

УДК: 616-053.2-008.64

Шкурупий Д.А.¹, Снисарь В.И.²

**Клинико-генетические параллели развития синдрома
полиорганной недостаточности у новорожденных**

Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская
медицинская стоматологическая академия» (г. Полтава, Украина)¹

Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская
академия» (г. Днепропетровск, Украина)²

Введение. Критические состояния традиционно ассоциируются с универсальными остро развивающимися процессами, которые без активного медицинского вмешательства приводят к быстрому летальному финалу заболевания. Оптимизация тактических подходов к интенсивной терапии и усовершенствование медицинской аппаратуры позволили продлить жизнь реанимационным больным, однако, привели к своеобразному изменению течения критических состояний, искусственно растянув их во времени. В подобной ситуации возникают условия для бактериальной транслокации, запуска неконтролируемых цитокиновых, эндотелиальных, перекисных и прочих реакций, приводящих к одновременному универсальному поражению нескольких органов и систем. Подобное состояние получило название синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) [2].

СПОН, в основном, рассмотрен у взрослых пациентов. В то же время, данная проблема является крайне актуальной у новорожденных ввиду их анатомо-физиологических особенностей. Так, уже на момент рождения многие новорожденные, нуждающиеся в интенсивной терапии, имеют признаки СПОН. В этой связи требует объяснения факт развития СПОН у детей с перинатальной асфиксией, которые имеют стерильные микробиоценозные локусы и, тем не менее, проявляют признаки иммунной реакции, схожей с ответом на бактериальную агрессию. Как один из вариантов данного механизма рассматривается синдром фетального воспалительного ответа, свидетельствующего о возможности внутриутробного формирования СПОН [5, 6, 8].

Известно, что ряд иммунных реакций возникает в ответ на экспансию микроорганизмов, их остатков или продуктов жизнедеятельности. Физиологический иммунный ответ заключается в продукции флогогенов, который реализуется путем экспрессии определенных рецепторов и генов. В единичных работах [1] высказывается мнение о возможности нарушения генетического аппарата у больных с признаками СПОН. В связи с этим поиск генетических детерминант развития данного синдрома и их сопоставления с клиническими проявлениями у новорожденных является актуальным.

Материалы и методы. В период с 2011 по 2012 годы проведенное обследование 149 новорожденных, находившихся на лечении в неонатальных стационарах городов Полтава и Кременчуг по поводу последствий перинатальной асфиксии и перинатального инфицирования. Основную группу (n=113) составили новорожденные с признаками СПОН, которым проводилась интенсивная терапия. Группу сравнения (n=36) составили новорожденные, которые не имели признаков СПОН, не нуждались в интенсивной терапии и находились на лечении в отделениях патологии и выхаживания новорожденных. Факт СПОН определяли при одновременном наличии расстройств двух и более органов или систем по авторской шкале [10].

Перед началом исследования были получены информированные согласия законных представителей детей и разрешение комиссии по этическим вопросам и биоэтике высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия». Во время исследования были соблюдены права пациентов соответственно требованиям Хельсинкской декларации 1975 года с поправками от 2005 года.

Исследование предполагало анализ экспрессии и полиморфизма гена Toll-like рецепторов 2-го типа (Toll-like receptor 2, TLR2), концентрации интерлейкина 1 β (ИЛ-1 β), лейкоцитарной формулы

крови и их сопоставление с клиническими признаками, в частности – с признаками СПОН, синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), количеством одновременно пораженных систем.

Иммунологические и генетические исследования проводились сотрудниками научно-исследовательского института генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия» (г. Полтава, Украина. Директор – д.мед.н., профессор Л.С. Веснина).

Полиморфизм TLR2 определяли выделением генома дезоксирибонуклеиновой кислоты из цельной крови с помощью комплекта для выделения нуклеиновых кислот (ЛитТех, Россия) и амплификацией полиморфного участка Arg753Yln гена TLR2 полимеразной цепной реакцией на амплификатере “Терцик” („ДНК-Технология”, Россия) с последующим рестрикционным анализом с помощью эндонуклеазы рестрикции Pst I (СибЭнзим, Россия), выявлением продуктов расщепления полиморфного участка гена с помощью электрофореза и визуализации его в ультрафиолетовом свете.

Уровень экспрессии гена TLR2 определяли методом полимеразной цепной реакции, обратной транскрипцией с использованием комплекта реагентов «РИБО-золь-В» (AmpliSens,

Россия) в присутствии красителя SYBR Green I. В качестве эфферентного гена использовали ген β -актина.

Концентрацию ИЛ-1 β в плазме крови новорожденных определяли с помощью тест-системы для иммуноферментного анализа соответственно с протоколами производителя (НВФ «Цитокин», Россия).

Лейкоцитарную формулу определяли унифицированным методом подсчета в автоматическом счетчике [4].

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0. с помощью методов описательной статистики и непараметрических критериев: коэффициента корреляции (R) Спирмена, критерия χ^2 Пирсона. Статистическая вероятность частоты возникновения генетических мутаций рассчитывалась с использованием метода нормирования интенсивных показателей (НИП) Е.Н. Шигана, применяющегося для популяционной экстраполяции данных. Минимальным уровнем безошибочного прогноза считали $P=0,95$ и, соответственно, уровнем вероятности ошибки - $p<0,05$ [7, 9].

Результаты и обсуждение. Анализ наличия полиморфизма был проведен у 62 детей, из них 43 новорожденных основной группы и 19 - группы сравнения. Полиморфный ген GA среди всех обследованных детей ($n=62$) был выявлен в 5 случаях (8,06%), ген

дикого типа GG - в 57 случаях (91,94%). При этом у детей без признаков СПОН частота данной мутации была констатирована в 1 случае (5,26%; n=19), а у детей с наличием СПОН – в 4 случаях (9,30%; n=43). После расчета НИП для частоты возникновения мутации было установлено, что популяционный риск наличия полиморфного участка GA Arg753Yln гена TLR2 составляет для основной и контрольной группы 10,70% и 3,42% соответственно ($\chi^2=4,05$; p=0,03).

Частота выявления аллели A гена TLR2 достоверно не различалась в обеих группах и составляла 2,63% (n=86) в основной группе и 4,88% в группе сравнения ($\chi^2=0,28$; p=0,60). Частота вероятности популяционной реализации аллели A гена TLR2 после расчета НИП составила 5,95% (n=86) в основной группе и 1,71% (n=38) в группе сравнения ($\chi^2=0,07$; p=0,97).

Полученные результаты были сопоставлены с литературными данными о полиморфизме и частоте выявления мутантной аллели A гена TLR2 в популяции жителей Полтавской области [3]. Из 299 полтавчан полиморфизм гена TLR2 типа GA и частота мутантной аллели A были выявлены в 3 случаях, что составило соответственно 1,00% (n=299) и 0,5% (n=598). При статистическом анализе этих данных с приведенными выше результатами обследованных детей было установлено, у детей без СПОН частоты выявления

полиморфизма гена TLR2 типа GA и мутантной аллели A достоверно не отличались от среднепопуляционных ($\chi^2=2,42$; $p=0,11$ и $\chi^2=2,59$; $p=0,11$ соответственно). У детей с признаками СПОН частоты выявления аналогичных признаков были достоверно выше среднепопуляционных ($\chi^2=12,91$; $p=0,0003$ и $\chi^2=12,74$; $p=0,0004$ соответственно). Подобные результаты свидетельствуют о генетической склонности ряда новорожденных к формированию возникновения СПОН.

В дальнейшем, клиническое течение СПОН у новорожденных было сопоставлено с фактом наличия полиморфизма гена TLR2 и его экспрессией. Было установлено, что полиморфизм гена TLR2 имел прямую корреляцию с динамическим изменением уровня незрелых нейтрофилов ($n=37$; $R=0,35$; $p=0,04$) и обратную корреляцию с динамическим изменением уровня лимфоцитов ($n=39$; $R=-0,35$; $p=0,03$).

Экспрессия гена TLR2 имела прямую корреляцию с уровнем лимфоцитов ($n=23$; $R=0,48$; $p=0,02$), изменением динамической концентрации ИЛ-1 β ($n=27$; $R=0,40$; $p=0,04$), присоединением госпитальной инфекции ($n=25$; $R=0,52$; $p=0,007$) и обратную корреляцию с уровнем сегментоядерных нейтрофилов ($n=47$; $R=-0,35$; $p=0,01$), агрессивностью респираторной терапии ($n=51$; $R=-0,28$; $p=0,05$), реализацией СПОН ($n=51$; $R=-0,30$; $p=0,04$), количеством

пораженных органов и систем ($n=51$; $R=-0,33$; $p=0,02$), признаками ССВО ($n=51$; $R=-0,30$; $p=0,04$). Полученные данные могут трактоваться следующим образом: экспрессия гена TLR2 происходит в ответ на бактериальную агрессию, носит характер защитной реакции и уменьшает клинические проявления СПОН у новорожденных. Наличие полиморфного гена GA, кодирующего экспрессию TLR2, приводит к депрессии выше описанных компенсаторных иммунологических механизмов, способствуя прогрессированию СПОН у новорожденных.

Выводы.

1. Популяционный риск наличия полиморфного участка GA Arg753Yln гена TLR2 у новорожденных со СПОН составляет 10,70%.
2. У новорожденных с признаками СПОН частоты выявлений полиморфизма гена TLR2 типа GA и мутантной аллели A достоверно выше, чем у здоровых лиц, что свидетельствует о генетической детерминации формирования ряда случаев возникновения СПОН у новорожденных.
3. Полиморфизм гена TLR2 имеет прямую корреляцию с динамическим изменением уровня незрелых нейтрофилов и обратную корреляцию с динамическим изменением уровня лимфоцитов.

4. Экспрессия гена TLR2 имеет прямую корреляцию с уровнем лимфоцитов, изменением динамической концентрации ИЛ-1 β , присоединением госпитальной инфекции и обратную корреляцию с уровнем сегментоядерных нейтрофилов, агрессивностью респираторной терапии, реализацией СПОН, количеством пораженных органов и систем, признаками ССВО.
5. Можно предположить, что экспрессия гена TLR2 происходит в ответ на бактериальную агрессию, носит характер защитной реакции и уменьшает клинические проявления СПОН у новорожденных. Наличие полиморфного гена GA, кодирующего экспрессию TLR2 приводит к извращению механизмов иммунологической защиты способствуя прогрессированию СПОН у новорожденных.

Литература.

1. Викторов В.В. Значение наследственных факторов в реализации синдрома органной дисфункции при хирургической инфекции у детей / В.В. Викторов, Т.В. Викторова, П.И. Миронов, Э.К. Хуснутдинова //Анестезиология и реаниматология.-2001.-№1.- С.-32-34.
2. Зильбер А.П. Полиорганная недостаточность как новый вид патологии: клиническая физиология, интенсивная терапия,

профилактика / А.П. Зильбер // Актуальные проблемы
медицины критических состояний.-2000.-№7.-С. 71-91.

3. Измайлова О.В. Дослідження поліморфізму генів TLR2 ARG753GLN та TLR4 ASP7299GLY, THR399ILE при урогенітальних інфекціях / О.В. Измайлова, О.А. Шликова, І.П. Кайдашев // Журнал Академії Медичних Наук України.- 2010.- Т.16 (додаток).-С. 72-73.
4. Камышников В.С. Справочник по клинической биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С.Камышников.– 3-е изд.– М.: МЕДпресс.-информ, 2009.– 896 с.
5. Куваева И.Б., Ладодо К.С. Микроеккологические и иммунные нарушения у детей: Диетическая коррекция.- М.: Медицина, 1991.-240 с.
6. Неонатологія (2004) / [За ред. П.С. Мощича, О.Г. Суліми].- Київ: «Вища школа».- 407 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA / Реброва О. Ю. – М: Медиафера, 2002. – 312 с.
8. Сергеева В.А. Влияние фетального воспалительного ответа на тяжесть течения раннего неонатального периода у новорожденных с внутриутробным инфицированием / В.А.

Сергеева, Ю.С. Александрович, Н.П. Шабалов, С.Н. Нестеренко
// Курский научно-практический вестник «Человек и его
здоровье».- 2011.-№1.- С. 80-88.

9. Шиган Е.Н. Методы прогнозирования и моделирования в
социально-гигиенических исследованиях.-М.:Медицина,1986.-
155с.

10.Шкурупій Д.А. Таблиця критеріїв поліорганної недостатності у
новонароджених.- Свідоцтво про реєстрацію авторського права
на твір №15669 від 15.02.2006.

Реферат. Цель исследования – сопоставление клинических
признаков синдрома полиорганной недостаточности с наличием
генетических детерминант его развития у новорожденных.

Обследовано 149 новорожденных – пациентов неонатальных
стационаров городов Полтава и Кременчуг. Проанализированы
экспрессия и полиморфизм гена Toll-like рецепторов 2-го типа (TLR2),
концентрации интерлейкина 1 β , лейкоцитарная формула крови и их
сопоставление с клиническим течением заболевания.

Установлено, что популяционный риск наличия полиморфного
участка GA Arg753Yln гена TLR2 составляет у детей со СПОН
10,70%, а частоты выявлений полиморфизма гена TLR2 типа GA и
мутантной аллели A достоверно выше среднепопуляционных.

Полиморфизм гена TLR2 имеет прямую корреляцию с динамикой уровня незрелых нейтрофилов и обратную корреляцию с динамикой уровня лимфоцитов. Экспрессия гена TLR2 имеет прямую корреляцию с уровнем лимфоцитов, динамикой концентрации интерлейкина 1 β , присоединением госпитальной инфекции и обратную корреляцию с уровнем сегментоядерных нейтрофилов, агрессивностью респираторной терапии, реализацией СПОН, количеством пораженных систем, признаками синдрома системного воспалительного ответа.

Подобные результаты свидетельствуют о генетической детерминации формирования СПОН у новорожденных. Экспрессия гена TLR2 носит характер защитной реакции и уменьшает клинические проявления СПОН. Наличие полиморфного гена GA TLR2 приводит к депрессии компенсаторных иммунологических механизмов, способствуя прогрессированию СПОН у новорожденных.

Ключевые слова: новорожденные, синдром полиорганной недостаточности, полиморфизм и экспрессия гена Toll-like рецепторов 2-го типа.