У групі генералізованих форм типовий варіант гену із генотипом (308 G/G) виявлено у 8 (66%) дітей, атипичний із генотипом (308 A/G) – у 4 (34%), що відображено в табл. 3.

Таблиця 1.

#### Локалізовані форми гнійно-септичних захворювань у дітей

Клінічні форми	Діти	
	абс.	%
Абдомінальна порожнина	10	66,
Торакальна порожнина	2	13,3
ЛОР-органи	1	6,7
Остеомієліт	1	6,7
Менінгококова інфекція	1	6,7

Таблиця 2.

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

Клінічні форми	Діти	
	абс.	%
Абдомінальна порожнина	2	16,7
Торакальна порожнина	2	16,7
ЛОП-органи	2	16,7
Остеомієліт	2	16,7
Менінгококова інфекція	4	33,2

Таблиця 3.

**Поліморфізм гену ФНП-альфа при локалізованих і генералізованих формах гнійно-септичних захворювань у дітей**

Генотип ФНП-альфа	Локалізовані форми		Генералізовані форми		P
	абс.	%	абс.	%	
ФНП-альфа (308A\G)	1	6,7	4	34	<0,05
ФНП-альфа (308G\G)	14	93,3	8	66	

Дані таблиці свідчать, що у дітей з генералізованими формами гнійно-септичних станів з достовірною різницею частіше зустрічався атиповий (дикий) варіант ФНП-альфа (308 A).

**Висновок.** Атиповий варіант гену ФНП-альфа (308 A/G) є предиктором розвитку генералізованих форм гнійно-септичних станів у дітей. Носіям даного варіанту гену ФНП-альфа при появі локалізованої бактеріальної інфекції слід зразу ж призначати потужну антибактеріальну терапію.

Рецензент: д.мед.н., професор Хайтович М.В.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Александрович Ю.С. Интенсивная терапия инфекционных заболеваний у детей [Текст] / Ю.С. Александрович, В.И. Гордеев, К.В. Пишенисн. – Санкт-Петербург: Элби-СПб, – 2010. – 311с. – ISBN 978-5-93979-247-9.

2. Волосовець О.П. Етіологія, патогенез, діагностика, лікування та профілактика сепсису новонароджених [Текст] / О.П. Волосовець, С.П. Кривопустов // Клиническая педиатрия. – 2006. – № 1. – С. 36-41.

3. Джеллінджер Р.Ф. Рекомендации по ведению пациентов с тяжелым сепсисом и септическим шоком. [Текст] / Р.Ф. Джеллінджер, Ж.М. Карле, Г. Мазур, Х. Герлах, Т. Каландра, Дж. Коэн, Х. Геа-Банакло, Д. Ке, Дж. Маршал, М.М. Паркер, Г. Ремсей, Дж.Л. Циммерман, Ж.-Л. Винсент, М.М. Леви // Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. – 2005. – №3. – Том 7. – С. 208-234.

4. Исаков Ю. Ф. Сепсис у детей. [Текст] / Ю.Ф. Исаков, Н.В. Белобородова. – М.: Издатель Мокеев, 2001. – 268 с. – ISBN 5-93135-005-5.

5. Курганова Е.В. Клинико-иммунологические особенности сепсиса и полиморфизм генов TNF-а и IL-10 у больных гнойно-хирургической патологией. [Текст] / Е.В. Курганова, О.В. Голованова, А.В. Шевченко, И.Г. Ракова, Е.И. Стрельцова, А.А. Останин, Е.Р. Черных, В.И. Коненков // Цитокины и воспаление. – 2007. – № 2. – С. 37-43.

6. Миронов П.И. Терминология педиатрического сепсиса: прошлое, настоящее и будущее. [Текст] / П.И. Миронов // Журнал интенсивная терапия. – 2006. – №1. – С. 63-74.

7. Козлов В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. [Текст] / В.К. Козлов. – Санкт-Петербург: Диалект, 2008. – С. 296. – ISBN 978-5-98230-043-0.

8. Cornell T.T. Mechanisms and regulation of the gene-expression response to sepsis [Text] / T.T. Cornell, J. Wynn, T.P. Shanley, D.S. Wheeler, H.R. Wong // Pediatrics. – 2010. – Vol.125. – P. 1248-1258.

9. Czaja A.S. Readmission and Late Mortality After Pediatric Severe Sepsis [Text] / A.S. Czaja, J.J. Zimmerman, A.B. Nathens // Pediatrics. – 2009. – №3. – P. 849-857.

10. Goldstein B. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. [Text] / B. Goldstein, B. Giroir, A. Randolph 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 [Text] / 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. [Text] / R.S. Hotchkiss, E.I. Karl // N. Engl. J. Med.- 2003.- Vol. 348, № 2.- P. 138-150.

13. McGuire W. Variation in the TNF-a promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. [Text] / W. McGuire W, A.V. Hill, C.E. Allsopp et al. // Nature. – 1994.- Vol. 371.- P. 508-510.

14. Nadel S. Variation in the tumor necrosis factor- a gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. [Text] / S. Nadel, M.J. Newport, R. Booy et al. // J. Infect. Dis.- 1996.- Vol. 174.- P. 878-880.

15. Watson R.S. The increasing burden of severe sepsis in U.S. children. [Text] / R.S. Watson, W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker et al. // Crit. Care Med. – 2001. – Vol.29. – P. 8-13.

16. Westendorp R.G. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. [Text] / R.G. Westendorp, J.A.M. Langermans, T.W.J. Huizinga, C.L. Verweij, A. Sturk // Lancet.- 1997.- Vol. 349.- P. 170-173.

17. Wilson A.G. Effects of polymorphism in the human tumor necrosis factor б promoter on transcriptional activation [Text] / A.G. Wilson, J.A. Symons, T.L. McDowell, H.O. McDevitt, G.V. Duff // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1997.-Vol. 94.- P. 3195-3199.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNF-АЛЬФА  
ПРИ ЛОКАЛИЗИРОВАННЫХ  
И ГЕНЕРАЛИЗИРОВАННЫХ ГНОЙНО-  
СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ**

*Мургина М.М., Пыпа Л.В.*

*Винницкий национальный медицинский  
университет имени Н.И. Пирогова  
г. Винница, Украина*

**Резюме:** в статье приведены данные по изучению одноаллельного полиморфизма гена TNF-АЛЬФА, как предиктора развития генерализированных форм гнойно-септических заболеваний у детей. Было обследовано 27 больных с локализованными и генерализированными гнойно-септическими заболеваниями. Определялся полиморфизм промоторного участка гена TNF-АЛЬФА в точке 308 (G/A). Выявлено, что атипичный вариант гена TNF-АЛЬФА (308 A) является фактором риска развития генерализированной формы инфекции.

**Ключевые слова:** дети, фактор некроза опухоли б, одноаллельный полиморфизм.

**POLYMORPHISM OF TNF-ALPHA GENE  
IN LOCALIZED AND GENERALIZED  
PYOSEPTIC DISEASES IN CHILDREN**

*Marina M. Murgina, Larisa V. Pipa*

*Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University  
Vinnitsa, Ukraine*

**Summary:** In the article is shown the data on single polymorphism of a TNF-ALPHA gene as a predictor of the development of pyoseptic children diseases generalized forms. 27 children with localized and generalized pyoseptic diseases were examined. They were diagnosed with polyphormism of a promoter site of TNF-ALPHA gene in point 308 (G/A). It was established that the presence of an wild-type of the TNF-ALPHA (308 A) gene is a factor of a risk of the development of a generalized form of the infection.

**Key words:** children, tumor necrosis factor, single polymorphism.