

Гаврилюк-Скиба Г.О., Волков К.С., Небесна З.М.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ МАКРОМЕТРИЧЕСКИХ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕЛЕЗЁНКИ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

Резюме. Проведены макрометрические и морфометрические исследования селезенки половозрелых белых крыс-самцов после экспериментальной термической травмы. Установлено, что на 7 день опыта макрометрические и морфометрические показатели имеют наибольшие значения за все время проведенного опыта, на 14 показатели уменьшаются, а на 21 день достигают наименьших величин, что свидетельствует про глубокие деструктивные изменения органа.

Ключевые слова: селезенка, морфометрические изменения, термическая травма.

Havryliuk-Skyba H.O., Volkov K.S., Nebesna Z.M.

THE DYNAMIC OF MACROMETRIC AND MORPHOMETRIC CHANGES OF THE SPLEEN AFTER EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

Summary. In mature white male rats there has been conducted macrometric and morphometric research of the spleen after experimental thermal injury. It has been defined that on the 7 day macrometric and morphometric parameters most changes, this is confirmed histologically, and shows the development of compensatory-adaptive changes. The parameters have decreased on the 14 day and on the 21 day of the experiment they have reached the lowest levels, what shows that the deep destructive changes in the structural components of the spleen have occurred.

Key words: spleen, morphometric changes, thermal injury.

Стаття надійшла до редакції 1.10.2012р.

© Пипа Л.В., Мургіна М.М

УДК: 616.944:577.245-053.2

Пипа Л.В., Мургіна М.М.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, кафедра педіатрії факультету післядипломної освіти (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 20018, Україна)

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

Резюме. В статті наведені дані по вивченню одноалельного поліморфізму гену TNF- α , як предиктора розвитку генералізованих форм гнійно-септичних захворювань у дітей. Було обстежено 27 дітей з генералізованими та локалізованими бактеріальними інфекціями. Визначали поліморфізм промоторної ділянки гену TNF- α в точці 308 (G→A). Виявлено, що атиповий варіант гену TNF- α (308A) є фактором ризику генералізації бактеріальної інфекції.

Ключові слова: діти, фактор некрозу пухлин α , одноалельний поліморфізм.

Вступ

Досягнення фармакології та сучасні хірургічні методи дозволили значно покращити наслідки багатьох захворювань, однак кількість гнійно-септичних захворювань та їхнього крайнього прояву - сепсису - постійно зростає [Александрович и др., 2010; Watson et al., 2001; Holmes et al., 2003]. Стабільно високий рівень летальності при септичних станах ставить їх у центрі уваги спеціалістів самих різних спеціальностей [Ісаков, Белобородова, 2001; Волосовець, Кривопустов, 2006]. 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 [Westerndorp et al., 1997]. Алельний варіант генів цитокінів, особливо в його промоторній частині, може детермінувати рівень продукції білку, що має особливе значення в умовах патології [Курганова и др., 2007; Wilson et al., 1997]. Фактор не-

крозу пухлини альфа (ФНП- α) є одним із найкраще вивчених цитокінів. Це білковий цитокін доімунного 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 [Ісаков, Белобородова, 2001; Козлов, 2008].

В багатьох дослідженнях було виявлено, що певні патологічні стани супроводжуються високим вмістом ФНП- α в крові [McGuire et al., 1994; Westerndorp et al., 1997]. Ген ФНП- α , представлений однією копією в 6-тій хромосомі людини, розміщується в 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 в промоторній ділянці гену ФНП- α в позиції 308. При типовому варіанті алелі в позиції 308 розміщується гуанін (ФНП- α 308 G), в атиповому (дикому) варіанті - аланін (ФНП- α 308 A). Дикий варіант в людській популяції зустрічається у близько 30% осіб [Goldstein et al., 2005]. Дослідження

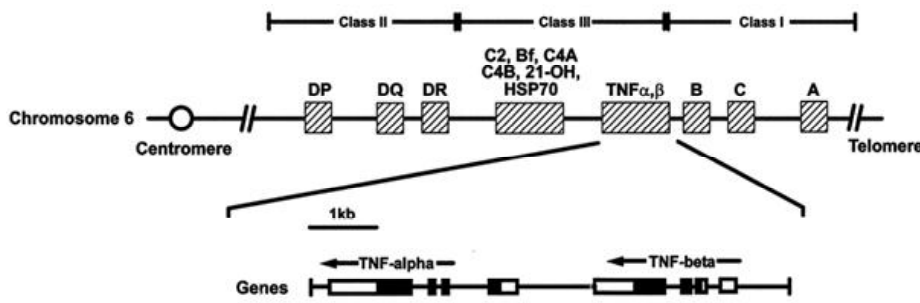


Рис. 1. Будова головного комплексу гістосумісності людини та гену ФНП [Goldstein et al., 2005].

показали, що атипичний варіант алелі ФНП- α (308A) спричиняє підвищену транскрипцію гену, у порівнянні із типовим варіантом алелі ФНП- α (308 G), що призводить до підвищення секреції ФНП- α макрофагами *in vitro* та збільшення концентрації ФНП- α в сироватці крові *in vivo* [Максимов и др., 2010; Wilson et al., 1997].

Доведено, що атипичний варіант алелі ФНП- α (308 A) асоційований із несприятливими наслідками різноманітних інфекційних та запальних захворювань, зокрема генералізованою формою менінгококової інфекції, церебральною формою малярії тощо [McGuire et al., 1994; Hotchkiss, Karl, 2003]. Тому атипичний варіант промоторної частини гену ФНП- α (308 A) може розглядатися як окремий фактор ризику розвитку генералізованих форм гнійно-септичних захворювань різної етіології.

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

Матеріали та методи

В 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 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- α (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 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- α 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 StyI. Отримані продукти ампліфікації змішувались 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 реєструються 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. Статистична обробка проводилась шляхом обчислення абсолютного ризику та відношення шансів, достовірність показників оцінювалась інтервальним методом за допомогою визначення 95% довірчого інтервалу.

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. Статистична обробка проводилась шляхом обчислення абсолютного ризику та відношення шансів, достовірність показників оцінювалась інтервальним методом за допомогою визначення 95% довірчого інтервалу.

Результати. 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) [Мироснов, 2006; Goldstein et al., 2005].

ССЗВ визначається при наявності 2-х із 4-х критеріїв, один з яких обов'язковий - аномальна температура або зміна кількості лейкоцитів в периферійній крові [Александрович и др., 2010; Goldstein et al., 2005]. 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

Таблиця 1. Локалізовані форми гнійно-септичних захворювань у дітей.

Клінічні форми	Діти	
	абс.	%
Абдомінальна порожнина	8	72,73
ЛОР-органи	1	9,09
Кістково-м'язова система	2	18,18

Таблиця 2. Генералізовані форми гнійно-септичних захворювань у дітей.

Клінічні форми	Діти	
	абс.	%
Абдомінальна порожнина	2	12,5
Торакальна порожнина	4	25
ЛОР-органи	2	12,5
Кістково-м'язова система	3	18,75
Менінгококова інфекція	5	31,25

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 [Александрович і др., 2010; Goldstein et al., 2005].

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 - 10 дітей (37,04%); торакальна порожнина - 4 дітей (14,81%); гнійно-запальні процеси ЛОР-органів - 3 дітей (11,11%); Кістково-м'язова система - 5 дітей (18,52%); менінгококова інфекція - 5 дітей (18,52 %).

Серед локалізованих форм 11 дітей (40,75%) переважала локалізація в черевній порожнині - 8 дітей (72,73%); патологія ЛОР органів - 1 дитина (9,09%); кістково-м'язова система - 2 (18,18%) що відображено в табл. 1.

Генералізовані форми діагностовано у 16 дітей, що склало 59,25%. Діагностика базувалась на основі ознак ССЗВ - 2 і більше критеріїв у поєднанні з декількома вогнищами запалення. Серед генералізованих форм переважала генералізована менінгококова інфекція - 5 (31,25%); абдомінальна порожнина - 2 (12,5%); торакальна порожнина - 2 (25%); ЛОР-патологія - 2 (12,5%); кістково-м'язова система - 3 (18,75%), що відображено в табл. 2.

Всім дітям було проведено визначення алельного поліморфізму ФНП- α (308 G→A). У групі локалізованих інфекцій у 10 (90,9%) дітей був виявлений типовий варіант алелі ФНП- α із генотипом (308G/G) і в 1 (9,1%) дитини був атипичний варіант алелі ФНП- α із генотипом (308A/G). У групі генералізованих форм типовий варіант гену із генотипом (308 G/G) виявлено у 12 (75%) дітей, атипичний із генотипом (308 A/G) - у 4 (25%).

Для оцінки ризику виникнення генералізованого процесу у дітей носіїв мутованого алелю (наявність аланіну в точці 308) ми вираховували відносний ризик та для оцінки вірогідності того, що у дитини з аланіном в дослідній точці бактеріальна інфекція реалізується в сепсис по відношенню до дітей з гуаніном в точці 308 розраховували відношення шансів, для обох показників були розраховані довірчі інтервали.

Ризик - це вірогідність того, що у осіб, які підлягли впливу деяких факторів, виникає певний стан. Ризик розраховується відношенням кількості осіб з виниклою подією (випадків) до загального числа осіб, які знаходяться під впливом певного фактору. Кількісно ризик визначається величиною від 0 (відображаючого впевненість в тому, що події не буде) до 1 (відображаючого впевненість в тому, що події виникнуть), або від 0 % до 100 %.

Шанси - відношення вірогідності того, що подія виникне, до вірогідності того, що подія не виникне. Відношення шансів (odds ratio) - це відношення шансів події в групі, що досліджується, до шансів подій в контрольній групі. Інтерпретація ВШ: рівний 1 свідчить про те, що вплив фактору не змінює ризик виникнення певної події, > 1 свідчить про те, що вплив фактору збільшує ризик виникнення певної події, < 1 свідчить про те, що вплив фактору зменшує ризик виникнення певної події [Cornell et al., 2010].

Для визначення достовірності результату визначають довірчий інтервал (ДІ) для ВШ. ДІ являється інтервалом значень, в якому із заданою довірчою вірогідністю знаходиться істинне значення оцінюваного параметру. Якщо ДІ для ВШ включає 1, то різниця між групами по вивчаємій ознаці статистично не значима. Якщо значення ДІ більше 1 і не включає 1, то шанс розвитку

Таблиця 3. Ризик виникнення генералізованої бактеріальної інфекції в залежності від алельного поліморфізму гену ФНО - α .

Алель	Генералізована	Локалізована	Всього	AP %	95% ДІ для AP %	ВШ	95% ДІ для ВШ
A	4	1	5	0,8	0,45 - 1,15	3	2,54-3,46
G	28	21	49	0,571	0,43 - 0,7		

вивчаемого стану статистично значимо вищий в групі, яка відповідає першому рядку чотирирядкової таблиці (експонована група). Якщо ДІ менше 1 і не включає 1, то ВШ вище в групі, яка відповідає другому рядку чотирирядкової таблиці (неекспонована група) [Максимов и др., 2010].

Для зручності оцінки ризику ми визначили частоту зустрічаємості алелю із гуаніном та аланіном у дітей із генералізованою та локалізованою інфекціями.

Як видно із даних таблиці у експонованій групі абсолютний ризик генералізації інфекційного процесу складає 80%, оскільки ВШ дорівнює 3 та ДІ не включає одиниці це свідчить про збільшення втри рази шансу виникнення сепсису при бактеріальній інфекції у дітей

із аланіном в точці 308, в порівнянні із дітьми у яких наявний гуанін в даному локусі.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Наявність аланіну в точці 308 є предиктором розвитку генералізованих форм гнійно-септичних станів у дітей. Такі діти при проявах локалізованих бактеріальних інфекціях повинні отримувати потужну антибактеріальну терапію. Визначення даної мутації може бути корисним при відборі контингентів для проведення профілактичних щеплень проти бактеріальних інфекцій (пневмокок, менінгокок) оскільки є групою ризику по розвитку сепсису.

Список літератури

- Александрович Ю.С. Интенсивная терапия инфекционных заболеваний у детей [Текст] / Ю.С. Александрович, В.И. Гордеев, К.В. Пшениснов. - Санкт-Петербург: Элби-СПб, 2010. - 311 с. - ISBN 978-5-93979-247-9.
- Волосовець О.П. Етіологія, патогенез, діагностика, лікування та профілактика сепсису новонароджених [Текст] / О.П. Волосовець, С.П. Кривопус-тов // Клиническая педиатрия. - 2006. - № 1. - С. 36-41.
- Исаков Ю. Ф. Сепсис у дітей. [Текст] / Ю.Ф. Исаков, Н.В. Белобородова. - М.: Издатель Мокеев, 2001. - 268 с. - ISBN 5-93135-005-5.
- Клинико-иммунологические особенности сепсиса и полиморфизм ненов TNF- α и IL-10 у больных гнойно-хирургической патологией. [Текст] / [Курганова Е.В., Голованова О.В., Шевченко А.В. и др.] // Цитокины и воспаление. - 2007. - № 2. - С. 37-43.
- Козлов В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. [Текст] / В.К. Козлов. - Санкт-Петербург: Диалект, 2008. - 296 с. - ISBN 978-5-98230-043-0.
- Миронов П.И. Терминология педиатрического сепсиса: прошлое, настоящее и будущее [Текст] / П.И. Миронов // Журнал интенсивная терапия. - 2006. - № 1. - С. 63 - 74.
- Риски и их оценка в медико-биологических исследованиях: метод. рекоменд. / [С. А. Максимов, С. Ф. Зинчук, Е. А. Давыдова, В. Г. Зинчук]. - Кемерово.: КемГМА, 2010. - 28 с.
- Cornell T.T. Mechanisms and regulation of the gene-expression response to sepsis [Text] / [Cornell T.T., Wynn J., Shanley T.P. et al.] // Pediatrics. - 2010. - Vol. 125. - P. 1248-1258.
- Effects of polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation [Text] / [Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L. et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - Vol. 94. - P. 3195-3199.
- Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. [Text] / [Westendorp R.G., Langermans J.A.M., Huizinga T.W.J. et al.] // Lancet. - 1997. - Vol. 349. - P. 170-173.
- 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.
- 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.
- International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. [Text] / [Goldstein B., Giroir B., Randolph A. et al.] // Pediatr. Crit. Care Med. - 2005. - Vol. 6. - P. 2-8.
- The increasing burden of severe sepsis in U.S. children. [Text] / [Watson R.S., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J. et al.] // Crit. Care Med. - 2001. - Vol. 29. - P. 8-13.
- Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. [Text] / [McGuire W.W., Hill A.V., Allsopp C.E. et al.] // Nature. - 1994. - Vol. 371. - P. 508-510.

Пыпа Л.В., Мургина М.М.

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

Резюме. В статье приведены данные по изучению одноаллельного полиморфизма гена TNF- α , как предиктора развития генерализованных форм гнойно-септических заболеваний у детей. Было обследовано 27 больных с локализованными и генерализованными гнойно-септическими заболеваниями. Определялся полиморфизм промоторного участка гена TNF- α в точке 308 (G→A). Выявлено, что атипичный вариант гена TNF- α (308 A) является фактором риска развития генерализованной формы инфекции.

Ключевые слова: дети, фактор некроза опухоли α , одноаллельный полиморфизм.

Pipa L.V., Murgina M.M.

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

Summary. In the article is shown the data on single polymorphism of a TNF α 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 polymorphism of a promoter site of TNF α gene in point 308 (G→A). It was established that the presence of a wild-type of the TNF- α (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.

Стаття надійшла до редакції 8.10.2012р.