



Oļegs Sabeļņikovs

Ģenētisko polimorfismu saistība ar septisko komplikāciju attīstību un klīnisko gaitu

Promocijas darbs medicīnas doktora grāda iegūšanai specialitātē Anestezioloģija un reanimatoloģija

Darba vadītājs: *Dr. habil. med.*, prof. **Indulis Vanags**

Dr.med., **Liene Ņikitina-Zaķe**

Zinātniskais konsultants:

Dr.med., docente **Angelika Krūmiņa**

Rīga, 2011



Zinātniskais darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē ” finansiālu atbalstu.

Saturs

1.	Tekstā lietotie saīsinājumi	6
2.	Ievads.....	8
2.1	Darba aktualitāte.....	8
2.2	Darba mērķis.....	9
2.3	Darba uzdevumi.....	9
2.4	Darba novitāte, zinātniskā un praktiskā nozīme	9
2.5	Promocijas darba struktūra	9
2.6	Ētiskie aspekti.....	10
3.	Literatūras apskats	11
3.1	Sepses aktualitāte mūsdienu medicīnā	11
3.1.1	Terminoloģija	11
3.1.2	Ieskats sepses patoģenēzē.....	14
3.1.3	MODS patoģenēze un klīniskā izvērtēšana	16
3.1.4	Kopsavilkums par patoģenēzi.....	17
3.2	Predispozīcija sepses attīstībai un nelabvēlīgam iznākamam intensīvās terapijas nodaļas pacientiem.....	18
3.2.1	Negēnētiskie sepses attīstības un klīniskā iznākuma riska faktori	18
3.2.2	Iedzimto faktoru loma infekcijas procesa attīstībā un klīniskā gaitā.....	21
3.3	Audzēju nekrozes faktors alfa (TNF α)	23
3.3.1	TNF α loma septiskā šoka un smagas sepses patoģenēzē	23
3.3.2	TNF ģenētisko polimorfismu funkcionālais nozīmīgums septiskā šoka un smagas sepses patoģenēzē.....	24
3.4	Interleikīns 6 (IL-6)	27
3.4.1	IL-6 vispārējais raksturojums	27
3.4.2	IL-6 loma smagas sepses un septiskā šoka patoģenēzē.....	28
3.4.3	IL-6 ģenētisko polimorfismu funkcionālais nozīmīgums sepses un septiskā šoka patoģenēzē	29
3.5	Interleikīns 10 (IL-10)	30

3.5.1	IL-10 vispārējais raksturojums	30
3.5.2	IL-10 loma smagas sepses patogēnēzē	31
3.5.3	IL-10 ģenētisko polimorfismu funkcionālais nozīmīgums smagas sepses un septiskā šoka patogēnēzē.....	32
4.	Materiāli un metodes	34
4.1	Pētījuma populācija	34
4.1.1	Pacientu iekļaušanas kritēriji	34
4.1.2	Pacientu izslēgšanas kritēriji:	34
4.1.3	Septiskā šoka apakšgrupa	35
4.1.4	Orgānu mazspējas vērtēšana.....	35
4.1.5	Izdzīvojušo un mirušo slimnieku apakšgrupas	36
4.2	Klīniskais fenotips	36
4.3	Citokīnu analīze.....	37
4.3.1	TNF α	37
4.3.2	IL-6	38
4.3.3	IL-10	38
4.4	Ģenētisko polimorfismu tipēšana	39
4.5	Datu statistiskā analīze	41
5.	Rezultāti.....	43
5.1	Pētījuma populācijas raksturojums	43
5.1.1	Kopējās pētījuma populācijas demogrāfiskais un klīniskais raksturojums	43
5.1.2	Izdzīvojušo un mirušo slimnieku svarīgāko raksturlielumu analīze	48
5.1.3	Demogrāfisko un klīnisko raksturlielumu analīze slimnieku grupās ar un bez septiskā šoka pazīmēm.....	49
5.2	TNF -308 A/G polimorfisms	51
5.2.1	TNF α cirkulējošā līmeņa saistība ar septiskā šoka attīstību un klīnisko iznākumu	51
5.2.2	TNFA -308 A/G polimorfisma saistība ar TNF α cirkulējošo līmeni	52
5.2.3	TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci	56
5.2.4	TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu	58

5.3	IL-6 -174 G/C polimorfisms.....	61
5.3.1	IL-6 cirkulējošā līmeņa saistība ar sepses veidu un klīnisko iznākumu.....	61
5.3.2	IL-6 gēna promotera polimorfisma -174 G/C saistība ar IL-6 cirkulējošo līmeni 62	
5.3.3	IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci.....	68
5.3.4	IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu.....	71
5.3.5	Kopsavilkums par IL-6 -174 G/C polimorfismu	74
5.4	IL-10 -1082 G/A polimorfisms	75
5.4.1	IL-10 -1082 G/A polimorfisma izplatība kopējā pētījuma populācijā	75
5.4.2	IL-10 cirkulējošā līmeņa saistība ar sepses veidu un klīnisko iznākumu.....	75
5.4.3	IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar IL-10 sistēmisko koncentrāciju	77
5.4.4	IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci	80
5.4.5	IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu.....	82
5.4.6	Kopsavilkums par IL-10 (-1082 G/A) polimorfismu	85
6.	Diskusija	86
6.1	Ievads.....	86
6.2	Svarīgāko epidemioloģisko raksturlielumu analīze.....	86
6.3	TNF -308 A/G	88
6.4	IL-6 -174 G/C	93
6.5	IL-10 -1082 G/A.....	97
6.6	Diskusijas kopsavilkums	105
7.	Secinājumi	109
8.	Praktiskās rekomendācijas.....	109
9.	Izmantotā literatūra:.....	110

1. Tekstā lietotie saīsinājumi

ARDS – Akūts respiratoriskā distresa sindroms (angļu val., *Acute Respiratory Distress Syndrome*)

ARVS – Akūta respiratora vīrusu saslimšana

APTL – Aktivētā parciālā tromboplastīna laiks

CARS – Kompensators pretiekaisuma sindroms (angļu val., *compensatory anti-inflammatory response syndrome*)

CI – Ticamības intervāls (angļu val., *confidence interval*)

CRP – C reaktīvais proteīns

DIK - Difūza intravazālā koagulopātija

DNS - Dezoksiribonukleīnskābe

EDTA – Etilēndiamīntetraacetāts (antikoagulants)

ELISA – Enzimātiskā imūnfermentatīvā reakcija (angļu val., *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

ESICM – Eiropas Intensīvās terapijas asociācija (angļu val., *European Society of Intensive Care Medicine*)

FiO₂ - skābekļa daļa (tilp.%) inhalējamā gāzu maisījumā

IQR – starpkvartīļu intervāls (angļu val., *interquantile range*)

IL-6 – Interleikīns-6 (angl., *Interleukin 6*)

IL-10 – Interleikīns-10 (angl., *Interleukin 10*)

INR – Starptautiskais Normalizētais Indekss (angļu val., *International Normalized Ratio*)

ITN – Intensīvās terapijas nodaļa

HOPS – hroniska obstruktīva plaušu slimība

LPS – lipopolisaharīds

MHC - galvenais audu saderības komplekss (angļu val., *major histocompatibility complex*)

MODS - Multiorgānu disfunkcijas sindroms (angļu val., *multiorgan dysfunction syndrome*)

MMDS – Mikrocirkulācijas un mitohondriālā distresa sindroms (angļu val., *microcirculation un Mitochondrial Distress Syndrome*)

OR – Izredžu attiecība (angļu val., *odds ratio*)

P_aCO₂ – CO₂ parciālais spiediens arteriālās asinīs

SE - Standartklūda (angļu val., *standart error*)

SD – Standartnovirze (angļu val., *standart deviation*)

SIRS – sistēmiskās iekaisuma reakcijas sindroms (angļu val., *systemic inflammatory response syndrome*)

SNP – viena nukleotīda polimorfisms (angļu val., *single nucleotide polymorphism*)

SOAP- Sepses attīstība akūtiem pacientiem (angļu val., *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients*)

SOFA – Secīgā iesaistīto orgānu mazspējas novērtēšanas skala (angļu val., *Sequential Related Organ Failure Assessment*)

PIRO – „Predispozīcija, iekaisums, reakcija, orgānu mazspēja” modelis (angļu val., *Predisposition, Inflammation, Responce, Organ failure*)

PIF – trombocītu inhibīcijas faktors (angļu val., *Platelet Inhibitory Factor*)

PG-E₂ – prostaglandīns E₂

SvO₂ – jaukto venozo asiņu skābekļa saturācija (angļu val., *Mixed Venous Oxygen Saturation*)

Th – T līdzētājšūnas (angļu val., *T helpers*)

TLR – *Toll*-līdzīgie receptori (angļu val., *Toll-Like Receptors*)

TNF α - Audzēju nekrozes faktors alfa (angļu val., *Tumor Necrosys Factor α*)

2.Ievads

2.1 Darba aktualitāte

Sepse jau vairākus gadus ir viena no aktuālākām problēmām mūsdienu medicīnā. Sepses problēmas aktualitāti nosaka tās augstā incidence, mirstība un ārstēšanas izmaksas. Epidemioloģiskos pētījumos konstatēta augsta sepses izplatība gan vispārējā populācijā, gan arī starp intensīvās terapijas nodaļu pacientiem [1]. Saskaņā ar nesen veiktā *SOAP (Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients)* pētījuma datiem, sepses incidence Eiropas valstu intensīvās terapijas nodaļās (ITN) svārstās no 17,5% līdz 72,5%, bet mirstība ITN - no 7,9% līdz 34,8% [2]. Analizējot sepses incidenci pasaulē 1979.-2000.gados, novēroja tās pieaugumu vidēji par 13,7% gadā [3].

Augstus sepses sastopamības un mirstības rādītājus nosaka vairāki faktori (piem., slimnieku vecuma un blakuspatoloģiju skaita pieauguma tendence [4], invazīvo manipulāciju skaita pieaugums medicīnā, augoša mikroorganismu rezistence utt.). Kā viens no būtiskākiem septisko komplikāciju attīstības un nelabvēlīgas klīniskās gaitas riska faktoriem pēdējos gados arvien biežāk tiek minēta arī ģenētiskā predispozīcija.

Ģenētiskās predispozīcijas svarīgā nozīme sepses attīstībā un iznākumā uzsvērtā arī jaunajā *PIRO* koncepcijā, kas tiek piedāvāta kā riska noteikšanas metode un potenciāli arī kā iekļaušanas kritērijs pētījumos [5]. Ģenētiskās predispozīcijas noteikšanas nozīmi paredz arī modernāko terapijas un diagnostikas metožu attīstībā [6]. Kaut gan ģenētisko faktoru nozīme infekcijas slimību attīstībā un klīniskā gaitā ir demonstrēta vairākos dažāda dizaina pētījumos [7], tomēr lielākai daļai iekaisuma procesu regulācijā iesaistīto gēnu nozīme un funkcija organismā joprojām vēl nav pilnībā noskaidrota.

Sepses patoģenēzē svarīga loma pieder iekaisumu veicinošo (proinflammatoro) un iekaisumu nomācošo (antiinflammatoro) procesu aktivitātei, ko regulē vairāku signālmolekulu (piem., citokīnu) mijiedarbība. Gēni, kas kodē iekaisuma procesos iesaistītos proteīnus, ir potenciāli kandidāti, lai noteiktu atšķirības sistēmiskās iekaisuma reakcijas norisē un iznākumā infekciju gadījumos dažādiem indivīdiem.

Tumoru nekrozes faktors alfa (TNF α), interleikīns-6 (IL-6), interleikīns-10 (IL-10) ir nozīmīgi sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma patoģenēzes procesu regulatori. Šo citokīnu kodējošo gēnu strukturālo variāciju saistība ar kodējamo molekulu produkciju, kā arī asociācija ar sepses attīstību, klīnisko gaitu un iznākumu pēdējos gados tiek intensīvi pētīta. Kaut gan šo pētījumu rezultāti būtiski paplašina mūsu izpratni par ģenētisko faktoru saistību ar smagas sepses attīstību un klīnisko gaitu, tomēr rezultāti bieži vien ir pretrunīgi un tos ne vienmēr izdodas reproducēt atkārtotos pētījumos.

Kaut gan ģenētisko asociāciju pētījumu skaits pēdējos gados pieaug visā pasaulē, Latvijā līdzīgu pētījumu skaits ITN sepses slimnieku populācijā ir visai ierobežots. Darba rezultāti precizēs izvēlēto citokīnu ģenētisko polimorfismu lomu septisko komplikāciju patoģenēzē saistībā ar predispozīciju, klīniskās gaitas īpatnībām, kā arī ar izdzīvošanas prognozi sepses pacientiem Latvijā.

2.2 Darba mērķis

Izvērtēt TNF α , IL-6, IL-10 ģenētisko polimorfismu asociāciju ar septisko komplikāciju attīstību, klīniskās gaitas īpatnībām un izdzīvošanas prognozi ITN slimniekiem.

2.3 Darba uzdevumi

Noteikt TNF -308 A/G, IL-6 -174 G/C, IL-10 -1082 G/A polimorfismu saistību ar:

- septiskā šoka incidenci,
- attiecīgā citokīna sistēmisko koncentrāciju,
- klīnisko prognozi ITN.

2.4 Darba novitāte, zinātniskā un praktiskā nozīme

1. Darba novitāte: Latvijā pirmo reizi tika veikts ģenētiskās asociācijas pētījums ITN sepses slimnieku populācijā ar mērķi precizēt citokīnu ģenētiskā polimorfisma saistību ar septiskā šoka incidenci, sepses klīnisko gaitu un iznākumu.
2. Zinātniskā nozīme: Precizējot ģenētiskos polimorfismus, kas ir saistīti ar smagu sepses gaitu un prognozi, pavērtos iespēja mērķtiecīgi pētīt pamatā esošos molekulāros mehānismus, pilnveidojot mūsdienīgo sepses patoģenēzes izpratni.
3. Praktiskā nozīme: Pierādot attiecīga ģenētiskā polimorfisma asociāciju ar septisko komplikāciju attīstību, gaitu un prognozi, uzlabojas iespējas atlasīt (stratificēt) slimniekus klīniskiem pētījumiem un komplicētām monitorēšanas un terapijas metodēm (pamatot klīniskā lēmuma pieņemšanu).

2.5 Promocijas darba struktūra

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir klasiska uzbūve, ietverot ievadu, literatūras apskatu, materiālu un metožu sadaļas, rezultātus, diskusiju, secinājumus un literatūras avotu sarakstu, kopā 119 lappuses.

2.6 Ētiskie aspekti

Pētījuma ētiskie aspekti tika rūpīgi izvērtēti un ir saņemti pozitīvi atzinumi par pētījuma veikšanu no Rīgas Stradiņa universitātes un Centrālās Medicīnas Ētikas komitejām.

3. Literatūras apskats

Šī darba literatūras apskata mērķis ir analizēt līdzšinējo publikāciju datus par ģenētisko faktoru lomu septisko komplikāciju patoģenēzē un to ietekmi uz klīnisko gaitu un iznākumu.

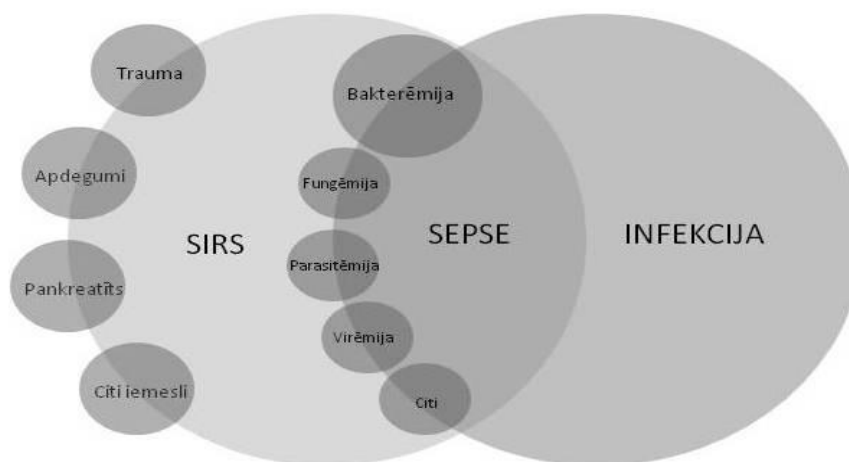
Literatūras apskata struktūra. Literatūras apskata pirmajā daļā analizēta sepses aktualitāte modernajā medicīnā un patoģenēzes mūsdienu koncepcija, kā arī apskatīta vairāku neģenētisku faktoru loma sepses attīstībā un tās klīniskā gaitā. Apskata otrā daļa veltīta izvēlēto citokīnu un ģenētisko kandidātpolimorfismu aprakstam un funkcionālā nozīmīguma analīzei, balstoties uz līdzšinējo pētījumu publicētiem rezultātiem.

Metodoloģija. Literatūras apskatā iekļautas pēdējo gadu publikācijas, kas tika atlasītas, izmantojot meklēšanu (pēc attiecīgiem atslēgvārdiem) pieejamo datubāzu katalogos (PubMed, OVID utt.). Rakstu meklēšanai izmantoto atslēgvārdu izvēle balstījās uz pētamās problēmas aktualitātēm.

3.1 Sepses aktualitāte mūsdienu medicīnā

3.1.1 Terminoloģija

Sepses starptautiskās definīcijas pamatā ir sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma (SIRS) koncepcija. Termins piedāvāts lietošanai 1992.g. ASV vadošo intensīvās terapijas speciālistu konferencē (*ACCP/SCCM Consensus Conference*) ar mērķi definēt vispārējo sindromu, kas ir raksturīgs sistēmiskai iedzimtās imūnās sistēmas mehānismu aktivācijai neatkarīgi no izraisošā iemesla [8]. SIRS var izraisīt lokāla vai ģeneralizēta infekcija, trauma, termisks bojājums, kā arī sterils iekaisums (piem., pankreatīts). Ar sepsi saistītā terminoloģija grafiski apkopota 1.attēlā.



1.attēls. Ar sepsi saistītās terminoloģijas grafisks apkopojums [9]

1992.g. definētās klasiskās SIRS pazīmes ir sekojošas (vienlaicīgi divas vai vairāk):

- ķermeņa temperatūra augstāka par 38 °C vai zemāka par 36 °C;
- sirdsdarbības frekvence > 90 sitieni/min;
- elpošanas frekvence, kas lielāka par 20 reizēm minūtē vai $P_aCO_2 < 32$ mm Hg;
- leukocītu skaits, kas > 12 000/mm³ vai < 4000/mm³ vai vairāk par 10% nenobriedušu neitrofilo leukocītu.

SIRS koncepcija ir vairākkārt kritizēta par pārmērīgu diagnostisko jūtību, nespecifiskumu, nespēju precizēt procesa stadijas un iespējamo prognozi, kopš tās ieviešanas klīniskajā un zinātniskajā praksē. Toties ir jāatzīmē, ka, atzīstot norādītos SIRS koncepcijas trūkumus, pasaules vadošie speciālisti tomēr atbalsta tās lietošanu, līdz netiks izveidota labāka alternatīva [9]. Perspektīvā, raksturojot organisma iekaisuma atbildes reakciju (SIRS), būtu plašāk jālieto augsti jūtīgi un specifiski kvantitatīvi laboratoriski parametri (piem., bioķīmiski un/vai imunoloģiski marķieri), pretstatā subjektīviem un bieži vien nekvantitatīviem klīniskiem novērojumiem.

2001.g. ar mērķi pilnveidot esošo ar sepsi saistīto terminoloģiju, notika atkārtota pasaules vadošo intensīvās terapijas speciālistu konference (*2001SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*). Atzīstot, ka esošā terminoloģija nevar precizēt infekcijas izraisītās organisma atbildes reakcijas gaitu (stadijas), konferences dalībnieki tomēr uzsvēra, ka esošām *sepsis*, *smagas sepsis* un *septiskā šoka* definīcijām jāpaliek bez izmaiņām [9]. Šīs konferences ietvaros tika arī precizēti un papildināti sepsei raksturīgie klīniskie simptomi un laboratoriskā atrade (1.tabula).

1.tabula. Sepses diagnostiskie kritēriji pieaugušajiem [9]

Infekcija (definēta kā mikroorganismu ierosināts patoloģisks process), dokumentēta vai iespējama, kombinācijā ar:

Vispārējas pazīmes:

Drudzis (serdes temperatūra $>38,3^{\circ}\text{C}$)

Hipotermija (serdes temperatūra $<36^{\circ}\text{C}$)

Sirdsdarbības frekvence > 90 sitieni/min vai vairāk par 2 standartnovirzēm virs vecuma normas

Paātrinātā elpošana

Apziņas traucējumi

Izteikta tūska vai pozitīva šķidruma bilance ($>20\text{ml/kg/24h}$)

Hiperglikēmija ($> 7,7\text{ mmol/L}$), ja nav cukura diabēta

Iekaisuma rādītāji:

Leikocitoze ($\text{Lei} > 12\,000/\text{mkL}$)

Leikopēnija ($\text{Lei} < 4000/\text{mkL}$)

Normāls leikocītu skaits ar vairāk par 10% nenobriedušo formu

C reaktīva proteīna koncentrācija asinīs, kas pārsiedz 2 standartnovirzes virs laboratoriskās normas

Prokalcitonīna koncentrācija asinīs, kas pārsniedz 2 standartnovirzes virs laboratoriskās normas

Hemodinamiskie rādītāji

Arteriālā hipotenzija ($\text{TA}_{\text{sist.}} < 90\text{ mm Hg}$, $\text{MAP} < 70\text{ mm Hg}$ vai $\text{TA}_{\text{sist.}}$ pazemināšanos vairāk kā par 40%)

$\text{SvO}_2 > 70\%$

Kardiālais indekss $> 3,5\text{ L/min/m}^2$

Orgānu disfunkcijas raksturlielumi

Arteriālā hipoksēmija ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$)

Akūtā oligūrija (diurēze $< 0,5\text{ ml/kg/h}$ vai 45 mmol/l vismaz 2h)

Kreatinīna pieaugums $> 0,5\text{ mg/dl}$

Diskoagulācija ($\text{INR} > 1,5$ vai $\text{APTL} > 60\text{s}$)

Ileus (neizklausas zarnu peristaltiku)

Trombocitopēnija ($\text{Tr} < 100\,000/\text{mkl}$)

Hiperbilirubinēmija (kopējais bilirubīns $> 70\text{mmol/l}$)

Audu perfūzijas traucējumi

Hiperlaktatēmija ($>1\text{ mmol/L}$)

Pagarināts kapilāru atpakaļuzpildīšanas laiks

Kopumā atzīstot ar sepsi saistītas terminoloģijas objektīvos trūkumus, to tomēr plaši pielieto gan klīniskos, gan arī zinātniskos mērķos. Lielākā daļā ar sepsi saistītos klīniskos pētījumos slimnieku iekļaušanas kritēriji izstrādāti, balstoties uz 1992. un 2001. gados piedāvātajām sepses un to komplikāciju definīcijām.

3.1.2 Ieskats sepses patoģenēzē

Atlasot kandidātģēnus šim pētījumam, tika rūpīgi analizēta modernā septisko komplikāciju patoģenēzes koncepcija. Šajā promocijas darba sadaļā īsumā apkopoti pēdējo gadu sepses patoģenēzes procesu regulācijai veltīto laboratorisko un klīnisko pētījumu rezultāti.

Jāatzīmē, ka mūsdienu molekulārās bioloģijas metožu attīstība radījusi iespēju plaši izpētīt sepses patoģenēzē iesaistītos molekulāros, ģenētiskos, imunoloģiskos procesus un to mijiedarbību. Pēdējos gados atklāta arī virkne jaunu molekulu un molekulāro mehānismu, kas ir iesaistīti sepses patoģenēzē (piem., TLR receptoru grupa, precizēta koagulācijas sistēmas nozīme utt.). Šī darba rezultātā veidojas modernā septisko komplikāciju patoģenēzes koncepcija, kas izprot sepsi kā sarežģītu kompleksu sindromu, kurā iesaistīti vairāki imunoloģiskie, iekaisuma, koagulācijas, neiroendokrīnie u.c. procesi.

Saskaņā ar sepses definīciju, tās patoģenēzes pamatā ir infekcijas izraisītie organisma SIRS attīstības mehānismi. Attīstoties SIRS, mikroorganismu produkti aktivē iedzimtās imūnsistēmas procesus. Patogēnu komponentu atpazīšanā iesaistīti gan membrānas receptori (piem., TLR grupa), gan arī citoplazmas proteīni (piem., *Nod*). Ligandu saistīšanās ar receptoriem aktivē virkni intracelulāro procesu, kā rezultātā pieaug nukleārā faktora NFκB aktivitāte. NFκB izraisa iekaisuma un pretiekaisuma citokīnu sintēzi, vairāku iekaisuma mediatoru (piem., citokīnu) gēnu ekspresiju ar to sekojošu sintēzi un sekrēciju.

Citokīni ir nozīmīgākā efektoro molekulu grupa, kas regulē SIRS gaitu. Citokīnu grupā ietilpst TNF, hemokīni, interferons, koloniju stimulējošais faktors. Citokīni ir neliela izmēra molekulas (parasti $< 30\text{ kDa}$), kuras reaģē ar specifiskiem mērķa šūnu receptoriem, izraisot attiecīgus efektus. Nosacīti citokīnus iedala pro- un antiinflamatorios. Proinflamatorie citokīni – aktivē vairākus imūnsistēmas šūnu veidus un izraisa vairāku mediatoru produkciju. Tie izraisa MHC I un II klases molekulu ekspresiju un T un B limfocītu aktivāciju un proliferāciju. Antiinflamatorie citokīni inhibē proinflamatorios efektus.

TNF α un IL-1 ir mononukleāro šūnu producētie sākotnējie proinflammatorie citokīni, kas nodrošina vairākus ar bakteriālo LPS efektus. TNF α un IL-1 savukārt stimulē vairākus iekaisuma procesus - sekundāro citokīnu sekrēciju, lipīdu mediatoru un skābekļa brīvo radikāļu izdalīšanos, adhēzijas molekulu aktivāciju, kas savukārt veicina iekaisuma šūnu migrāciju audos (bet pārlika TNF-alfa aktivitāte veicina neitrofilo leukocītu adhēziju pie asinsvadu endotēlija arī iekaisuma vēl neskartajos apvidos).

3.1.2.1 Sistēmisko iekaisumu ierobežojošie mehānismi

Sepses patoģenēzes iekaisumu inhibējošo procesu kopumu dēvē par kompensatoro antiinflammatorās reakcijas sindromu (angļu val., *CARS - compensatory anti-inflammatory response syndrome*). CARS, līdzīgi kā SIRS, ir kompleksa organisma atbildes reakcija uz infekciju, kas ietver vairākus mehānismus. CARS svarīgākā funkcija ir mazināt iekaisuma izpausmes un atjaunot homeostāzi. Pēdējos gados veiktā sepses patoģenēzes dziļa izpēte precizēja sākotnējo koncepciju, kas uzskatīja sepsi par pārmērīga sistēmiskā iekaisuma rezultātu.

Sākotnēji dominēja uzskats, ka sepse ir pārmērīgas nekontrolētas proinflammatorās organisma reakcijas rezultāts. Šīs koncepcijas pamatā bija eksperimentālo pētījumu rezultāti, kurus ieguva, dzīvniekiem ievadot augstas LPS devas vai bakteriālo slodzi un izraisot izteiktu proinflammatoro reakciju, kas klīniski atgādināja sepses simptomus. Bloķējot proinflammatoro reakciju, šiem dzīvniekiem novēroja labāku klīnisko iznākumu. Jāatzīmē, ka klīniskajos pētījumos tik augstas proinflammatoro citokīnu koncentrācijas parasti novēro tikai atsevišķām sepses formām (piem., meningokokēmijai). Vairākumā klīnisko pētījumu proinflammatorās reakcijas intensitāte ir bijusi vidēji izteikta. Līdz ar to jautājums par pieminēto eksperimentālo dzīvnieku proinflammatorā sepses modeļa atbilstību reālajai klīniskai situācijai joprojām paliek diskutējams.

Antiinflammatoro mehānismu aktivācija ir normāla organisma reakcija stresa apstākļos, un, ja infekcijas perēklī ir izteiktāka proinflammatora reakcija, sistēmiski tomēr dominē antiinflammatorie mehānismi [10]. Analizējot T-limfocītu funkciju sepses slimniekiem, jau sepses sākotnējā fāzē novēroja imūnosupresiju, kas ļāva secināt, ka hipoimūna reakcija mēdz būt arī primāra (nevis proinflammatoro mehānismu izraisīta kompensatora jeb sekundārā reakcija) [11]. Līdzīgi dati tika iegūti, pētot citokīnu produkciju ar LPS stimulētos monocītos, kas izdalīti no sepses slimniekiem, kur novēroja gan pro- gan arī antiinflammatoro citokīnu ekspresijas izmaiņas [12]. Šo pētnieku kolektīvs secināja, ka sepses sākotnējā fāzē notiek gan pro-, gan arī antiinflammatoro citokīnu produkcijas izmaiņas un slimnieku izdzīvošana ir saistīta tieši ar proinflammatorās reakcijas normalizāciju. Līdzīgi dati ir iegūti pētot gēnu ekspresijas profilus. Tajā pat laikā ir jāatzīmē, ka daļa pētnieku tomēr uzskata antiinflammatoro reakciju par sekundāru kompensatoru atbildi uz pārmērīgu proinflammatoru reakciju [13, 14].

CARS mehānismu realizācijā piedalās vairākas šūnas un citokīnu grupas un šis sindroms nopietni ietekmē prognozi. CARS iesaistītie svarīgākie mehānismi:

Limfocītu anergija, kas ir novērota pēc liela apjoma ķirurģiskām operācijām, smagām traumām un apdegumiem [15]. Sepses slimnieku limfocītiem novēro pazeminātu *ex vivo* spēju producēt Th1 grupas citokīnus, bet, tajā pat laikā, paaugstinātu Th2 grupas citokīnu produkciju.

IL-10 produkcija. IL-10 piemīt vairāki imūnosupresīvi efekti, bet nozīmīgākais - TNF α produkcijas nomākšana (*IL-10 efekti sīkāk ir aprakstīti attiecīgajā promocijas darba sadaļā*).

Holīnērgiskā pretiekaisuma reakcija. Holīnērgiskai sistēmai, respektīvi *n.vagus* efektiem, ir nozīmīga loma proinflammatoro procesu ierobežošanā. Tā norit acetilholīnam stimulējot $\alpha 7$ holīnērgiskos receptorus uz makrofāgu virsmas, kas nomāc citokīnu sintēzi.

Makrofāgu migrāciju inhibējošais faktors (MIF) – citokīns, kuru spēj producēt vairāki šūnu tipi. MIF regulē imūnreakcijas modulējot TLR4 ekspresiju. Eksperimentos ar bezMIF pelēm novēroja TLR pazemināto ekspresiju. Sepses slimniekiem MIF līmenis ir paaugstināts.

Antiinflammatoro mehānismu aktivācija novērota vairākos gan eksperimentālos, gan arī klīniskos pētījumos. *Van der Poll* ar kolēģiem novēroja vairākiem sepses slimniekiem antiinflammatoro stāvokli, ko raksturoja paaugstināta pretiekaisuma citokīnu un proinflammatoro citokīnu inhibitoru koncentrācija, kā arī imūnosupresija šūnu līmenī [16].

Kaut gan pretiekaisuma reakcija ir nepieciešama proinflammatoro procesu kontrolei, tā tomēr varētu sekmēt sekundārās infekcijas pievienošanos, tādā veidā ietekmējot prognozi.

3.1.3 MODS patoģenēze un klīniskā izvērtēšana

Sepses slimnieku stāvokļa smagumu un ar to saistīto mirstību nosaka multiplo orgānu disfunkcijas sindroma (MODS) izpausmes.

Secīgu orgānu disfunkcijas sindromu pirmais 1973.gadā ir aprakstījis *Tilney* ar līdzautoriem 18 slimniekiem ar akūtu nieru mazspēju pēc abdominālās aortas aneirismas operācijas [17].

Saskaņā ar 2001.g. Starptautiskās Sepses definīcijas konferences ieteikumiem par MODS sauc vienlaikus vai straujā secībā attīstījušos divu vai vairāku orgānu mazspēju [9]. Nozīmīgākais MODS definīcijas trūkums ir ierobežota spēja precizēt orgānu disfunkcijas attīstības tiešo cēlonisko saistību ar sepses ierosinātiem patoģenētiskiem procesiem. Neskatoties uz šo problēmu, MODS klīniskās izpausmes plaši analizē klīniskos pētījumos, raksturojot septisko slimnieku stāvokļa smagumu. Jāpiebilst, ka 2001.g. sepses simptomu sarakstā atsevišķa apakšsadaļa apraksta orgānu mazspējas pazīmes (1.tabula).

Pēc plaša multicentru observācijas SOAP pētījuma rezultātiem, 71% no Eiropas ITN slimniekiem novēroja nopietnu orgānu mazspēju [2]. Saskaņā ar šī pētījuma rezultātiem multiorgānu mazspējas sindromu biežāk novēroja tieši sepses slimniekiem, nekā ITN slimniekiem ar citu

patoloģiju (attiecīgi 75 un 43%). Jāatzīmē, ka izolētu orgānu mazspēju novēroja pārsvarā slimniekiem bez sepses (57 un 25%).

SOAP pētījumā novēroja arī augstāku mirstību slimniekiem ar MODS. Slimniekiem ar sepses izraisīto MODS tā bija augstāka, nekā slimniekiem ar citu iemeslu izraisīto MODS. Pētījuma rezultāti norāda uz augstu MODS incidenci Eiropas ITN slimniekiem, MODS ciešu saistību ar sepsi, kā arī uz sepses izraisīto MODS smagāku gaitu un augstāku mirstību.

Pēc mūsdienu pētījumu rezultātiem MODS patoģenēzē ir iesaistīti vairāki mehānismi. MODS patoģenēzē svarīga loma pieder šūnu hipoksijai, apoptozes procesiem, vairāku molekulu (piem., endotoksīna, skābekļa brīvo radikāļu) toksiskiem efektiem.

Sepses izraisītās orgānu mazspējas objektīvai vērtēšanai ir izveidotas vairākas multiparametru skalas (piem., MODS utt.). Eiropas Intensīvās medicīnas asociācija (*ESICM*) 1996. gadā ieteikusi īpašu klasifikāciju — *SOFA Score (Sepsis-Related Organ Failure Assessment Score)*. *SOFA* skala ļauj kvantitatīvi novērtēt orgānu bojājumu pakāpi, septiskā procesa attīstību, gaitu, saistību ar ārstēšanu.

3.1.4 Kopsavilkums par patoģenēzi

Sepses patoģenēzes izpratne pēdējos gados tika būtiski pilnveidota, pateicoties vairāku pētnieku kolektīvu aktivitātei šajā jomā. Tika precizēti vairāki sepses patoģenēzē iesaistītie molekulārie mehānismi, kas pārveidoja arī sepses patoģenēzes koncepciju kopumā, jo tika noskaidrota arī iekaisumu ierobežojošo procesu loma.

Līdzšinējo publikāciju analīzes rezultātā autors atlasījis trīs nozīmīgas sepses patoģenēzē iesaistītās regulatorās molekulas (citokīnu grupas) - TNF α , IL-6, IL-10. Sīkāk šo molekulu un to kodējošo gēnu polimorfismu nozīme sepses patoģenēzē ir analizēta turpmākajās promocijas darba apakšsadaļās.

3.2 Predispozīcija sepses attīstībai un nelabvēlīgam iznākamam intensīvās terapijas nodaļas pacientiem

Infekcija ir mikroorganismu iekļūšana un savairošanās normāli sterilos organisma audos, ko pavada iekaisuma reakcija. Infekcijas procesa attīstību un klīnisko gaitu konkrētam indivīdam nosaka vairāki faktori, kas ir saistīti ar ārējās vides, kā arī mikro- un makroorganisma mijiedarbību. Makroorganisma reaktivitātei ir būtiska nozīme infekcijas procesu ierosinošo mikroorganismu eliminācijā, kas savukārt nosaka slimības klīnisko gaitu. Makro- un mikroorganisma mijiedarbība attēlota arī sepses starptautiskajā definīcijā – infekcijas (mikroorganisma) izraisīts (makroorganisma) sistēmisks iekaisuma reakcijas sindroms [9]. Sepsē ir komplekss un heterogēns sindroms ar polimorfām izpausmēm, ko nosaka imunoloģisko, koagulācijas, neiroendokrīno un citu procesu mijiedarbība.

3.2.1 Nēģenētiskie sepses attīstības un klīniskā iznākuma riska faktori

Epidemioloģiskajos pētījumos ir indentificēti vairāki faktori, kuri iespaido septisko komplikāciju attīstību, klīnisko gaitu un prognozi. Apskatot sepsi kā makro- un mikroorganisma mijiedarbības procesu noteiktos ārējās vides apstākļos, ko mēģina ietekmēt ar ārstnieciskām metodēm, riska faktorus nosacīti varētu iedalīt četrās svarīgākās grupās – ārējie vides faktori, ar mikro- un makroorganismu saistītie faktori un ar ārstēšanu saistītie faktori (2.tabula). Ģenētisko predispozīciju varētu uzskatīt, kā ar makroorganismu saistīto faktoru.

2.tabula. Sepses incidenci un mirstību ietekmējošo faktoru klasifikācija

Ārējās vides faktori:
Gadalaiks
Ar ierosinātāju saistītie faktori:
Patogēna veids
Infekcijas procesa lokalizācija
Ar pacientu saistītie faktori
Demogrāfiskie (vecums, dzimums, etniskā piederība)
Hronisko blakuspatoloģiju skaits un smagums
Ar medicīnisko aprūpi saistītie faktori

Ārējie vides faktori

Ārējie vides faktori (piem., aukstums) ietekmē gan makro-, gan mikroorganismus. Virknē publikāciju gadalaiks ir uzrādīts kā sepses incidenci un mirstību ietekmējošs faktors (īpaši ziemeļu valstu iedzīvotājiem). Lielbritānijas un ASV populācijā novēroja sepses incidences un mirstības pieaugumu ziemas un rudens mēnešos, ko autori skaidroja ar ARVS un to komplikāciju incidences pieaugumu. Šajos pētījumos arī novēroja augstāku ar sepsi saistīto mirstību ziemā un rudenī, ko mēģināja saistīt ar sepses incidences pieaugumu [18, 19].

Ar infekcijas ierosinātāju saistītie faktori

Infekcijas procesa ierosinātāja dabas un virulences ietekme uz sepses klīnisko gaitu un iznākumu ir novērota vairākos pētījumos. Pētot klīniskā iznākuma saistību ar pneimonijas ierosinātāju, visaugstāko mirstību novēroja *P. aeruginosa* izraisītās pneimonijas slimniekiem (77%), tajā pat laikā Gram-pozitīvām pneimonijām (piem., *S. aureus*) šis rādītājs bija 41%, bet biežākās gram-negatīvās floras izraisītām pneimonijām - 13% [20].

Sepses attīstības risku un mirstību ietekmē arī faktori, kas saistīti ar primārās infekcijas lokalizāciju – piem., pneimonija ir biežākā primārās infekcijas lokalizācijas vieta, kas ir arī saistīta ar augstāku mirstību [21].

Ar slimnieku saistītie faktori

Slimnieku demogrāfiskie raksturlielumi, kā arī esošā hroniskā blakuspatoloģija ietekmē infekcijas procesa gaitu un iznākumu.

Vairākos pētījumos ziņots par vecuma un dzimuma saistību ar septiskā šoka incidenci. *Angus* ar kolēģiem ziņo, ka septiskā šoka incidence ir augstāka vīriešiem. Tā pozitīvi korelē ar vecumu, sasniedzot maksimumu ap 60 gadiem [1]. Par augstāku smagas sepses attīstības risku vīriešiem ziņo arī citas pētnieku grupas [21-23].

Analizējot dzimuma saistību ar mirstības risku sepses slimniekiem, vairākumā veikto pētījumu būtiskas atšķirības nav novērotas [21-23]. Tajā pat laikā ir publikācijas, kurās sievietēm ir aprakstīta augstāka mirstība no infekciozām komplikācijām. *Crabtree* un kolēģu ziņojumā, analizējot ķirurģisko nodaļu slimniekus, sievietēm novēroja augstāku mirstības risku no nozokomiālām pneimonijām [24]. Līdzīgu atradi novēroja arī smagu traumu pacientu populācijā,

kur sievietēm ar pneimoniju mirstības risks bija augstāks, kaut gan infekciozo komplikāciju incidence bija augstāka vīriešiem [25]. Jāpiebilst, ka abos pētījumos atšķirīgo mirstības risku abiem dzimumiem novēroja tikai analizējamās apakšgrupās (slimniekiem ar nozokomiālām pneimonijām), bet kopējā pētāmajā populācijā dzimuma saistība ar iznākumu nav pierādīta.

Vēl viens ar slimnieku saistīts faktors ir etniskā piederība. Epidemioloģiskajos pētījumos novēroja dubultu sepses attīstības risku ASV afroamerikāņu iedzīvotāju populācijā [22]. Līdzīgi Austrālijas aborigēniem ir novērota augstāka sepses incidence, salīdzinot ar Austrālijas iedzīvotājiem ne-aborigēniem (14,5% pret 4,0%) [26].

Saskaņā ar epidemioloģisko pētījumu datiem hronisko saslimšanu esamība būtiski ietekmē sepses attīstības risku un pacientu izdzīvošanu. *Andrie* ar līdzautoriem ziņo, ka hroniska blakuspatoloģija ir novērota ap 50% ITN sepses slimnieku [27]. Hroniskās blakuspatoloģijas ietekme uz prognozi ir ņemta vērā arī daudzfaktoru prognostiskās skalās, piem., APACHE II sistēmā [28].

Onkoloģiskās saslimšanas ir biežākā blakuspatoloģija slimniekiem ar sepsi [22, 29]. Onkoloģiskā slimība ievērojami paaugstina sepses attīstības risku, salīdzinot ar citām blakusslimībām. Onkoloģiskiem slimniekiem ir 9,8 reizes augstāks sepses attīstības risks [30]. Infekcijas avots šiem slimniekiem bieži vien ir atkarīgs no onkoloģiskā procesa lokalizācijas. Tā, piemēram, plaušu audzēju slimniekiem sepses iemesls bieži ir pneimonija. Sepse ir nāves iemesls 30% hospitalizēto onkoloģisko slimnieku. Audzēji paaugstina ar sepsi saistīto mirstību par 55%.

Ar medicīnisko aprūpi saistīti faktori

Adekvāta agrīnā antibakteriālā preparāta izvēle ietekmē mirstību slimniekiem ar hematogēnām infekcijām [31] un ventilācijas pneimonijām [32].

Vēl viena nopietna problēma, kas ietekmē sepses slimnieku ārstēšanas iznākumu ir medicīniskās **aprūpes kvalitāte**. Sepses slimnieki ITN bieži vien saņem vairākus medikamentus (līdz ar to pieaug ar medikamentu saistīto kļūdu un blakņu risks), ir pakļauti augstam dažādo invazīvo manipulāciju skaitam, kas arī varētu ietekmēt klīnisko iznākumu. Vismaz viena multicentru pētījuma rezultāti norāda uz ārstēšanas blakusefektu augsto prevalenci ITN slimnieku populācijā un to saistību ar ārstēšanas prognozi [33]. Līdzīgi *Asch* ar līdzautoriem ziņo par novēroto augstāko mirstību brīvdienās, ko autori saista ar ierobežotu resursu, diagnostikas iespēju un speciālistu pieejamību šajā laika posmā [34].

Kopsavilkums

Sepses incidenci, klīnisko gaitu un iznākumu ietekmē vairākas neģenētisko faktoru grupas. Šo faktoru iespējamo ietekmi būtu jāņem vērā gan plānojot ģenētiskos asociācijas pētījumus, gan arī interpretējot iegūtos rezultātus.

3.2.2 Iedzimto faktoru loma infekcijas procesa attīstībā un klīniskā gaitā

Ģenētiskā predispozīcija smagai infekcijas gaitai aprakstīta Sorensena pētījumā ar agrīnā bērnībā adoptētiem bērniem. Pētījumā novēroja 5,8 reižu augstāku relatīvo risku priekšlaicīgi nomirt no infekcijas tiem indivīdiem, kuriem bioloģiskie vecāki arī bija miruši no infekcijas slimībām pirms 50 gadu vecuma sasniegšanas [35].

Ģenētisko faktoru nozīme infekcijas procesa attīstībā novērota eksperimentālajos pētījumos ar standartizēto sepses modeli (*caecum* ligācija un punkcija) dažādām tuvradnieciski pārotu (angļu val., *inbredu*) peļu līnijām, kurām novēroja atšķirības gan sistēmiskā iekaisuma procesa attīstībā (resp., citokīnu produkcijā), gan arī klīniskajā iznākumā [36, 37].

Dvīņu pētījumos, homozigotu dvīņiem demonstrēts augstāks risks inficēties ar identisku patogēnu nekā heterozigotu dvīņiem [38, 39].

Līdzšinējie pētījumi norāda uz iedzimto faktoru nozīmi infekcijas procesa incidencē, klīniskā gaitā un iznākumā.

3.2.2.1 Ģenētiskās predispozīcijas apraksts un aktuālas pētīšanas metodes

Ģenētiskai predispozīcijai smagas sepses attīstībā ir kompleksa multifaktoriāla izcelsme, kas ir vairāku ģenētisku un vides faktoru mijiedarbības rezultāts. Kompleksai multifaktoriālai izcelsmei ir raksturīga variabla penetrance (biežums ar kādu genotips izraisa slimības incidences pieaugumu, piem., ja diviem identiskiem dvīņiem ir predispozīcija kādas multifaktoriālās slimības attīstībai, vienam tā var arī neizpausties, jo nav notikusi noteikto faktoru sakritība).

Lai identificētu gēnus, kas nosaka predispozīciju vai rezistenci smagai sepsei, var izmantot dažādas metodes. Pašlaik vairāku ar sepsi saistīto ģenētisko pētījumu metodoloģija ir ģenētiskie asociācijas (saistības) pētījumi. Tie analizē saistību starp bināro slimības pazīmi (piem., septiskā šoka attīstību utt.) un attiecīgo gēnu ar divām (vai vairāk) alēlēm.

Genoma reģiona polimorfisms ir DNS secības variācija, kuras frekvence kopējā populācijā pārsniedz 1% [40]. Lielākā ģenētisko polimorfismu daļa ir vienkārša viena nukleotīda ietilpstošas bāzes substitūcija (tā saucamais „viena nukleotīda polimorfisms”), kaut gan ir iespējami arī sarežģītāki varianti. SNP parasti izsauc kodējamo proteīnu transkripcijas intensitātes izmaiņas, atšķirībā no „nopietnākām” mutācijām, kad kodējamais proteīns nesintezējas vai ir funkcionāli nepilnvērtīgs.

Asociācijas pētījumiem nepieciešams liels savstarpēji neatkarīgu (neradinieku) cilvēku skaits, kam ir tipēti interesējošie funkcionālie gēni (polimorfismi) un apsekotas interesējošās pazīmes (fenotips). Asociācijas pētījumiem jāatbilst arī citiem rekomendētiem kritērijiem [41].

Asociācijas pētījumu validitātes (ticamības) novērtējuma pamatā ir zināmie pamatnoteikumi [42]. Pētāmai populācijai ir jābūt homogēnai, jo alēļu frekvences un no tām atkarīgie rādītāji var tikt precīzi izvērtēti tikai kvalitatīvi atlasītās populācijās. Kontroles grupai jābūt Hārdija-Veinberga līdzsvarā (Hārdija-Veinberga princips paredz, ka genotipu sadalījums populācijā ir konstants (līdzsvarā), līdz kamēr neiedarbojas kāds jauns faktors).

Funkcionālo kandidātpolimorfismu atlase ģenētisko asociāciju pētījumiem pamatojas uz esošiem datiem par slimības patogēnēzē iesaistīto faktoru nozīmi. Citokīnu svarīgā loma sepses patogēnēzes regulācijā ir plaši pētīta vairākos eksperimentālos un klīniskos pētījumos. Šim darbam izvēlēto citokīnu (TNF α , IL-6, IL-10) funkcionālais nozīmīgums sepses patogēnēzē ir plaši aprakstīts vairākās līdzšinējās publikācijās un tiek detalizēti analizēts turpmākās promocijas darba sadaļās. Izvēlētiem citokīnus kodējošiem gēniem aprakstīti vairāki strukturālo variāciju veidi (piem., viena nukleotīda polimorfismi, mikrosatelīti utt.) ar variablu funkcionālo nozīmīgumu. Šim pētījumam, pamatojoties uz līdzšinējo publikāciju datiem, izvēlēti trīs SNP (pa vienam katrā analizējamā citokīna gēna promoterā). Izvēlētie kandidātpolimorfismi un līdzšinējā publicētā informācija par to funkcionālo nozīmīgumu analizēta turpmākās promocijas darba sadaļās.

3.3 Audzēju nekrozes faktors alfa (TNF α)

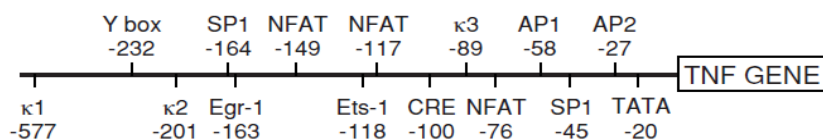
3.3.1 TNF α loma septiskā šoka un smagas sepses patoģenēzē

Tumora nekrozes faktors alfa ir proinflatators citokīns, kam piemīt plašas bioloģiskās funkcijas. TNFa nosaka arī vairākas SIRS klīniskās izpausmes.

TNFa tiek sintezēts kā 26 kDa 2.tipa transmembrānas proteīns, kam vēlāk tiek proteolītiski šķelts ekstracelulārs fragments, kas arī formē bioloģiski aktīvo 17 kDa proteīnu. Bioloģiskos šķīdumos TNF monomērs formē simetrisko homotrimēru. Trimerā struktūra ir svarīga TNFa bioloģiskās aktivitātes nodrošināšanai.

TNF α producē galvenokārt aktivētie mononukleārie fagocīti (monocīti/makrofāgi), kā arī citas imūnsistēmas šūnas (piem., T un B limfocīti, NK-šūnas u.c.). TNFa produkciju stimulē vairāki faktori – bakteriālais endotoksīns (LPS), hipoksija, IL-1, leikotrieni u.c. TNFa biosintēze ir cieši regulēta. TNF gēna ekspresija, iedarbojoties dažiem stimuliem, notiek 15-30 min laikā.

Transkripcijas procesi tiek regulēti ar aktivējošo un inhibējošo faktoru līdzdalību. DNS reģionam ap 1100-bp starp limfotoksīna alfa gēna 3' galu un 5' TNF A galu demonstrēta ievērojama nozīme transkripcijas kontrolē [43]. Šajā reģionā identificēta virkne regulatoro secību (2.attēls).



2.attēls. TNF A promotera modelis (attēlotas promotera regulatorās secības un norādīta to lokalizācija attiecībā pret transkripcijas sākumu)

TNF mRNS ekspresijas negatīvā regulācija nav plaši pētīta. Identificēti daži TNF A promotera reģioni, kas ir svarīgi mRNS ekspresijas inhibīcijā [44, 45]

Sevišķi būtu jāatzīmē, ka TNF transkripcijas regulācija ir šūnu specifika, jo dažādos šūnu tipos darbojas dažādu regulatoro faktoru kombinācijas [46].

TNF molekula saistās ar divu tipu receptoriem – 1.tipa (TNFR1 vai p55) un 2.tipa (TNFR2 vai p75), kas ir plaši ekspresēti uz vairākiem šūnu tiem. Signāla pārraidīšana notiek pārsvarā caur 1.tipa receptoru.

Svarīgākā TNF α bioloģiskā funkcija ir stimulēt neitrofilu un monocītu iesaistīšanu infekcijas perēklī un aktivēt šīs šūnas. TNF α izraisa adhēzijas molekulu ekspresiju uz endotēlija šūnu membrānām, kas atvieglo leukocītu, kā arī monocītu un limfocītu, piesaistīšanos. TNF α arī stimulē citu proinflammatoro molekulu produkciju (hemokīnu, IL-1, u.c.).

TNF α nozīme sepses patoģenēzē aprakstīta vairākās publikācijās [47, 48]. TNF α nozīme **septiskā šoka** patoģenēzē balstās uz sekojošiem novērojumiem:

- TNF α detektējams sistēmiskā asinsritē septiskā šoka slimniekiem [49].
- Eksogēnā TNF α ievadīšana izraisa šoku un audu bojājumu, kas ir patofizioloģiski identisks septiskā šoka sindromam [50, 51].
- TNF α neitralizācija novērš septiskā šoka attīstību letālās bakterēmijas gadījumā [52, 53]. Peles ar izslēgto TNF 1.tipa receptora gēnu ir rezistentas pret endotoksēmisko šoku [54].
- TNF α produkcija tiek cieši regulēta gan transkripcijas, gan arī pēctranskripcijas līmenī [55].

Starpindivīdu atšķirības TNF α produkcijā uz dažādiem iekaisumu stimulējošiem faktoriem novēroja vairākos pētījumos. Yagoob ar kolēģiem *ex vivo*, stimulējot 48 veselo indivīdu asins kultūras un mononukleāro šūnu kultūras, novērojis nozīmīgas starpindivīdu variācijas TNF α produkcijā [56]. Līdzīgas starpindivīdu variācijas TNF α produkcijā novērojis arī *Aguillon* ar kolēģiem *ex vivo*, stimulējot 18 veselo indivīdu asins kultūru ar lipopolisaharīdu (LPS) [57]. Iespējamo rezultātu izskaidrojumu, pēc autora domām, būtu jāmeklē starpindivīdu ģenētisko komponentu atšķirībās.

3.3.2 TNF ģenētisko polimorfismu funkcionālais nozīmīgums septiskā šoka un smagas sepses patoģenēzē

TNF lokuss ir lokalizēts 6.hromosomā MHC IV gēnu klasterā. Tas sastāv no trim funkcionāliem gēniem. TNFA gēns atrodas starp limfotoksīna α (TNF β) un limfotoksīna β (TNF γ) gēniem.

TNFA gēna kodējošā secība ir relatīvi konstanta, bet vairāki viena nukleotīda polimorfismi un mikrosatelīti tika aprakstīti nekodējošos reģionos un promoterā.

TNF -308 G/A polimorfisms ir viens no līdz šim visvairāk pētītiem TNFA gēna promotera polimorfismiem.

TNFA -308 G/A polimorfisma saistība ar augstāku TNF α produkciju bija novērota dažos **eksperimentālos pētījumos** pārsvarā *in vitro* vai *ex vivo* apstākļos.

1997.g. *Wilson* ar kolēģiem demonstrēja augstāko transkripcijas ātrumu TNF -308 A alēlei cilvēka B šūnu līnijā [58]. Jāpiebilst, ka šo atradi pamatojošs molekulārais mehānisms tomēr nav skaidrs, jo pētījumā nenovēroja DNS saistošā proteīna (angļu val., *DNA-binding-protein*) afinitātes atšķirības starp abām alēlēm. TNFA -308 A alēles saistību ar intensīvāko TNF α produkciju novēroja ar LPS *ex vivo*, stimulējot veselo indivīdu asins kultūras [59]. Pretēji dati bija iegūti standartizētos *in vitro* apstākļos *Brinkman* grupas eksperimentālajā pētījumā [60].

Eksperimentos *in vivo* veseliem indivīdiem pēc standartizētās LPS devas ievadīšanas nenovēroja TNFA -308 G/A polimorfisma saistību ar sistēmisko TNF α koncentrāciju [61].

Ģenētisko asociāciju pētījumos bija iegūti pretrunīgi rezultāti par iespējamo TNFA -308 G/A polimorfisma funkcionālo nozīmīgumu sepses patoģenēzē un klīniskajā gaitā.

Novēroja saistību:

TNFA -308 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu jauktā ITN slimnieku populācijā ir ziņota vismaz divās publikācijās.

Mira ar kolēģiem analizēja TNFA -308 G/A polimorfisma asociāciju ar septiskā šoka risku un mirstību 97 septiskā šoka slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem asins donoriem [62]. Septiskā šoka slimniekiem novēroja augstāku TNF -308 A alēles frekvenci salīdzinājumā ar veselu indivīdu kontroles grupu. Mirušajiem septiskā šoka slimniekiem novēroja augstāko A alēles frekvenci. Tajā pašā laikā nebija konstatētas statistiski ticamas TNF α sistēmiskās koncentrācijas atšķirības A un G alēļu nēsātājiem.

Tang pētījumā tika iekļauti 112 ITN slimnieki ar pēcoperācijas sepsi [63]. Tika analizēta TNF -308A alēles asociācija ar TNF α plazmas koncentrāciju, kā arī ar predispozīciju un mirstību no septiskā šoka. Šajā pētījumā nebija atrasta TNF -308 A alēles saistība ar septiskā šoka incidenci un mirstību (kopējā grupā), kā arī ar TNF α plazmas koncentrāciju. Bet tajā pašā laikā pētījumā iesaistītiem slimniekiem, kuriem tomēr attīstījās septiskais šoks, TNF -308 A alēles nēsāšana asociējās ar augstāku mirstību un ar augstākām cirkulējošā TNF α koncentrācijām. Šis pētījums ir vienīgais promocijas darba autoram zināmais darbs, kur klīniskos apstākļos bija atrasta TNF -308 G/A polimorfisma saistība ar TNF α sistēmisko koncentrāciju ITN sepses slimniekiem.

TNFA -308 G/A polimorfisma saistība ar sepses (septiskā šoka) attīstību un klīnisko iznākumu aprakstīta arī dažās stingrāk atlasītās populācijās:

- Augstāka TNF -308 A alēles frekvence novērota 98 no meningokoku infekcijas mirušajiem bērniem [64].
- TNF gēna -308 A alēles saistība ar sepses klīnisko iznākumu aprakstīta arī mehāniski ventilētiem ļoti zema svara zīdaiņiem [65].

- Novērota TNFA -308 A alēles saistība ar agrīnā septiskā šoka attīstību akūta smaga pankreatīta slimniekiem [66].
- TNF -308 A alēles saistību ar augstāku risku smagas sepses attīstībai un nelabvēlīgam klīniskam iznākamam novēroja arī traumas slimnieku populācijā [67].

Nenovēroja saistību

Stuber ar kolēģiem salīdzināja TNF -308 A alēles frekvenci 80 smagas sepses slimniekiem un 153 veseliem asins donoriem [68]. Pētījumā netika atrasta statistiski nozīmīga atšķirība starp abām grupām. Smagas sepses slimnieku grupā alternatīvas alēles nēsāšana nebija saistīta ne ar augstāku mirstību, nedz ar augstāku TNF α plazmas koncentrāciju. Tāpat nebija novērota TNF α produkcijas saistība ar genotipu, stimulējot slimnieku monocītus *in vitro*.

Plašā multicentru pētījumā ar 213 Lielbritānijas un Austrālijas ITN pacientiem nebija novērota TNFA -308 G/A polimorfisma saistība ar sepses incidenci un klīnisko iznākumu [69].

Salīdzinoši nelielā pētījumā ar 44 SIRS slimniekiem (bez kontroles grupas) nenovēroja atšķirības sepses, septiskā šoka incidencē un mirstībā starp TNFA -308 dažādu alēļu nēsātājiem [70].

Kopsavilkums. Publicētos ģenētisko asociāciju pētījumos par iespējamo TNFA -308 G/A polimorfisma saistību ar sepses (septiskā šoka) attīstību, klīnisko gaitu un prognozi iegūti pretrunīgi rezultāti samērā līdzīgās ITN slimnieku populācijās. TNFA -308 G/A polimorfisma funkcionālais nozīmīgums septisko komplikāciju patoģenēzē un klīniskā gaitā joprojām paliek precizējams.

3.4 Interleikīns 6 (IL-6)

3.4.1 IL-6 vispārējais raksturojums

IL-6 ir pleiotropisks citokīns ar plašām bioloģiskām funkcijām, kas sintezējas vairākās limfoīdās un nelimfoīdās izcelsmes šūnās, un ir iesaistīts imūnprocesu, iekaisuma procesu, onkoģenēzes un hematopoēzes regulācijā.

Agrīnās publikācijās IL-6 var sastapt ar vairākiem nosaukumiem (piem., interferons- β 2, B šūnu diferenciācijas faktors, hepatocītu stimulējošs faktors utt.), bet kopš 1988.g. šīs molekulas starptautiski pieņemtais nosaukums ir interleikīns-6.

IL-6 ir glikoproteīns ar molekulāro masu 21-28 kDa. Cilvēka IL-6 sastāv no 212 aminoskābēm, tajā skaitā arī hidrofora signālā secība. IL-6 struktūra sastāv no 4 antiparalēlām spirālēm ar divām garām un divām īsām cilpām. IL-6 strukturālā uzbūve ir līdzīga citiem citokīniem (piem., IL-2, IL-4) un glikopeptīdu hormoniem (piem., somatotropais hormons), kas, zināmā mērā, liecina par iespējamo filoģenētisko saistību starp šīm molekulām.

IL-6 saistās ar specifisko receptoru (IL-6R α). IL-6R α molekulai raksturīga īsa intracelulārā daļa, kas nepiedalās signāla pārraidīšanā. Komplekss IL-6-IL-6R α pārraida signālu, saistoties ar transmembrāno proteīnu gp130, ko izmanto arī citi ligandi (piem., IL-11, IL-27 utt.).

IL-6 piemīt vairākas svarīgas bioloģiskās funkcijas:

- IL-6 veicina T-limfocītu aktivāciju, proliferāciju un diferenciāciju, kā arī proliferējošo B-limfocītu diferenciāciju plazmatiskās šūnās un antivielu produkcijas stimulāciju.
- IL-6 stimulē akūtas fāzes proteīnu sintēzi aknās (piem., CRP, seruma amiloīds A, α 1 antitripsīns, fibrinogēns utt.).

Citas bioloģiskās aktivitātes: IL-6 stimulē hipofīzes hormonu sintēzi (piem., prolaktīna, somatotropā un luteinizējošā hormona). IL-6 arī regulē ķermeņa tauku sastāvu.

IL-6 spēj producēt vairāki šūnu veidi. Monocīti/makrofāgi varētu būt pirmie, kas iekaisuma apstākļos producē IL-6, bet šo šūnu izdalītais TNF un IL-1 stimulē IL-6 produkciju citās šūnās – fibroblastos, endotēlija šūnās utt.

Cilvēka IL-6 gēns lokalizējas 7. hromosomā (7p21p14) un sastāv no 5 eksoniem un 4 introniem. IL-6 gēna ekspresiju spēj ierosināt vairāki **stimuli** – mikroorganismu antigēni (piem., LPS), paša organisma signālpeptīdi (piem., TNF α , IL-1, IL-2, INF β). Šīs signālmolekulas ar attiecīgo intracelulāro mehānismu līdzdalību ietekmē **transkripcijas** procesa intensitāti.

IL-6 produkcijas (ekspresijas) aktivitāte tiek regulēta ar vairākiem transkripcijas faktoriem (piem., NF IL-6, NF kB, Fos/Jun, CRBP), kas saistās ar IL-6 gēna promotera reģioniem [71]. Eksperimentos ar *HeLa* šūnām novēroja, ka promotera reģioni -180 līdz -123, ir ārkārtīgi svarīgi transkripcijas indukcijai atbildot uz stimulāciju ar TNF α , IL-1 [72]. IL-6 promotera aktivācijai ir nepieciešama mijiedarbība starp NF IL6 un NF kB [73].

IL-6 sistēmiskā koncentrācija ir galvenokārt atkarīga no citokīna produkcijas (ekspresijas). Pētot radioaktīvi iezīmēta rekombinanta IL-6 kinētiku žurkām, novēroja ātru citokīna elimināciju no sistēmiskās asinsrites [74].

3.4.2 IL-6 loma smagas sepses un septiskā šoka patoģenēzē

IL-6 svarīgu lomu sistēmiskās iekaisuma reakcijas sindroma patoģenēzē atbalsta vairāku eksperimentālo un klīnisko pētījumu dati.

Vairākos klīniskos pētījumos sepses slimniekiem novēroja paaugstināto IL-6 sistēmisko koncentrāciju, kas pozitīvi korelēja ar citiem iekaisuma un orgānu mazspējas rādītājiem, kā arī ar klīnisko iznākumu [75-77]. Kaut gan pieminēto pētījumu dati skaidri norāda uz IL-6 saistību ar stāvokļa smagumu un izdzīvošanu sepses slimniekiem, tie tomēr nevar precizēt šī citokīna funkcionālo nozīmi SIRS patoģenēzē (stāvokļa marķieris vai orgānu mazspēju tieši izraisošs faktors).

Lai precizētu ar IL-6 saistītus efektus SIRS attīstības procesā, veikti vairāki eksperimentālie pētījumi. Hipotēzi par IL-6 orgānu mazspēju veicinošo efektu atbalsta pētījumi, kas demonstrē IL-6 inhibīcijas pozitīvo ietekmi uz izdzīvošanu dzīvnieku sepses modeļos [78, 79].

IL-6 nepieciešamību akūtas fāzes reakcijās atbalsta arī eksperimenti ar ģenētiski modificētām pelēm, kurām (IL-6 -/- salīdzinot ar IL-6 +/- pelēm) novēroja agrīnu mirstību no *S. pneumonia* izraisītas pneimonijas [80].

IL-6 piemīt arī pretiekaisuma efekti, kurus saista ar spēju inducēt akūtās fāzes proteīnu sintēzi aknās. Akūtās fāzes proteīniem raksturīgs proteāžu inhibējošs efekts, kas ierobežo iekaisumu. Hipotēzi par IL-6 pretiekaisuma efektiem atbalsta eksperimenti ar intraperitoneālo LPS ievadīšanu pelēm ar izslēgtu IL-6 gēnu. Ģenētiski modificētiem dzīvniekiem novēroja augstāku cirkulējošā TNF α koncentrāciju nekā kontroles grupā [81].

Vismaz divos eksperimentālos pētījumos IL-6 gēna trūkums neietekmēja klīnisko iznākumu dzīvnieku sepses modeļos. Izraisot lokālo audu bojājumu pelēm ar izslēgtu IL-6 gēnu, novēroja pazeminātu akūtas fāzes reakcijas intensitāti, bet ievadot LPS, sistēmiski nenovēroja atšķirību starp ģenētiski modificētu un normālo dzīvnieku grupām [82]. Līdzīgi dati novēroti *Remick* pētījumā ar

polimikrobu sepses modeli (CLP) pelēm ar izslēgtu IL-6 gēnu, kurām, salīdzinot ar parastām, novēroja līdzīgu mirstību [83].

Veikto eksperimentālo un klīnisko pētījumu dati liecina, ka IL-6 ir iesaistīts gan lokālos, gan arī sistēmiskos infekciju pavadošos procesos. Tajā pat laikā IL-6 sintēzes defekti būtiski neietekmē izdzīvošanu dzīvnieku sepses modeļos.

Sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma patogēnēzē IL-6 ekspresiju veicina vairāki proinflammatorie mehānismi, kas arī nosaka IL-6 sistēmisko līmeni. IL-6 varētu raksturot kā vairāku proinflammatoro procesu aktivitātes apvienoto rādītāju, kas padara šo citokīnu par vērtīgu diagnostisko marķieri ar augstu diagnostisko jūtību.

3.4.3 IL-6 ģenētisko polimorfismu funkcionālais nozīmīgums sepses un septiskā šoka patogēnēzē

1998.g. *Fishman* un līdzautoriem aprakstījis SNP IL-6 gēna promotera -174 pozīciju [84]. IL-6 -174 C alēles frekvence pētījuma populācijā (383 veseli Londonas iedzīvotāji) ir bijusi 0,403 (95% CI 0.37–0.44). *In vitro* IL-6 -174 C alēlei novēroja zemāko IL-6 ekspresiju, bet veseliem indivīdiem C nēsāšana ir bijusi saistīta ar zemāko IL-6 cirkulējošo līmeni.

Vairākos turpmākos pētījumos demonstrēta IL-6 (-174 G/C) polimorfisma asociācija ar dažādiem klīniskiem stāvokļiem [85, 86].

3.4.3.1 Eksperimentālie pētījumi

Pētot IL-6 sistēmiskā līmeņa izmaiņas *in vivo* veseliem indivīdiem pēc eksperimentālās mikrobu produktu ievadīšanas, iegūti pretrunīgi rezultāti.

Rivera-Chavez ar līdzautoriem arī demonstrēja -174 G alēles saistību ar IL-6 produkciju *ex vivo*, ar LPS stimulējot 49 veselo indivīdu leukocītus. IL-6 produkcija bija augstāka -174 G homozigotām un kodola proteīni (nukleārie faktori) intensīvāk saistījās ar guanīnu promotera -174 pozīcijā [87].

Bennermo pētījumā tika analizēta IL-6 koncentrācija veseliem -174 C un -174 G homozigotiem pēc *S. typhi* vakcīnas ievadīšanas. Pētījumā novēroja augstāku IL-6 koncentrāciju asins serumā -174 GG genotipam [88].

Citā pētījumā ar eksperimentālo endotoksēmiju veseliem cilvēkiem nav novērota -174 GC polimorfisma saistība ar IL-6 sistēmisko līmeni [89].

3.4.3.2 Klīniskie pētījumi

Schluter ar kolēģiem pētīja IL-6 -174 G alēles asociāciju ar IL-6 līmeni serumā, kā arī sepses incidenci un klīnisko iznākumu 50 ķirurģiskiem slimniekiem [90]. Pētījumā nenovēroja genotipu sadales un alēļu frekvences atšķirības starp sepses slimniekiem un veseliem kontroles grupas pārstāvjiem. Tajā pat laikā starp mirušajiem sepses slimniekiem novēroja mazāk IL-6 -174 C alēles homozigotu. Šā novērojuma pamatā esošais patoģenētiskais mehānisms tomēr palicis neskaidrs, jo, kaut gan IL-6 mediānā plazmas koncentrācija pozitīvi korelēja ar klīnisko iznākumu, tā tomēr nebija saistīta ar promotera genotipu.

Michalek ar kolēģiem pētīja 421 septiskos bērnus salīdzinājumā ar 644 veselo bērnu kontroles grupu ziņojumu par IL-6 -174 genotipu sadalījuma atšķirībām gan starp slimajiem un veseliem bērniem, gan arī starp septisko slimnieku apakšgrupām (CC genotips asociējās ar smagāku diagnozi) [91].

3.5 Interleikīns 10 (IL-10)

3.5.1 IL-10 vispārējais raksturojums

IL-10 ir aprakstīts 1989.g. *Fiorentino* un kolēģu publikācijā, kurā ziņots par „citokīnu sintēzi inhibējošu faktoru”, ko producē Th2 šūnu kloni pēc stimulācijas ar antigēnu. Šim faktoram novēroja izteiktu inhibējošu ietekmi uz vairāku citokīnu sintēzi Th1 šūnās. Aprakstītais efekts attīstījās aptuveni 8 stundu laikā, kopš Th2 šūnu stimulācijas, līdz ar to agrīno Th1 citokīnu sintēzi šis faktors būtiski nebija ietekmējis [92]. Turpmākie pētījumi precizēja ārkārtīgi plašu IL-10 lomu imūnprocesu regulācijā.

IL-10 **producē** un izdala vairāki šūnu tipi – aktivētie T un B limfocīti, mononukleārie fagocīti (monocīti/makrofāgi), NK-šūnas, eozinofili, epitēlija šūnas, tuklās šūnas, keratinocīti un audzēju šūnas [93].

IL-10 **gēns** lokalizējas 1q31-32. hromosomā un sastāv no 5 eksoniem [94].

Cilvēka IL-10 **proteīns** sastāv no 178 aminoskābēm ar molekulāro svaru 17 kDa. Cilvēka IL-10 spēj atrasties šķīdumos kā homodimērs.

IL-10 produkciju regulē citu citokīnu efekti. Eksperimentālie pētījumi ar rodentiem un primātiem parādīja, ka IL-10 sintēzi primāri inducē TNF α un IL-1 sistēmiskā izdalīšanās [95]. Veseliem pieaugušiem novēroja TNF α inducēto monofāzisko IL-10 atbildi ar maksimālo līmeni aptuveni pēc 45 min kopš TNF ievades [96]. Šie dati demonstrē, ka IL-10 ekspresija primāri ir atkarīga no proinflammatoro citokīnu (TNF α un IL1) izdalīšanas, t.i. mēdz būt antigēn-neatkarīga.

IL-4, IL-13, INF γ nomāc IL-10 produkciju ar LPS aktivētajos monocītos [97, 98]. IL-10 nomāc IL-10 mRNS sintēzi, kas liecina par negatīvās atgriezeniskās regulācijas pastāvēšanu [99].

Tajā pat laikā **TNF α** , IL-1, IL-2, IL-3, **IL-6**, IL-7, IL-12 un IL-15 inducē IL-10 produkciju monocītos, T-šūnās, NK-šūnās, B-šūnās un tuklajās šūnās [100-103].

IL-10 promotera sastāvā ietilpst vairāki elementi, kas piedalās IL-10 gēna ekspresijas regulācijā, piem., CRE - ar ciklisko AMP reaģējošs elements (angļu val., cAMP-response element), vieta, kur piesaistās NF-kB, GRE - ar glikokortikoīdiem reaģējošs elements (angļu val., glucocorticoid response element) [94, 104, 105].

Faktori, kas paaugstina cAMP līmeni citoplazmā (piem., hormoni, prostaglandīns E2) aktivē proteīnkināzi A un izraisa CREB (*CAMP-response element binding protein*) fosforilāciju, CREB saistās ar CRE promoterā un paaugstina IL-10 ekspresiju. NF-kB aktivatori (piem., LPS, TNF α) izraisa IL-10 ekspresiju, stimulējot NF-kB piesaistīšanos IL-10 promoterā. Glikokortikoīdi, saistoties ar GRE, inducē IL-10 ekspresiju.

IL-10 iedarbojas uz vairākām šūnām, saistoties ar specifiskiem IL-10 receptoriem, kas pārsvarā ekspresēti uz hematopoētiskās sistēmas šūnām (T un B limfocītiem, NK-šūnām, neitrofiliem leukocītiem, dendrītiskām šūnām, monocītiem/makrofāgiem), un daudz zemākā koncentrācijā uz citām šūnām [106]. No ne-hemopoētiskās sistēmas šūnām IL-10 receptori ekspresēti uz oligodendrocītiem [107] un epidermālām šūnām [108]. IL-10 piemīt vairākas funkcijas imūno un iekaisuma procesu regulācijā.

IL-10 nomāc limfocītu replikāciju un Th₁ citokīnu (sevišķi IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) ekspresiju, kā arī TNF α produkciju aktivētajos makrofāgos [109].

Pelēm, kurām inaktivēts IL-10 gēns, novērota spontāna zarnu iekaisīgo slimību attīstība un intensīvāka atbildes reakcija uz endotoksīna ievadi [110]. Šī atrade demonstrē IL-10 svarīgo lomu iekaisuma procesu inhibīcijā *in vivo*, kā arī norāda uz iekaisuma procesu negatīvās atgriezeniskās regulācijas pastāvēšanu.

3.5.2 IL-10 loma smagas sepses patoģenēzē

IL-10 spēja nomākt antigēn-neatkarīgo iekaisuma atbildi (tajā skaitā arī dažu proinflammatoro citokīnu produkciju, piem., TNF α), padarīja to par interesantu izpētes objektu ar sepsi saistītos eksperimentālos un klīniskos pētījumos.

IL-10 lomai sepses attīstībā un klīniskajā gaitā ir pievērsta uzmanība vairākos klīniskos pētījumos. Slimniekiem ar septisko šoku novēroja augstāko IL-10 sistēmisko līmeni, salīdzinot ar neinfekciozās izcelsmes šoka slimniekiem, kā arī stingru IL-10 līmeņa korelāciju ar TNF α koncentrāciju [111]. Septiskā šoka slimniekiem IL-10 sistēmiskā koncentrācija korelē ar slimnieku stāvokļa smagumu, kā arī ar TNF α un IL-6 līmeņiem [112]. Pieminētajā pētījumā novēroja arī augsto IL-10 sistēmisko līmeņu saistību ar MODS attīstību un smagumu. Šie dati apstiprināti arī

nesen publicētajā pētījumā ar pieaugušajiem septisko šoku slimniekiem, kuriem arī bija novērota IL-10 pozitīvā korelācija ar orgānu mazspējas smagumu un klīnisko iznākumu [113].

Līdzīgi dati ir iegūti arī dažās septisko slimnieku apakšpopulācijās. Pediātriskā populācijā novēroja IL-10 sistēmiskā līmeņa saistību ar orgānu mazspējas pakāpi un mirstību [114]. Augstāks IL-10 līmenis un IL-10/TNF α attiecība ir novēroti mirušiem slimniekiem ar nehospitalām infekcijām [115].

IL-10 lomu sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindromā novēroja arī smagu traumu slimniekiem. *Neidhardt* ar līdzautoriem ziņo par augstāku IL-10 sistēmisko līmeni smagas traumas slimniekiem ar MODS, salīdzinot ar tiem, kuriem orgānu mazspēja netika novērota [116]. Šis pētījums norāda uz IL-10 līmeņa prognostisko vērtību, paredzot smagas orgānu mazspējas attīstību un nelabvēlīgo klīnisko iznākumu slimniekiem ar primāri neinfekciozo SIRS. Daļēji šo novērojumu apstiprina eksperimentālais pētījums, kur agrīni ievadīts IL-10 pazemināja iekaisuma reakciju endotoksēmijas gadījumā [117].

Jāatzīmē, ka, kaut gan IL-10 ir nepieciešams pārmērīgas proinflammatoras atbildes inhibīcijai, tomēr tā ilgstoša produkcija septiskiem slimniekiem var veicināt imūnās disfunkcijas attīstību, izraisot „imūnās paralīzes” fenomenu [118]. Eksperimentālā augsto IL-10 devu ievadīšana *caecum* ligācijas un punkcijas sepses modelī pelēm nomāc imūno atbildi sekundāro pneimoniju gadījumos [119]. Pētījumā konstatēts, ka augsta IL-10 sistēmiskā koncentrācija nomāc adekvāto imūno atbildes reakciju, gan uz primāro infekciju, gan arī uz sekundāro nozokomiālo infekciju, kas arī nosaka nelabvēlīgo klīnisko iznākumu.

Kopumā vairāku klīnisko pētījumu dati norāda uz IL-10 pozitīvo korelāciju ar TNF α sistēmisko koncentrāciju un sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma smagumu. Šie novērojumi liecina par IL-10 nepieciešamību TNF α atkarīgo sistēmisko proinflammatoru efektu modulācijā, sevišķi sepses agrīnajā posmā, tādā veidā ietekmējot orgānu mazspējas attīstību un arī klīnisko iznākumu.

3.5.3 IL-10 ģenētisko polimorfismu funkcionālais nozīmīgums smagas sepses un septiskā šoka patoģenēzē

Viens no pirmajiem par ģenētisko variāciju iespējamo ietekmi uz IL-10 produkciju ir ziņojis *Westendorp* ar līdzautoriem, kurš novērojis augstāko IL-10 produkciju *ex vivo* stimulētajās asins šūnās no meningokoku infekcijas mirušo bērnu radiniekiem, salīdzinot ar izdzīvojušo bērnu radiniekiem [120]. Šī pētījuma rezultāti norāda, ka IL-10 ekspresijas spējas indivīdiem vismaz daļēji ir ģenētiski determinētas.

IL-10 ekspresijas starpindivīdu atšķirības novēroja arī pētījumos ar *ex vivo* stimulētajām asins kultūrām [121]. Novērotā atšķirīgā IL-10 ekspresija šūnām reaģējot uz standartizēto stimulu, liecina par iespējamām starpindivīdu ģenētiskām variācijām IL-10 produkciju regulējošos gēnos.

Turner ar līdzautoriem 1997.gadā aprakstījis vairākus IL-10 gēna promotera viena nukleotīda polimorfismus -1082 (G/A) (rs1800896), -819(C/T) (rs1800871), -592 (C/A) (rs1800872) un ar tiem saistītas IL-10 ekspresijas atšķirības [122]. Vēlāk IL-10 -1082 A/G polimorfisma funkcionālo nozīmīgumu sepses slimniekiem novēroja vairākos eksperimentālos un klīniskos pētījumos, kas ir apskatīti sekojošā tekstā.

Rees ar kolēģiem demonstrējis augstāku IL-10 -1082 A alēles transkripcijas aktivitāti salīdzinot ar G alēli [123]. Pretēji rezultāti ziņoti publikācijā, kur tieši IL-10 -1082 G ir saistīta ar augstākām mRNS un citokīna koncentrācijām [124].

Smagas sepses slimniekiem novērota augstāka IL-10 -1082 A alēles frekvence salīdzinot ar veseliem indivīdiem, bet tieši alternatīvai G alēlei ir saistība ar augstāku IL-10 produkciju *ex vivo* stimulētās mononukleārās šūnās un nelabvēlīgo prognozi [125]. Līdzīgi rezultāti iegūti slimniekiem ar pneimokoku infekciju, kuriem novēroja IL-10 -1082 G alēles saistību ar septiskā šoka attīstību un augstāku IL-10 produkciju [126]. Aprakstīta IL-10 -1082 GG genotipa saistība ar sistēmiskā iekaisuma intensitāti, kā arī G alēles saistība ar nelabvēlīgo prognozi mājas pneimonijas slimniekiem [127].

IL-10 -1082 AA genotipa saistību ar nelabvēlīgo klīnisko prognozi novēroja meningokoku infekcijas slimnieku populācijā [128]. Tajā pat laikā citā pētījumā IL-10 -1082 GG genotips bija saistīts ar zemāku orgānu mazspējas smagumu un mirstību ARDS slimniekiem, bet asociāciju ar ARDS attīstību novēroja tikai atsevišķās vecuma grupās [129]. IL-10 -1082 GG genotipa saistību ar akūtas elpošanas mazspējas attīstību novēroja arī smagas traumas slimnieku populācijā [130].

Reid ar līdzautoriem novēroja atšķirīgu IL-10 -1082 genotipu sadalījumu starp ITN sepses slimniekiem un veselo indivīdu kontroles grupu, bet nenovēroja polimorfisma saistību ar IL-10 līmeni un klīnisko iznākumu [131].

Kopumā veikto pētījumu rezultāti joprojām ir pretrunīgi un IL-10 -1082 G/A polimorfisma funkcionālā nozīme ITN slimniekiem saistībā ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci un mirstību ir precizējama.

4. Materiāli un metodes

Zinātniskais darbs veikts Rīgas Stradiņa universitātes Anestezioloģijas un reanimatoloģijas katedras klīniskajā bāzē – VSIA „Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca” Intensīvās terapijas un reanimācijas nodaļā, sadarbībā ar šīs pašas slimnīcas Imunoloģijas centru (vadītāja dr. I. Jaunalksne) un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru (Dr. med. L. Ņikitina-Zaķe). Pētījuma saturu apstiprināja Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komiteja (lēmums Nr. 53-4/2, 14.02.2008.) un Latvijas Centrālā medicīnas Ētikas komiteja (lēmums Nr. 13, 17.09.2008.).

4.1 Pētījuma populācija

Laika posmā no 2006. līdz 2008. gadam pētījuma datubāzē iekļauta 103 personu detalizēta medicīniskā informācija. Pētījuma grupa izveidota no 103 slimniekiem, kuriem ir veiktas DNS analīzes - veiksmīgi tipēti pētāmie ģenētiskie polimorfismi: TNFA (-308) A/G, IL-6 (-174) G/C, IL-10 (-1082) G/A. Pētījumā tika iekļauti VSIA „Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca” Intensīvās terapijas un reanimācijas nodaļas slimnieki saskaņā ar izstrādātajiem iekļaušanas kritērijiem.

4.1.1 Pacientu iekļaušanas kritēriji

Iekļaušanas kritēriji izstrādāti, pamatojoties uz izvirzītajiem pētījuma uzdevumiem ar mērķi atlasīt no kopējās ITN slimnieku populācijas pietiekoši homogēnu slimnieku grupu ar infekcijas izraisīto sistēmiskās iekaisuma reakcijas sindroma (sepses) pazīmēm. Ņemot vērā, ka pašreiz nav starptautiski akceptēti stingri kritēriji sepses slimnieku iekļaušanai klīniskajos pētījumos [9], tie tika izveidoti, pamatojoties uz izmantotajiem iekļaušanas kritērijiem līdzīgos augsti kvalitatīvos starptautiskos pētījumos (par definēto problēmu). Par pamatu iekļaušanai pētījumā izmantotas aktuālās starptautiskās sepses klīniskās diagnostikas vadlīnijas, kas paredz infekcijas un tās izraisītā sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma iespējamo simptomu izvērtēšanu.

Pētījumā tika iekļauti slimnieki ar bakterioloģiski pierādītu vai augsti iespējamu infekciju un tās izraisītā sistēmiskā iekaisuma sindroma pazīmēm (1.tabula), ko nevarēja izskaidrot ar citu patoloģisko procesu norisi.

4.1.2 Pacientu izslēgšanas kritēriji:

Pētījumā netika iekļautas sekojošas slimnieku kategorijas:

- jaunāki par 18 gadiem;
- hroniski vai šīs saslimšanas laikā saņēmuši imūnomodulējošo terapiju;

- atteikušies piedalīties pētījumā.

Saskaņā ar definētajiem darba uzdevumiem iegūto datu statistiskā analīze tika veikta vairākās apakšgrupās (izdzīvojušo un mirušo slimnieku grupās, septiskā šoka un smagas sepses apakšgrupā utt.). Turpmāk aprakstīti apakšgrupu atlases kritēriji.

4.1.3 Septiskā šoka apakšgrupa

Datu statistiskai analīzei par pētāmo ģenētisko polimorfismu saistību ar septiskā šoka incidenci no kopējās pētījuma grupas atlasīti slimnieki ar septiskā šoka simptomiem pēc starptautiski definētiem kritērijiem - sistoliskais arteriālais spiediens zem 90 mmHg, vidējais arteriālais spiediens zem 60 mmHg vai sistoliskā arteriālā spiediena pazemināšanas vairāk par 40 mmHg no izejošā pie adekvātas infūzijas terapijas, ja nav citu arteriālās hipotensijas iemeslu [9].

4.1.4 Orgānu mazspējas vērtēšana

Smagas sepses apakšgrupā iekļauti slimnieki ar sistēmiskā iekaisuma procesa izraisīto vienu vai vairāku orgānu mazspēju. Orgānu mazspējas kvantitatīvai izvērtēšanai un standartizācijai turpmākai statistiskai apstrādei tika izmantota *SOFA* skala, kas atspoguļota 3.tabulā [132].

3.tabula. *SOFA* skala

Orgānu sistēma	Rādītājs	Balles			
		1	2	3	4
Elpošana	P_{aO_2} / F_{iO_2}	<400	<300	<200	<160
	(mm Hg)	(±MPV)	(±MPV)	(ar MPV)	(ar MPV)
Koagulācija	Trombocīti ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	<150	<100	<50	<20
Aknas	Bilirubīns (mg/dl)	1,2—1,9	2,0—5,9	6,0—11,9	>12
	(mkmol/l)	20—32	33—101	102—204	>204
Sirds/asinsrite	Arteriālā hipotenzija (deva mkg/kg/min vismaz 1h)	MAP <70	Dopamīns ≤5 vai dobutamīns jebkurā devā	Dopamīns >5 vai adrenalīns/noradrenalīns ≤0,1	Dopamīns >15 vai adrenalīns/noradrenalīns >0,1
CNS	Glāzgovas komas skala	13—14	10—12	6—9	<6
	(balles)				

Nieres	Kreatinīns (mg/dl)	1,2—1,9	2,0—3,4	3,5—4,9	>5
	(mkmol/l)	110—170	171—299	300—440	>440
	diurēze (ml/24h)			<500	<200

SOFA skalas iespējamais punktu minimums 0 (jo ar punktiem tiek vērtētas tikai patoloģiskas raksturlielumu vērtības), maksimums – 24 (maksimāls punktu skaits katrā no 6 kategorijām).

4.1.5 Izzīvojušo un mirušo slimnieku apakšgrupas

Iegūto datu statistiskai analīzei attiecībā uz izdzīvošanas prognozi pētījuma grupu sadalīja atkarībā no klīniskā iznākuma. Izzīvojušo slimnieku grupā iekļauti slimnieki, kuri sakarā ar vispārējā stāvokļa stabilizāciju pārvesti turpmākai ārstēšanai uz citām nodaļām vai stacionāriem. Mirušo slimnieku grupā iekļauti slimnieki, kuriem nelabvēlīgs iznākums iestājās ITN ārstēšanas laikā.

4.2 Klīniskais fenotips

Informācija par pētāmo slimnieku klīnisko fenotipu tika fiksēta maksimāli precīzi, ņemot vērā izvēlēto polimorfismu potenciālās fenotipiskās izpausmes.

Visiem slimniekiem pētījuma iekļaušanas dienā protokolā fiksēti pamata demogrāfiskie rādītāji – personas identificējošie dati (vārds, uzvārds, slimības vēstures numurs), dzimums, vecums, esošās saslimšanas anamnēze, dati par esošām hroniskām blakuspatoloģijām un to kompensācijas pakāpi, pastāvīgi lietojamiem medikamentiem, kā arī iespēju robežās ģimenes infekcijas slimību anamnēze.

Pirmajās 24h (kopš attiecīgas diagnozes noteikšanas laika) no slimniekiem tika iegūts analīzes materiāls (asins paraugs) ģenētiskiem pētījumiem (izvēlēto citokīnu polimorfismu tipēšanai), imunoloģiskiem pētījumiem (citokīnu plazmas koncentrācijas noteikšanai), kā arī pārējiem attiecīgas patoloģijas ārstēšanas standartos iekļautiem laboratoriskajiem izmeklējumiem (bioķīmiskai, klīniskai izmeklēšanai, utt.). Pētījuma mērķiem tika noteikti SOFA skalā ietilpstošie laboratoriskie raksturlielumi:

- asins serumā – kopējais bilirubīns, kreatinīns;
- EDTA asinīs – trombocītu skaits mm^3 ;
- arteriālās asinīs - PaO_2 (mmHg).

Analīžu materiāls maksimāli ātri tika nogādāts attiecīgajās laboratorijās, ievērojot glabāšanas un transportēšanas rekomendācijas.

Visiem pētījumā iekļautajiem slimniekiem tika noteikta orgānu mazspējas smaguma pakāpe. Orgānu mazspējas smagums noteikts pēc SOFA skalas rezultātiem. SOFA skalas punkti aprēķināti pamatojoties uz klīniskajiem un laboratoriskajiem datiem, kas tika fiksēti analīžu materiāla iegūšanas brīdī (ar mērķi maksimāli precīzi analizēt pētāmo citokīnu plazmas koncentrāciju un orgānu disfunkcijas pakāpi).

Infekcijas verifikācija

Infekcijas diagnostika pētījumā iekļautajiem slimniekiem balstījās uz klīniskām, laboratoriskām (tajā skaitā arī mikrobioloģisko) un vizuālās diagnostikas metodēm.

Pētījumā iekļauto slimnieku medicīniskā aprūpe tika veikta saskaņā ar vispārpieņemtajiem standartiem. Pētījuma mērķiem iegūtie papildus dati neiespaidoja ārstēšanas taktiku. Pētījumā iekļauto slimnieku patoloģijas klīniskā gaita tika novērota ITN ārstēšanas laikā.

4.3 Citokīnu analīze

Pētāmo citokīnu (TNF α , IL-6, IL-10) koncentrācijas noteikšana veikta VSIA „Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīca” Imunoloģijas centrā. Citokīnu līmeņa noteikšanai izmantots izmeklējamā pacienta serums. Venozās asinis iegūtas venopunkcijā, izmantojot BD (*Becton Dickenson*) vakutainerus. Pacienta materiāls pēc iegūšanas centrifugēts, serums alikvotēts eppendorf stobriņos un sasaldēts -70°C līdz testa veikšanai. TNF α , IL-6, IL-10 līmenis noteikts pacienta izmeklējamajā materiālā, lietojot standarta ELISA (imunofermentatīvo metodi) ar *Biosource Nivelles*, Beļģijā ražotajām testa sistēmām.

4.3.1 TNF α

TNF α līmenis noteikts izmeklējamā pacienta serumā, izmantojot imūnfermentatīvo metodi (BioSource TNF- α -EASIA, Nivelles, Beļģija). BioSource TNF α noteikšanai izmantota mikroplates cietās fāzes imūnfermentatīvā metode. Testā izmantotas monoklonālās antivielas pret dažādiem TNF α epitopiem. Kalibratori un izmeklējamais pacienta materiāls (serums) reaģē ar monoklonālajām antivielām (MKA1), ar ko nosepta mikroplate un reaģē ar monoklonālajām antivielām, kuras konjugētas ar peroksidāzi (MKA2).

Pēc inkubācijas veidojas komplekss MKA1- cilvēka TNF α –MKA2-peroksidāze. Pēc inkubācijas mazgā mikroplati, lai atdalītu nesaistītās antivielas. Pievieno hromogēnu (TMB), inkubē un reakciju apstādina ar Stop –apstādināšanas šķīdumu. Rezultātu nolasa ar fotometru, izmantojot noteiktu viļņu garumu. Fotokolorimetriski nolasītais optiskais blīvums ir tieši proporcionāls TNF α

koncentrācijai izmeklējamajā materiālā. Pēc kalibratoru optiskajiem rādītājiem veido kalibrācijas līkni, no kuras nolasa izmeklējamā materiālā iegūtos TNF α rezultātus.

4.3.2 IL-6

IL-6 noteikšanai pacienta serumā, līdzīgi kā citu citokīnu noteikšanai, izmantota mikroplates cietās fāzes imūnfermentatīvā metode (BioSource IL-6 EASIA, Nivelles, Beļģija). Testā izmantotas monoklonālās antivielas pret dažādiem IL-6 epitopiem. Kalibratori un izmeklējamais pacienta materiāls (serums) reaģē ar monoklonālajām antivielām (MKA1), ar kurām nosepta mikroplate, un vēlākā etapā reaģē ar monoklonālajām antivielām, kuras konjugētas ar peroksidāzi (MKA2). Pēc inkubācijas veidojas kompleks-MKA1 -cilvēka IL-6–MKA2-peroksidāze. Pēc inkubācijas atmazgā mikroplati, lai atdalītu nesaistītās antivielas. Pievieno hromogēnu (TMB), inkubē un reakciju apstādina ar Stop –apstādināšanas šķīdumu. Rezultātu nolasa ar fotometru, izmantojot noteiktu viļņu garumu. Fotokolorimetriski nolasītais optiskais blīvums ir tieši proporcionāls IL-6 koncentrācijai izmeklējamajā materiālā. Pēc kalibratoru optiskajiem rādītājiem veido kalibrācijas līkni, no kuras nolasa izmeklējamā materiālā iegūtos IL-6 rezultātus.

4.3.3 IL-10

IL-10 noteikšanai pacienta serumā izmantota mikroplates cietās fāzes imūnfermentatīvā metode (BioSource IL-10 EASIA, Nivelles, Beļģija). Testā izmantotas monoklonālās antivielas pret dažādiem IL-10 epitopiem. Kalibratori un izmeklējamais pacienta materiāls (serums) reaģē ar monoklonālajām antivielām (MKA1), ar kurām nosepta mikroplate, un vēlākā etapā reaģē ar monoklonālajām antivielām, kuras konjugētas ar peroksidāzi (MKA2). Pēc inkubācijas veidojas kompleks-MKA1 -cilvēka IL-10–MKA2-peroksidāze. Pēc inkubācijas mazgā mikroplati, lai atdalītu nesaistītās antivielas. Pievieno hromogēnu (TMB), inkubē un reakciju apstādina ar Stop –apstādināšanas šķīdumu. Rezultātu nolasa ar fotometru, izmantojot noteiktu viļņu garumu. Fotokolorimetriski nolasītais optiskais blīvums ir tieši proporcionāls IL-10 koncentrācijai izmeklējamajā materiālā. Pēc kalibratoru optiskajiem rādītājiem veido kalibrācijas līkni, no kuras nolasa izmeklējamā materiālā iegūtos IL-10 rezultātus.

Test sistēmu rezultāti kontrolēti, lietojot iekšējās kontroles, kurām jāiekļaujas noteiktu intervālu robežās, ko uzrāda ražotājs.

4.4 Ģenētisko polimorfismu tipēšana

Ģenētisku polimorfismu tipēšana veikta APP Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra Genoma centra laboratorijās. Genomiskā DNS tika izdalīta no asins parauga ar standarta fenola-hloroforma ekstrakcijas metodi.

Lai analizētu interesējošos polimorfismus, tika izstrādāta un aprobēta metodika. Tika apskatītas TNFA, IL-6 un IL-10 promoteru sekvences un izvēlēti oligonukleotīdi polimerāzes ķēdes reakcijai (PĶR) un sekvenēšanas reakcijai.

PĶR reakcijas maisījums 1 paraugam ir sekojošs – 15mkl 2xPCR Master Mix (Fermentas, Lietuva), 1Mm sekvencei specifiski oligonukleotīdi (oligonukleotīdu sekvences, kas izmantotas interesējošo SNPu amplifikācijai un sekvenēšanai skat. 4.tabulā) un 28ng sausas genomiskās DNS.

4.tabula. Polimerāzes ķēdes reakcijai un sekvenēšanai izmantotie oligonukleotīdi

Oligonukleotīda nosaukums	Oligonukleotīda sekvence	PĶR produkta garums	Amplificētais reģions	hromosomas
TNFA-308F	5'-ACAGGCCTCAGGACTCAACA-3'			
TNFA-308R	5'-GCACCTTCTGTCTCGGTTTC-3'	364bp	chr6:31650822+31651185	
TNFA-308seq	5'-AACACAGCTTTTCCCTCCAA-3'			
IL-6-174F	5'-TCGTGCATGACTTCAGCTTT-3'			
IL-6-174R	5'-GCCTCAGACATCTCCAGTCC-3'	328bp	chr7:22539729+22540056	
IL-6-174seq	5'-TCATGGGAAAATCCCACATT-3'			
IL-10-1F	5'-TTCCCCAGGTAGAGCAACAC-3'			
IL-10-1R	5'-ATCCTCAAAGTTCCCAAGCA-3'	328bp	chr1:203334743-203335427	
IL-10-1rsseq	5'-GATGGGGTGGAAGAAGTTGA-3'			

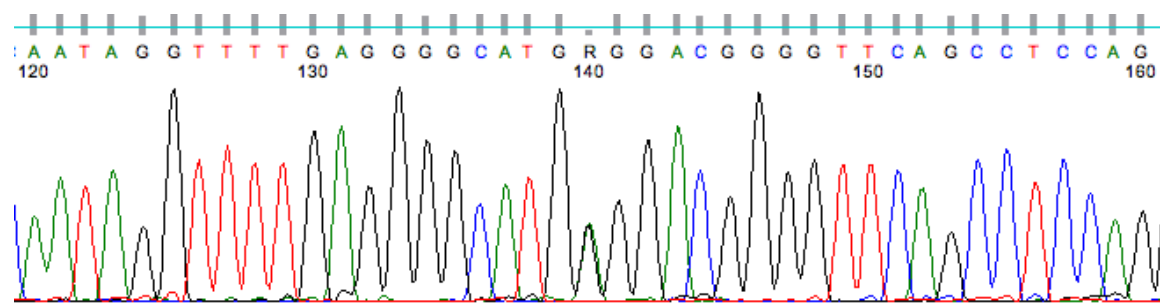
PĶR apstākļi ir bijuši sekojoši: 5 minūtes sākotnēja denaturācija pie 95°C, kam sekoja 32 cikli - 15 sek. pie 95°C, 30 sek. pie 56°C, 30 sek. pie 72°C un beigu fāze 10 min. pie 72°C. Reakcijas produkti tika attīrīti ar *Sap-ExoI* un tika veikta sekvenēšanas reakcija. Produkti tika

analizēti ar tiešās sekvenēšanas palīdzību, izmantojot „ABI prism 3100” (Applied Biosystems) (3.attēls) DNS sekvenseru saskaņā ar izgatavotāja rekomendācijām.



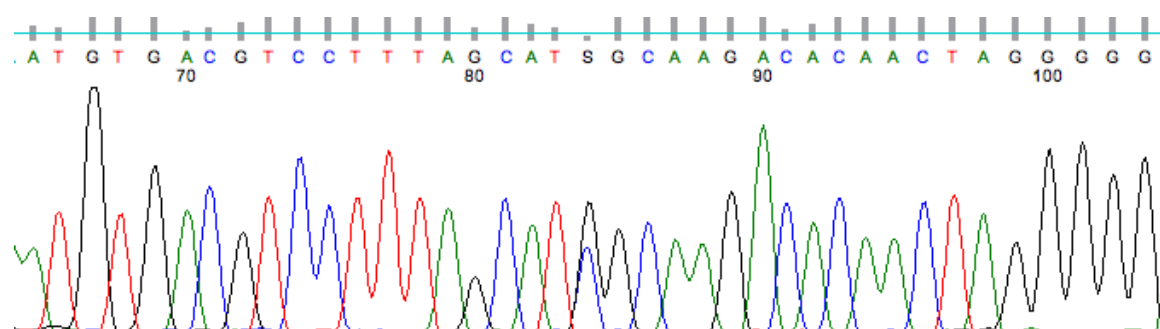
3.attēls. „ABI Prism 3100“ ģenētiskais analizators

Sekvencēšanas rezultātu paraugi attēloti 7.-10.attēlos.



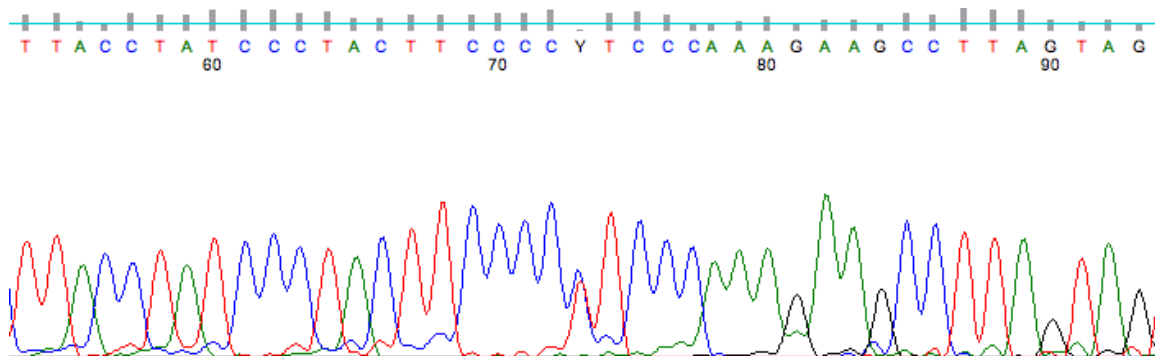
4. attēls. TNF -308 polimorfisms G/A

Attēlā A/G polimorfisms iezīmēts ka „R”.



5. attēls. IL-6 -174 polimorfisms G/C

Attēlā C/G polimorfisms iezīmēts kā „S”.



6. attēls. IL-10 -1082 polimorfisms

Jāatzīmē, ka tika sekvenēta DNS reversā ķēde, tāpēc polimorfisms uzrādās kā C/T (attēla iezīmēts kā „Y”), bet alēles tika sauktas pēc tiešās ķēdes – t.i. A/G (C=G un T=A).

4.5 Datu statistiskā analīze

Pētījuma ietvaros iegūtie dati tika fiksēti speciāli izstrādātajā pētījuma protokolā, kā arī elektroniskajā datu bāzē.

Pētījumā iegūtie kvalitatīvie un kvantitatīvie mainīgie apstrādāti, izmantojot aprakstošās un analītiskās statistikas metodes.

Aprakstošā statistika

Aprakstot nominālo mainīgo sadalījumu testējamās izlasēs, izmantota procentuālā proporcija (genotipu un alēļu sadalījumiem – frekvences attiecīgās izlasēs).

Aprakstot attiecību skalas mainīgo sadalījumu (centrālo tendenci, izkliedi), izmantots vidējais aritmētiskais un standartnovirze (normāli sadalītiem datiem) vai mediāna vērtība un starpkvartīļu intervāls (asimetriskiem datiem).

Analītiskā statistika

Attiecību skalas mainīgo atbilstība normālajam varbūtību sadalījumam pārbaudīta ar Kolmogorova-Smirnova testu.

Nulles hipotēzes pārbaudei, testējot kategorisko mainīgo (piem., genotipu) sadalījuma atšķirības apakšgrupās, izmantots Pīrsona hī kvadrāta (χ^2) tests vai Fišera precīzais (*Fisher Exact*) tests saskaņā ar testa pielietošanas priekšnosacījumiem.

Statistiskās hipotēzes par centrālās tendences raksturlielumu vienādību apstiprināšanai vai noraidīšanai normāli sadalītiem attiecību skalas mainīgiem (piem., vecums) izmantots Stjūdenta t-tests (divām neatkarīgām izlasēm), asimetriski sadalītiem – neparametriskās metodes, atkarībā no salīdzināmo grupu skaita (divām neatkarīgām izlasēm – Manna-Vitnija (*Mann-Whytney*) U testu nepārtrauktiem mainīgajiem, trīs neatkarīgām izlasēm – Kraskela-Vollisa (*Kruskal Wallis*) testu, ievērojot testa izmantošanas priekšnosacījumus).

Statistiskās analīzes aprēķiniem izmantota specializēta statistikas programmatūra (*SPSS 15 for Windows, SPSS, Chicago, IL*). Abpusēja p vērtība $<0,05$ pieņemta par statistiskās ticamības sliekšni.

4.5.1.1 Polimorfismu saistības statistiskā analīze

Izvērtējot izvēlētajā polimorfisma saistību ar noteikto bināro pazīmi, genotipu vai alēļu sadalījumi salīdzināti grupās, kas bija atlasītas pēc pētāmās pazīmes (piem., ar/bez septiskā šoka vai mirušie/izdzīvojuši).

Polimorfisma saistību ar definēto fenotipu (piem., septisko šoku) vērtēja:

- alēlēm (alternatīvas alēles nēsātājiem salīdzinājumā ar parastās alēles nēsātājiem);
- dominantajā ģenētiskajā modelī (alternatīvās alēles nēsātāji salīdzinājumā ar parastās alēles homozigotām);
- recesīvajā ģenētiskajā modelī (alternatīvās alēles homozigotas salīdzinājumā ar parastās alēles nēsātājiem)

Nulles hipotēzes (piem., ka testējamās izlases pieder vienai populācijai) pārbaudīja ar Pīrsona hī kvadrāta (χ^2) testu vai Fišera precīzo testu. Gadījumos, kad tika izmantots Pīrsona χ^2 tests, 2x2 tabulām aprēķināta arī izredžu attiecība (*Odds ratio, OR*). Lai spriestu par izredžu attiecības centrālo tendenci un izkliedi tika aprēķinātas 95% ticamības intervāla robežas.

Novēroto genotipu atbilstība Hārdija-Veinberga (H-W) līdzsvaram (*Hardy-Weinberg equilibrium*) pārbaudīta ar χ^2 testu. Tika testēta nulles hipotēze par novēroto un sagaidāmo ($p^2 + 2pq + q^2$, kur p – izplatītākās, bet q - retākās alēles frekvences) polimorfismu sadalījuma vienādību.

5.Rezultāti

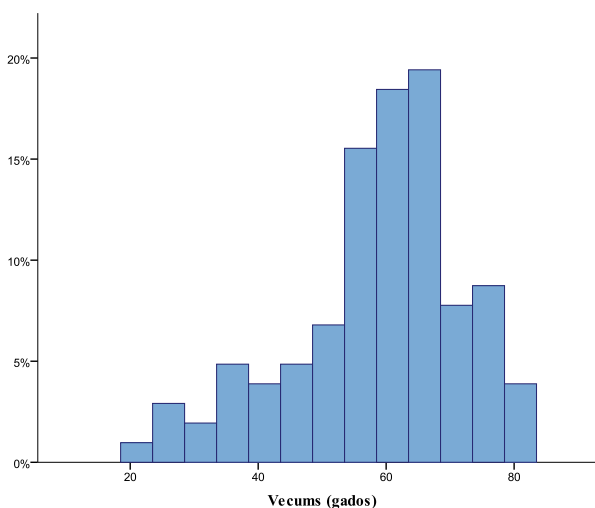
5.1 Pētījuma populācijas raksturojums

Analizētā populācija sastāv no 103 slimniekiem, kuri ietverti pētījumā saskaņā ar izstrādātajiem iekļaušanas kritērijiem. Pētījuma populācijā TNF -308 A/G polimorfismu veiksmīgi izdevās genotipēt 99 slimniekiem, savukārt IL-6 -174 G/C un IL-10 -1082 G/A polimorfismus - visā pētījuma grupā (n=103). Sakarā ar to, statistiskā analīzē iekļauto subjektu skaits mainās atkarībā no pētāmā jautājuma (n=99 vai n=103). Pārējo analīzei nepieciešamo klīnisko informāciju izdevās savākt pilnā apjomā.

Kopējā pētījuma populācijā tika analizēti vairāki ar slimniekiem saistīti demogrāfiskie un klīniskie raksturlielumi (piem., vecums, dzimums, orgānu mazspējas pakāpe utt.), ar mērķi izvērtēt salīdzināmo apakšgrupu viendabīgumu un apzināties citu iespējamo riska faktoru ietekmi uz pētāmo rezultātu (piem., septiskā šoka attīstību vai mirstību ITN). Tajā skaitā tika analizēts arī primārā infekcijas procesa raksturs (ierosinātājs, lokalizācija).

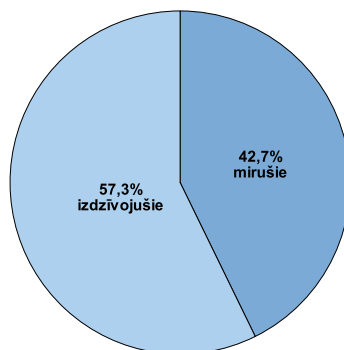
5.1.1 Kopējās pētījuma populācijas demogrāfiskais un klīniskais raksturojums

Kopējā pētījuma populācijā slimnieku vecuma sadalījums atbilst normālam (asimetrijas rādītājs $\pm SE$ ir $0,8 \pm 0,2$), līdz ar ko vidējā tendence norādīta kā vidējais un standarta novirze. Vidējais vecums pētījumā iekļautiem slimniekiem bija $59 (\pm 13)$ gadi, 7.attēls.



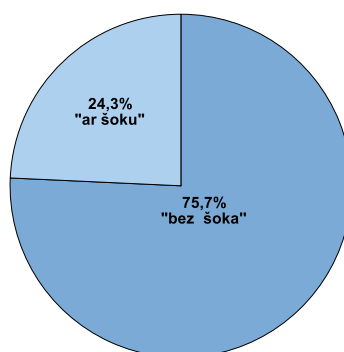
7.attēls. Vecuma sadalījums kopējās pētījuma grupas slimniekiem

Analizējot dzimumu sadalījumu, novēroja vīriešu pārsvaru (74,8%). Miruši ITN ārstēšanas posmā 44 (42,7%) slimnieki, 8.attēls.



8.attēls. Mirstība kopējā pētījuma populācijā

Septiskā šoka pazīmes novēroja 25 (24,3%) slimniekiem, 9.attēls.

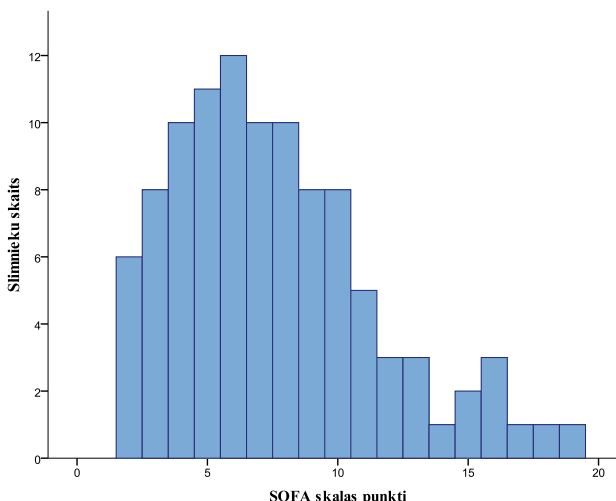


9.attēls. Septiskā šoka incidence pētījuma slimniekiem

5.1.1.1 Orgānu mazspējas smaguma raksturojums kopējā pētījuma populācijā

Pētījumā tika iekļauti ITN slimnieki ar dažādas smaguma pakāpes multiorgānu mazspējas sindromu. MODS smaguma pakāpes standartizētai izvērtēšanai un salīdzināšanai izmantots SOFA skalas punktu skaits. Ņemot vērā novērojamo asimetrisko datu sadalījumu, analīzei izmantotas neparametriskās statistikas metodes.

Kopējai pētījuma populācijai mediānā SOFA skalas vērtība bija 7 punkti, kas atbilst vidēji smagas pakāpes orgānu mazspējai. SOFA skalas punktu intervāls – 2-19, bet starpkvantīļu intervāls 4-10 punkti. Informācija par SOFA skalas punktu sadalījumu kopējās pētījuma populācijas slimniekiem grafiski atspoguļota 10.attēlā.



10.attēls. Pētījuma populācijas sadalījums pēc SOFA skalas punktu skaita

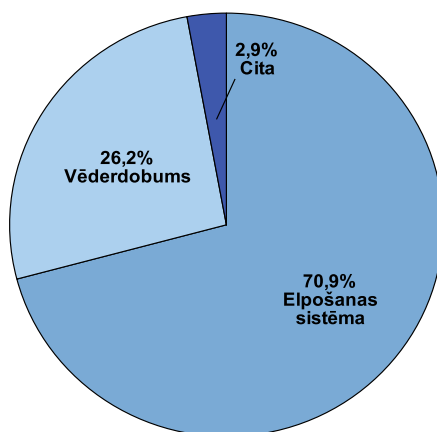
Analizējot esošās hroniskās orgānu sistēmu mazspējas prevalenci, pētījuma kopējā populācijā visbiežāk novēroja elpošanas sistēmas smagas formas hronisko mazspēju (biežākā diagnoze HOPS), hronisko sirds mazspēju un hronisko nieru mazspēju. Kopsummā smagas hroniskas blakuspatoloģijas ar orgānu sistēmu mazspēju tika novērotas 60% slimnieku. Pārējiem mazspējas pakāpe vai nu bija vieglāka, vai arī netika novērota. Procentuālais sadalījums attēlots 5.tabulā.

5.tabula. Smagas hroniskās orgānu mazspējas prevalence kopējā pētījuma grupā

Diagnoze	Prevalence (% no kopējā pētījumā iekļautā slimnieku skaita)
Hroniskā elpošanas mazspēja	32%
Hroniskā sirds mazspēja	12%
Hroniskā nieru mazspēja	16%

5.1.1.2 Populācijas sadalījums pēc primārā infekcijas procesa lokalizācijas

Pētījuma slimniekiem par primāro infekcijas perēkli tika uzskatīta infekciozā procesa lokalizācija tieši pētījumā iekļaušanas dienā („sepses avots”). Pētījuma slimniekiem primārās infekcijas perēklis lokalizējās pārsvarā elpošanas sistēmas orgānos (pneimonija) vai vēdera dobumā (peritonīti). Slimnieku skaits ar citās orgānu sistēmās lokalizēto primāro infekcijas perēkli nepārsniedza 3% (11.attēls).



11.attēls. Pētījuma slimnieku sadalījums pēc primārās infekcijas lokalizācijas

5.1.1.3 Populācijas sadalījums pēc primārās infekcijas ierosinātāja

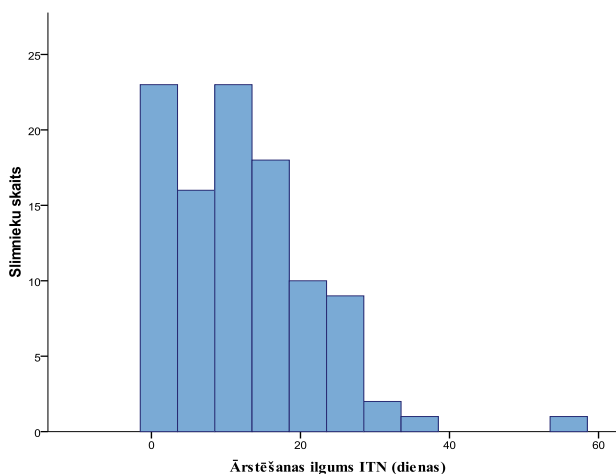
Primārās infekcijas ierosinātāji mikrobioloģiski verificēti 82 (79,6%) gadījumos. Pārējos gadījumos mikrobioloģiski ierosinātājs netika verificēts, neskatoties uz pozitīvām klīniskām, laboratoriskām iekaisumu apliecināšanām metodēm un pat vizuālo infekcijas procesa diagnostiku. Mikrobioloģiski verificēto biežāko infekcijas ierosinātāju procentuālais sadalījums attēlots 6.tabulā.

6.tabula. Sepses ierosinātāju mikrobioloģiskais profils

Gram pozitīva flora	% no gram pozitīvajiem
<i>S.aureus</i>	43
MRSA	22
<i>Enterococcus spp</i>	31
Citi	14
Gram negatīva flora	% no gram negatīvajiem
<i>E. coli</i>	32
<i>K. pneumoniae</i>	24
<i>P. aeruginosa</i>	20
Citi	14

5.1.1.4 Ārstēšanas ilgums ITN

Visiem pētījuma slimniekiem tika analizēts arī ārstēšanas ilgums ITN. Novērotais ārstēšanas ilgums ITN neatbilst normālam sadalījumam (*asimetrijas rādītājs* $\pm$ SE, 1,3 $\pm$ 0,24), līdz ar ko centrālās tendences un izkliedes raksturojumam izmantotas neparametriskās statistikas metodes. ITN ārstēšanas ilguma mediāna ir 11 dienas, starpkvartīļu intervāls 4-17 dienas, intervāls. ITN ārstēšanas ilguma sadalījuma histogramma norādīta 12.attēlā.



12.attēls. Slimnieku sadalījums atkarībā no ārstēšanas ilguma ITN

5.1.1.5 Kopsavilkums par kopējo pētījuma populāciju

Apkopotā informācija par kopējās pētījuma populācijas svarīgākajiem demogrāfiskiem un klīniskiem raksturlielumiem ir attēlota 7.tabulā.

7.tabula. Pētījuma kopējās populācijas raksturojums

Raksturlielumi	Mērvienības	Vērtība kopējā pētījuma populācijā (n=103)
Dzimums	vīrieši, n (% no kopēja skaita)	77 (74,8%)
Vecuma raksturlielumi	vidējais vecums ¹ , gados (± SD)	58,7 (±13,4)
	CI 95% vidējām, gados	56,0-61,3
	vecuma intervāls, gados	21-83
MODS smaguma raksturlielumi	SOFA mediāna (IQR)	7 (4-10)
Septiskā šoka incidence	n (% no kopēja skaita)	25 (24,3%)
Klīniskā iznākuma raksturlielumi	mirstība ITN, n (%)	44 (42,7%)
	Ārstēšanas ilguma ITN mediāna (IQR), dienas	11 (4-17)
	Ārstēšanas ilguma intervāls, dienas	1-56

¹vecuma raksturlielumi izlasē atbilst normālam sadalījumam (*asimetrijas rādītājs* = -0,775, ar SE 0,238)

5.1.2 Izdzīvojušo un mirušo slimnieku svarīgāko raksturlielumu analīze

Saskaņā ar noteiktajiem darba uzdevumiem, lai izvērtētu izvēlēto ģenētisko polimorfismu saistību ar izdzīvošanas prognozi, to sadalījumi, kā arī citi pētījumā iegūtie raksturlielumi tika salīdzināti starp izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem. Lai apzinātos citu riska faktoru potenciālo ietekmi uz sagaidāmo rezultātu, grupās salīdzinājām svarīgākos demogrāfiskos un klīniskos raksturlielumus.

Abās grupās, tāpat kā kopējā populācijā, novēro vīriešu procentuālo pārsvaru (mirušiem – 73%, bet izdzīvojušiem – 76%), bet dzimumu sadalījums apakšgrupā būtiski neatšķiras ($p=0,682$, Pīrsona χ^2 tests).

Vecuma sadalījums abās grupās atbilst normālam sadalījumam (asimetrijas rādītājs $\pm$ SE – $0,8\pm0,3$ un $-0,7\pm0,4$) un izkliedes vērtības ir līdzīgas, līdz ar ko atšķirības izvērtēšanai ir iespējams pielietot parametriskās statistikas metodes. Salīdzinot vidējo vecumu izdzīvojušiem un mirušiem pētījuma populācijas slimniekiem, tas būtiski neatšķiras (attiecīgi 58 ± 14 un 59 ± 13 , $p=0,6$, t-tests divām neatkarīgām izlasēm).

Septiskā šoka incidence ir augstāka mirušo slimnieku grupā (attiecīgi 34% un 17%, $p=0,045$, Pīrsona χ^2 tests). Nelabvēlīga klīniskā iznākuma risks slimniekiem ar septisko šoku ir nedaudz augstāks par slimniekiem bez šoka pazīmēm (OR 2,534, CI 95% 1,007-6,376).

Ārstēšanas ilguma ITN vērtību sadalījumi atbilst normālam sadalījumam tikai mirušiem slimniekiem, bet izdzīvojušiem slimniekiem novēro pozitīvo novirzi (asimetrijas rādītājs $\pm$ SE, attiecīgi $0,3\pm0,4$ un $2,3\pm0,3$), līdz ar ko vidējas tendences un izkliedes raksturošanai pielietojām mediānu un starpkvantīlu intervālu, bet starpgrupu atšķirību vērtēšanai neparametrisko *Mann-Whitney U* testu. Salīdzinot grupas būtiskās ITN ārstēšanas ilguma atšķirības abām grupām nav novērotas ($p=0,226$, *Mann-Whitney U* tests). Abu grupu svarīgākie klīniskie raksturlielumi attēloti 8.tabulā.

8.tabula. Svarīgākie demogrāfiskie un klīniskie raksturlielumi *izdzīvojušo* un *mirušo* slimnieku apakšgrupās

	Izdzīvojušie n=59	Mirušie n=44	P vērtība	Statistiskā metode
Vīrieši, n (% no kopējā skaita)	45 (76,3%)	32 (72,7%)	0,7	Pīrsona χ^2 tests
Vecums, gados ($\pm$ SD)	58 ($\pm$ 14)	59 ($\pm$ 12)	0,6	t-tests
Ārstēšanas ilgums ITN mediāna (IQR), dienas	10 (5-14)	15 (3-19)	0,2	<i>Mann-Whitney U</i> tests
MODS smagums, SOFA skalas punktu mediāna (IQR)	6 (4-8)	9 (6-12)	0,002	<i>Mann-Whitney U</i> tests
Septiskais šoks, n (%)	10 (17%)	15 (34%)	0,045	Pīrsona χ^2 tests

Svarīgākie demogrāfiskie parametri izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem būtiski neatšķiras, bet septisko šoku biežāk novēro slimniekiem ar nelabvēlīgu klīnisko prognozi.

5.1.3 Demogrāfisko un klīnisko raksturlielumu analīze slimnieku grupās ar un bez septiskā šoka pazīmēm

Iekļaušanas laikā kopējā pētījuma grupā septiskā šoka pazīmes novēroja 25 (24%) slimniekiem. Saskaņā ar pētījuma uzdevumiem bija paredzēts salīdzināt iegūtos datus starp slimniekiem ar septisko šoku un bez tā. Šajā sadaļā izvērtēti svarīgākie demogrāfiskie un klīniskie raksturlielumi abās grupās.

Analizējot dzimuma sadalījumu, līdzīgi kā kopējā populācijā, novērots vīriešu procentuālais pārsvars. Vecuma sadalījumi slimnieku grupās ar/bez septiskā šoka pazīmēm atbilst normālam sadalījumam (attiecīgi asimetrijas rādītājs ($\pm$ SE), -0,9 ($\pm$ 0,46) un -0,73 ($\pm$ 0,27)), sakarā ar ko analīzei tika izmantots parametriskais t-tests neatkarīgām izlasēm. Abās grupās vidējais vecums bija tuvu 59 gadiem. Ārstēšanas ilguma sadalījums slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm neatbilst normālam (asimetrijas rādītājs ($\pm$ SE) 1,6 ($\pm$ 0,3)), līdz ar ko grupas salīdzinājumam pielietoja neparametriskās statistikas testus. Ārstēšanas ilgums bija līdzīgs abās grupās, ap 10-11 dienām.

Salīdzināmās grupas krasi atšķīrās pēc orgānu mazspējas smaguma un mirstības raksturlielumiem. Slimniekiem ar septiskā šoka pazīmēm SOFA skalas vidējā vērtība bija 12 punkti,

bet slimniekiem bez šoka pazīmēm - 6. Svarīgākie demogrāfiskie un klīniskie raksturlielumi ir apkopoti 9.tabulā.

9.tabula. Svarīgākie klīniskie raksturlielumi slimnieku apakšgrupās ar/bez septiskā šoka pazīmēm

	„ar šoku“ n=25	„bez šoka“ n=78	P vērtība	Statistiskā metode
Vīrieši, n (% no kopējā skaita)	20 (80%)	57 (73%)	0,49	Pīrsona χ^2 tests
Vecums, vid. ($\pm$ SD), gadi	59,0 ($\pm$ 15,7)	58,5 ($\pm$ 12,7)	0,87	t-tests
ITN ārstēšanas ilguma mediāna (IQR), dienas	12 (2-19)	11 (6-17)	0,76	<i>Mann-Whitney U</i> tests
MODS smagums, SOFA skalas punktu mediāna (IQR)	12 (10-15)	6 (4-8)	<0,01	<i>Mann-Whitney U</i> tests
Miruši, n (%)	15 (60%)	29 (37%)	0,045	Pīrsona χ^2 tests

5.2 TNF -308 A/G polimorfisms

Kopējā pētījuma populācijā (n=103) TNF -308 A/G polimorfisms veiksmīgi tipēts 99 slimniekiem, kuri tika iekļauti turpmākā statistiskā analīzē. TNF -308 A/G polimorfisma un retākās A alēles novērotie biežumi kopējā pētījuma populācijā un analizējamās apakšgrupās attēloti 10.tabulā.

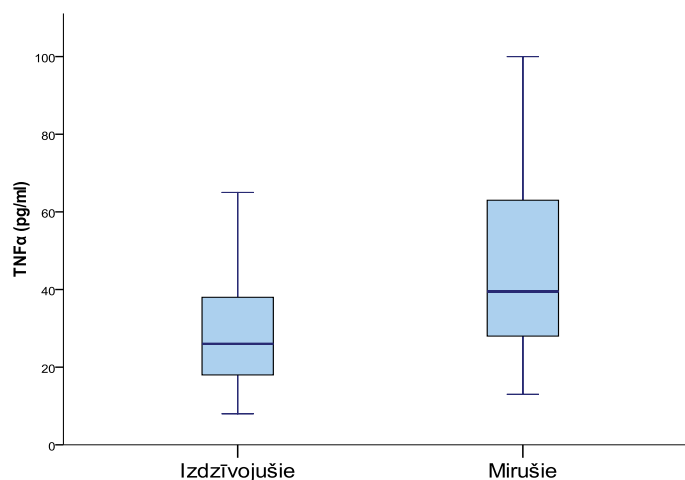
10.tabula. Novērotie TNF -308 A/G polimorfisma un alternatīvas alēles biežumi

Populācija	Novērotā TNF -308 A/G polimorfisma frekvence	Novērotā TNF -308 A alēles frekvence
Kopējā pētījuma populācijā	0,36 (36/99)	0,19
Slimniekiem ar šoku	0,38 (9/24)	0,19
Slimniekiem bez šoka	0,36 (27/75)	0,21
Izdzīvojušiem	0,38 (22/58)	0,20
Mirušiem	0,34 (14/41)	0,18

5.2.1 TNF α cirkulējošā līmeņa saistība ar septiskā šoka attīstību un klīnisko iznākumu

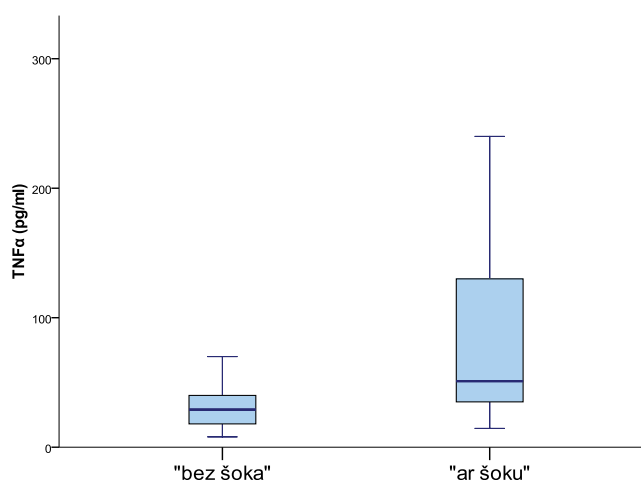
Pārbaudot pētījuma hipotēzi par TNF α cirkulējošā līmeņa saistību ar klīnisko iznākumu, to mediānās vērtības salīdzināja starp ITN etapā izdzīvojušajiem un neizdzīvojušajiem sepses slimniekiem kopējā pētījuma grupā.

Mirušiem slimniekiem novēroja augstāku TNF α seruma līmeni nekā izdzīvojušiem [attiecīgi 40 (28/63), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles) pret 26 (18/40), pg/ml, p=0,002, Mann-Whitney U tests], 13.attēls.



13.attēls. TNFα koncentrācija izdzīvojušiem un mirušiem sepses slimniekiem

Veicot TNFα sistēmiskās koncentrācijas analīzi slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm, pirmajiem novēroja augstāku TNFα līmeni [51 (35/130), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles), pret 29 (18/40), $p < 0,001$, *Mann-Whitney U tests*], 14.attēls.



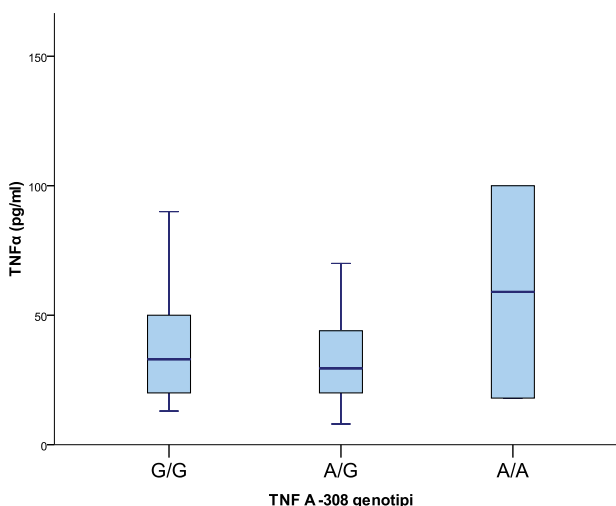
14.attēls. TNFα koncentrācija slimniekiem ar un bez septiskā šoka

5.2.2 TNFA -308 A/G polimorfisma saistība ar TNFα cirkulējošo līmeni

5.2.2.1 TNFA -308 genotipu saistība ar TNFα cirkulējošo līmeni kopējā pētījuma populācijā

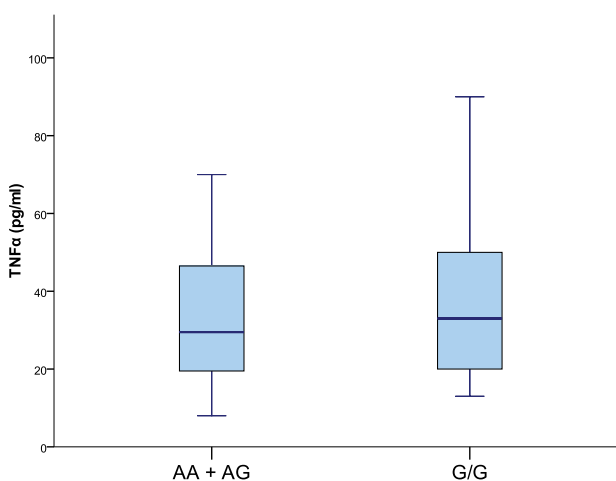
Saskaņā ar darba uzdevumiem, analizējot TNF -308 A/G polimorfisma iespējamo saistību ar cirkulējošo TNFα līmeni, TNFα seruma līmeni salīdzināja grupās, kas sadalītas pēc TNF -308

genotipiem. Statistiskās analīzes rezultātā būtiskas TNF α koncentrāciju atšķirības starp grupām netika novērotas [attiecīgi G/G 33 (20/51), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles) pret A/G 30 (20/44) pret A/A 59 (18/100), $p=0,81$, *Kruskal Wallis tests*], 15.attēls.



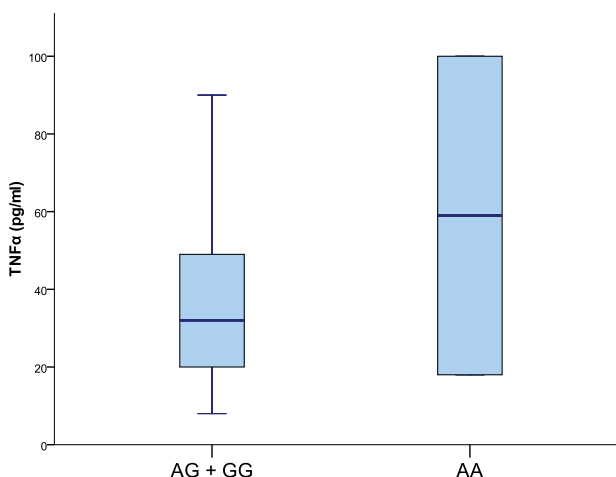
15.attēls. TNF α koncentrācija pēc TNFA -308 genotipiem sadalītās grupās

Dominantajā modelī. Lai izvērtētu alternatīvās A alēles saistību ar TNF α cirkulējošiem līmeņiem, tie tika salīdzināti starp parastā genotipa (G/G) nēsātājiem un vismaz vienas alternatīvās alēles (A) nēsātājiem (A/G un A/A genotipi). Datu analīzes rezultātā statistiski nozīmīgas atšķirības starp G/G genotipa un A alēles nēsātājiem nav novērotas [attiecīgi 33 (20/51), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles) un 30 (20/47), $p=0,6$; *Mann-Whitney U tests*], 16.attēls.



16.attēls. TNF α koncentrācija TNF A -308 alternatīvās un parastās alēles nēsātājiem

Recesīvajā modelī nozīmīgas TNF α cirkulējošo līmeņu atšķirības starp AA un parastās alēles nēsātājiem (AG un GG genotipi) nav novērotas [attiecīgi 59(18/100), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles) un 32 (20/49), $p=0,8$, *Mann-Whitney U tests*], 17.attēls.



17.attēls. TNF α koncentrācija recesīvajā ģenētiskajā modelī

Kopējā pētījuma grupā nenovēro TNFA -308 A/G polimorfisma saistību ar TNF α sistēmisko koncentrāciju.

5.2.2.2 TNF A -308 polimorfisma saistība ar TNF α cirkulējošo līmeni apakšgrupās

Novērotā TNF α plazmas līmeņa starpība starp septiskā šoka un smagas sepses slimniekiem, kā arī starp izdzīvojušiem un mirušiem, norāda uz iespējamo TNF A -308 A/G polimorfisma funkcionālo nozīmi tieši minētās apakšgrupās.

TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar TNF α sistēmisko līmeni analizēta **izdzīvojošo un mirušo** slimnieku apakšgrupās (11.tabula).

11.tabula. TNF α mediāno plazmas koncentrāciju sadalījums atkarībā no TNFA -308 genotipa izdzīvojošo un mirušo sepses slimnieku grupās

	G/G	A/G	A/A	P vērtība ²
Izdzīvojušie	32 (18/44) ¹	25 (18/30)	18 (18/18)	0,3
Mirušie	34 (22/55)	44 (35/63)	100 (100/100)	0,3

¹ TNF α koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² *Kruskal Wallis tests*

TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar TNF α cirkulējošo koncentrāciju izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem testēta arī **dominantajā** (12.tabula) un **recesīvajā** modelī (13.tabula).

12.tabula. TNF α dominantajā modelī izdzīvojušo/mirušo slimnieku apakšgrupā

	AG+AA	GG	P vērtība ²
Izdzīvojušie	25 (18/30)	32 (18/44)	0,15
Mirušie	48 (35/70)	34 (22/55)	0,22

¹ TNF α koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Mann-Whitney U tests

13.tabula. TNF α recesīvajā modelī izdzīvojušo/mirušo slimnieku apakšgrupā

	AA	AG+GG	P vērtība ²
Izdzīvojušie	18(18/18) ¹	28 (18/40)	0,59
Mirušie	100 (100/100)	40 (27/62)	0,34

¹ TNF α koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Mann-Whitney U tests

Lai precizētu TNFA -308 A/G polimorfisma funkcionālo nozīmīgumu, atsevišķiem slimniekiem **ar un bez septiskā šoka** pazīmēm, līdzīgi kā iepriekšējā apakšdaļā, salīdzināta mediānā citokīna seruma koncentrācija pēc genotipa sadalītās grupās (G/G, G/A, A/A), kuru rezultāti attēloti 14.tabulā.

14.tabula. TNF α mediāno plazmas koncentrāciju sadalījums atkarībā no TNF -308 genotipa slimniekiem ar un bez septiskā šoka

	G/G	A/G	A/A	P vērtība ²
Ar šoku	45 (28/130) ¹	44 (31/182)	100 (100/100)	0,72
Bez šoka	30 (18/46)	26 (18/36)	18 (18/18)	0,59

¹ TNF α koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Kruskal Wallis tests

TNFA -308 A/G polimorfisma saistība ar TNF α cirkulējošo koncentrāciju slimniekiem ar/bez septiskā šoka testēta arī **dominantajā** (15.tabula) un **recesīvajā** modeļos (16.tabula).

15.tabula. TNF α dominantajā modelī ar/bez septiskā šoka slimnieku apakšgrupā

	AG+AA	GG	P vērtība ²
Ar šoku	51 (35/100) ¹	45 (28/130)	0,95
Bez šoka	26 (18/36)	30 (18/46)	0,46

¹ TNF α koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Mann-Whitney U tests

16.tabula. TNF α recesīvajā modelī ar/bez septiskā šoka slimnieku apakšgrupā

	AA	AG+GG	P vērtība ²
Ar šoku	100 (100/100) ¹	45 (28/130)	0,58
Bez šoka	18 (18/18)	29 (18/43)	0,53

¹ TNF α koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Mann-Whitney U tests

Kopsavilkums. Analizējot TNF -308 A/G polimorfisma saistību ar TNF α koncentrāciju asins serumā, tā nav novērota ne kopējā pētījuma populācijā, ne arī testējamās apakšgrupās.

5.2.3 TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci

5.2.3.1 TNF -308 A/G saistība ar septiskā šoka attīstību kopējā pētījuma populācijā

Ar mērķi pārbaudīt hipotēzi par TNFA -308 A/G polimorfisma saistību ar paaugstināto septiskā šoka attīstības risku, genotipu sadalījums salīdzināts starp slimniekiem ar septiskā šoka pazīmēm un pārējiem sepses slimniekiem, kā arī izvērtēts septiskā šoka attīstības risks alternatīvas (A) alēles nēsātājiem dažādos ģenētiskos modeļos.

Analizējot TNFA -308 genotipu (G/G, G/A, A/A) sadalījumu slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm, statistiski nozīmīgu atšķirību nenovēroja ($p=0,69$). Iegūtie rezultāti attēloti 17.tabulā.

17. tabula. TNF -308 genotipu sadalījums starp smagas sepses un septiskā šoka slimniekiem

	G/G	A/G	A/A
Ar šoku, n (%)	15 (62,5)	8 (33,3)	1 (4,2)
Bez šoka, n (%)	48 (64,0)	26 (34,7)	1 (1,3)

$P=0,69$, Pearson $\chi^2=0,74$

TNFA -308 polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību ir testēta arī dažādos ģenētiskos modeļos (18.tabula).

18.tabula. TNF -308 polimorfisma asociācija ar septiskā šoka incidenci dažādos ģenētiskos modeļos kopējā pētījuma populācijā

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
A/G	10/38	28/122	0,74	1,15 (0,51-2,57)
AA+AG/GG	9/15	27/48	0,89	1,07 (0,41-2,76)
AA/AG+GG	1/23	1/74	0,39	3,22 (0,19-53)

TNF -308 alēļu sadalījumi nozīmīgi neatšķiras starp slimniekiem ar septiskā šoka pazīmēm un bez tām. Abās apakšgrupās novēro līdzīgu alternatīvās A alēles frekvenci (0,21 un 0,19, $p=0,74$, Pearson χ^2 tests). Dominantajā modelī un recesīvajā modelī nozīmīgas A alēles sadalījuma atšķirības testējamās apakšgrupās nav atrastas.

Statistiskās analīzes rezultāti neatbalsta izvirzīto hipotēzi par TNF -308 A/G polimorfisma saistību ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci kopējā pētījuma populācijā.

5.2.3.2 TNFA -308 A/G saistība ar septiskā šoka attīstību apakšgrupās

TNFA -308 A/G polimorfisma iespējama saistība ar septiskā šoka attīstību testēta arī izdzīvojušo un mirušo slimnieku apakšgrupās (19.tabula).

19.tabula. TNFA-308 genotipu sadalījums starp slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm izdzīvojušo un mirušo apakšgrupās

		G/G		A/G		A/A	
Izdzīvojušie¹	Ar šoku, n (%)	7	(70,0)	3	(30,0)	0	(0)
	Bez šoka, n (%)	29	(60,4)	18	(37,5)	1	(2,1)
Mirušie²	Ar šoku, n (%)	8	(57,1)	5	(35,7)	1	(7,1)
	Bez šoka, n (%)	19	(70,4)	8	(29,6)	0	(0)

¹ $P=0,795$, Pearson $\chi^2=0,459$

² $P=0,320$, Pearson $\chi^2=2,281$

Statistiskās kalkulācijas nenorāda uz būtiskām atšķirībām TNFA -308 A/G genotipu sadalījumos slimniekiem ar un bez šoka pazīmēm mirušo un izdzīvojušo slimnieku apakšgrupās.

TNFA -308 A/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību izvērtēta arī dažādos ģenētiskos modeļos izdzīvojušiem (20.tabula) un mirušiem (21.tabula) pētījuma slimniekiem.

20.tabula. TNFA -308 saistība ar septiskā šoka attīstību dažādos ģenētiskos modeļos izdzīvojušiem

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
A/G	3/17	20/76	0,55	0,67 (0,18-2,52)
AA+AG/GG	3/7	19/29	0,57	0,65 (0,20-2,43)
AA/AG+GG	0/10	1/47	0,65 ¹	1,21 (1,08-1,37)

¹Fisher's Exact Test p=1, pielietots, jo 2x2 tabulā vienam mainīgajam (25%) vērtība ir 0

21.tabula. TNFA -308 saistība ar septiskā šoka attīstību dažādos ģenētiskos modeļos mirušiem

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
A/G	7/21	8/46	0,258	1,917 (0,614-5,982)
AA+AG/GG	6/8	8/19	0,397	1,781 (0,465-6,821)
AA/AG+GG	1/13	0/27	0,160 ¹	3,077 (1,969-4,809)

¹Fisher's Exact Test p=0,34, pielietots, jo 2x2 tabulā 2 (50%)mainīgajiem vērtība <5

Pielietotos ģenētiskos modeļos TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību nav novērota.

5.2.4 TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu

5.2.4.1 TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu kopējā pētījuma populācijā

Lai izvērtētu TNF -308 polimorfisma ietekmi uz klīnisko iznākumu pētījuma slimniekiem, TNF A -308 attiecīgo genotipu (G/G, G/A, A/A) sadalījumi salīdzināti izdzīvojošo un mirušo slimnieku apakšgrupās, kuru rezultāti attēloti 22.tabulā.

22.tabula. TNF-308 genotipu sadalījums starp izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem

	G/G	A/G	A/A
Izdzīvojušie, n (%)	36 (62,1)	21 (36,2)	1 (1,7)
Mirušie, n (%)	27 (65,9)	13 (31,7)	1 (2,4)

P=0,88, Pearson χ^2 =0,256

Iegūtā p vērtība (p=0,88) norāda, ka izdzīvojošo un mirušo sepses slimnieku grupās TNF -308 genotipu sadalījumi statistiski nozīmīgi neatšķiras, līdz ar to balstoties uz šajā testā iegūtajiem

rezultātiem nav iespējams apstiprināt TNF – 308 A/G polimorfismā saistību ar klīnisko iznākumu ITN sepses slimniekiem.

Miršanas risks TNFA -308 A/G polimorfisma nēsātājiem aprēķināts arī dažādos ģenētiskos modeļos, bet statistiski ticamas atšķirības nav novērotas (23.tabula).

23.tabula. TNFA -308 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos kopējā pētījuma populācijā

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
A/G	15/67	23/93	0,79	0,91 (0,44-1,86)
AA+AG/GG	14/27	22/36	0,70	0,84 (0,37-1,95)
AA/AG+GG	1/40	1/57	0,80	1,43 (0,09-23,46)

5.2.4.2 TNFA -308 A/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu apakšgrupās

Ar mērķi izvērtēt iespējamo TNFA -308 polimorfisma saistību ar klīnisko iznākumu atsevišķi smagas sepses un septiskā šoka slimniekiem, abās grupās salīdzināts attiecīgo genotipu biežumu sadalījums starp izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem (24.tabula).

24.tabula. TNFA-308 genotipu sadalījums starp izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem ar/bez šoka apakšgrupās

			G/G (n=63)	A/G (n=34)	A/A (n=2)
Septiskā slimnieki¹	šoka	Izdzīvojušie, n (%)	7 (70,0)	3 (30,0)	0 (0)
		Mirušie, n (%)	8 (57,1)	5 (35,7)	1 (7,1)
Slimnieki bez šoka pazīmēm²	bez šoka	Izdzīvojušie, n (%)	29 (60,4)	18 (37,5)	1 (2,1)
		Mirušie, n (%)	19 (70,4)	8 (29,6)	0 (0)

¹P=0,63, Pearson χ^2 =0,93

²P=0,57, Pearson χ^2 =1,14

Analizējot TNF -308 genotipu (G/G, G/A, A/A) saistību ar klīnisko iznākumu slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm, līdzīgi kā kopējā pētījuma populācijā, statistiski nozīmīga sadalījuma atšķirība netika novērota.

Analizējot miršanas risku, A alēles nēsātājiem dažādās ģenētisko modeļu apakšgrupās, kas sadalītas pēc septiskā šoka pazīmēm, būtiskas atšķirības nenovēro (25. un 26.tabula).

25.tabula. TNF -308 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos septiskā šoka slimniekiem

	Izdzīvojušie	Mirušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
A/G	3/17	7/21	0,40	1,89 (0,42-8,43)
AA+AG/GG	3/7	6/8	0,52	1,75 (0,31-9,75)
AA/AG+GG	0/10	1/13	1 ¹	----- ²

¹ Fisher's Exact Test pielietots, jo 2x2 tabulā vienam mainīgajam ir bijusi 0. vērtība

² Nav iespējams aprēķināt, jo 2x2 tabulā vienam mainīgajam ir 0. vērtība

26.tabula. TNF -308 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos sepses slimniekiem bez šoka pazīmēm

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
A/G	8/46	20/76	0,36	0,66 (0,27-1,62)
AA+AG/GG	8/19	19/29	0,39	0,64 (0,23-1,76)
AA/AG+GG	0/27	1/47	1 ¹	----- ²

¹ Fisher's Exact Test pielietots, jo 2x2 tabulā vienam mainīgajam ir bijusi 0. vērtība

² Nav iespējams aprēķināt, jo 2x2 tabulā vienam mainīgajam ir 0. vērtība

Kopsavilkums. Analizējot iespējamo TNFA -308 A/G polimorfisma saistību ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu gan kopējā pētījuma populācijā, gan slimniekiem ar un bez septiskā šoka, tā nav novērota nevienā no izmantotiem ģenētiskiem modeļiem.

5.2.4.3 Kopsavilkums par TNFA -308

1. TNF α koncentrācija ir augstāka septiskā šoka slimniekiem un neizdzīvojušiem.
2. TNFA -308A mūsu pētījumā nav saistīta ar TNF α līmeni.
3. TNFA -308A mūsu pētījumā nav saistīta ar septiskā šoka incidenci.
4. TNFA -308A mūsu pētījumā nav saistīta ar klīnisko iznākumu.

5.3 IL-6 -174 G/C polimorfisms

IL-6 -174 G/C polimorfisms ir veiksmīgi tipēts visiem (n=103) pētījuma slimniekiem. IL-6 -174 G/C polimorfisma un alternatīvas IL-6 -174 C alēles biežumi kopējā pētījuma populācijā, kā arī testējamās apakšgrupās ir norādītas 27.tabulā.

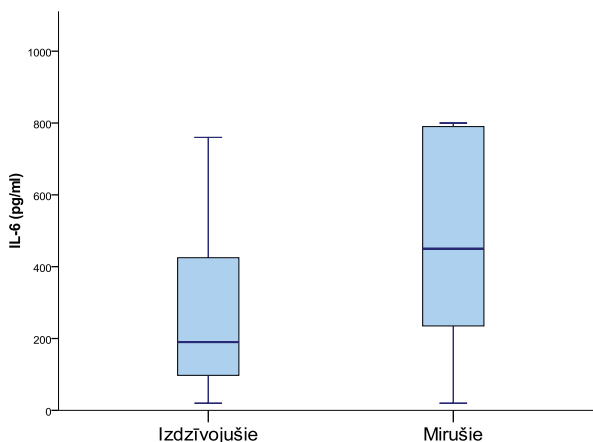
27.tabula. Novērotie IL-6 -174 G/C polimorfisma un alternatīvas alēles biežumi

Populācija	Novērotā IL-6 -174 G/C polimorfisma frekvence	Novērotā IL-6 -174 C alēles frekvence
Kopējā pētījuma populācija	0,709 (73/103)	0,451
Slimniekiem ar šoku	0,760 (19/25)	0,480
Slimniekiem bez šoka	0,692 (54/78)	0,442
Izdzīvojušiem	0,661 (39/59)	0,390
Mirušiem	0,772 (34/44)	0,534

5.3.1 IL-6 cirkulējošā līmeņa saistība ar sepses veidu un klīnisko iznākumu

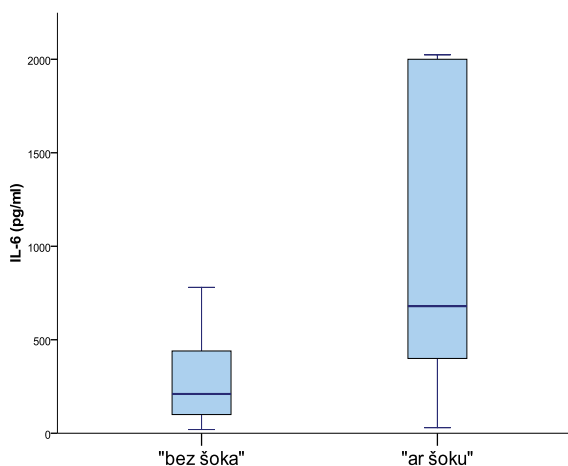
Pārbaudot hipotēzi par IL-6 sistēmiskā līmeņa saistību ar septiskā šoka attīstību un klīnisko prognozi, IL-6 seruma koncentrācijas salīdzinātas attiecīgās apakšgrupās.

Izdzīvojušajiem sepses slimniekiem novēroja zemāku cirkulējošo IL-6 līmeni nekā mirušajiem [attiecīgi 190 (95/430), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles), pret 450 (235/790), *Mann-Whitney U tests*, $P=0,003$], 18.attēls.



18.attēls. IL-6 koncentrācija izdzīvojušiem un mirušiem

Slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm cirkulējošā IL-6 līmenis bija zemāks nekā septiskā šoka slimniekiem [attiecīgi 210 (100/440), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles), pret 680 (400/2000), *Mann-Whitney U tests*, $P<0,001$], 19.attēls.

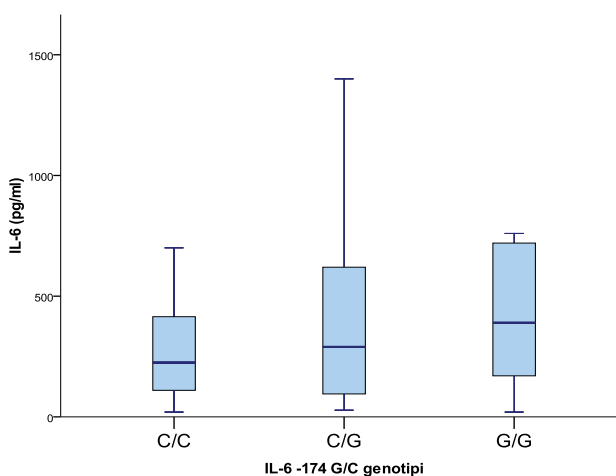


19.attēls. IL-6 koncentrācija slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm

5.3.2 IL-6 gēna promotera polimorfisma -174 G/C saistība ar IL-6 cirkulējošo līmeni

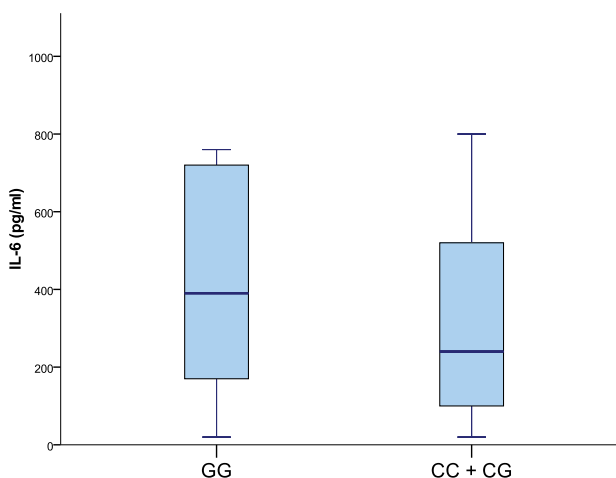
5.3.2.1 IL-6 gēna promotera polimorfisma -174 G/C saistība ar IL-6 cirkulējošo līmeni kopējā pētījuma populācijā

Ar mērķi pārbaudīt izvirzīto hipotēzi par IL-6 promotera -174 G/C polimorfisma saistību ar IL-6 sistēmisko līmeni, salīdzinātas mediānas IL-6 seruma koncentrācijas pēc IL-6 -174 genotipiem sadalītās grupās. Apstrādājot datus, būtiskas IL-6 koncentrāciju atšķirības starp grupām nenovēro [attiecīgi C/C 225 (110/415), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles), C/G (290 (95/620), G/G 390 (170/720), $P=0,2$, *Kruskal Wallis tests*], 20.attēls.



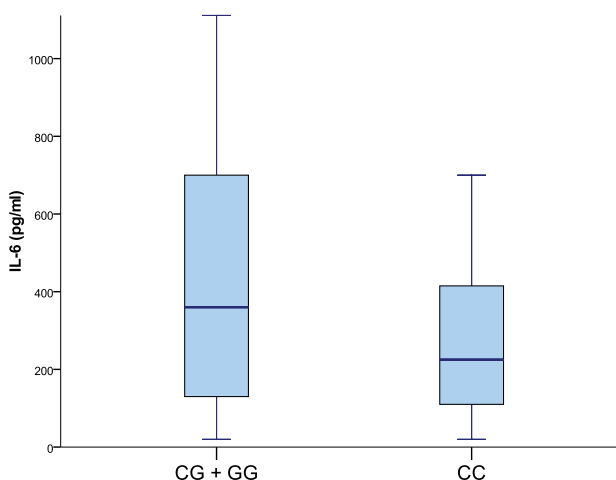
20.attēls. IL-6 koncentrācijas -174 G/C genotipu grupās kopējā pētījuma populācijā

Dominantajā modeli, salīdzinot IL-6 koncentrācijas starp IL-6 -174 C/G polimorfisma nēsātājiem un homozigotām pēc parastās alēles būtisku atšķirību nenovēro [attiecīgi 240 (100/520), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles) un 390 (170/720), $p=0,103$, *Mann-Whitney U tests*], 21.attēls.



21.attēls. IL-6 koncentrācija kopējā pētījumā populācijā -174 G/C polimorfisma dominantajā ģenētiskajā modeli

Recesīvajā modeli, salīdzinot IL-6 koncentrācijas IL-6 -174 CC genotipa nēsātājiem un vismaz vienas G alēles kopijas nēsātājiem nozīmīgu atšķirību nenovēro [attiecīgi 225 (110/415), mediāna (pg/ml), (25./75.procentīles) un 360 (120/720) un $p=0,241$, *Mann-Whitney U tests*].



22.attēls. IL-6 koncentrācija kopējā pētījuma populācijā -174 G/C polimorfisma recesīvajā ģenētiskajā modeli

Statistiskās analīzes rezultāti neatbalsta izvirzīto hipotēzi par IL-6 -174 G/C polimorfisma saistību ar cirkulējošo IL-6 koncentrāciju kopējā pētījuma populācijā.

5.3.2.2 IL-6 gēna promotera polimorfisma -174 G/C saistība ar IL-6 cirkulējošo līmeni apakšgrupās

Pārbaudot hipotēzi par iespējamo IL-6 -174 G/C polimorfisma saistību ar IL-6 cirkulējošo līmeni pēc klīniskā iznākuma sadalītās apakšgrupās, salīdzināja IL-6 koncentrācijas izdzīvojušo un mirušo slimnieku grupās (28.tabula).

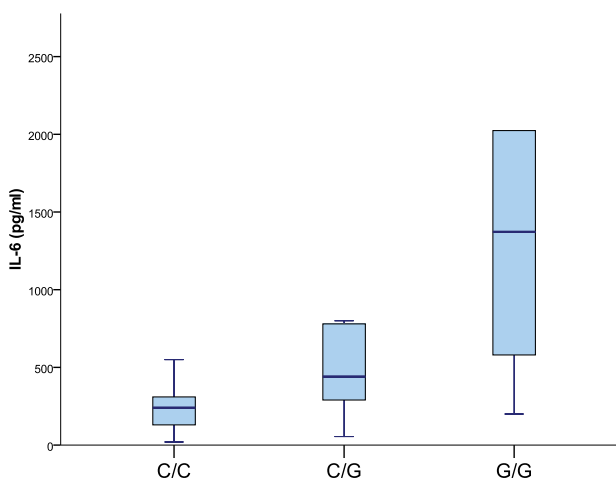
28.tabula. IL-6 mediāno plazmas koncentrāciju sadalījums atkarībā no (-174 G/C) genotipa izdzīvojušo un mirušo slimnieku grupās

	C/C (n=13)	C/G (n=11)	G/G (n=9)	P vērtība ²
Izdzīvojušie	170 (100/700) ¹	190 (85/465)	330 (150/410)	0,71
Mirušie	240 (130/310)	440 (290/780)	1372 (580/2024)	0,01

¹ IL-6 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75. procentiles)

² Kruskal Wallis tests

Izdzīvojušo slimnieku grupā nenovēroja statistiski nozīmīgu atšķirību IL-6 koncentrācijā ($p=0,71$). Tajā pat laikā mirušo slimnieku grupā novēroja būtiskas ($p=0,01$) atšķirības IL-6 līmeņos starp izvēlēto genotipu nēsātājiem ar augstāku IL-6 līmeni G/G genotipa pārstāvjiem, salīdzinot ar C/C un C/G, 23.attēls.



23.attēls. IL-6 līmenis IL-6 -174 G/C genotipa grupās mirušiem slimniekiem

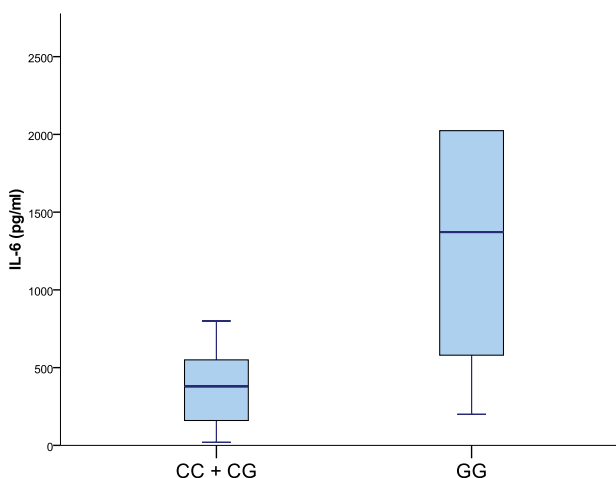
IL-6 -174 G/C polimorfisma saistību ar IL-6 koncentrāciju izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem analizēja **dominantajā modeli**, (29.tabula).

29.tabula. IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar IL-6 koncentrāciju dominantajā modeli

	GG	CC+CG	P vērtība ¹
Izdzīvojušie	330 (150/410)	190 (90/510)	0,527
Mirušie	1372 (580/2024)	380 (160/550)	0,003

¹ Mann Whitney U tests

Dominantajā ģenētiskajā modeli IL-6 -174 C/G polimorfisma saistību ar IL-6 koncentrāciju novēro mirušo slimnieku apakšgrupā, C alēles nēsāšana ir saistīta ar nozīmīgi zemāko IL-6 līmeni šajā grupā (24.attēls).



24.attēls. IL-6 sistēmiskā koncentrācija dominantajā ģenētiskajā modelī mirušiem slimniekiem

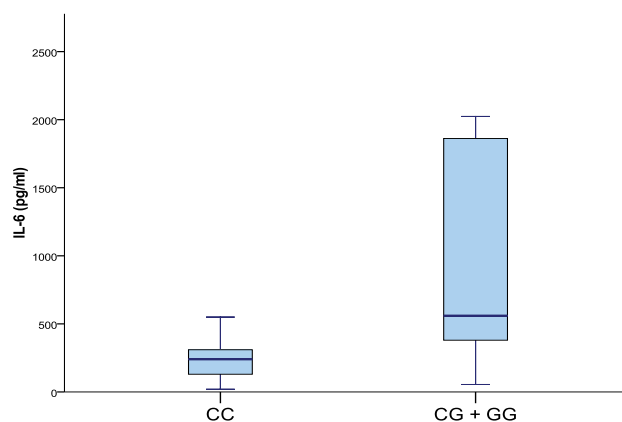
IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar cirkulējošo IL-6 līmeni analizēta arī recesīvajā ģenētiskajā modelī (30.tabula).

30.tabula. IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar IL-6 koncentrāciju recesīvajā modelī

	GG+CG	CC	P vērtība ¹
Izdzīvojušie	195 (93/425)	170 (100/700)	0,944
Mirušie	560 (360/2024)	240 (130/310)	0,007

¹Mann Whitney U tests

Analizējot IL-6 -174 C/G polimorfisma saistību ar IL-6 cirkulējošo līmeni mirušiem pētījuma slimniekiem recesīvajā modelī novēro līdzīgu tendenci dominantajam modelim – slimniekiem ar CC genotipu IL-6 līmenis ir zemāks par G alēles nēsātājiem, 25.attēls.



25.attēls. IL-6 sistēmiskā koncentrācija recesīvajā ģenētiskajā modelī mirušiem slimniekiem

Hipotēze par iespējamo IL-6 -174 G/C polimorfisma saistību ar IL-6 cirkulējošo līmeni tika pārbaudīta arī ar/bez septiskā šoka slimnieku apakšgrupā (31.tabula).

31.tabula. IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar IL-6 koncentrāciju ar/bez septiskā šoka slimniekiem

	CC	CG	GG	P vērtība ²
Bez šoka	220 (100/310) ¹	190 (85/440)	340 (165/590)	0,290
Ar šoku	280 (170/520)	775 (400/2024)	720 (680/2024)	0,083

¹ IL-6 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² *Kruskal Wallis Test*

Statistiskās kalkūlācijas rezultāti neliecina par būtiskām IL-6 līmeņu atšķirībām starp IL-6 -174 dažādu genotipu nēsātājiem testējamās apakšgrupās. Tomēr CC genotipa nēsātājiem ar septiskā šoka pazīmēm novēro zemāku IL-6 līmeni, kaut gan šajā testā iegūtā p vērtība atļauj runāt tikai par iespējamo tendenci.

IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar IL-6 koncentrāciju ar/bez septiskā šoka slimniekiem tika analizēta dominantajā (32.tabula) un recesīvajā (33.tabula) modelī.

32.tabula. IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar IL-6 līmeni slimniekiem ar/bez šoka dominantajā modelī

	CC+CG	GG	P vērtība ²
Bez šoka	195 (90/420)	340 (165/590)	0,116
Ar šoku	620 (280/2000)	720 (680/2024)	0,274

¹ IL-6 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² *Mann Whitney U tests*

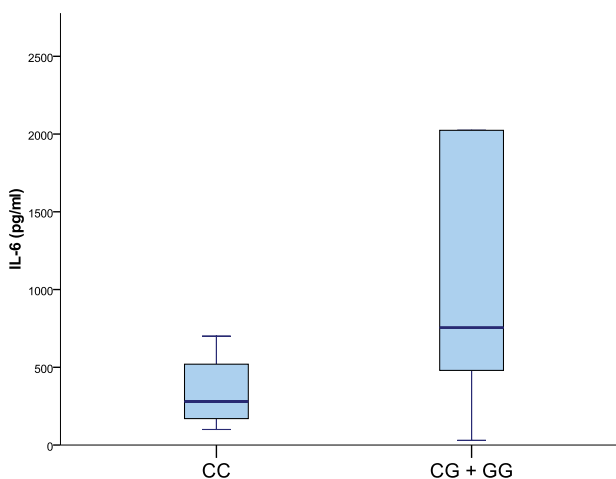
33.tabula. IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar IL-6 līmeni slimniekiem ar/bez šoka recesīvajā modelī

	CC	CG+GG	P vērtība ²
Bez šoka	220 (100/310)	210 (95/460)	0,666
Ar šoku	280 (170/520)	755 (480/2024)	0,031

¹ IL-6 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Mann Whitney U tests

Statistiskās kalkūlācijas norāda uz -174 CC genotipa saistību ar būtiski zemāko cirkulējošo IL-6 līmeni slimniekiem ar septisko šoku, 26.attēls.



26.attēls. IL-6 sistēmiskā koncentrācija septiskā šoka slimniekiem IL-6 -174 C/G polimorfisma recesīvajā ģenētiskajā modelī

Kopumā IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar IL-6 sistēmisko koncentrāciju tika novērota mirušo slimnieku apakšgrupā un septiskā šoka slimniekiem.

5.3.3 IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci

5.3.3.1 IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību kopējā pētījuma populācijā

Ar mērķi analizēt IL-6 -174 G/C polimorfisma saistību ar septiskā šoka incidenci, attiecīgu genotipu sadalījums salīdzināts starp slimniekiem ar un bez šoka pazīmēm (34.tabula).

34. tabula. IL-6 -174 G/C genotipu sadalījums starp smagas sepses un septiskā šoka slimniekiem

	C/C	C/G	G/G
Ar šoku, n (%)	5 (20,0%)	14 (56,0%)	6 (24,0%)
Bez šoka, n (%)	15 (19,2%)	39 (50,0%)	24 (30,8%)

P=0,8, Person $\chi^2=0,44$

IL-6 -174 G/C genotipu frekvences sadalījums starp smagas sepses un septiskā šoka slimniekiem statistiski nozīmīgi neatšķiras.

IL-6 -175 G/C polimorfisma asociācija ar septiskā šoka attīstību izvērtēta arī dažādos ģenētiskos modeļos (35.tabula).

35.tabula. IL-6 -174 polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību kopējā pētījuma populācijā

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
C/G	24/26	69/87	0,641	1,16 (0,62-2,20)
CC+CG/GG	19/6	54/24	0,517	1,41 (0,50-3,97)
CC/CG+GG	5/20	15/63	0,933	1,05 (0,34-3,25)

IL-6 -174 G/C polimorfisma alēļu sadalījums būtiski neatšķiras kopējas populācijas slimniekiem ar un bez septiska šoka pazīmēm.

Dominantajā modelī analizējot septiskā šoka attīstības risku alternatīvas IL-6 -174 C alēles nēsātājiem, salīdzinājām indivīdus ar vismaz vienu alternatīvas alēles kopiju un parastas alēles homozigotas. Statistiskā analīze nenorāda uz būtiskām IL-6 -174 G/C polimorfisma sadalījuma atšķirībām testējamās apakšgrupās. Recesīvajā modelī nozīmīgas atšķirības arī nav novērotas.

Statistiskās analīzes rezultāti nenorāda uz IL-6 -174 G/C polimorfisma saistību ar septiskā šoka attīstību kopējā pētījuma populācijā.

5.3.3.2 IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību apakšgrupās

IL-6 -174 genotipu sadalījumi salīdzināti slimniekiem ar šoku un bez šoka izdzīvojušo un mirušo apakšgrupās (36.tabula).

36.tabula. IL-6 -174 genotipu sadalījumi slimniekiem ar/bez šoka izdzīvojušo un mirušo apakšgrupās

		C/C	C/G	G/G
Izdzīvojušie¹	Ar šoku, n (%)	2 (20,0)	6 (60,0)	2 (20,0)
	Bez šoka, n (%)	5 (10,2)	26 (53,1)	18 (36,7)
Mirušie²	Ar šoku, n (%)	3 (20,0)	8 (53,3)	4 (26,7)
	Bez šoka, n (%)	10 (34,5)	13 (44,8)	6 (20,7)

¹P=0,489, Pearson $\chi^2=1,432$

²P=0,604, Pearson $\chi^2=1,007$

IL-6 -174 polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību testēta arī dažādos ģenētiskos modeļos (37.un 38.tabula).

37.tabula. IL-6 -174 polimorfisma asociācija ar septiskā šoka attīstību dažādos ģenētiskos modeļos izdzīvojušiem

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
C/G	10/10	36/62	0,268	1,722 (0,654-4,534)
CC+CG/GG	8/2	31/18	0,308	2,323 (0,444-12,2)
CC/CG+GG	2/8	5/44	0,383	2,200 (0,362-13,4)

38.tabula. IL-6 -174 polimorfisma asociācija ar septiskā šoka attīstību dažādos ģenētiskos modeļos mirušiem

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
C/G	14/16	33/25	0,362	0,663 (0,273-1,607)
CC+CG/GG	11/4	23/6	0,654	0,717 (0,167-3,073)
CC/CG+GG	3/12	10/19	0,318	0,475 (0,108-2,084)

IL-6 -174 polimorfisma asociācija ar septiskā šoka attīstību nav novērota nevienā no analizētajiem ģenētiskiem modeļiem.

Statistiskās analīzes rezultāti nenorāda uz IL-6 -174 polimorfisma saistību ar septiskā šoka attīstību ne kopējā pētījuma populācijā, ne arī atsevišķi mirušo un izdzīvojušo slimnieku apakšgrupās.

5.3.4 IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu

5.3.4.1 IL-6 -174 G/C polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu kopējā populācijā

Ar mērķi noteikt IL-6 gēna -174 G/C polimorfisma saistību ar mirstību ITN, analizēts genotipu sadalījums izdzīvojušo un mirušo slimnieku grupās kopējā pētījuma populācijā (39.tabula).

39.tabula. IL-6 gēna promotera polimorfisma (-174 G/C) genotipu sadalījums starp izdzīvojušiem un mirušiem sepses slimniekiem

	C/C	G/C	G/G
Izdzīvojušie	7 (12%)	32 (54%)	20 (34%)
Mirušie	13 (30%)	21 (48%)	10 (23%)

P=0,07, $\chi^2=5,36$, Pearson χ^2

Statistiskās analīzes rezultātā nav novērotas būtiskas atšķirības genotipu sadalījumos abās grupās, kaut gan iegūtā p vērtība (p=0,07) minimāli atšķiras no pieņemtās par statistiski būtisku (p=0,05).

Alternatīvās IL-6 -174 G alēles saistība ar klīnisko iznākumu analizēta arī dažādos ģenētiskos modeļos (40.tabula).

40.tabula. IL-6 -174 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos kopējā pētījuma populācijā

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
C/G	47/41	46/72	0,040	1,794 (1,026-3,138)
CC+CG/GG	34/10	39/20	0,217	1,744 (0,718-4,235)
CC/CG+GG	13/31	7/52	0,025	3,115 (1,122-8,646)

IL-6 -174 G un C alēles sadalījumi mirušiem un izdzīvojušiem kopējās pētījuma populācijas slimniekiem statistiski ticami (p=0,04) atšķiras, mirušiem novēro augstāku C alēles frekvenci (0,534 un 0,390). Šis sadalījums arī norāda uz nelielu augstāko risku nēsāt C alēli mirušiem pētījuma kopējās populācijas slimniekiem, salīdzinot ar izdzīvojušiem (OR 1,794, CI 95% 1,026-3,138, p=0,04).

Dominantajā modelī precizējot IL-6 -174 G/C alternatīvas alēles saistību ar klīnisko iznākumu kopējā pētījuma populācijā, tika analizēts nelabvēlīga klīniska iznākuma risks indivīdiem

ar vismaz vienu alternatīvas (C) alēles kopiju. Statistiskās kalkūlācijas nenorāda uz būtiskām IL-6 - 174 G/C polimorfisma biežuma atšķirībām starp testējamām grupām.

Recesīvajā modelī analizējot miršanas risku IL-6 alternatīvās C alēles homozigotām salīdzinot ar vismaz vienas G alēles kopijas nēsātājiem, statistiski novēro augstāku CC genotipa frekvenci mirušo slimnieku grupā (0,295 un 0,119, $p=0,025$, Pearson χ^2).

Analizējot IL-6 -174G/C polimorfisma iespējamo saistību ar klīnisko iznākumu ITN kopējā pētījuma populācijā, statistiskās analīzes rezultāti norāda uz iespējamo IL-6 -174 C alēles un sevišķi CC genotipa saistību ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu.

5.3.4.2 IL-6 (-174 G/C) polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu apakšgrupās

IL-6 -174 G/C saistība ar izdzīvošanu tika analizēta arī slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm. IL-6 -174 G/C genotipu sadalījums izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem ar septisko šoku ir attēlots 41.tabulā.

41.tabula. IL-6 -174 genotipu sadalījums starp izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem ar/bez šoka apakšgrupās

			C/C	C/G	G/G
Septiskā slimnieki ¹	šoka	Izdzīvojušie, n (%)	10 (34,5)	13 (44,8)	6 (20,7)
		Mirušie, n (%)	5 (10,2)	26 (53,1)	18 (36,7)
Slimnieki bez pazīmēm ²	bez šoka	Izdzīvojušie, n (%)	3 (20,0)	8 (53,3)	4 (26,7)
		Mirušie, n (%)	2 (20,0)	6 (60,0)	2 (20,0)

¹ $P=0,924$, Pearson $\chi^2=0,159$

² $P=0,025$, Pearson $\chi^2=7,355$

IL-6 -174 genotipu sadalījuma atšķirības novēro slimniekiem bez šoka pazīmēm ($p=0,025$), bet nenovēro septiskā šoka slimniekiem.

IL-6 -174 G alēles saistība ar klīnisko iznākumu tika testēta dažādos ģenētiskos modeļos atsevišķi slimniekiem ar septiskā šoka pazīmēm un bez tā (42.un 43.tabula)

42. tabula. IL-10 -174 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgu klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos septiskā šoka slimniekiem

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
C/G	14/16	10/10	0,817	0,875 (0,282-2,716)
CC+CG/GG	11/4	8/2	0,702	0,688 (0,100-4,719)
CC/CG+GG	3/12	2/8	1,000	1,000 (0,135-7,395)

43.tabula. IL-10 -174 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgu klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos slimniekiem bez septiskā šoka

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
C/G	33/25	36/62	0,014	2,273 (1,172-4,409)
CC+CG/GG	23/2	31/18	0,008	6,677 (1,407-31,7)
CC/CG+GG	10/19	5/44	0,009	4,632 (1,394-15,39)

Analizējot IL-10 -174 G/C polimorfisma alēļu sadalījumu starp mirušiem un izdzīvojušiem slimniekiem atsevišķi grupās ar šoku un bez tā, nozīmīgas atšķirības konstatētas tikai slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm. Šajā grupā mirušiem slimniekiem tika novērota būtiski augstāka IL6 -174 C alēles frekvence salīdzinot ar izdzīvojušiem (attiecīgi 0,660 un 0,367 $p=0,014$, Pearson χ^2), kas arī nosaka augstāku C alēles nēsāšanas risku mirušiem slimniekiem (OR 2,273, 95% CI 1,172-4,409).

Dominantajā modelī analizējot nelabvēlīga klīniskā iznākuma risku, vismaz vienas IL-6 -174 C alēles kopijas nēsātājiem salīdzinot ar parastās G alēles homozigotām, tika novērota augstāka IL-6 -174 polimorfisma frekvence mirušiem slimniekiem (0,920 un 0,633 $p=0,008$, Pearson χ^2), un, līdz ar to arī augstāks IL-6 -174 C/G polimorfisma nēsāšanas risks mirušiem pētījuma slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm (OR 6,677, 95% CI 1,407-31,7, $p=0,008$).

Recesīvajā modelī salīdzinot IL-6 -174 C alēles homozigotas un vismaz vienas parastās G alēles kopijas nēsātājus tika novērots augstāks CC genotipa biežums mirušiem septiskā šoka slimniekiem (0,344 un 0,102, $p=0,009$, Pearson χ^2).

Statistisko kalkulāciju rezultāti norāda uz IL-6 -174 G/C polimorfisma saistību ar klīnisko iznākumu kopējā pētījuma grupā, ko visvairāk ietekmē novērotās polimorfisma frekvences sadalījuma atšķirības slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm.

5.3.5 Kopsavilkums par IL-6 -174 G/C polimorfismu

- 1) IL-6 līmenis ir augstāks septiskā šoka slimniekiem un mirušiem.
- 2) -174 CC genotips saistīts ar zemāku IL-6 līmeni septiskā šoka slimniekiem, -174 C alēles nēsāšana ir saistīta ar zemāku IL-6 koncentrāciju mirušiem pētījuma slimniekiem.
- 3) -174 C nav saistīts ar septiskā šoka incidenci.
- 4) -174 C alēle un CC genotips saistīts ar augstāku miršanas risku slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm.

5.4 IL-10 -1082 G/A polimorfisms

5.4.1 IL-10 -1082 G/A polimorfisma izplatība kopējā pētījuma populācijā

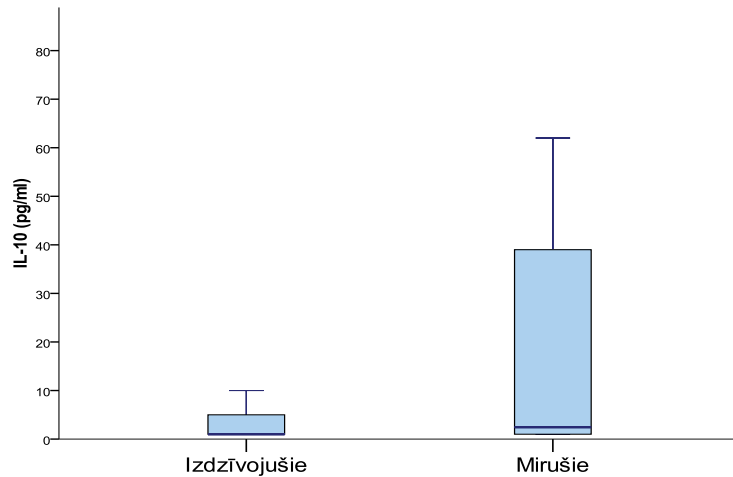
IL-10 -1082 G/A polimorfismu izdevās tipēt visiem pētījuma slimniekiem. IL-10 -1082 G/A polimorfisma un IL-10 -1082 G alēles biežumi kopējā pētījuma populācijā un testējamās apakšgrupās ir norādītas 44.tabulā.

44.tabula. Novērotie IL-10 -1082 G/A polimorfisma un alternatīvas alēles biežumi

Populācija	Novērotā IL-10 -1082 G/A polimorfisma frekvence	Novērotā IL-10 -1082 G alēles frekvence
Kopējā pētījuma populācijā	0,69 (71/103)	0,422
Slimniekiem „ar šoku“	0,72 (18/25)	0,420
Slimniekiem „bez šoka“	0,68 (53/78)	0,423
Izdzīvojušiem	0,61 (36/59)	0,398
Mirušiem	0,80 (35/44)	0,455

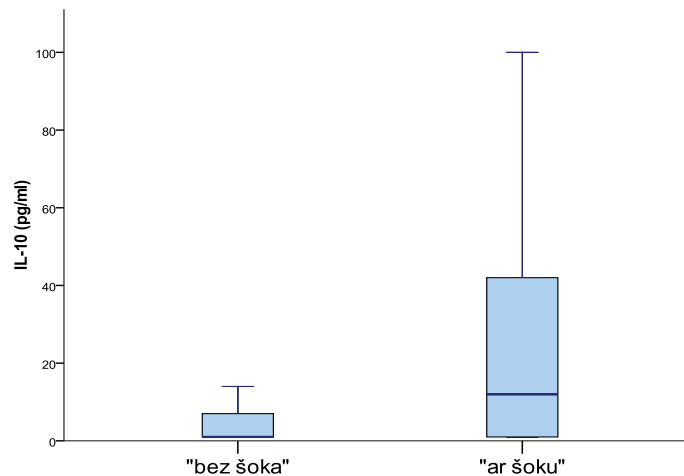
5.4.2 IL-10 cirkulējošā līmeņa saistība ar sepses veidu un klīnisko iznākumu

Testējot IL-10 sistēmiskā līmeņa saistību ar septiskā šoka attīstību un nelabvēlīgo klīnisko prognozi, tā sistēmiskā koncentrācija salīdzināta starp attiecīgām slimnieku apakšgrupām. Izdzīvojošo un mirušo slimnieku grupā augstākas IL-10 seruma koncentrācijas mediānas vērtības novērotas mirušiem slimniekiem [attiecīgi 2 (1/39), (25./75.procentīles), pret 1 (1/7), pg/ml, $p=0,027$, Mann-Whitney U tests], 27.attēls.



27.attēls. IL-10 koncentrācija izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem

Septiskā šoka slimniekiem IL-10 sistēmiskais līmenis bija augstāks nekā smagas sepses slimniekiem [attiecīgi 12 (1/42), (25./75.procentīles), pret 1 (1/7), pg/ml, $p=0,014$, *Mann-Whitney U* tests]. Statistiskās analīzes rezultāti demonstrē nozīmīgas ($p<0,05$) atšķirības IL-10 koncentrācijās starp pētāmajām apakšgrupām, kas norāda uz iespējamo IL-10 sistēmiskā līmeņa saistību ar septiskā šoka attīstību un sepses klīnisko prognozi.



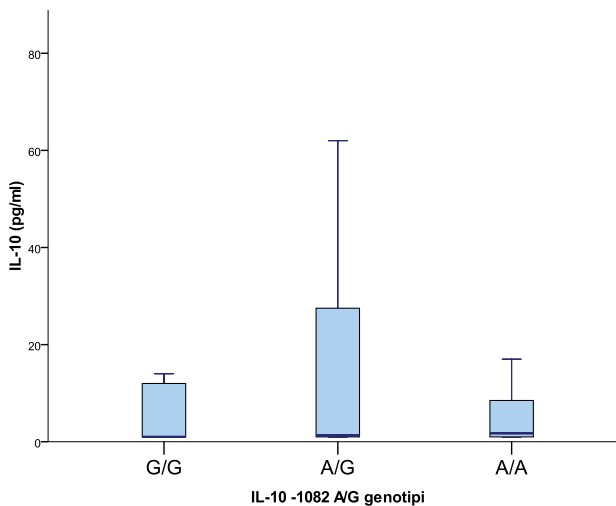
28.attēls. IL-10 koncentrācija slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm

5.4.3 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar IL-10 sistēmisko koncentrāciju

5.4.3.1 IL-10 -1082 genotipu (un -1082 G) saistība ar IL-10 sistēmisko koncentrāciju kopējā pētījuma populācijā

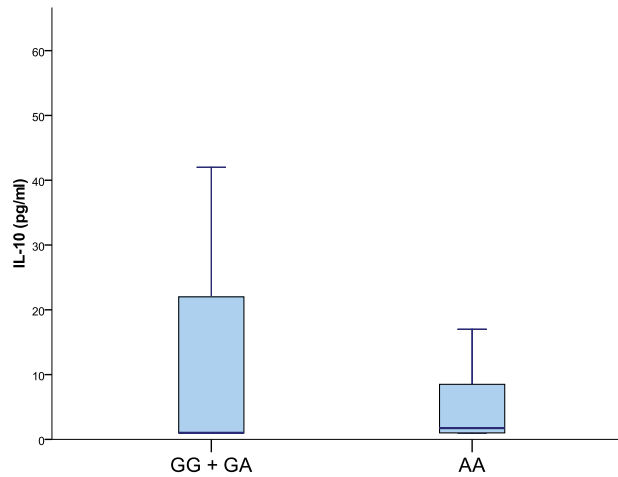
Lai pārbaudītu izvirzīto hipotēzi par IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar IL-10 koncentrāciju asins serumā, pētījuma populācija tika sadalīta pēc attiecīgiem genotipiem (G/G, A/G un A/A) trīs apakšgrupās. Katrā tika noteikta IL-10 sistēmiskā līmeņa centrālā tendence (mediāna) un izvērtēta datu izkliede (25./75.procentīles), un visas grupas salīdzinātas savā starpā.

Analizējot starpgrupu IL-10 mediānas plazmas līmeņu vērtības kopējā pētījuma populācijā, statistiski nozīmīgas atšķirības netika novērotas [G/G genotipam - 1 (1/12), pg/ml (25/75 procentiles), A/G - 1 (1/30), A/A - 2 (1/9), $p=0,72$, *Kruskal Wallis tests*], 29.attēls.



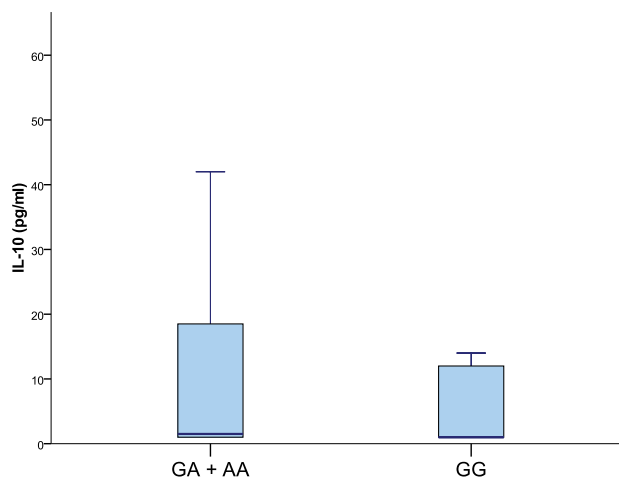
29.attēls. IL-10 sistēmiskās koncentrācijas atkarībā no IL-10 -1082 genotipa

Dominantajā modelī IL-10 sistēmiskās koncentrācijas tika salīdzinātas arī starp alternatīvās alēles nēsātājiem (GG un GA genotipi) un parastās alēles homozigotām (AA), bet nozīmīgas atšķirības netika novērotas [attiecīgi 1 (1/24), (25./75.procentīles), pret 2 (1/9), $p=0,7$; *Mann-Whitney U tests*], 30.attēls.



30.attēls. IL-10 sistēmiskā koncentrācija dominantajā ģenētiskajā modelī

Recesīvajā modelī, salīdzināta IL-10 sistēmiskā koncentrācija GG genotipam ar parasto A alēli saturošiem genotipiem (GA un AA), bet nozīmīgas atšķirības nav atrastas [attiecīgi 2(/20), (25./75.procentīles), pret 1(1/12), $p=0,5$; *Mann-Whitney U tests*], 31.attēls.



31.attēls. IL-10 sistēmiskā koncentrācija recesīvajā ģenētiskajā modelī

Datu analīzes rezultāti neatbalsta hipotēzi par IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar IL-10 sistēmisko koncentrāciju **kopējā** sepses slimnieku **populācijā**.

5.4.3.2 IL-10 -1082 genotipu (un -1082 G) saistība ar IL-10 sistēmisko koncentrāciju apakšgrupās

Pārbaudot IL-10 -1082 G/A genotipa saistību ar cirkulējošā IL-10 koncentrāciju **izdzīvojušiem un mirušiem** pētījuma slimniekiem, nozīmīgu atšķirību nenovēro (45.tabula).

45.tabula. IL-10 līmeņu sadalījums IL-10 -1082 genotipu grupās atkarībā no klīniskās prognozes

	G/G	A/G	A/A	P vērtība ²
Izdzīvojušie	1 (1/12) ¹	1 (1/3)	2 (1/7)	0,75
Mirušie	2 (1/12)	8 (1/42)	2 (1/24)	0,72

¹ IL-10 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Kruskal Wallis tests

IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar IL-10 koncentrāciju **izdzīvojušiem un mirušiem** slimniekiem tika analizēta dominantajā (46.tabula) un recesīvajā (47.tabula) modelī.

46.tabula. IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar IL-10 koncentrāciju dominantajā modelī (izdzīvojušiem/mirušiem)

	GG+GA	AA	P vērtība ²
Izdzīvojušie	1 (1/5)	2 (1/7)	0,45
Mirušie	4 (1/42)	2 (1/24)	0,47

¹ IL-10 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Mann Whitney U tests

47.tabula. IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar IL-10 koncentrāciju recesīvajā modelī (izdzīvojušiem/mirušiem)

	GG	GA+AA	P vērtība ²
Izdzīvojušie	1 (1/12)	1 (1/5)	0,89
Mirušie	2 (1/12)	3 (1/40)	0,69

¹ IL-10 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Mann Whitney U tests

Pārbaudot IL-10 -1082 G/A genotipu saistību ar cirkulējošā IL-10 koncentrāciju slimniekiem **ar un bez septiskā šoka**, nozīmīgu atšķirību nenovēro (48.tabula).

48.tabula. IL-10 līmeņu sadalījums IL-10 -1082 genotipu grupās ar/bez šoka slimniekiem

	G/G	A/G	A/A	P vērtība ²
Septiskā šoka slimnieki ¹	1 (1/12) ¹	25 (2/68)	2 (1/24)	0,16
Slimnieki bez šoka pazīmēm	1 (1/12)	1 (1/10)	2 (1/2)	0,87

¹ IL-10 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Kruskal Wallis tests

IL-10 -1082 genotipu saistība ar cirkulējošo IL-10 tika testēta arī **dominantajā** (49.tabula) un **recesīvajā** modelī (50.tabula).

49.tabula. IL-10 līmeņu sadalījums slimniekiem ar/bez šoka IL-10 -1082 genotipu dominantajā modelī

	GG+GA	AA	P vērtība ²
Bez šoka	1(1/12)	2 (1/2)	0,688
Ar šoku	18 (1/62)	2 (1/24)	0,326

¹ IL-10 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Kruskal Wallis tests

50.tabula. IL-10 līmeņu sadalījums slimniekiem ar/bez šoka IL-10 -1082 genotipu recesīvajā modelī

	GG	GA+AA	P vērtība ²
Bez šoka	1 (1/12)	1(1/7)	0,688
Ar šoku	1 (1/12)	18(1/62)	0,326

¹ IL-10 koncentrācija asins serumā (pg/ml) norādīta kā mediāna un (25./75.procentīles)

² Kruskal Wallis tests

Kopsavilkums. IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar IL-10 koncentrāciju asins serumā nenovēro ne kopējā pētījuma populācijā, nedz arī testējamās apakšgrupās (izdzīvojušie/mirušie un ar/bez šoka pazīmēm).

5.4.4 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci

5.4.4.1 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci kopējā pētījuma populācijā

Ar mērķi noteikt IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar predispozīciju septiskam šokam, tika veikts genotipu (G/G, G/A, A/A) biežumu salīdzinājums slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm, tomēr statistiski ticama atšķirība netika novērota (51.tabula).

51.tabula. IL-10 -1082 G/A genotipu sadalījums slimniekiem ar/bez septiskā šoka

	GG	GA	AA
Ar šoku, n (%)	3 (12,0)	15 (60,0)	7 (28,0)
Bez šoka, n (%)	13 (16,7)	40 (51,3)	25 (32,1)

P=0,73, $\chi^2=0,635$

IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību ir testēta arī dažādos ģenētiskos modeļos 52. tabulā.

52.tabula. IL-10 -1082 polimorfisma asociācija ar septiskā šoka incidenci dažādos ģenētiskos modeļos kopējā pētījuma populācijā

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
G/A	21/29	56/90	0,649	1,164 (0,606-2,236)
GG+GA/AA	18/7	53/25	0,703	1,213 (0,449-3,278)
GG/GA+AA	3/22	13/65	0,575	0,68 (0,178-2,618)

Kopējā pētījuma populācijā analizējot iespējamo IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar septiskā šoka attīstību, tā nav novērota nevienā no testējamiem ģenētiskiem modeļiem.

5.4.4.2 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci apakšgrupās

IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību ir izvērtēta arī izdzīvojušo un mirušo slimnieku apakšgrupās (53.tabula).

53.tabula. IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem

		GG	GA	AA
Izdzīvojušie ¹	Ar šoku, n (%)	1 (10,0)	3 (30,0)	6 (60,0)
	Bez šoka, n (%)	10 (20,4)	22 (44,9)	17 (34,7)
Mirusie ²	Ar šoku, n (%)	2 (13,3)	12 (80,0)	1 (6,7)
	Bez šoka, n (%)	3 (10,3)	18 (62,1)	8 (27,6)

¹P=0,320, Pearson $\chi^2=2,282$

²P=0,265, Pearson $\chi^2=2,659$

Salīdzinot IL10 -1082 genotipu sadalījumus slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm nozīmīgas atšķirības nenovēro nedz izdzīvojušo, nedz arī mirušo slimnieku apakšgrupās.

IL-10 -1082 polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību ir testēta arī vairākos ģenētiskos modeļos (54.un 55.tabula)

54.tabula. IL-10 -1082 saistība ar septiskā šoka attīstību dažādos ģenētiskos modeļos izdzīvojušiem

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
G/A	5/15	42/46	0,064	0,365 (0,122-1,091)
GG+GA/AA	4/6	32/17	0,135	0,354 (0,088-1,429)
GG/GA+AA	1/9	10/39	0,441	0,433 (0,049-3,832)

55.tabula. IL-10 -1082 saistība ar septiskā šoka attīstību dažādos ģenētiskos modeļos mirušiem

	Ar šoku	Bez šoka	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
G/A	16/14	24/34	0,286	1,619 (0,667-3,932)
GG+GA/AA	14/1	21/8	0,103	5,333 (0,599-47,5)
GG/GA+AA	2/13	3/26	0,767	1,333 (0,198-8,996)

Testējot IL-10 -1082 G/A polimorfisma iespējamo saistību ar septiskā šoka attīstību mirušiem un izdzīvojušiem slimniekiem, tā nav novērota nevienā no pielietotiem ģenētiskiem modeļiem, kaut gan izdzīvojušo slimnieku apakšgrupā alēļu sadalījuma atšķirības tuvojas statistiski ticamai pieņemtai vērtībai (alternatīvās alēles biežumi slimniekiem ar un bez šoka attiecīgi – 0,25 un 0,49, $p=0,064$, Pearson χ^2).

Kopsavilkums. Statistiskās kalkulācijas neatbalsta hipotēzi par iespējamo IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar septiskā šoka incidenci.

5.4.5 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu

5.4.5.1 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu kopējā pētījuma grupā

Testējot IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar klīnisko iznākumu, tika novērotas nozīmīgas genotipu sadalījuma atšķirības izdzīvojušiem un mirušiem sepses slimniekiem (56.tabula).

56.tabula. IL-10 -1082 G/A genotipu sadalījums starp izdzīvojušajiem un mirušajiem slimniekiem

	G/G	A/G	A/A
Izdzīvojušie, n (%)	11 (18,6%)	25 (42,4%)	23 (39,0%)
Mirušie, n (%)	5 (11,4%)	30 (68,2%)	9 (20,5%)

P=0,034, Pearson $\chi^2=6,789$

Alternatīvās IL-10 -1082 G alēles saistība ar klīnisko iznākumu analizēta arī dažādos ģenētiskos modeļos (57.tabula).

57.tabula. IL-10 -1082 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos kopējā pētījuma populācijā

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
G/A	40/48	47/71	0,418	1,26 (0,72-2,20)
GG + GA/AA	35/9	36/23	0,044	2,49 (1,01-6,11)
GG/GA + AA	5/39	11/48	0,313	0,56 (0,18-1,75)

Salīdzinot IL-10 -1082 G/A polimorfisma alēļu sadalījumu starp mirušiem un izdzīvojušiem slimniekiem, būtiskas atšķirības nenovēro.

Dominantajā modelī analizējot miršanas risku alternatīvas alēles nēsātājiem, indivīdus ar vismaz vienu alternatīvas G alēles kopiju salīdzināja ar parastās alēles homozigotām. Statistiskie testi norāda uz augstāku IL-10 -1082 G/A polimorfisma biežumu mirušiem slimniekiem (attiecīgi 0,80 un 0,61, $p=0,044$, Pearson χ^2) un līdz ar to arī augstāku G alēles nēsāšanas risku mirušiem slimniekiem (OR 2,49, 95% CI 1,01-6,11, $p=0,044$).

Recesīvajā modelī būtiska atšķirība starp mirušiem un izdzīvojušiem netika novērota.

5.4.5.2 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu apakšgrupās

Turpinot analizēt IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar izdzīvošanas prognozi, genotipu sadalījuma nozīmīgas atšķirības tika novērotas septiskā šoka apakšgrupā, bet netika novērotas sepses slimniekiem bez šoka pazīmēm (58.tabula).

58.tabula. IL-10 -1082 genotipu sadalījums starp izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem ar/bez šoka apakšgrupās

			G/G	A/G	A/A
Septiskā slimnieki ¹	šoka	Izdzīvojušie, n(%)	1 (10,0)	3 (30,0)	6 (60,0)
		Mirušie, n(%)	2 (13,3)	12 (80,0)	1 (6,7)
Smagas slimnieki ²	sepses	Izdzīvojušie, n(%)	10 (20,4)	22 (44,9)	17 (34,7)
		Mirušie, n(%)	3 (10,3)	18 (62,1)	8 (27,6)

¹P=0,013, Pearson $\chi^2=8,651$

²P=0,295, Pearson $\chi^2=2,442$

IL-10 -1082 alēles saistība ar klīnisko iznākumu tika testēta dažādos ģenētiskos modeļos atsevišķi slimniekiem ar septiskā šoka pazīmēm un bez tā (59.un 60.tabula).

59.tabula. IL-10 -1082 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos septiskā šoka slimniekiem

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
G/A	16/14	5/15	0,047	3,429 (0,992-11,884)
GG+GA/AA	14/1	4/6	0,007 ¹	21,0 (1,9-229,4)
GG/GA+AA	2/13	1/9	0,802	1,385 (0,108-17,7)

¹ Fisher's Exact tests

60.tabula. IL-10 -1082 polimorfisma asociācija ar nelabvēlīgo klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos slimniekiem bez septiskā šoka

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pearson χ^2)	OR (95% CI)
G/A	24/34	42/46	0,451	0,773 (0,396-1,510)
GG+GA/AA	21/8	32/17	0,516	1,395 (0,511-3,808)
GG/GA+AA	3/26	10/39	0,249	0,450 (0,113-1,793)

Statistiski ticamas atšķirības konstatē tikai septiskā šoka slimniekiem, kuriem novēro augstāku IL-10 -1082 G alēles frekvenci (attiecīgi 0,53 un 0,25, p=0,047, Pearson χ^2), kas nosaka arī augstāku G alēles nēsāšanas risku mirušiem septiskā šoka slimniekiem (OR 3,429, 95% CI 0,992-11,884). Jāatzīmē, ka p vērtība šajā testā ir ļoti tuvu pieņemtai ticamības robežai.

Dominantajā modelī IL-10 -1082 G/A polimorfisma frekvence arī ir augstāka mirušiem septiskā šoka slimniekiem (attiecīgi 0,72 un 0,65, $p=0,004$, Pearson χ^2), līdz ar ko arī -1082 G/A polimorfisma nēsāšanas risks ir nozīmīgi augstāks mirušiem (OR 21,0, 95% CI 1,9-229,4).

Recesīvajā modelī būtiskas atšķirības nenovēro.

Kopsavilkums. Statistiskā analīze norāda uz nozīmīgām IL-10 -1082 G/A polimorfisma sadalījuma atšķirībām izdzīvojušiem un mirušiem septiskā šoka slimniekiem, kas lielā mērā nosaka novērotās atšķirības kopējā pētījuma populācijā.

5.4.6 Kopsavilkums par IL-10 (-1082 G/A) polimorfismu

1. IL-10 seruma līmenis **ir augstāks** septiskā šoka slimniekiem un neizdzīvojušiem.
2. -1082G/A polimorfisms nav saistīts ar IL-10 līmeni.
3. -1082G/A polimorfisms nav saistīts ar septiskā šoka incidenci.
4. -1082G/A polimorfisms **ir saistīts** ar augstāku miršanas risku septiskā šoka slimniekiem.

6. Diskusija

6.1 Ievads

Darba galvenais mērķis bija izvērtēt saistību starp iepriekš aprakstītiem sepses patoģenēzē iesaistīto citokīnu viena nukleotīda polimorfismiem un sepses klīniskās gaitas un prognozes īpatnībām ITN slimnieku populācijā. Darbā analizēta izvēlēto polimorfismu asociācija ar attiecīgo citokīnu sistēmisko līmeni, septiskā šoka incidences un klīniskā iznākuma raksturlielumiem.

Šim pētījumam izvēlēto citokīnu (TNF α , IL-6, IL-10) svarīga loma sepses patoģenēzē ir aprakstīta vairākos līdzšinējos pētījumos. Šo citokīnu gēnos ir aprakstīti vairāki viena nukleotīda polimorfismi, kam vairākos eksperimentālos un klīniskos pētījumos mēģināts pierādīt funkcionālo nozīmīgumu. Pamatojoties uz literatūras analīzi, katram citokīnam darba autors izvēlējās nozīmīgāko viena nukleotīda kandidātpolimorfismu. TNF gēnam – A/G polimorfismu promotera -308. pozīcijā, IL-6 G/C -174. pozīcijā un IL-10 G/A -1082. pozīcijā. Visiem pētījumam izvēlētiem polimorfismiem ir joprojām neskaidrs funkcionālais nozīmīgums sepses slimnieku populācijā, par ko liecina pretrunīgi līdzšinējo publikāciju dati (*sīkāk aplūkoti literatūras analīzes sadaļā*).

Par pētāmo populāciju izvēlēta ITN septisko slimnieku populācija – slimnieki ar smagāko infekcijas izraisīto sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma klīnisko gaitu, kuriem attīstījies orgānu mazspējas sindroms. Pētījuma slimniekiem ir tipēti pētāmie polimorfismi, kā arī noteikta citokīnu sistēmiskā koncentrācija pētījuma iekļaušanas dienā. Tika noteikti arī citi klīniskā fenotipa raksturlielumi (stāvokļa smagums pēc SOFA skalas utt.). Visi slimnieki ārstēti pēc vispārpieņemtiem standartiem.

Diskusijas sadaļas struktūra:

Pētījuma kopējās populācijas un analizējamo apakšgrupu svarīgāko epidemioloģisko raksturlielumu analīze ar mērķi precizēt to reprezentatīvo vērtību (salīdzinot ar publicētiem datiem).

Polimorfismu novērotās saistības analīze, salīdzinot ar citiem pētījumiem un atšķirību interpretācija.

Kopsavilkums par pētījuma hipotēzes testēšanu un rezultātu interpretāciju.

6.2 Svarīgāko epidemioloģisko raksturlielumu analīze

Saskaņā ar darba uzdevumiem, pētījuma rezultātā ir iegūti sistematizēti un statistiski apstrādāti 103 pieaugušo ITN sepses pacientu demogrāfiskie, epidemioloģiskie, klīniskie un laboratoriskie (tajā skaitā arī ģenētiskie) dati. Pirmo reizi Latvijā šai slimnieku populācijai ir tipēti

citokīnu gēnu polimorfismi un iegūtā informācija attiecināta uz epidemioloģiskām un klīniskām sepses gaitas īpatnībām.

Ar mērķi raksturot pētījuma populāciju un izvērtēt tās reprezentatīvo vērtību, tajā un arī pētāmās apakšgrupās veikta svarīgāko demogrāfisko un epidemioloģisko raksturlielumu analīze un iegūtie dati salīdzināti ar literatūrā publicētiem.

Slimnieku *demogrāfiskās īpatnības* (vecums, dzimums) tika analizētas gan kopējā pētījuma grupā, gan salīdzinātās izdalītās apakšgrupās (t.i. izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem, un ar/bez septiskā šoka pazīmēm). Kopējā pētījuma populācijā vidējais vecums - 59 gadi, un atsevišķās apakšgrupās nav īpaši izteiktas vecuma svārstības. Savukārt analizējot dzimumu kopējā populācijā, dominē vīrieši (75%). Līdzīga tendence tika novērota arī apakšgrupās. Salīdzinot dzimumu sadalījumu apakšgrupās, nozīmīgas atšķirības nav novērotas. Šie novērojumi daļēji atbalsta iepriekšējās publikācijās ziņoto sepses un septiskā šoka incidences pozitīvo korelāciju ar vecumu (ar maksimumu ap 60 gadiem), kā arī ar vīriešu dzimumu [1, 22]. Līdzīgi, kā virkne iepriekšējo pētījumu, promocijas darba autors nenovēroja dzimuma saistību ar mirstību ne kopējā populācijā, ne septiskā šoka slimniekiem [21-23].

Autora veiktajā pētījumā novērotā *ITN mirstība* kopējā populācijā sasniedza 43%, bet apakšgrupās - sepses slimniekiem bez šoka pazīmēm – 37%, septiskā šoka slimniekiem 60%. Līdzšinējos epidemioloģiskajos pētījumos iegūti variabli dati par sepses slimnieku mirstību ITN. Pēc *Padkin* un līdzautoru multicentru retrospektīva pētījuma hospitālā mirstība slimniekiem, kuriem iestāšanās dienā uzstādīta sepses diagnoze, sastāda 47,3% [19]. „*Finnsepsis*” pētījumā sepses slimniekiem novēroja hospitālo mirstību 28,3%, bet viena gada mirstību 40,9% [133]. Vienā no lielākajiem sepses epidemioloģijai veltītajiem pētījumiem ar 14364 vairāku Eiropas valstu, Kanādas, Izraēlas ITN slimniekiem novērota hospitālā mirstība ap 50% [29]. Francijas ITN smagas sepses un septiskā šoka slimniekiem novērotā mirstība bija 56% [134]. Mirstība slimniekiem ar septisko šoku ir krietni augstāka un sasniedz pat 81,8% [135]. Ņemot vērā publicēto pētījumu metodoloģiskās atšķirības pacientu atlases un iegūto datu apstrādes un prezentācijas metodēs, rezultātu tiešā salīdzināšana ir apgrūtināta. Bet tajā pat laikā būtu jāatzīmē, ka pētījumā iegūtie dati būtiski neatšķiras no iepriekš publicētiem.

Slimnieku *orgānu mazspējas* pakāpi vērtēja pēc SOFA skalas, kas ietver 6 svarīgāko orgānu sistēmu funkciju traucējumu kvantitatīvas novērtēšanas apkopoto rezultātu. Pētījuma slimniekiem mediānā SOFA skalas vērtība bija 7 punkti, bet starpkvantīlu intervāls – 4-10 punkti. Ņemot vērā, ka SOFA skalas iespējamais vērtēšanas intervāls ir 0-24 punkti, pētījuma slimniekiem pārsvarā novēroja vidēji izteiktu orgānu sistēmu disfunkciju. Izteikti smago (SOFA>13 punktu) pacientu skaits nepārsniedza 10%. Jāatzīmē, ka īstais SIRS izraisītās orgānu sistēmu disfunkcijas smagums varētu būt zemāks, jo vērtējot orgānu mazspējas smagumu ar SOFA skalu, vērā tiek ņemts aktuālais svarīgāko orgānu sistēmu funkcionālais stāvoklis. Citiem vārdiem, nav iespējams atšķirt esošo

hronisko orgānu mazspēju no SIRS izraisītās akūtās. Līdz ar to slimniekiem ar esošo hronisko orgānu mazspēju pie līdzīgas SIRS intensitātes varētu būt augstāks SOFA skalas punktu skaits nekā iepriekš veselam indivīdam. Pētījuma slimniekiem novēroja augstu hroniskās blakuspatoloģijas prevalenci. Tajā pat laikā pacientu ar smagas pakāpes hronisko orgānu mazspēju bija samērā maz – 14%. Pārsvārā tie bija slimnieki ar kombinēto hronisko elpošanas, sirds vai nieru mazspēju.

Analizējot *ITN ārstēšanas ilgumu* pētījuma kopējās populācijas slimniekiem, centrālās tendences un datu izkliedes raksturojumam pielietojām mediānu un starpkvantīļu intervālu, jo datu izkliede neatbilst normālam sadalījumam. Pētījuma populācijai ārstēšanas ilgums ITN svārstījās no 1 diennakts (dnn) līdz 56 dnn. Ņemot vērā, ka šā pētījuma metodoloģijā nebija paredzēts slimnieku novērošanas ierobežojums, tas ir reāls ITN ārstēšanas ilgums apsekotai grupai. ITN ārstēšanas ilguma mediāna bija 11 dnn, starpkvantīļu intervāls 4-17 dnn. Interesanti, ka 10% slimnieku ārstējušies ITN <1,4 diennakti (10 procentile). Sīkāk analizējot šos gadījumus konstatējam, ka no tiem 3 tika pārvesti uz citām nodaļām pēc stāvokļa stabilizācijas, bet 7 pacienti ir miruši. Salīdzinot ITN ārstēšanas ilgumu testējamās apakšgrupās nozīmīgu atšķirību nenovērojam.

Jāatzīmē, ka analizējamās apakšgrupās izvērtēšanas potenciālu ietekmējošie faktori būtiski neatšķīrās, kas sniedz iespēju attiecināt novērotās atšķirības uz testējamo polimorfismu efektiem.

Salīdzinot pētījumā iegūtos demogrāfiskos un klīniskos riska un iznākuma raksturlielumus ar literatūrā ziņotajiem, būtiskas atšķirības nav novērotas, kas liecina par zināmo pētāmās populācijas un ITN ārstēšanas metožu līdzību un sniedz iespēju salīdzināt pētījumā iegūtos datus ar citu autoru publikācijām.

6.3 TNF -308 A/G

TNF α ir nozīmīgs proinflatators citokīns, kam novērota svarīga loma sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma attīstībā. Tieši ar TNF sistēmiskiem efektiem saista vairākas septiskā šoka izpausmes. Saskaņā ar izvirzīto pētījuma hipotēzi, TNF A gēna strukturālās izmaiņas spēj ietekmēt citokīna (TNF α) ekspresiju (cirkulējošo līmeni) un līdz ar to ietekmēt sepses klīnisko gaitu (septiskā šoka attīstību vai kopējo mirstību). TNF A gēna promoterā -308. pozīcijā aprakstīts viena nukleotīda polimorfisms (A/G). Šim polimorfismam novēro funkcionālo nozīmīgumu saistībā ar vairākām patoloģijām ģenētisko asociāciju pētījumos. Asociāciju pētījumu rezultāti sepses slimnieku populācijā sniedz pretrunīgus datus par iespējamo TNF A -308 polimorfisma funkcionālo nozīmīgumu.

6.3.1.1 TNF A -308 A/G polimorfisma izplatība kopējā pētījuma populācijā

Mūsu pētījumā novērota TNF A -308 A/G polimorfisma frekvence kopējā pētījuma populācijā - 36%, bet novērotā alternatīvās TNF -308 A alēles frekvence - 19% (zemāka alēles frekvence ir izskaidrojama ar lielu alternatīvas alēles heterozigotu skaitu).

Apkopotie dati no svarīgākiem līdzšinējiem pētījumiem līdzīgās populācijās ir norādīti 61.tabulā.

61. tabula. Pētījumā novērotās TNF A –308 A/G polimorfisma un alternatīvās alēles frekvences salīdzinājums ar līdzšinējām publikācijām

Autors	Pētījuma populācija	Novērotā TNF -308 polimorfisma frekvence kontroles grupā	Novērotā TNF -308 polimorfisma frekvence pētījuma populācijā	Novērotā TNF -308 A alēles frekvence pētījuma populācijā
Autora pētījums	Latvija, ITN sepses slimnieki, n=99	-----	0,36	0,19
<i>Mira</i> grupas pētījums [62]	Francija, ITN septiskā šoka slimnieki, n=89	0,18	0,39	0,21
<i>Tang</i> grupas pētījums [63]	Taivāna, ITN sepses slimnieki, n=112	0,10 ¹	0,23	0,12
<i>Gordon</i> grupas pētījums[69]	Lielbritānijas un Austrālijas, ITN sepses slimnieki, n=213	0,34	0,36	0,20

¹ Pētījumā nebija veselo indivīdu kontroles grupas, bet rezultāti salīdzināti ar kontroles grupu no cita pētījuma Taivānas populācijā [136].

Autora pētījumā novērotā polimorfisma frekvence ir līdzīga līdzšinējos pētījumos ziņotām attiecīgām populācijām. Jāatzīmē, ka polimorfisma frekvence veselo indivīdu kontroles grupās ir būtiski atšķirīga (0,1-0,34), bet ITN sepses slimnieku populācijā svārstās salīdzinoši šaurās (0,3-0,4) robežās.

Nedaudz atšķirīgus datus ziņo *Tang* grupa, kura novēroja zemāko polimorfismu un alternatīvās alēles frekvences. Iespējamais izskaidrojums ir zemāka TNF polimorfisma frekvence Taivānas vispārējā populācijā.

6.3.1.2 Svarīgākās pētījumā novērotās asociācijas:

TNF A -308A nav saistīta ar TNF α līmeni.

TNF A -308A nav saistīta ar septiskā šoka incidenci.

TNF A -308A nav saistīta ar klīnisko iznākumu.

6.3.1.3 TNF A -308 A/G polimorfisma saistība ar cirkulējošo TNF α līmeni

TNF α cirkulējošā līmeņa nozīmi septiskā šoka attīstībā un klīniskā iznākumā kārtējo reizi apstiprināja mūsu pētījumā novērotā šī citokīna augsta koncentrācija mirušo un septiskā šoka slimnieku asins serumā. Autora iegūtie rezultāti atbalsta virkni līdzšinējo pētījumu atradi [47, 48].

Pētījuma rezultāti neapstiprina izvirzīto hipotēzi par TNF -308 A/G polimorfisma saistību ar TNF α cirkulējošo līmeni nedz kopējā pētījuma populācijā, ne arī testējamās apakšgrupās. Vairākumā līdzšinējo publikāciju šī saistība arī nav novērota testējot dažādas septisko slimnieku subpopulācijas [62, 66, 69].

Vismaz vienā publikācijā ITN septiskā šoka slimnieku populācijā ir ziņota TNF -308 A/G polimorfisma un TNF α cirkulējošā līmeņa asociācija [63]. Šajā pētījumā ITN slimniekiem, kuriem attīstījās septiskais šoks, novēroja augstāku TNF α līmeni TNF -308 polimorfisma nēsātājiem, salīdzinot ar parastā genotipa slimniekiem (attiecīgi GA un GG genotipiem, vidējais (pg/ml), $\pm$ SD, 1526,7 ($\pm$ 804) un 971,7 ($\pm$ 716): $p < 0,05$, *Student's t test*). Analizējot šo ziņojumu jāpievērš uzmanība, ka datu analīzei pielietotas parametriskās statistikas metodes. Kaut gan autori ziņo, ka pētāmo nepārtraukto mainīgo (dotajā gadījumā TNF α koncentrācija asins serumā) sadalījumi atbilst normālajam, apliecināto testu rezultāti nav norādīti un pievienotajā attēlā tas nav skaidri saskatāms, 32.attēls.

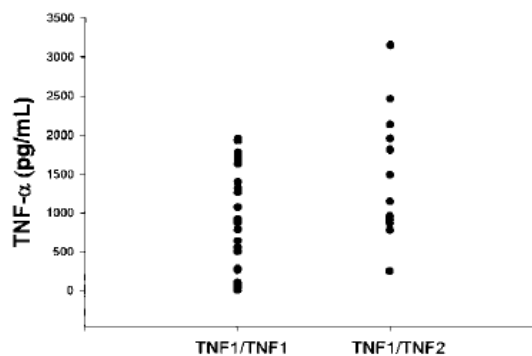


Figure 4. Peak plasma tumor necrosis factor (TNF)- α levels in patients who developed septic shock TNF1/TNF1 and TNF1/TNF2 patients.

32.attēls. Tang un līdzautoru rezultāti par TNF -308 polimorfisma saistību ar TNF α maksimālo koncentrāciju asins serumā [63]

Aprakstītās metodoloģiskās atšķirības apgrūtina autora pētījuma iegūto rezultātu salīdzināšanu ar Tang un līdzautoru publicētiem.

6.3.1.4 TNF A -308 A/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka attīstību

Veiktajā pētījumā neizdevās demonstrēt TNF -308 A/G polimorfisma saistību ar paaugstināto septiskā šoka attīstības risku ITN sepses slimnieku populācijā. Literatūras dati ir pretrunīgi un lielā mērā atkarīgi no testējamām subpopulācijām (62.tabula).

62.tabula. TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenti svarīgākās līdzšinējās publikācijās

Autors	Pētījuma populācija	Kontroles populācija	Novērotā TNF A - 308 A/G polimorfisma frekvence septiskā šoka slimniekiem	Novērotā TNF A - 308 A/G polimorfisma frekvence kontroles grupā	P vērtība, OR (95% CI)
Autora pētījums	Latvija, ITN septiskā šoka slimnieki, n=25	ITN slimnieki bez šoka pazīmēm (n=74)	0,38	0,36	0,89 1,07 (0,41-2,76)
Mira grupas pētījums [62]	Francija, ITN septiskā šoka slimnieki, n=89	Veseli indivīdi (n=87)	0,39	0,18	0,002 2,88 (1,44-2,09)
Tang grupas pētījums [63]	Taivāna, ITN sepses slimnieki, n=112	ITN slimnieki bez šoka pazīmēm (n=70)	0,31	0,19	0,13 1,97 (0,81-4,78)

Mira ar līdzautoriem ziņo par TNF A -308 polimorfisma saistību ar septiskā šoka attīstību salīdzinot polimorfisma frekvences starp ITN septiskā šoka slimniekiem un veselo indivīdu grupām [62]. Ņemot vērā, ka mūsu pētījumā polimorfisma frekvence salīdzināta slimniekiem ar un bez šoka pazīmēm (nevis ar veselo indivīdu kontroles grupu), ir problemātiski korekti salīdzināt pētījuma rezultātus. Jāatzīmē, ka novērotā polimorfisma frekvence septiskā šoka slimniekiem abos pētījumos ir praktiski identiska (kas liecina par zināmu pētāmās populācijas līdzību).

Dianliang grupas pētījumā aprakstīta augstāka TNF -308 alternatīvas alēles frekvence akūta smaga pankreatīta slimniekiem ar agrīno septisko šoku salīdzinot ar slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm (53.8% un 22.4%; $p = 0.003$) [66]. Šis pētījums ir interesants, jo pēc dizaina līdzīgs mūsu pētījumam - salīdzināti slimnieki ar un bez šoka pazīmēm. Bet pētījuma kopējās populācijas atlases kritēriji ir būtiski atšķirīgi (mūsu pētījumā pārsvarā iekļauti slimnieki ar pulmonālās izcelsmes sepsi).

Tajā pat laikā *Tang* pētījumā iegūtie rezultāti, salīdzinot ITN sepses slimniekus ar un bez septiskā šoka pazīmēm, līdzīgi mūsu pētījuma rezultātiem, TNF -308 polimorfisma frekvences būtiski neatšķiras [63]. Autora dati atbalsta arī *Calvano* pētījumu, kur slimniekiem ar SIRS pazīmēm

nav novērota alternatīvas alēles saistība ar septiskā šoka attīstību, bet alternatīvās A alēles frekvence 17% ir līdzīga 19% mūsu pētījumā [137].

Kopsummā autora iegūtie rezultāti ir līdzīgi pētījumiem, kur polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci testēta ITN slimniekiem, bet kontroles grupa bija līdzīga mūsu pētījuma slimniekiem bez šoka pazīmēm.

6.3.1.5 TNF A -308 A/G polimorfisma saistība ar mirstību

Saskaņā ar pētījuma rezultātiem TNF A -308 A/G polimorfisms nav saistīts ar klīnisko iznākumu ITN sepses slimnieku populācijā. Šim jautājumam veltīto līdzšinējo publikāciju dati arī ir samērā pretrunīgi (63.tabula).

63.tabula. TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu svarīgākās līdzšinējās publikācijās

Autors	Populācija	Novērotā mirstība kopējā pētījuma grupā	Septiskā šoka incidence pētījuma grupā	Novērotā mirstība septiskā šoka slimniekiem	TNF -308 polimorfisma biežumi izdzīvojušiem un mirušiem kopējā populācijā	TNF -308 polimorfisma biežumi izdzīvojušiem un mirušiem septiskā šoka slimniekiem
Autora pētījums	Latvija, ITN sepses slimnieki, n=99	42,7% (n=44)	24,3% (n=25)	60,0% (n=15)	0,38 un 0,34 (p=0,70) OR 0,84 (0,37-1,95)	0,30 un 0,43 (p=0,68) OR 1,75 (0,31-9,75)
Mira grupas pētījums [62]	Francija, ITN septiskā šoka slimnieki, n=89	----	-----	53,9% (n=48)	-----	0,24 un 0,52 (p=0,008) OR 3,37 (1,36-8,37)
Tang grupas pētījums [63]	Ķīnas, ITN sepses slimnieki, n=112	51%	37% (n=42)	71%	0,18 un 0,28 (p=0,22)	0,03 un 0,4 (p<0,05)
Gordon grupas pētījums [69]	Lielbritānijas un Austrālijas, ITN sepses slimnieki, n=213	24,4% (n=52)	----	-----	0,40 un 0,25 (p=0,051)	-----

Atšķirībā no *Mira*, kurš ziņo par augstāku TNF A -308 A/G polimorfisma frekvenci Francijas ITN mirušo septiskā šoka slimnieku populācijā (52% un 24%, p=0,008, Pearson χ^2 tests), mūsu pētījumā ticamu atšķirību nenovēro (43% un 30%, p=0,68, Pearson χ^2 tests). Iespējamais

izskaidrojums šim faktam ir atšķirīgs slimnieku skaits pētāmās grupās (mums – 25 septiskā šoka slimnieki, bet Mira pētījumā – 89), kas nozīmīgi ietekmē β kļūdu. Tajā pat laikā, kaut gan mūsu rezultāts šajā testā nesasniedz statistiski ticamu vērtību, bet novērojama Mira pētījumam līdzīga tendence – mirušiem septiskā šoka slimniekiem TNF -308 A/G polimorfisms sastopams biežāk.

Tang pētījumā izmantotais Pīrsona χ^2 tests nav īsti pielietojams, jo nav izpildīti visi šā testa priekšnosacījumi (80% no paredzamām šūnu vērtībām būtu jābūt >5 , bet šajā gadījumā šim nosacījumam atbilst tikai 75% no šūnām). Šajā gadījumā korektāk būtu pielietot *Fisher's Exact Test*, bet, pārreķinot rakstā ziņotos rezultātus, p vērtība dotajā pētījumā ir 0,67 (abpusēja) un 0,45 (vienpusēja). Tā kā nav iespējams prognozēt polimorfisma ietekmi uz mirstību (paaugstina vai pazemina), būtu jāpieņem abpusējo p vērtību, bet tā nesasniedz statistisko ticamību. Līdz ar to *Tang* pētījumā ziņotā TNF -308 saistība ar mirstību septiskā šoka slimniekiem ir diskutējama.

Kopsavilkums. Salīdzinot ar literatūras avotiem autora dati ir līdzīgi vairākamam līdzšinējo publikāciju, kas neatbalsta TNF -308 A/G polimorfisma asociāciju ar TNF α cirkulējošo līmeni, septiskā šoka incidenci un mirstību ITN sepses slimniekiem.

6.4 IL-6 -174 G/C

Interleikīns 6 ir citokīns ar plašām bioloģiskām funkcijām un nozīmīgu lomu sepses patoģenēzē. IL-6 -174 G/C polimorfisma asociācija ar dažādiem klīniskiem stāvokļiem aprakstīta vairākās līdzšinējās publikācijās [85, 86].

6.4.1.1 IL-6 -174 G/C polimorfisma izplatība kopējā pētījuma populācijā

Pētījuma kopējā populācijā novērotā IL-6 -174 G/C polimorfisma frekvence ir 0,709, bet alternatīvās C alēles frekvence 0,451, kas ir līdzīga novērotajām sepses slimnieku populācijām citu autoru pētījumos [90, 91], (64.tabula).

64.tabula. Pētījumā novērotās IL-6 -174 G/C polimorfisma un alternatīvās alēles frekvences salīdzinājums ar līdzšinejām publikācijām

Autors		Pētījuma populācija	Novērotā IL-6 -174 G/C polimorfisma visp. populācijā	Novērotā IL-6 -174 G/C polimorfisma frekvence pētījuma populācijā	Novērotā IL-6 -174 C alēles frekvence pētījuma populācijā
Autora pētījums		Latvija, ITN sepses slimnieki, n=103	Nav pētīta	0,71	0,45
Schluter	grupas	Vācija, ITN sepses slimnieki, n=95 ¹	0,657	0,74	0,49
Michalek	grupas	Čehija, PITN sepses slimnieki (n=421)	0,752	0,69	0,42

¹Pacientu grupa „sepsis” un „severe sepsis”

Čehijas pediatrikās ITN slimnieku populācijā novēroja līdzīgas IL-6 -174 G/C polimorfisma un alternatīvās C alēles frekvences (attiecīgi kopējā pētījuma populācijā - 0,69 un 0,42, septiskā šoka slimniekiem – 0,61 un 0,53) [91]. Kaut gan ziņotie dati iegūti no pediatrikās populācijas, tos tomēr būtu lietderīgi salīdzināt ar mūsu pētījuma rezultātiem. Tajā pat laikā jāņem vērā, ka polimorfisma frekvence ziņota subpopulācijai (ITN sepses slimniekiem), ko vecums būtiski iespaido (riska faktors sepses attīstībai).

Testējot IL-6 -174 asociāciju ar IL-6 līmeni, septiskā šoka incidenci un klīnisko iznākumu - iegūti sekojoši **svarīgākie rezultāti**:

- 174 C **saistīts** ar zemāku IL-6 līmeni (septiskā šoka slimniekiem un mirušiem);
- 174 C **nav saistīts** ar septiskā šoka incidenci;
- 174 C **saistīts** ar augstāku miršanas risku (slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm).

6.4.1.2 IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar IL-6 cirkulējošo līmeni

Komentējot iegūtos rezultātus jāatzīmē, ka polimorfisma saistība ar IL-6 cirkulējošo koncentrāciju pārsvarā novērota apakšgrupās (septiskā šoka un mirušiem slimniekiem), par ko liecina zemākas p vērtības un šaurāki 95% CI. Kopēja pētījuma populācijas dati pārsvarā atspoguļo apakšgrupās novērotās atšķirības. Šī tendence varētu norādīt, ka IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar IL-6 koncentrāciju kļūst detektējama pie intensīvas gēna ekspresijas (par ko liecina augstāka IL-6 koncentrācija tieši šo slimnieku grupās).

Autora rezultāti norāda uz IL-6 -174 C/G polimorfisma saistību ar zemāku IL-6 cirkulējošo līmeni, šī tendence novērota gan septiskā šoka, gan mirušo slimnieku grupās.

Mirušiem slimniekiem šī saistība demonstrēta vairākos modeļos un liecina arī par alternatīvās C alēles saistību ar IL-6 līmeni gan homo- gan heterozigotām. Tajā pat laikā septiskā šoka slimniekiem ticamas koncentrācijas atšķirības novēroja tikai salīdzinot IL-6 -174 CC genotipa nēsātājus ar parastās G alēles nēsātājiem, kas norāda uz iespējamo polimorfisma nozīmīgumu tikai alternatīvas alēles homozigotām (vismaz viena parastās G alēles kopija ir saistīta ar izteikti augstāku IL-6 koncentrāciju).

6.4.1.3 IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci

Mēs nenovērojam nozīmīgas IL-6 -174 C/G polimorfisma frekvences atšķirības slimniekiem ar un bez septiskā šoka, kas neatbalsta izvirzīto hipotēzi par polimorfisma saistību ar septiskā šoka attīstību. Līdzšinējo publikāciju svarīgākā atrade par apskatāmo jautājumu apkopota 65.tabulā. (Autoram izdevās atrast tikai vienu līdzšinējo publikāciju, kur analizēta IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar septisko šoku).

65.tabula. IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci salīdzinājumā ar līdzšinējām publikācijām

Autors	Pētāmā populācija	Kontroles populācija	Novērotā IL-6 -174 polimorfisma frekvence septiskā šoka slimniekiem	Novērotā IL-6 -174 polimorfisma frekvence kontroles grupā	p vērtība, OR (CI 95%)
Autora pētījums	Latvija, ITN sepsis slimnieki, n=103	ITN slimnieki bez šoka pazīmēm (n=78)	0,76	0,69	0,52 1,407 (0,49-3,96)
Michalek grupas pētījums [91]	Čehija, PITN sepsis slimnieki (n=421)	veseli indivīdi (n=644)	0,61	0,75	0,18 0,519 (0,19-1,36)
Michalek grupas pētījums [91]	Čehija, PITN slimnieki ar septisko šoku (n=18)	PITN sepsis slimnieki bez šoka pazīmēm ¹ (n=96)	0,61	0,53	0,51 0,722 (0,27-1,92)

¹ Oriģinālā pētījuma „SIRS“, „sepsis“ un „severe sepsis“ grupas

Michalek grupa ziņo, ka IL-6 -174 G/C polimorfisma frekvence atšķiras SIRS un septiskā šoka PITN slimniekiem. Ņemot vērā, ka septiskā šoka slimniekiem IL-6 -174 CC genotipa

frekvence būtiski augstāka (0,138 un 0,333, $p=0,038$), autori secina, ka tieši šis genotips varētu būt saistīts ar septiskā šoka attīstību. Jāpievērš uzmanību, ka statistiski ticamas genotipu atšķirības *Michalek* novēroja tikai recesīvajā modelī. Analizējot *Michalek* datus ar dominanto modeli, rezultāti ir līdzīgi mūsējiem – polimorfisma asociāciju ar septiskā šoka incidenci nenovēro (ne salīdzinot ar veselīgiem indivīdiem, nedz arī ar pētījuma sepses slimniekiem).

Autora pētījumā IL-6 174 polimorfisms nav saistīts ar septiskā šoka attīstību nevienā no testējamajiem modeļiem - ne kopējā pētījuma populācijā, nedz arī apakšgrupās. Atšķirību izskaidrojums varētu būt pētāmo apakšgrupu atlases metodoloģijā. Mēs salīdzinājām IL-6 -174 polimorfisma frekvenci starp slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm, un mūsu grupa „bez šoka” visvairāk atbilst *Michaleka* grupām „*SIRS+sepsis*” un „*Severe sepsis*”. Apvienojot to vienā grupā un salīdzinot to ar „*Septic shock + MODS*” apakšgrupu būtisku atšķirību arī nenovēro (65.tabula). Līdz ar to varētu secināt, ka, saskaņojot analizējamo fenotipu (t.i. salīdzinot sepses un septiskā šoka slimniekus), abu pētījumu rezultāti pēc būtības ir līdzīgi – IL-6 -174 polimorfisms nav saistīts ar augstāku septiskā šoka attīstības risku ITN sepses slimniekiem.

Iemesli, kas varētu ietekmēt iegūto rezultātu ir apskatīti diskusijas kopsavilkumā.

6.4.1.4 IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu

Saskaņā ar veiktā pētījuma rezultātiem slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm IL-6 -174 C/G polimorfisms (un arī C alēle) ir saistīts ar nelabvēlīgu klīnisko iznākumu. No apskatītiem literatūras avotiem līdzīga analīze veikta tikai *Schluter* pētījumā, abu pētījumu svarīgāka atrade apkopota 66.tabulā.

66.tabula. IL-6 -174 C/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu salīdzinājumā ar līdzšinējām publikācijām

Autors	Populācija	Novērotā mirstība kopējā pētījuma grupā	IL-6 -174 C/G polimorfisma biežumi, p vērtība un OR ¹ izdzīvojušiem un mirušiem kopējā pētījuma populācijā	IL-6 -174 C/G polimorfisma biežumi, p vērtība un OR ¹ izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem bez šoka pazīmēm
Autora pētījums	Latvija, ITN sepses slimnieki, n=103	42,7% (n=44)	0,66 un 0,77 P=0,22 OR 1,74 (0,72-4,24)	0,63 un 0,92 P=0,008 OR 6,68 (1,41-31,7)
Schluter grupas pētījums [90]	Vācija, ITN sepses slimnieki, n=50	50% (n=25)	0,56 un 0,92 P=0,004 OR 9,04 (1,74-46,9)	Dati nav norādīti atsevišķi

¹ OR – izredžu attiecība nelabvēlīgam klīniskam iznākumam IL-6 -174 C/G polimorfisma nēsātājiem (t.i. CC un CG pret GG)

Schluter ar līdzautoriem arī ziņo par -174 GG genotipa saistību ar labvēlīgu klīnisko iznākumu ITN sepses slimniekiem [90]. Šo secinājumu atbalsta pētījumā novērotā augstākā IL-6 - 174 G/C polimorfisma frekvence mirušiem sepses slimniekiem, salīdzinot ar GG genotipa nēsātājiem.

Mēs novērojām IL-6 -174 polimorfisma saistību ar prognozi slimniekiem *bez šoka pazīmēm*, kā arī augstāku IL-6 -174 C/G polimorfisma frekvenci *mirušiem* slimniekiem. Mūsu pētījuma apakšgrupa „sepses slimnieki bez šoka pazīmēm” visvairāk atbilst *Schluter* pētāmai ITN sepses slimnieku populācijai (līdzīga mirstība, genotipu sadalījumi, OR utt.), kas liecina par zināmo populācijas un metodoloģijas līdzību, kā arī mazina viltus pozitīvu (α kļūdas) secinājumu iespējamību.

Abu pētījumu rezultāti norāda, ka starp ITN sepses slimniekiem (bez šoka pazīmēm) IL-6 - 174 C/G polimorfisma nēsātājiem nelabvēlīga klīniskā iznākuma izredžu attiecība ir augstāka nekā parastā GG genotipa slimniekiem (mūsu pētījumā vismaz 1,4, bet *Schluter* publikācijā vismaz 1,7 reizes augstāka). Jautājums kādā veidā IL-6 -174 C/G polimorfisms varētu ietekmēt mirstību, sīkāk apskatīts diskusijas kopsavilkumā.

6.5 IL-10 -1082 G/A

6.5.1.1 Ievads

IL-10 ir citokīns ar vairākiem pretiekaisuma efektiem, kura loma sepses patogēnēzē ir saistīta ar sistēmiskās iekaisuma reakcijas procesu inhibīciju. IL-10 -1082 G/A polimorfismam aprakstīta saistība ar IL-10 cirkulējošo līmeni un klīnisko iznākumu sepses slimniekiem.

6.5.1.2 IL-10 -1082 G/A polimorfisma izplatība pētījuma populācijā

Autora pētījumā gandrīz 70% slimnieku novērots IL-10 -1082 G/A polimorfisms. IL-10 - 1082 A/G polimorfisma izplatība pētījuma populācijā salīdzinājumā ar svarīgāko līdzšinējo publikāciju datiem (sepses slimnieku populācijām) apkopota 67.tabulā.

67.tabula. IL-10 -1082 A/G polimorfisma frekvence salīdzinot ar līdzšinējām publikācijām

Autors	Pētījuma populācijas raksturojums	Novērotā IL-10 - 1082 G/A polimorfisma frekvence visp. populācijā	Novērotā IL-10 - 1082 G/A polimorfisma frekvence pētījuma populācijā	Novērotā IL-10 - 1082 G alēles frekvence pētījuma populācijā
Autora pētījums	Latvija, ITN sepses slimnieki, n=103	Nav pētīta	0,689	0,422
<i>Stanilovas</i> grupas pētījums [125]	Bulgārija, ITN sepses slimnieki, n=33	0,774	0,485	0,258
<i>Lowe</i> grupas pētījums [138]	Lielbritānija, ITN slimnieki, n=67	0,680	0,806	0,5371
			Sepses slimniekiem (n=31), 0,9052	
<i>Shu</i> grupas pētījums [139]	Ķīna, sepses slimnieki, n=116	0,702	0,931	0,599
<i>Schaaf</i> grupas pētījums [126]	Vācija, pneimokoku infekcijas slimnieki, m=69	0,600	0,638	0,435
		(pētījuma kontroles populācija, n=50)	Sepsis+severe sepsis+shock (n=51) 0,667	Sepsis+severe sepsis+shock (n=51) 0,471

¹ Aprēķināta izejot no publikācijā ziņotiem IL-10 -1082 A/G genotipu procentuāliem sadalījumiem

² Komentāri tekstā (zemāk)

Vairākos līdzšinējos pētījumos novērotā IL-10 -1082 A/G polimorfisma frekvence vispārējā populācijā (vai kontroles grupās) ir samērā līdzīga (intervāls - 0,60-0,77). Tajā pat laikā par ITN sepses slimniekiem apskatītās publikācijās ziņotā polimorfisma frekvence ir atšķirīga (0,49-0,91). Šis fakts jādomā ir saistīts ar pētījumā analizējamo apakšpopulāciju atlasē kritēriju atšķirībām.

Mūsu pētījumā novērota IL-10 -1082 A/G polimorfisma frekvence kopējā pētījuma populācijā visvairāk līdzinās *Schaaf* publikācijā ziņotai (it sevišķi atlasot no kopējās pneimokoku infekcijas slimnieku populācijas apakšgrupas ar sepses pazīmēm, apkopojot grupas “*sepsis*” + “*severe sepsis*” + “*shock*”).

Shu publikācijā polimorfisma frekvence sepses slimniekiem ir būtiski augstāka (0,931), neskatoties ka polimorfisma frekvence vispārējā populācija ir zemākā un būtiski neatšķiras no pārējiem autoriem.

Komentējot *Lowe* atradni, jāpievērš uzmanību, ka norādot genotipu sadalījumus (33.attēls) IL-10 -1082 A/G polimorfismam, autori atspoguļo tikai procentuālo sadalījumu, kur procentu summa „*Sepsis*” un „*No sepsis*” grupās ir attiecīgi 116,3% un 84,4% (bet tai būtu jābūt 100%).

Līdz ar to norādītā sadalījumu precizitāte ir diskutējama. Ņemot vērā, ka īstā pētījumā novērotā genotipa frekvence pieminētās grupās nav zināma, korekti salīdzināt mūsu pētījuma datus nav iespējams.

Table 1. Frequency of the single nucleotide polymorphism at positions –592 and –1082 base pairs in healthy volunteers and critically ill patients

–592 Base Pairs	Genotype, %		
	A/A	A/C	C/C
Healthy subjects (n = 132)	4.0	29.0	67.0
Critically ill patients (n = 67)	1.5	33.5	65.0
Sepsis (n = 31)	3.0	32.3	65.7
No sepsis (n = 36)	0	35.2	64.7

–1082 Base Pairs	Genotype, %		
	G/G	A/G	A/A
Healthy subjects (n = 128)	24.2	43.8	32.0
Critically ill patients (n = 67)	26.9	53.7	19.4
Sepsis (n = 31)	32.2	58.3	25.8
No sepsis (n = 36)	22.2	48.3	13.9

33.attēls. IL-10 -1082 G/A polimorfismu sadalījums [138] pētījumā

Norādītie genotipu sadalījumi ITN pacientiem kopumā ir nedaudz augstāki par novērotajiem mūsu populācijā, bet G alēles frekvence ir līdzīga novērotai autora veiktajā pētījumā.

6.5.1.3 Svarīgākās pētījumā novērotās asociācijas

1. -1082G/A polimorfisms **nav saistīts** ar IL-10 līmeni.
2. -1082G/A polimorfisms **nav saistīts** ar septiskā šoka incidenci.
3. -1082G/A polimorfisms **ir saistīts** ar augstāku miršanas risku septiskā šoka slimniekiem.

6.5.1.4 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar cirkulējošo IL-10 līmeni

Veicot iegūto datu analīzi, mēs novērojām augstākās mediānas IL-10 koncentrācijas asins serumā slimniekiem ar septiskā šoka pazīmēm, kā arī mirušiem slimniekiem. Tajā pat laikā mums neizdevās demonstrēt IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar IL-10 sistēmisko līmeni ne kopējā pētījuma populācijā, ne arī analizējamās apakšgrupās. *Analizēts diskusijas kopsavilkumā.*

6.5.1.5 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci

Mūsu dati neapstiprina izvirzīto hipotēzi par IL -1082 G/A polimorfisma saistību ar paaugstināto septiskā šoka incidenci ITN sepses slimniekiem.

IL-10 -1082 A/G polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci nav plaši pētīta. Autoram izdevās atrast tikai vienu līdzšinējo publikāciju, kur IL-10 -1082 G/A polimorfisma sadalījumi ir analizēti sepses slimniekiem ar un bez septiskā šoka pazīmēm [126]. Tajā pat laikā dažos pētījumos analizēta IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar sepses attīstību salīdzinājumā ar veseliem indivīdiem. Apkopoti līdzšinējo pētījumu rezultāti ir norādīti 68.un 69. tabulā.

68.tabula. IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci līdzšinējos pētījumos

Autors	Analizējamā populācija	Kontroles populācija	Novērotā IL-10 -1082 G/A polimorfisma frekvence septiskā šoka slimniekiem	Novērotā IL-10 -1082 G/A polimorfisma frekvence kontroles grupā	p vērtība, OR (CI 95%)
Autora pētījums	Latvija, ITN slimnieki ar septiskā šoka pazīmēm, n=25	ITN sepses slimnieki bez šoka pazīmēm, n=78	0,72 (18/25)	0,679 (53/78)	0,703 1,213 (0,449-3,278)
<i>Schaaf</i> grupa pētījums [126]	Vācija, pneimokoku infekcijas slimnieki ar septiskā šoka pazīmēm, n=13	Pneimokoku sepses slimnieki bez šoka pazīmēm ¹ , n=38	0,69 (9/13)	0,658 (25/38)	1,000 1,170 (0,302-4,536)

¹ Oriģinālā pētījuma “sepsis”+”severe sepsis” grupas

Schaaf pētījumā, salīdzinot IL-10 -1082 A/G polimorfisma sadalījumu starp pneimokoku infekcijas slimniekiem ar un bez septiskā šoka, novēroja būtiski augstāku GG genotipa frekvenci septiskā šoka slimniekiem (54% un 16%, p=0,024) [126]. Jāpievērš uzmanību, kā *Schaaf* pētījuma IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar septiskā šoka incidenci ir novērota tikai recesīvajā modelī (salīdzināti GG un GA+AA genotipi). Veiktajā pētījumā mēs testējām iespējamo asociāciju gan dominantajā, gan recesīvajā modelī, bet polimorfisma saistību ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci nenovērojām (GG frekvence slimniekiem ar šoku ir 0,120 un bez šoka 0,166 p=0,575).

Pārreķinot *Schaaf* publikācijā ziņotos rezultātus pēc dominanta modeļa, IL-10 polimorfisma saistību ar septiskā šoka incidenci arī nenovēro (skat. 68.tabulu). Tajā pat laikā, būtu jāatzīmē ļoti līdzīgas polimorfisma frekvences attiecīgās apakšgrupās abos pētījumos, kas varētu norādīt uz pētāmo populāciju līdzību.

Iespējams IL-10 -1082 G/A polimorfisma funkcionālais nozīmīgums predispozīcijā septiskā šoka attīstībai ir novērojams tikai recesīvajā modelī, par ko liecina *Schaaf* atrade. Mūsu dati divreiz lielākam pacientu skaitam šo tendenci neapstiprināja. Jāsecina, ka jautājums par IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar septiskā šoka incidenci tomēr paliek atklāts un prasa turpmāko izpēti.

69.tabula. IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar sepses incidenci līdzšinējos pētījumos

Autors	Analizējamā populācija	Kontroles populācija	Novērotā IL-10 - 1082 polimorfisma frekvence sepses slimniekiem	Novērotā IL-10 - 1082 polimorfisma frekvence kontroles grupā	p vērtība, OR (CI 95%)
Autora pētījums	Latvija, ITN sepses slimnieki, n=103	nav	0,689 (71/103)	nav	nav
<i>Schaaf</i> grupas pētījums [126]	Vācija, pneimokoku infekcijas slimnieki, n=69	Vācija, plāna ķirurģijas slimnieki bez infekcijas pazīmēm, n=50	0,638 (44/69)	0,60 (30/50)	0,676 1,173 (0,555-2,482)
<i>Stanilovas</i> grupas pētījums [125]	Bulgārija, ITN sepses slimnieki, n=33	Vesēlie indivīdi, n=53	0,485 (16/33)	0,774 (41/53)	0,006 0,275 (0,108-0,704)
<i>Lowe</i> grupas pētījums [138] ¹	Lielbritānija, ITN slimnieki, n=67	Vesēlie indivīdi, n=128	0,806 (54/67)	0,680 (87/128)	0,061 1,958 (0,962-3,984)
<i>Shu</i> grupas pētījums [139]	Ķīna, sepses slimnieki, n=116	Vesēlie indivīdi, n=141	0,931 (108/116)	0,702 (99/141)	0,000 5,727 (2,564-12,8)

¹ oriģinālā publikācijā slimnieku skaits sadalījumos nav norādīts, līdz ar to tas ir aprēķināts pēc uzradītiem procentiem no kopējā skaita attiecīgā grupā.

IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar sepses incidenci salīdzinot ar veselīgiem indivīdiem novērota vairākos pētījumos. Jāatzīme, ka rezultāti ir pretrunīgi – vismaz vienā pētījumā IL-10 -1082 G/A polimorfisms ir saistīts ar zemāku sepses attīstības risku, bet vismaz divos pētījumos ir novērots augstāks sepses risks IL-10 -1082 G/A polimorfisma nēsātājiem (69.tabula).

Lowe, salīdzinot IL10 -1082 G/A polimorfisma sadalījumu ITN slimniekiem un veselīgiem indivīdiem novērojis statistiski ticamu atšķirību ($p=0,04$). Diemžēl sadalījumi publikācijā nav norādīti absolūtos skaitļos (attiecīgā genotipa nēsātāju skaits analizējamajā grupā), bet procentos. Zinot kopējo slimnieku skaitu grupā, pēc procentiem varētu aprēķināt attiecīgā genotipa nēsātāju skaitu un veikt analīzi. Salīdzinot genotipu sadalījumu abās analizējamās grupās ar Pearsona χ^2 testu iegūta p vērtība ir 0,167 (nevis 0,04), bet pārreķinot ziņotos rezultātus pēc dominanta modeļa

(AG+GG/AA), atšķirību starp grupām nenovēro. Iegūtā p vērtība ($p=0,061$) ļauj runāt par tendenci sepses attīstībā IL-10 -1082 G/A polimorfisma nēsātājiem.

Shu salīdzināja smagas sepses slimniekus un veselus indivīdus, atlasītus no Ķīnas populācijas un novēroja būtiski augstāku risku sepses attīstībā IL-10 -1082 G/A nēsātājiem.

Mūsu pētījuma dati diemžēl nesniedz iespēju veikt secinājumus par predispozīciju sepses attīstībai, salīdzinot ar veseliem indivīdiem. Tajā pat laikā novērotā IL-10 -1082 G/A polimorfisma frekvence ietilpst citos pētījumos novēroto frekvenču intervālā (0,485-0,931), kas liecina par zināmo analizējamo populāciju līdzību.

6.5.1.6 IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu

Mūsu pētījuma rezultāti norāda uz iespējamo IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar izdzīvošanas prognozi. Atšķirīgo IL-10 -1082 polimorfismu novēroja starp izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem kopējā pētījuma populācijā, kā arī septiskā šoka slimniekiem. Jāatzīme, ka kopējas grupas rezultātus pārsvarā nosaka novērotā atšķirība septiskā šoka slimniekiem.

IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu sepses slimniekiem nav plaši pētīta. Publikāciju par IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar izdzīvošanu tieši septiskā šoka slimniekiem autoram atrast neizdevās. Apkopotā informācija par līdzšinējiem pētījumiem līdzīgās populācijās ir norādīta 70.tabulā.

70.tabula. IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu līdzinējos pētījumos

Autors	Populācija	Noverotā mirstība pētījuma populācijā	IL-10 -1082 polimorfisma biežumi izdzīvojušiem un mirušiem kopējā pētījuma populācijā	IL-10 -1082 polimorfisma biežumi izdzīvojušiem un mirušiem septiskā šoka slimniekiem
Autora pētījums	Latvija, ITN sepses slimnieki, n=103	42,7% (Septiskā šoka 60%)	0,61 un 0,79 P=0,044 OR 2,49 CI 95% (1,01-6,11)	0,40 un 0,93 P=0,007 OR 21,0 CI 95% (1,9-229)
<i>Schaaf</i> grupas pētījums [126]	Vācija, pneimokoku infekcijas slimnieki, n=69	7,2% (5/69)	0,20 un 0,60 P=0,651 OR 2,40 CI 95% (0,25-22,7)	Mirstības dati nav norādīti atsevišķi
<i>Stanilovas</i> grupas pētījums [125]	Bulgārija, ITN sepses slimnieki, n=33	63,6% (21/33)	0,33 un 0,57 P=0,19 OR 2,67 CI 95% (0,61-11,7)	Septiskā šoka slimnieki nav analizēti
<i>Lowe</i> grupas pētījums [138]	Lielbritānija, ITN slimnieki, n=67	32,8% (22/67)	Saistība nav novērota (genotipu sadalījumi nav norādīti)	Septiskā šoka slimnieki nav analizēti
<i>Shu</i> grupas pētījums [139]	Ķīna, sepses slimnieki, n=116	Nav ziņots	~0,5 un ~0,52	Septiskā šoka slimnieki nav analizēti

¹ Fisher Exact tests

² pēc attēla (Fig.2.) attiecīgajā publikācijā

Kaut gan mūsu dati norāda uz iespējamo IL-10 -1082 G/A polimorfisma saistību ar klīnisko iznākumu slimniekiem ar septiskā šoka pazīmēm, tos tomēr būtu jāinterpretē uzmanīgi. Septiskā šoka apakšgrupa mūsu pētījumā ir samērā neliela (n=25), un rezultātu nozīmīgi ietekmē IL-10 -1082 G/A polimorfisma frekvence mirušo septiskā šoka slimnieku grupā, kur tikai vienam indivīdam novēroja parasto AA genotipu. Jāatzīmē, ka saskaņā ar mūsu rezultātiem šajā apakšgrupā miršanas izredžu attiecība polimorfisma nēsātājiem ir vismaz 1,9 reizes augstāka nekā parastā AA genotipa nēsātājiem.

Stanilovas pētījumā sepses slimniekiem ziņots par IL-10 -1082 A/G saistību ar klīnisko iznākumu. Kaut gan šajā pētījumā novēroja zemāko G alēles frekvenci izdzīvojušiem sepses slimniekiem, salīdzinot ar veseliem indivīdiem, paliek diskutējams jautājums, cik korekti ir izvēlētas grupas salīdzinājumam. Būtu korekti salīdzināt polimorfisma (alēļu) sadalījumu starp mirušiem un izdzīvojušiem sepses slimniekiem (viendabīga grupa sadalīta pēc dihotomas pazīmēs), nevis vienu dihotomu apakšgrupu (izdzīvojušus) ar veseliem indivīdiem. Jāpiebilst, ka turpinot tādā stilā un veicot līdzīgu analīzi mirušiem, arī novēro zemāku miršanas risku G alēles nēsātājiem (miršanas OR salīdzinot ar veseliem indivīdiem 0,502 ar CI 95% 0,235-1,071, $p=0,072$), kaut gan bez statistiskās ticamības.

Stanilovas ziņotos rezultātus par polimorfisma saistību ar mirstību īstenībā nosaka zemāka G alēles frekvence sepses slimniekiem salīdzinot ar kontroles populāciju ($p=0,005$, OR 0,389 ar CI 95% 0,199-0,760). Citiem vārdiem, ar veseliem indivīdiem salīdzina apakšgrupas no populācijas ar jau iepriekš konstatēto zemāku G alēles frekvenci. Salīdzinot ziņotos alēļu sadalījumus mirušo un izdzīvojušo slimnieku apakšgrupās, *Stanilovas* pētījumā būtiskas atšķirības netiek novērotas (OR 2,241 (0,638-7,879), $p=0,202$). Līdz ar to šā pētījuma secinājums par polimorfisma saistību ar sepses iznākumu ir diskutējams.

Lowe publikācijā ziņots, ka sepses slimniekiem IL-10 -1082 G/A polimorfisms nav saistīts ar mirstību, bet novērotie genotipu sadalījumi izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem nav norādīti, līdz ar ko nav iespējams salīdzināt tos ar mūsu rezultātiem.

Shu publikācijā arī ziņots par asociācijas trūkumu starp IL-10 -1082 G alēli un mirstību sepses slimniekiem. Jāatzīmē, ka pētījumā novērotās alēļu frekvences publikācijā attēlotas tikai grafiskā veidā (2.attēlā redzams, kā alternatīvās alēles frekvence gan izdzīvojušiem, gan mirušiem slimniekiem ir ap 0,5).

Apkopojot analizētās publikācijas ir jāatzīst, ka ITN sepses slimnieku populācijā IL-10 -1082 A/G polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu līdz šim korekti nav pierādīta, bet septiskais šoks slimniekiem nav pētīts.

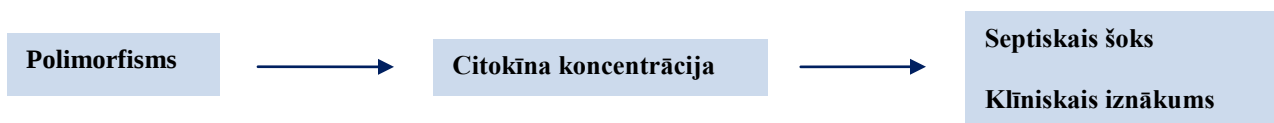
6.5.1.7 Kopsavilkums

Iegūto datu interpretācija nav viennozīmīga, jo, kaut gan mēs novērojām polimorfisma saistību ar klīnisko iznākumu, kā arī augstāku IL-10 sistēmisko līmeni mirušiem slimniekiem, demonstrēt polimorfisma saistību ar IL-10 koncentrāciju neizdevās. Līdz ar to pētījuma hipotēzē izvirzītais polimorfisma darbības mehānisms neapstiprinājās.

6.6 Diskusijas kopsavilkums

Izvirzītā pētījuma hipotēze par ģenētisko polimorfismu saistību ar citokīnu sistēmisko koncentrāciju, septiskā šoka attīstību un klīnisko iznākumu daļēji apstiprinājās tikai IL-6 -174 G/C polimorfismam, kam izdevās parādīt saistību ar IL-6 sistēmisko koncentrāciju un klīnisko iznākumu. IL-10 -1082 G/A polimorfismam izdevās demonstrēt zināmo saistību ar izdzīvošanas prognozi, bet tajā pat laikā nav novērota asociācija ar citokīna sistēmisko līmeni. TNF -308 A/G polimorfisma saistība ar TNF α koncentrāciju, septiskā šoka attīstību, klīnisko gaitu un iznākumu nav novērota.

Autora pētījuma izvirzītā hipotēze paredzēja testēt divsoļu cēlonisko saistību – „*polimorfisms – citokīna koncentrācija*” un „*citokīna koncentrācija – septiskais šoks/klīniskais iznākums*”, ka arī kopējo cēlonisko saistību „*polimorfisms – septiskais šoks/klīniskais iznākums*” (34.attēls).



34.attēls. Pētījuma hipotēzes vienkāršotais modelis

Jāatzīmē, kā pilnībā cēloniskā ķēde „*polimorfisms – citokīna koncentrācija – septiskais šoks/klīniskais iznākums*” nav apstiprinājusies kopējā pētījuma populācijā nevienam no pētāmajiem polimorfismiem (71.tabula).

71.tabula. Pētījumā novēroto saistību apkopojums

	Kopējā populācijā	“Ar šoku”	“Bez šoka”	Mirušie	Izdzīvojušie
SNP – citokīns	nenovēro	IL-6	nenovēro	L-6	nenovēro
SNP - mirstība	IL-6, IL-10	IL-10	IL-6	xxxxx	xxxxx
SNP – septiskais šoks	nenovēro	xxxxx	xxxxx	nenovēro	nenovēro

Visciešākā atbilstība hipotēzes modelim novērota IL-6 -174 G/C polimorfismam, kuram dažādās apakšpopulācijās izdevās demonstrēt cēloniskās ķēdes elementu saistību (piem., IL-6 -174 G/C ar IL-6 koncentrāciju septiskā šoka slimniekiem). Jāatzīmē, ka IL-6 -174 G/C polimorfisms ir vienīgais, kam veiktajā pētījumā novēroja saistību ar kodēta proteīna (IL-6) sistēmisko koncentrāciju. Parējiem pētījuma polimorfismiem – TNF -308 A/G un IL-10 -1082 G/A saistība ar kodētā proteīna sistēmisko koncentrāciju nav novērota.

6.6.1.1 Polimorfisms - citokīns

Novēroto IL-6 polimorfisma saistību ar IL-6 sistēmisko koncentrāciju būtu jāinterpretē uzmanīgi. Būtu jāatzīme, ka kopējā pētījuma populācijā saistību nenovēro, kas varētu liecināt par samēra vāju polimorfisma efektu uz IL-6 sistēmisko koncentrāciju šajā grupā. IL-6 polimorfisma saistību ar IL-6 koncentrāciju visstingrāk novēro mirušiem slimniekiem un septiskā šoka slimniekiem, kuriem C alēle saistīta ar zemāko IL-6 cirkulējošo līmeni. Izteiktāku polimorfisma efektu apakšgrupās varētu izskaidrot ar jutīgāko fenotipu. IL-6 sistēmiskā koncentrācija ir augstāka tieši septiskā šoka un mirušo apakšgrupās, tas nozīmā, ka IL-6 gēna ekspresija (arī transkripcija) ir aktīvāka šīs grupas slimniekiem. Tāpēc, teorētiski, šo apakšgrupu slimniekiem polimorfisma efekts varētu būt izteiktāks.

Diskutējams jautājums par IL-6 -174 polimorfisma cēlonisko saistību ar izmaiņām IL-6 produkcijā. Vai tieši C alēle IL-6 gēna -174.pozīcijā pazemina IL-6 ekspresijas aktivitāti (piem., mazinot transkripcijas faktoru aktivitāti) vai C alēle ir tikai marķieris, kas tiek pārmantots kopā ar citiem funkcionāliem polimorfismiem, un pati transkripcijas ātrumu neietekmē? Šā pētījuma metodoloģija nesniedz precīzu atbildi uz šo jautājumu. Pētījumā nav noteikta pilna IL-6 gēna struktūra, līdz ar ko potenciāli saglabājas iespēja, ka IL-6 koncentrāciju ietekmē citi neidentificēti polimorfismi, ko pārmanto nelīdzsvarotā saistībā (angļu val., *linkage disequilibrium*) ar -174 C/G polimorfismu.

Pētījumā novēroto asociāciju trūkumu ar citokīna koncentrāciju TNF un IL-10 gēnu polimorfismiem varētu interpretēt dažādi:

- TNF un IL-10 gēnu polimorfismi nav saistīti ar attiecīgo proteīnu (citokīnu) sistēmisko koncentrāciju.
- TNF un IL-10 polimorfismi ir saistīti ar attiecīgo citokīnu koncentrāciju, bet pētījums nav bijis pietiekoši jūtīgs, lai detektētu šos efektus.

Pirmā versija ir zināmā pretrunā ar iepriekšējo publikāciju datiem, līdz ar ko to varētu neizskatīt.

Analizējot otro versiju, būtu jāpievērš uzmanību iespējamām pētījuma metodoloģijas īpatnībām, kuras neļautu atklāt polimorfismu saistību ar citokīnu sistēmisku koncentrāciju. Zemāk analizēti daži iespējamie pētījuma nepietiekošas jūtības iemesli.

Citokīna sistēmiskā koncentrācija varētu neatspoguļot transkripcijas aktivitāti. Pētījumā meklētās saistības „*polimorfisms-citokīna koncentrācija*“ pamatā ir pieņēmums, ka strukturālās variācijas kandidātģēna promoterā ietekmē transkripcijas ātrumu, līdz ar ko līdzīgā virzienā mainās arī attiecīgā citokīna ekspresija un arī sistēmiskā koncentrācija. Bet šis pieņēmums, visticamāk, ir pārāk vienkāršots reālajai situācijai, kad citokīna sistēmisko koncentrāciju ietekmē un regulē vairāki

posttranskripcijas mehānismi (piem., translācijas regulācija, citokīna sekrēcijas regulācija, saistīšanās ar cirkulējošiem receptoriem utt.). Rezultējošs polimorfisma efekts uz attiecīgā citokīna sistēmisko koncentrāciju varētu būt izteikti vājš un, lai to detektētu, pētījuma jutībai būtu jābūt diezgan augstai (tas arī nozīmē, ka pētāmajam slimnieku skaitam jābūt samērā augstam, t.i. vairākos tūkstošos).

Citokīna sistēmiskā koncentrācija mainās laika dinamikā un mūsu pētījuma paraugu iegūšanas „laika logs“, iespējams, ir bijis parāk garš. Nosakot laiku, kad pētījuma slimniekiem veikta citokīnu koncentrācijas noteikšana, mēs pieņemam, ka polimorfisma efekts varētu būt izteiktāks situācijās, kad notiek pētamā citokīna intensīva ekspresija. Šo pieņēmumu atbalsta pētījumā novērotā saistība „IL-6 -174 C/G polimorfisms – IL-6 koncentrācija“ septiskā šoka un mirušiem sepses slimniekiem, kuriem IL-6 sistēmiskā koncentrācija ir bijusi augstāka (t.i. intensīvāka gēna stimulācija). Sepses slimniekiem slimības gaita ir diezgan atšķirīga, tāpēc pieņemot, ka stāvokļa pasliktināšanās (un ievietošana ITN) ir saistīta arī ar citokīnu ekspresijas izmaiņām, mēs pārsvarā noteicām to pirmajā diennaktī (24h). Iespējams, ka šis laika posms tomēr nav bijis optimāls. Literatūrā aprakstītā TNF koncentrācijas dinamika var izteikti mainīties 24h pēc eksperimentālas endotoksīna ievadīšanas [61].

Vairāki ar pētījuma saturu saistīti faktori varēja mazināt tā jutību uz polimorfisma efekta atklāšanu. Balstoties uz veiktā pētījuma rezultātiem, nav iespējams korekti noraidīt hipotēzi par pētamo kandidātpolimorfismu ietekmi uz citokīnu sistēmisko koncentrāciju.

6.6.1.2 Polimorfisms-septiskais šoks

Nevienam no pētījuma kandidātpolimorfismiem nav novērota saistība ar septiskā šoka attīstību. Septiskā šoka patoģenēzē nozīmīga loma ir vairākiem efektoriem mehānismiem, tajā skaitā arī TNFa, un IL-10 efektiem. IL-6 etioloģiskā loma septiskā šoka patoģenēzē joprojām ir diskutējama. Visi pētījumā analizētie citokīni septiskā šoka slimniekiem ir bijuši augstākā koncentrācijā nekā sepses slimniekiem bez šoka pazīmēm. Tomēr jāatzīmē, ka klīniski nozīmīgas atšķirības novēroja tikai IL-6 (210 un 680 pg/ml), bet TNFa (51 un 29 pg/ml) un IL-10 (12 un 1 pg/ml) koncentrācijas atšķirības, kaut gan ir bijušas statistiski ticamas, ir klīniski maznozīmīgas. Ņemot vērā, ka efektoru citokīnu koncentrācijas slimniekiem ar un bez šoka atšķiras maznozīmīgi, būtu loģiski arī pieņemt, ka citokīnu kodējošo gēnu variācijas arī būtiski neietekmē septiskā šoka attīstību.

Kaut gan ir iespējams arī cits variants, ka saistība pastāv, bet nav detektēta. Šo versiju atbalsta pētījumi, kur TNFa un IL-10 polimorfismu saistība ar septiskā šoka attīstību tomēr ir novērota. Bet jāatzīst, ka pētījumu, kur analizējamiem polimorfismiem pilnībā novērotu saistību „*polimorfisms-citokīna koncentrācija-septisks šoks*“ autoram atrast nav izdevies.

Balstoties uz šī pētījuma rezultātiem var secināt, ka saistību nenovēroja, bet apgalvot, ka saistība nepastāv, tomēr nav iespējams.

6.6.1.3 Polimorfisms-klīniskais iznākums

IL-6 un IL-10 kandidātpolimorfismiem novēroja saistību ar klīnisko iznākumu apakšgrupās. Rezultātu interpretāciju apgrūtina fakts, kā tieši šajās apakšgrupās polimorfismu saistību ar citokīnu koncentrāciju nenovēro. Hipotēzē izteiktais polimorfisma funkcionālā nozīmīguma patoģenētiskais mehānisms (spēja ietekmēt citokīna koncentrāciju) nav apstiprinājies (iespējamie iemesli ir apskatīti „polimorfisms-citokīns“ sadaļā). Ja pieņemam, ka pētījuma atrades ir īstas un polimorfismi neietekmē citokīna koncentrāciju, būtu jāsecina, ka tie ir saistīti ar klīnisko iznākumu caur citiem patoģenētiskiem mehānismiem. Iespējams, pētamie polimorfismi tiek nelīdzsvaroti pārmantoti kopā ar citiem (neidentificētiem) funkcionāli nozīmīgiem ģenētiskiem variantiem.

7.Secinājumi

1. TNF A -308 A/G polimorfisms nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci, augstāku TNF α sistēmisko koncentrāciju un sliktāku izdzīvošanas prognozi ITN sepses slimnieku populācijā Latvijā.
2. IL-6 -174 G/C polimorfisms sepses slimniekiem ir saistīts ar zemāku IL-6 cirkulējošo koncentrāciju un ar augstāku nelabvēlīgā iznākuma risku ITN ārstēšanas laikā, bet nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci.
3. IL-10 -1082 G/A polimorfisms sepses slimniekiem ir saistīts ar augstāku miršanas risku ITN posmā, bet nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci un augstāku IL-10 cirkulējošo koncentrāciju.

8.Praktiskās rekomendācijas

IL-6 -174G/C un IL-10 -1082 G/A polimorfismu tipēšana ITN sepses slimniekiem sniedz iespēju noteikt slimniekus ar augstāku letalitātes risku, izmantojot tos kopā ar citām prognostiskām skalām varētu uzlabot slimnieku atlasīšanu komplicētām monitorēšanas un ārstēšanas metodēm, ka arī uzlabot stratifikāciju iekļaušanai klīniskos pētījumos.

9. Izmantotā literatūra:

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.** *Crit Care Med* 2001, **29**(7):1303-1310.
2. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D: **Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study.** *Crit Care Med* 2006, **34**(2):344-353.
3. Martin G MD, Eaton S, Moss M: **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** *N Engl J Med* 2003:1546-1554.
4. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL: **Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003.** *Crit Care Med* 2007, **35**(5):1244-1250.
5. Angus DC, Burgner D, Wunderink R, Mira JP, Gerlach H, Wiedermann CJ, Vincent JL: **The PIRO concept: P is for predisposition.** *Crit Care* 2003, **7**(3):248-251.
6. Cariou A, Chiche JD, Charpentier J, Dhainaut JF, Mira JP: **The era of genomics: impact on sepsis clinical trial design.** *Crit Care Med* 2002, **30**(5 Suppl):S341-348.
7. Frodsham AJ, Hill AV: **Genetics of infectious diseases.** *Hum Mol Genet* 2004, **13 Spec No 2**:R187-194.
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** *Chest* 1992, **101**(6):1644-1655.
9. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: **2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** *Intensive Care Med* 2003, **29**(4):530-538.
10. Munford RS, Pugin J: **Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(2):316-321.
11. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B: **Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection.** *Am J Surg* 1999, **178**(4):288-292.
12. Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, Maier S, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B: **Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production.** *Surgery* 2000, **127**(3):309-315.
13. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA: **The effects of injury on the adaptive immune response.** *Shock* 1999, **11**(3):153-159.
14. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: **Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity.** *Shock* 2001, **16**(2):83-96.
15. O'Mahony JB, Wood JJ, Rodrick ML, Mannick JA: **Changes in T lymphocyte subsets following injury. Assessment by flow cytometry and relationship to sepsis.** *Ann Surg* 1985, **202**(5):580-586.

16. Van der Poll T vDS: **Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis.** *Infect Dis Clin North Am* 1999, **13**:413-426.
17. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP: **Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care.** *Ann Surg* 1973, **178**(2):117-122.
18. Danai PA, Sinha S, Moss M, Haber MJ, Martin GS: **Seasonal variation in the epidemiology of sepsis.** *Crit Care Med* 2007, **35**(2):410-415.
19. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, Young D, Black N, Rowan K: **Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland.** *Crit Care Med* 2003, **31**(9):2332-2338.
20. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J: **Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review.** *Crit Care Med* 2004, **32**(11 Suppl):S466-494.
21. Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS: **The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis.** *Crit Care Med* 2006, **34**(10):2576-2582.
22. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** *N Engl J Med* 2003, **348**(16):1546-1554.
23. Wichmann MW, Inthorn D, Andress HJ, Schildberg FW: **Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome.** *Intensive Care Med* 2000, **26**(2):167-172.
24. Crabtree TD, Pelletier SJ, Gleason TG, Pruett TL, Sawyer RG: **Gender-dependent differences in outcome after the treatment of infection in hospitalized patients.** *JAMA* 1999, **282**(22):2143-2148.
25. Croce MA, Fabian TC, Malhotra AK, Bee TK, Miller PR: **Does gender difference influence outcome?** *J Trauma* 2002, **53**(5):889-894.
26. Ho KM, Finn J, Dobb GJ, Webb SA: **The outcome of critically ill Indigenous patients.** *Med J Aust* 2006, **184**(10):496-499.
27. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay E, De Lassence A, Cohen Y, Meshaka P, Cheval C, Thuong M, Troche G *et al*: **Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost.** *J Crit Care* 2005, **20**(1):46-58.
28. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE: **APACHE II: a severity of disease classification system.** *Crit Care Med* 1985, **13**(10):818-829.
29. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R *et al*: **Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study.** *Intensive Care Med* 2002, **28**(2):108-121.
30. Danai PA, Moss M, Mannino DM, Martin GS: **The epidemiology of sepsis in patients with malignancy.** *Chest* 2006, **129**(6):1432-1440.
31. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH: **The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting.** *Chest* 2000, **118**(1):146-155.

32. Alvarez-Lerma F: **Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit.** ICU-Acquired Pneumonia Study Group. *Intensive Care Med* 1996, **22**(5):387-394.
33. Garrouste Orgeas M, Timsit JF, Soufir L, Tafflet M, Adrie C, Philippart F, Zahar JR, Clec'h C, Goldran-Toledano D, Jamali S *et al*: **Impact of adverse events on outcomes in intensive care unit patients.** *Crit Care Med* 2008, **36**(7):2041-2047.
34. Asch SM, Kerr EA, Keeseey J, Adams JL, Setodji CM, Malik S, McGlynn EA: **Who is at greatest risk for receiving poor-quality health care?** *N Engl J Med* 2006, **354**(11):1147-1156.
35. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW: **Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees.** *N Engl J Med* 1988, **318**(12):727-732.
36. De Maio A, Torres MB, Reeves RH: **Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis.** *Shock* 2005, **23**(1):11-17.
37. Stewart D, Fulton WB, Wilson C, Monitto CL, Paidas CN, Reeves RH, De Maio A: **Genetic contribution to the septic response in a mouse model.** *Shock* 2002, **18**(4):342-347.
38. Lin WJ, Wang CC, Lo WT, Chu ML, Lee CM: **Dizygotic twins discordant for early-onset *Citrobacter koseri* and group B streptococcal sepsis.** *J Formos Med Assoc* 2005, **104**(5):367-369.
39. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY: ***Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins.** *Ann Intern Med* 1994, **120**(12):982-986.
40. Brookes AJ: **The essence of SNPs.** *Gene* 1999, **234**(2):177-186.
41. Cooper DN, Nussbaum RL, Krawczak M: **Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations.** *Hum Genet* 2002, **110**(3):207-208.
42. Vitali SH, Randolph AG: **Assessing the quality of case-control association studies on the genetic basis of sepsis.** *Pediatr Crit Care Med* 2005, **6**(3 Suppl):S74-77.
43. Goldfeld AE, Doyle C, Maniatis T: **Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(24):9769-9773.
44. Fong CW, Siddiqui AH, Mark DF: **Characterization of protein complexes formed on the repressor elements of the human tumor necrosis factor alpha gene.** *J Interferon Cytokine Res* 1995, **15**(10):887-895.
45. An J, Ribeiro RC, Webb P, Gustafsson JA, Kushner PJ, Baxter JD, Leitman DC: **Estradiol repression of tumor necrosis factor-alpha transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(26):15161-15166.
46. Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE: **Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**(10):5232-5244.
47. Fugger R, Zadrobilek E, Gotzinger P, Klimann S, Rogy M, Winkler S, Andel H, Mittelbock M, Roth E, Schulz F *et al*: **Perioperative TNF alpha and IL-6 concentrations correlate with septic state, organ function, and APACHE II scores in intra-abdominal infection.** *Eur J Surg* 1993, **159**(10):525-529.
48. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, Moldawer LL: **Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis.** *Shock* 2005, **23**(6):488-493.

49. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T: **The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome.** *J Exp Med* 1989, **169**(1):333-338.
50. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, 3rd, Zentella A, Albert JD *et al*: **Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.** *Science* 1986, **234**(4775):470-474.
51. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ, 3rd, Albert JD, Fong Y, Hesse D, Beutler B, Manogue KR, Calvano S, Wei H *et al*: **Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog.** *Surg Gynecol Obstet* 1987, **164**(5):415-422.
52. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A: **Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.** *Nature* 1987, **330**(6149):662-664.
53. Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, Nedospasov SA, Rose-John S, Scheller J: **ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock.** *Plant Biotechnol J* 2010.
54. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW: **Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection.** *Cell* 1993, **73**(3):457-467.
55. Sariban E, Imamura K, Luebbbers R, Kufe D: **Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes.** *J Clin Invest* 1988, **81**(5):1506-1510.
56. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC: **Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells.** *Cytokine* 1999, **11**(8):600-605.
57. Aguillon JC, Escobar A, Ferreira V, Aguirre A, Ferreira L, Molina MC, Ferreira A: **Daily production of human tumor necrosis factor in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated ex vivo blood culture assays.** *Eur Cytokine Netw* 2001, **12**(1):105-110.
58. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW: **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(7):3195-3199.
59. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R *et al*: **Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans.** *Clin Exp Immunol* 1998, **113**(3):401-406.
60. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL: **Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation.** *J Inflamm* 1995, **46**(1):32-41.
61. Kovar FM, Marsik C, Cvitko T, Wagner OF, Jilma B, Endler G: **The tumor necrosis factor alpha -308 G/A polymorphism does not influence inflammation and coagulation response in human endotoxemia.** *Shock* 2007, **27**(3):238-241.
62. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F *et al*: **Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study.** *JAMA* 1999, **282**(6):561-568.

63. Tang GJ, Huang SL, Yien HW, Chen WS, Chi CW, Wu CW, Lui WY, Chiu JH, Lee TY: **Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection.** *Crit Care Med* 2000, **28**(8):2733-2736.
64. Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M: **Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease.** *J Infect Dis* 1996, **174**(4):878-880.
65. Hedberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ: **Tumor necrosis factor alpha -- 308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants.** *Pediatr Infect Dis J* 2004, **23**(5):424-428.
66. Dianliang Z, Jieshou L, Zhiwei J, Baojun Y: **Association of plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and its soluble receptors, two polymorphisms of the TNF gene, with acute severe pancreatitis and early septic shock due to it.** *Pancreas* 2003, **26**(4):339-343.
67. O'Keefe GE, Hybki DL, Munford RS: **The G-->A single nucleotide polymorphism at the - 308 position in the tumor necrosis factor-alpha promoter increases the risk for severe sepsis after trauma.** *J Trauma* 2002, **52**(5):817-825; discussion 825-816.
68. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U: **A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis.** *Crit Care Med* 1996, **24**(3):381-384.
69. Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, Cheung L, Peters CJ, McDermott MF, Millo JL, Welsh KI, Holloway P, Hitman GA *et al*: **TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study.** *Genes Immun* 2004, **5**(8):631-640.
70. Calvano JE, Um JY, Agnese DM, Hahm SJ, Kumar A, Coyle SM, Calvano SE, Lowry SF: **Influence of the TNF-alpha and TNF-beta polymorphisms upon infectious risk and outcome in surgical intensive care patients.** *Surg Infect (Larchmt)* 2003, **4**(2):163-169.
71. Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, Kishimoto T: **Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6.** *Ciba Found Symp* 1992, **167**:47-62; discussion 62-47.
72. Isshiki H AS, tanabe O *et al*: *Mol Cell Biol* 1990:2757-2764.
73. Ray A PK: *Proc Nati Acad Sci USA* 1994:752-756.
74. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC: **Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes.** *FEBS Lett* 1988, **232**(2):347-350.
75. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA: **Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis.** *Blood* 1989, **74**(5):1704-1710.
76. Schluter B, Konig B, Bergmann U, Muller FE, Konig W: **Interleukin 6--a potential mediator of lethal sepsis after major thermal trauma: evidence for increased IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells.** *J Trauma* 1991, **31**(12):1663-1670.
77. Riche FC, Cholley BP, Panis YH, Laisne MJ, Briard CG, Graulet AM, Gueris JL, Valleur PD: **Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis.** *Crit Care Med* 2000, **28**(2):433-437.

78. Gennari R, Alexander JW: **Anti-interleukin-6 antibody treatment improves survival during gut-derived sepsis in a time-dependent manner by enhancing host defense.** *Crit Care Med* 1995, **23**(12):1945-1953.
79. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, Lambris JD, Ward PA: **Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression.** *J Immunol* 2003, **170**(1):503-507.
80. van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF: **Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia.** *J Infect Dis* 1997, **176**(2):439-444.
81. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK: **IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.** *J Clin Invest* 1998, **101**(2):311-320.
82. Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V: **Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice.** *J Exp Med* 1994, **180**(4):1243-1250.
83. Remick DG, Bolgos G, Copeland S, Siddiqui J: **Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis.** *Infect Immun* 2005, **73**(5):2751-2757.
84. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: **The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis.** *J Clin Invest* 1998, **102**(7):1369-1376.
85. Flex A, Gaetani E, Pola R, Santoliquido A, Aloï F, Papaleo P, Dal Lago A, Pola E, Serricchio M, Tondi P *et al*: **The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with peripheral artery occlusive disease.** *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002, **24**(3):264-268.
86. Balding J, Livingstone WJ, Pittock SJ, Mynett-Johnson L, Ahern T, Hodgson A, Smith OP: **The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension.** *Ir J Med Sci* 2004, **173**(4):200-203.
87. Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, O'Keefe GE: **Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses.** *Shock* 2003, **20**(3):218-223.
88. Bennermo M, Held C, Green F, Strandberg LE, Ericsson CG, Hansson LO, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P: **Prognostic value of plasma interleukin-6 concentrations and the -174 G > C and -572 G > C promoter polymorphisms of the interleukin-6 gene in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis.** *Atherosclerosis* 2004, **174**(1):157-163.
89. Endler G, Marsik C, Joukhadar C, Marculescu R, Mayr F, Mannhalter C, Wagner OF, Jilma B: **The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism does not determine plasma interleukin-6 concentrations in experimental endotoxemia in humans.** *Clin Chem* 2004, **50**(1):195-200.
90. Schluter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van Aken H, Assmann G, Berendes E: **Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis.** *Crit Care Med* 2002, **30**(1):32-37.
91. Michalek J, Svetlikova P, Fedora M, Klimovic M, Klapacova L, Bartosova D, Hrstkova H, Hubacek JA: **Interleukin-6 gene variants and the risk of sepsis development in children.** *Hum Immunol* 2007, **68**(9):756-760.

92. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: **Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.** *J Exp Med* 1989, **170**(6):2081-2095.
93. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR: **Interleukin-10.** *Annu Rev Immunol* 1993, **11**:165-190.
94. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G: **Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence.** *Immunogenetics* 1997, **46**(2):120-128.
95. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: **Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug.** *Crit Care Med* 2002, **30**(1 Supp):S58-S63.
96. van der Poll T, JJ, Levi M et al: **Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees.** *J Exp Med* 1994:1985-1988.
97. Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P: **Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes.** *J Exp Med* 1993, **177**(2):523-527.
98. de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE: **Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10.** *J Immunol* 1993, **151**(11):6370-6381.
99. de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE: **Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation.** *J Immunol* 1993, **150**(11):4754-4765.
100. Wanidworanun C, Strober W: **Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis.** *J Immunol* 1993, **151**(12):6853-6861.
101. Tilg H, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW: **Induction of circulating interleukin 10 by interleukin 1 and interleukin 2, but not interleukin 6 immunotherapy.** *Cytokine* 1995, **7**(7):734-739.
102. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F: **IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha.** *J Immunol* 1996, **157**(1):12-20.
103. Jeannin P, Delneste Y, Seveso M, Life P, Bonnefoy JY: **IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells.** *J Immunol* 1996, **156**(9):3159-3165.
104. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW: **Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1.** *Science* 1990, **250**(4982):830-832.
105. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW: **Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes.** *J Immunol* 1992, **148**(11):3618-3623.
106. Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW: **Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor.** *J Immunol* 1994, **152**(4):1821-1829.
107. Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Guaza C: **LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10.** *Eur J Neurosci* 2001, **13**(3):493-502.
108. Michel G, Mirmohammadsadegh A, Olasz E, Jarzebska-Deussen B, Muschen A, Kemeny L, Abts HF, Ruzicka T: **Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human**

- epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes.** *J Immunol* 1997, **159**(12):6291-6297.
109. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: **Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.** *J Exp Med* 1991, **174**(5):1209-1220.
 110. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D: **Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance.** *J Clin Invest* 1995, **96**(5):2339-2347.
 111. Marchant A, Alegre ML, Hakim A, Pierard G, Marecaux G, Friedman G, De Groote D, Kahn RJ, Vincent JL, Goldman M: **Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock.** *J Clin Immunol* 1995, **15**(5):266-273.
 112. Friedman G, Jankowski S, Marchant A, Goldman M, Kahn RJ, Vincent JL: **Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock.** *J Crit Care* 1997, **12**(4):183-187.
 113. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT: **Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis.** *Crit Care* 2007, **11**(2):R49.
 114. Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA: **Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock.** *Crit Care Med* 2000, **28**(7):2591-2594.
 115. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M: **Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients.** *Lancet* 1998, **351**(9107):950-953.
 116. Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuen U, Trentz O, Ertel W: **Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients.** *J Trauma* 1997, **42**(5):863-870; discussion 870-861.
 117. Kumar A, Zanotti S, Bunnell G, Habet K, Anel R, Neumann A, Cheang M, Dinarello CA, Cutler D, Parrillo JE: **Interleukin-10 blunts the human inflammatory response to lipopolysaccharide without affecting the cardiovascular response.** *Crit Care Med* 2005, **33**(2):331-340.
 118. Sfeir T, Saha DC, Astiz M, Rackow EC: **Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock.** *Crit Care Med* 2001, **29**(1):129-133.
 119. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ: **IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense.** *J Immunol* 1999, **162**(1):392-399.
 120. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A: **Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease.** *Lancet* 1997, **349**(9069):1912-1913.
 121. van der Linden MW, Huizinga TW, Stoeken DJ, Sturk A, Westendorp RG: **Determination of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation.** *J Immunol Methods* 1998, **218**(1-2):63-71.

122. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV: **An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter.** *Eur J Immunogenet* 1997, **24**(1):1-8.
123. Rees LE, Wood NA, Gillespie KM, Lai KN, Gaston K, Mathieson PW: **The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**(3):560-569.
124. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C: **Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms.** *Transplantation* 2003, **75**(5):711-717.
125. Stanilova SA, Miteva LD, Karakolev ZT, Stefanov CS: **Interleukin-10-1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility.** *Intensive Care Med* 2006, **32**(2):260-266.
126. Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, Seitzer U, Kothe H, Maass M, Zabel P, Dalhoff K: **Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **168**(4):476-480.
127. Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, Bella A, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ: **Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia.** *Thorax* 2003, **58**(2):154-156.
128. Balding J, Healy CM, Livingstone WJ, White B, Mynett-Johnson L, Cafferkey M, Smith OP: **Genomic polymorphic profiles in an Irish population with meningococcaemia: is it possible to predict severity and outcome of disease?** *Genes Immun* 2003, **4**(8):533-540.
129. Gong MN, Thompson BT, Williams PL, Zhou W, Wang MZ, Pothier L, Christiani DC: **Interleukin-10 polymorphism in position -1082 and acute respiratory distress syndrome.** *Eur Respir J* 2006, **27**(4):674-681.
130. Schroeder O, Schulte KM, Schroeder J, Ekkernkamp A, Laun RA: **The -1082 interleukin-10 polymorphism is associated with acute respiratory failure after major trauma: a prospective cohort study.** *Surgery* 2008, **143**(2):233-242.
131. Reid CL, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Campbell IT: **Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome.** *Crit Care Med* 2002, **30**(10):2216-2221.
132. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: **The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine.** *Intensive Care Med* 1996, **22**(7):707-710.
133. Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, Pettila V, Parviainen I, Ala-Kokko TI, Kolho E, Rintala EM: **Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study.** *Intensive Care Med* 2007, **33**(3):435-443.
134. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B: **Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis.** *JAMA* 1995, **274**(12):968-974.
135. Salvo I, de Ciani W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfler A, Montani C, Magni E: **The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock.** *Intensive Care Med* 1995, **21** Suppl 2:S244-249.

136. Huang SL, Su CH, Chang SC: **Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **156**(5):1436-1439.
137. Calvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF: **Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance.** *Shock* 2003, **20**(5):415-419.
138. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR: **Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients.** *Crit Care Med* 2003, **31**(1):34-38.
139. Shu Q, Fang X, Chen Q, Stuber F: **IL-10 polymorphism is associated with increased incidence of severe sepsis.** *Chin Med J (Engl)* 2003, **116**(11):1756-1759.