



УДК 616.61-002-053.3/.5+575.191

КРЮЧКО Т.О., ОСТАПЕНКО В.П., КУШНЕРЕВА Т.В.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

КЛІНІКО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ХРОНІЧНОГО ПІЄЛОНЕФРИТУ В ДІТЕЙ: СТРУКТУРА СХИЛЬНОСТІ ТА ПЕРВИННИЙ ПРОГНОЗ

Резюме. У даний час вивчення механізмів розпізнавання чужорідних агентів, що реалізується за допомогою Toll-подібних рецепторів природженої імунної системи, стало одним із головних завдань клінічної імунології. Метою нашого дослідження був аналіз асоціацій між поліморфізмом гена Toll-подібного рецептора 4 (Asp299Gly) і основними збудниками інфекцій сечової системи. Отримані результати підтверджують важливу роль Toll-подібних рецепторів у реалізації вродженого імунної відповіді й дозволяють розглядати поліморфізм гена Toll-подібного рецептора 4 як додатковий прогностичний показник у генетичних дослідженнях.

Ключові слова: вроджений імунітет, поліморфізм, Toll-подібні рецептори, бактеріальні інфекції, внутрішньоклітинні збудники.

Питання вивчення факторів ризику, особливостей клініки та ранньої діагностики інфекційно-запальних захворювань сечової системи в дітей для педіатрів мають особливе значення у зв'язку з їх високою поширеністю і не завжди сприятливим прогнозом. За останні роки відзначається зростання питомої ваги інфекцій сечової системи в загальній структурі захворюваності в дітей з 18 на 1000 до 36–100 на 1000 дитячого населення [1, 3, 7]. У переважній більшості дітей запалення призводить до необоротних пошкоджень паренхіми нирок із заміщенням ушкоджених ділянок сполучною тканиною, що надалі призводить до розвитку хронічної ниркової недостатності й артеріальної гіпертензії [2, 5–7]. Хоча багато факторів, що призводять до розвитку пієлонефриту (ПН), загальновідомі (обструкція, дисметаболічні порушення, спадковість тощо), тим не менше, у 41 % дітей склерозування розвивається за відсутності порушень уродинаміки, тобто безпосередньою причиною ниркового пошкодження в дітей є інфекція, що супроводжується місцевою активацією й запуском цитотоксичного метаболізму [10, 17, 18]. Тому на сьогодні для вдосконалення медичної допомоги дітям з інвалідизуючими хронічними захворюваннями надзвичайно важливі дослідження, спрямовані на вивчення факторів ризику їх розвитку та прогресування.

Спектр мікроорганізмів, що викликають інфекції сечовивідних шляхів та нирок, різноманітний та залежить від віку, статі, шляхів по-

ширення та форми перебігу захворювання. В останній час у генезі інфекцій сечових шляхів у дітей велика увага приділяється ролі внутрішньоклітинних збудників, а саме *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* [4, 5, 7, 14]. Встановлено, що саме ці збудники відіграють провідну роль у розвитку рецидивуючого перебігу інфекцій сечової системи та при цьому часто перебігають як мікст-інфекції з бактеріальною флорою [8, 9, 13].

У зв'язку зі змінами, що відбуваються за останнє десятиліття в етіологічній структурі збудників пієлонефриту в дітей, та розвитком стійкості мікробної флори до раніше широко застосовуваних хіміопрепаратів дуже актуальними є дослідження регіональних особливостей етіології збудників, оскільки успіх лікування й прогноз пієлонефриту багато в чому залежать від правильно підбраної й вчасно розпочатої антибактеріальної терапії, що практично завжди починається з емпіричного призначення антибактеріальних препаратів [12, 14, 17, 18].

Слід зауважити, що, окрім характеристики збудника, розвиток та перебіг ПН визначається індивідуальними властивостями макроорганізму-господаря (насамперед здатністю давати адекватну імунну відповідь), що є відображенням його

© Крючко Т.О., Остапенко В.П., Кушнерева Т.В., 2013

© «Здоров'я дитини», 2013

© Заславський О.Ю., 2013

генетичної структури. Тому одним із сучасних підходів у запобіганні розвитку будь-якої патології є генетичне прогнозування ризику її формування. Це стало можливим тільки в останні роки, коли стартували біомедичні дослідження, спрямовані на розробку методів детекції молекулярних особливостей формування мультифакторних захворювань. На сьогодні відкривається все більше факторів, що свідчать про генетичну схильність до розвитку багатьох ниркових захворювань [7, 8, 17–19].

Імунологічний захист від різних патогенів здійснюється в результаті скоординованої роботи вродженої (неспецифічної) і адаптивної (специфічної) систем імунітету, взаємодія яких забезпечує ефективний перебіг імунної відповіді [15, 18]. Розпізнавання чужорідних для організму молекулярних структур мікробного походження, відомих як патогенасоційовані молекулярні патерни (pathogen associated molecular patterns — PAMPs), здійснюється за допомогою так званих патернрозпізнаючих рецепторів (PPR) [2].

У результаті структурних досліджень до групи PPR були віднесені й Toll-подібні рецептори (TLR). У людини Toll-подібні рецептори являють собою сімейство молекул, що налічує 13 індивідуальних рецепторів (на даний час добре охарактеризовані 11 із них), які здатні розпізнавати практично всі основні типи патогенів, у тому числі й різні типи бактерій, віруси, гриби, найпростіших та паразитів [14].

На сьогодні роль Toll-подібних рецепторів у розвитку багатьох інфекцій залишається нез'ясованою й потребує детального вивчення. Дефекти в системі Toll-подібних рецепторів, такі як порушення розпізнавання лігандів, експресії TLR, трансдукції сигналу, синтез ефекторних молекул, а також поліморфізм генів Toll-подібних рецепторів можуть призводити до розвитку тяжких інфекційних, аутоімунних захворювань, атеросклерозу, алергопатології тощо [14–16]. Нашу увагу привернув поліморфізм TLR4 Asp299Gly, адже існує ряд досліджень, які свідчать про те, що наявність саме цих мутантних алелей генів підвищує ризик зараження урогенітальними інфекціями, такими як хламідіоз, мікоплазмоз, уреоплазмоз, гарднеліоз, трихомоніаз [8, 9]. Поліморфізм генів припускає, що з одного й того ж гена може бути скопійовано кілька структурно відмінних копій одного й того ж білка, при цьому частина скопійованих варіантів або не відзначається активністю, або може мати протилежну функцію. Оскільки відмінності в генах, що контролюють захисні реакції організму, можуть визначати різний характер перебігу запальної відповіді та специфічних імунологічних реакцій при впровадженні чужорідних агентів, вивчення поширеності однонуклеотидних замін у дітей із хронічним ПН становить особливий інтерес [15, 16].

Мета нашого дослідження: із сучасних позицій оцінити значимість поліморфізму Asp299Gly Toll-подібного рецептора 4 у реалізації схильності до хронічного пієлонефриту в дитячому віці та проаналізувати його асоціації з основними збудниками інфекцій сечової системи.

Об'єкт та методи дослідження

Проведено клініко-лабораторне обстеження 53 дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, під час загострення, які перебували на стаціонарному лікуванні в педіатричному відділенні № 2 (нефрологічна ліжка) дитячої обласної клінічної лікарні м. Полтави.

Відбір біологічних зразків від хворих, за якими спостерігали, проводився за умови відсутності інфекційних захворювань. Матеріалом для дослідження була периферична венозна кров, забір якої проводився із кубітальної вени в стерильні вакутайнери із стабілізатором (ДТА) із наступним внесенням її в епендорфи з реактивом «ДНК-експрес». Генотипування поліморфної ділянки Asp299Gly проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням олігонуклеотидних праймерів. Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Москва).

Поліморфну ділянку Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 ампліфікували за допомогою ПЛР у 25 мкл реакційної суміші, до якої входило: 2,5 мкл 10 x Bui для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; 0,2 мМ кожного dNTP; 2,5 од. ДНК-полімерази Tag; 20–50 нг геномної ДНК; по 66 нг праймерів для Asp299Gly.

Бактеріологічне дослідження сечі із встановленням мікробного збудника та його чутливості до антибактеріальних і хімотерапевтичних засобів, а також молекулярно-біологічне дослідження (полімеразна ланцюгова реакція для визначення *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, матеріал дослідження — зіскрібок епітеліальних клітин з уретри) у більшості хворих здійснювали до призначення антибактеріальної терапії.

Групу контролю становили 95 практично здорових осіб із бази генетичних зразків НДІ генетичних та імунних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «УМСА». Від усіх пацієнтів була отримана добровільна письмова згода на участь у науковому дослідженні, що проводилось із дозволу комісії з біоетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія».

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми Statistica for Windows 7.0 (StatSoft Inc.) і електронних таблиць MS Excel. Розподіл генотипів по досліджуваних поліморфних локусах перевіряли на відповідність рівновазі Харді — Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . Для порівняння частот

алелей між групами, що досліджувались, використовували критерій χ^2 Пірсона з поправкою Іейтса на безперервність при числі ступенів свободи, що дорівнює 1. Порівняння частот генотипів між групами, що досліджуються, проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах вираховували відношення шансів із визначенням 95% довірчого інтервалу. Для усіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$, при $0,05 < p \leq 0,1$ відмічали тенденцію до відмінності.

Отримані результати

Проведений аналіз розподілу частот генотипів за досліджуваним геном TLR4 Asp299Gly в групах спостереження наведений в табл. 1.

Як видно із табл. 1, «дикий» тип генотипу TLR4 зустрічався у 91,6 % здорових осіб, частота гетерозиготного генотипу становила 8,4 %, мутантного GG — 0,0 %. На той час як у дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, частота генотипів AG і GG майже у 2 рази перевищувала показники групи контролю (AG — 13,2 % та GG — 1,9 %), що відповідало теоретично очікуваному відповідно до рівноваги Харді — Вайнберга. Тобто група хворих осіб наближається до вимог ідеальної популяції, еволюційні зміни якої відбуваються шляхом зміни генофонду загальної сукупності генів кожної такої популяції.

Вивчення поширеності нормальної й мутантної алелі 299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 в обстежуваних групах (табл. 2) показало, що мутантний алель Gly практично у 2 рази частіше виявлявся в дітей із хронічним пієлонефритом

Таблиця 1. Розподіл частот генотипів поліморфізму гена TLR4 Asp299Gly серед здорових осіб та дітей, хворих на ПН, % (n)

Ген, поліморфізм	Частота генотипу	Група контролю, n = 95	Діти, хворі на хронічний ПН, n = 53
TLR4 Asp299Gly	AA	91,6 (87)	84,9 (45)
	AG	8,4 (8)	13,2 (7)
	GG	0 (0)	1,9 (1)*

Примітка: * — $p < 0,05$ порівняно з групою осіб Полтавського регіону.

Таблиця 2. Розподіл частот алелей поліморфізму гена TLR4 Asp299Gly серед здорових осіб та дітей, хворих на хронічний ПН, % (n)

Ген, поліморфізм	Алель	Група контролю, n = 95	Діти, хворі на хронічний ПН, n = 53
TLR4 Asp299Gly	A	95,79 (182)	91,5 (97)
	G	4,21 (8)	8,4 (9)*

Примітка: * — $p < 0,05$ порівняно з групою здорових осіб Полтавського регіону.

Таблиця 3. Аналіз асоціації генотипів TLR4 з основними етіологічними збудниками хронічного пієлонефриту в генетично обстежених дітей, n (%)

Етіологічний чинник	Хворі з мутантною алелю (Asp299Gly, Gly299Gly), n = 8		Діти із нормальним розподілом алелей (Asp299Asp), n = 40	
	Абс.	Віднос., %	Абс.	Віднос., %
<i>Chlamidia trachomatis</i>	1	12,5	4	10,0
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	3	37,5*	5	12,5
<i>Mycoplasma hominis</i>	7	87,5*	8	20
Внутрішньоклітинні збудники не виявлені	0	0	26	65
Виявлені асоціації внутрішньоклітинних збудників	3	37,5*	3	7,5
Кишкова паличка	1	12,5	9	22,5
Протей	0	0	1	2,5
Клебсієла	1	12,5	1	2,5
Ентеробактерії	0	0	2	5,0
Мікробні асоціації	0	0	2	5,0
Мікст-інфекція	1	12,5*	1	2,5
Флора не виділена	6	75,0	27	67,5

Примітка: * — $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

(8,4 %) порівняно з групою контролю (4,21 %) ($p < 0,05$).

Генетичні маркери можуть визначати схильність до захворювання в цілому або бути асоційованими з конкретними етіопатогенетично значимими ознаками. Тому в рамках нашої роботи важливим етапом став аналіз асоціації поліморфізму гена TLR4 з основними збудниками інфекцій сечової системи у дітей із хронічним пієлонефритом. Для вирішення поставленого завдання ми сформували дві підгрупи дітей: перша — хворі із гетерозиготним та гомозиготним за мутантною алеллю генотипом (Asp/Gly, Gly/Gly), а в групу порівняння увійшли діти з хронічним пієлонефритом із нормальним розподілом алелей. Аналізуючи параметри захворювання, ми виявили вірогідні відмінності серед хворих із різними варіантами генотипів (табл. 3).

Результати молекулярно-біологічного обстеження хворих на хронічний пієлонефрит дітей свідчать, що частота виявлення мікоплазменної інфекції в дітей першої підгрупи більше ніж в 4 рази перевищувала показники групи порівняння (87,5 та 20 % відповідно). *Ureaplasma urealyticum* також у 3 рази частіше реєструвалася в дітей із мутантним алелем на противагу дітям із нормальним розподілом алелей (37,5 та 12,5 % відповідно). Внутрішньоклітинні збудники у переважній більшості дітей обох підгруп виявлялися у вигляді моноінфекції (62,5 та 92,5 % відповідно), а визначення асоціацій декількох збудників вірогідно частіше реєструвалася в дітей першої підгрупи на противагу дітям із нормальним розподілом алелей (37,5 та 7,5 % відповідно).

Результати бактеріального обстеження хворих на хронічний пієлонефрит дітей свідчать, що в переважній більшості дітей обох підгруп бактеріальну флору не визначали (75,0 та 67,5 % відповідно). Можливими причинами отримання негативних результатів бактеріологічного дослідження, на наш погляд, були: початок проведення антибактеріальної терапії в амбулаторних умовах, до направлення в стаціонар. Серед бактеріальних збудників у дітей першої підгрупи в рівній кількості були зафіксовані кишкова паличка та клебсієла на противагу хворим дітям із нормальним розподілом алелей, у яких домінували кишкова паличка та ентеробактерії, а клебсієла й протей були зареєстровані в одиничних випадках.

Висновки

Таким чином, отримані дані засвідчують, що гетерозиготний та гомозиготний за мутантною алеллю генотипи можуть розглядатися як предиктори підвищеного ризику реалізації хронічного пієлонефриту, що асоціюється з формуванням фенотипових проявів захворювання, з переважанням рецидивуючого і торпідного перебігу запальних змін та необхідністю проведення тривалої підтримуючої уросептичної терапії.

На підставі вивчення генотипічних особливостей хронічного пієлонефриту в дітей із поліморфізмом гена Toll-подібного рецептора 4 (TLR4) визначено, що гетерозиготний та гомозиготний за мутантною алеллю генотипи асоціюються із підвищеною чутливістю до основних внутрішньоклітинних збудників (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*) ПН, що дозволяє розглядати поліморфізм гена Toll-подібного рецептора 4 як додатковий прогностичний показник у генетичних дослідженнях.

Тому індивідуальний підхід до пацієнта, заснований на науковій інтерпретації результатів генетичного дослідження, їх зіставленні з даними клінічних, лабораторних та інструментальних методів дозволяє здійснити ранню діагностику генетично детермінованих захворювань і запропонувати максимально ефективну схему профілактичних і лікувальних заходів для попередження прогресування патологічного процесу.

Список літератури

1. Особенности терапии пиелонефрита у детей на современном этапе // Вопросы современной педиатрии. — 2003. — Т. 2, прил. 1. — С. 317.
2. Игнатова М.С., Харина Е.А., Длин В.В. Решенные и нерешенные проблемы эконепрологии детского возраста // Педиатрия. — 1997. — № 6. — С. 54-57.
3. Мальченко Л.А., Петрушина А.Д., Моргунова С.Л. Состояние иммунной системы при различных формах микробно-воспалительных заболеваний мочевой системы у детей // II съезд педиатров-нефрологов России: Материалы съезда. — М., 2000. — С. 34.
4. Катосова Л.К. Микрофлора мочи у детей с хроническим обструктивным пиелонефритом: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Оренбург, 1993. — 24 с.
5. Сидоренко С.В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов // Инфекции и антимикробная терапия. — 2003. — Т. 5, № 2. — С. 48-55.
6. Кириллов В.И., Теблоева Л.Т. Перспективный подход к лечению хронического обструктивного пиелонефрита как иммунопатологии // II съезд педиатров-нефрологов России: Материалы съезда. — М., 2000. — С. 35-36.
7. Измайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О., Кайдашев И.П. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих уrogenітальних інфекцій // Цитология и генетика. — 2011. — Т. 45, № 4. — С. 29-35.
8. Измайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О., Кайдашев И.П. Роль поліморфізму TLR4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом // Проблеми екології та медицини. — 2009. — Т. 13, № 5. — С. 3-6.
9. Haier J., Nasralla M., Franco A.R., Nicolson G.L. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis // Rheumatology. — 1999. — Vol. 38, № 6. — P. 504-509.
10. Zdrodowska-Stefanow B., Darewicz B., Ostaszewska I., Pucilo K. The role of Chlamydia trachomatis infections in women with urinary tract diseases // Pol. Merkurusz. Lek. — 1997. — Vol. 2, № 10. — P. 270-272.
11. White C.T., Matsell D.G. Children's UTIs in the new millennium. Diagnosis, investigation, and treatment of childhood urinary tract infections in the year 2001 // Can. Fam. Physician. — 2001. — Vol. 47. — P. 1603-1608.
12. Benador D., Benador N., Slosman D., Mermillod B., Girardin E. Are younger children at highest risk of renal sequelae after pyelonephritis? // Lancet. — 1997. — Vol. 349. — P. 17-19.

13. Centers of Disease Control and Prevention: Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002 // *MMWR*. — 2002. — Vol. 51, № 6. — P. 1-77.

14. Krishnan J. Toll-like receptor signal transduction / J. Krishnan, K. Selvarajoo, M. Tsuchiya, G. Lee, S. Choi // *Exp. Mol. Med.* — 2007. — 39. — 421-38.

15. Ferwerda B. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B. Ferwerda, M.B.V. McCall, K. Verheijen, B.J. Kullberg // *MOL MED.* — 2008. 14(5-6). — P. 346-352.

16. Lorenz E., Mira J.P., Cornish K.L. et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with Gram-negative

septic shock // *J. Infect. Immun.* — 2000. — 68. — 6398-6401.

17. Bergstrom T. Sex differences in childhood urinary tract infection // *Archives of Disease in Childhood.* — 1972. — 47(252). — 227-32.

18. Lomberg H., Hanson L.A., Jacobson B., Jodal U., Leffler H., Svanborg-Eden C. Correlation of P blood group, vesicoureteral reflux, and bacterial attachment in patients with recurrent pyelonephritis // *N. Engl. J. Med.* — 1983. — Vol. 308. — P. 1189-1192.

Отримано 20.02.13 □

Крючко Т.А., Остапенко В.П., Кушнерева Т.В.
ВГУЗУ «Українська медичинська стоматологічна академія», г. Полтава

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ПИЕЛОНЕФРИТА У ДЕТЕЙ: СТРУКТУРА СКЛОННОСТИ И ПЕРВИЧНЫЙ ПРОГНОЗ

Резюме. В данное время изучение механизмов распознавания чужеродных агентов, которое реализуется при помощи Toll-подобных рецепторов врожденной иммунной системы, стало одной из главных задач клинической иммунологии. Целью нашего исследования был анализ ассоциаций между полиморфизмом гена Toll-подобного рецептора 4 (Asp299Gly) и основными возбудителями инфекций мочевой системы. Полученные результаты подтверждают важную роль Toll-подобного рецептора в реализации врожденного иммунного ответа и позволяют рассматривать полиморфизм гена Toll-подобного рецептора 4 в качестве дополнительного прогностического показателя в генетических исследованиях.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, полиморфизм, Toll-подобные рецепторы, бактериальные инфекции, внутриклеточные возбудители.

Kryuchko T.O., Ostapenko V.P., Kushnereva T.V.
Higher State Educational Institution of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava, Ukraine

CLINICAL AND GENETIC ASPECTS OF CHRONIC PYELONEPHRITIS IN CHILDREN: THE STRUCTURE OF ADDICTION AND PRIMARY PROGNOSIS

Summary. Currently studying the mechanisms of recognition of foreign agents, which is implemented by Toll-like receptor of innate immune system, has become one of the main tasks of clinical immunology. The aim of our study was an analysis of the association between Toll-like receptor 4 gene polymorphism (Asp299Gly) and main pathogens of urinary system infections. These results confirm the important role of Toll-like receptors in the realization of an innate immune response and enables to consider Toll-like receptor 4 gene polymorphism as an additional prognostic indicator in genetic researches.

Key words: innate immunity, polymorphism, Toll-like receptors, bacterial infection, intracellular pathogens.