

RĪGAS STRADIŅA UNIVERSITĀTE



RĪGAS
STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Oļegs Sabeļņikovs

**Ģenētisko polimorfismu saistība ar septisko
komplikāciju attīstību un klīnisko gaitu**

Promocijas darba kopsavilkums

medicīnas zinātņu doktora grāda iegūšanai

Specialitāte - anestezioloģija un reanimatoloģija

Rīga, 2011

Promocijas darbs veikts:

- Rīgas Stradiņa universitātes Anestezioloģijas un reanimatoloģijas katedrā,
- Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Intensīvās terapijas un reanimācijas nodaļā,
- Valsts aģentūrā „Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs”,
- Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Imunoloģijas centrā.

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. med., profesors **Indulis Vanags**

Dr.med. **Liene Nikitina-Zaķe**

Darba zinātniskais konsultants: Dr.med., docente **Angelika Krūmiņa**

Oficiālie recenzenti:

Dr.med., docente **Ilze Štrumfa** (Rīgas Stradiņa universitāte)

Dr.biol. **Aija Linē** (Latvijas biomedicīnas studiju un pētniecības centrs)

Dr.med. **Vladimirs Harlamovs** (P.Stradiņa KUS)

Promocijas darba aizstāvēšana notiks **2011.gada 7.martā plkst.16.00** Rīgas Stradiņa universitātes (RSU) Teorētiskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties Rīgas Stradiņa universitātes bibliotēkā, Latvijas Akadēmiskajā bibliotēkā un Nacionālajā bibliotēkā.

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



Promocijas padomes sekretāre: Dr. habil. med., profesore **Līga Aberberga-Augškalne**

Ievads

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 starp intensīvās terapijas nodaļu (ITN) pacientiem (Angus, Linde-Zwirble et al. 2001). Saskaņā ar nesen veiktā *SOAP (Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients)* pētījuma datiem, sepses incidence Eiropas valstu ITN svārstās no 17,5% līdz 72,5%, bet mirstība ITN - no 7,9% līdz 34,8% (Vincent, Sakr et al. 2006). Analizējot sepses incidenci pasaulē 1979.-2000.gados, novēroja tās pieaugumu vidēji par 13,7% gadā (Martin G 2003).

Augstus sepses sastopamības un mirstības rādītājus nosaka vairāki faktori (piem., slimnieku vecuma un blakuspatoloģiju skaita pieauguma tendence (Dombrovskiy, Martin et al. 2007), invazīvo manipulāciju skaita pieaugums medicīnā, augošā 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 uzsvērta arī jaunajā *PIRO* koncepcijā, kas tiek piedāvāta kā riska noteikšanas metode un potenciāli arī kā iekļaušanas kritērijs pētījumos (Angus, Burgner et al. 2003). Ģenētiskās predispozīcijas noteikšanas nozīmi paredz arī modernāko terapijas un diagnostikas metožu attīstībā (Cariou, Chiche et al. 2002). Kaut gan ģenētisko faktoru nozīme infekcijas slimību attīstībā un klīniskā gaitā ir novērota vairākos pētījumos (Sorensen, Nielsen et al. 1988; Frodsham and Hill 2004), tomēr lielākai daļai iekaisuma procesu regulācijā iesaistīto gēnu nozīme un funkcija organismā joprojām vēl nav pilnībā noskaidrota.

Sepses patoģenēzē svarīga loma pieder iekaisumu veicinošo (proinflamatoro) un iekaisumu nomācošo (antiinflamatoro) 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 precīzē izvēlēto citokīnu ģenētisko polimorfismu lomu septisko komplikāciju patoģenēzē saistībā ar predispozīciju, klīniskās gaitas īpatnībām, kā arī ar izdzīvošanas prognozi Latvijas pacientiem.

Pētījuma mērķis

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

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.

Darba novitāte, zinātniskā un praktiskā nozīme

Darba novitāte: Latvijā pirmo reizi tika veikts ģenētiskais asociācijas pētījums ITN sepses slimnieku populācijā ar mērķi precīzēt citokīnu gēnu polimorfisma saistību ar septiskā šoka incidenci, sepses klīnisko gaitu un iznākumu.

Zinātniskā nozīme: Precīzējot ģenētiskos polimorfismus, kas ir saistīti ar smagāku sepses gaitu un prognozi, pavērtos iespēja mērķtiecīgāk pētīt pamatā esošos molekulāros mehānismus, pilnveidojot mūsdienīgo sepses patoģenēzes izpratni.

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).

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

TNF A -308 A/G, IL-6 -174 G/C, IL-10 -1082 G/A polimorfismu biežumi ITN sepses slimniekiem ir līdzīgi līdzšinējo publikāciju datiem.

Septiskā šoka slimniekiem, kā arī ITN mirušiem slimniekiem raksturīgi augstāki IL-6 un TNF α cirkulējošie līmeņi (nekā attiecīgi slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm un ITN izdzīvojušiem slimniekiem).

IL-6 -174 G/C polimorfisms sepses slimniekiem ir saistīts ar zemāku IL-6 cirkulējošo koncentrāciju un augstāku nelabvēlīgā iznākuma risku ITN ārstēšanas laikā, bet nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci.

IL-10 -1082 G/A polimorfisms ir saistīts ar augstāku miršanas risku ITN posmā, bet nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci un augstāku IL-10 cirkulējošo koncentrāciju.

Promocijas darba struktūra

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā. Darbs sastāv no 8 nodaļām: ievada, literatūras apskata, pētījuma metožu izklāsta, rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, rekomendācijām un citēto publikāciju saraksta. Kopējais darba apjoms ir 119 lappuses, analītiski ilustratīvais materiāls attēlots 71 tabulā, 34 attēlos. Literatūras saraksts sastāv no 139 atsaucēm.

Zinātniskā darba aprobācija

Darba rezultāti ir ziņoti 7 starptautiskos zinātniskos kongresos un konferencēs. Ir publicēti 4 raksti recenzējamos medicīnas izdevumos, 5 – citos izdevumos un mācību literatūrā. Iegūts viens patents. Publikāciju, kongresu un konferenču tēžu saraksts ir pievienots kopsavilkuma noslēgumā.

Izpētes materiāls 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 slimnīcas Imunoloģijas centru (vadītāja dr. I. Jaunalksne) un valsts aģentūru „Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs” (Dr. med. L. Ņikitina-Zaķe). Pētījuma metodoloģiju 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.).

Pētījuma metodoloģija, kopējās slimnieku grupas atlasē principi un izslēgšanas kritēriji

Pētījuma kopējā grupa izveidota no 103 ITN sepses slimniekiem ar pierādītu infekciju un tās izraisītām sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindroma pazīmēm, ko nevarēja izskaidrot ar citu patoloģisko procesu norisi. Pētījumā netika iekļauti slimnieki jaunāki par 18 gadiem, hroniski vai šīs saslimšanas laikā saņēmuši imūnomodulējošo terapiju, atteikušies piedalīties pētījumā.

Saskaņā ar definētajiem darba uzdevumiem iegūto datu analīze tika veikta apakšgrupās:

- slimniekiem ar/bez septiskā šoka pazīmēm un
- izdzīvojušiem/mirušiem slimniekiem.

Septiskā šoka diagnostiskie kritēriji - sistoliskais arteriālais spiediens zem 90 mmHg, vidējais arteriālais spiediens zem 60 mmHg vai sistoliskā arteriālā spiediena pazemināšanās vairāk par 40 mmHg no izejošā pie adekvātas infūzijas terapijas, ja nav citu arteriālās hipotensijas iemeslu.

Citokīnu analīze

Pētāmo citokīnu (TNF α , IL-6, IL-10) koncentrācijas noteikšana veikta Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Imunoloģijas centrā. Venozās asinis iegūtas venopunkcijā izmantojot BD (*Becton Dickenson*) vakutainerus. Pacienta materiāls pēc iegūšanas centrifugēts, serums alikvotēts *ependorf* stobriņos un sasaldēts -70°C līdz testa veikšanai. Citokīnu līmenis noteikts izmeklējamā pacienta serumā, izmantojot mikroplates cietās fāzes imūnfermentatīvo metodi (*BioSource*, Nivelles, Beļģija). Testā izmantotas monoklonālās antivielas pret dažādiem attiecīga citokīna epitopiem. Kalibratori un izmeklējamais pacienta materiāls (serums) reaģē ar monoklonālajām antivielām (MKA1) ar ko nosegta mikroplate un reaģē ar monoklonālajām antivielām, kuras konjugētas ar peroksidāzi (MKA2). Pēc inkubācijas veidojas komplekss MKA1-citokīns-MKA2-peroksidāze. Pēc inkubācijas mazgā mikroplati, lai atdalītu nesaistītās antivielas. Pievieno hromogēnu (TMB), inkubē un reakciju apstādina ar Stop-apstādīšanas šķīdumu. Rezultātu nolasa ar fotometru, izmantojot noteiktu viļņu garumu. Fotokolorimetriski nolasītais optiskais blīvums ir tieši proporcionāls citokīna koncentrācijai izmeklējamajā materiālā. Pēc kalibratoru optiskajiem rādītājiem veido kalibrācijas līkni, no kuras nolasa izmeklējamā materiālā iegūto attiecīgā citokīna koncentrāciju.

Ģenētisko polimorfismu tipēšana

Ģenētisku polimorfismu tipēšana veikta 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 sekvenču un izvēlēti oligonukleotīdi polimerāzes ķēdes reakcijai (PĶR) un sekvenēšanas reakcijai. PĶR reakcijas maisījums 1 paraugam ir sekojošs – 15mkl 2xPCR Master Mix (Fermentas, Lietuva), 1Mm sekvenču specifiski oligonukleotīdi (1.tabula) un 28ng sausas genomiskās DNS.

1.tabula. Polimerāzes ķēdes reakcijai un sekvenēšanai izmantotie oligonukleotīdi

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

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*) DNS sekvenseru saskaņā ar izgatavotāja rekomendācijām.

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 ar aprakstošās un analītiskās statistikas metodēm.

Aprakstošā statistika

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

Aprakstot attiecības skalas mainīgo sadalījumu (centrālo tendenci, izkliedi), izmantots vidējais aritmētiskais un standartnovirze (normāli sadalītiem datiem) vai mediāna vērtība un starpkvartiļu 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.

Polimorfismu saistības statistiskā analīze

Izvērtējot izvēlētā 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 apreķinātas 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.

Pētījuma rezultāti

Kopējās pētījuma populācijas un analizējamo apakšgrupu raksturojums

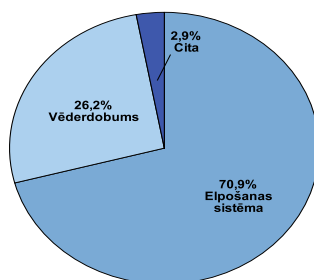
Saskaņā ar darba uzdevumiem, pētījuma rezultātā ir iegūti sistematizēti un statistiski apstrādāti 103 pieaugušo ITN sepses pacientu demogrāfiskie, epidemioloģiskie, klīniskie un laboratoriskie (tajā skaitā arī ģenētiskie) dati. Pirmo reizi Latvijā šai slimnieku populācijai ir tipēti citokīnu gēnu polimorfismi un iegūtā informācija attiecināta uz epidemioloģiskām un klīniskām sepses gaitas īpatnībām.

Kopējā pētījuma populācijā tika analizēti vairāki ar slimniekiem saistīti demogrāfiskie un klīniskie raksturlielumi (2.tabula), ar mērķi izvērtēt salīdzināmo apakšgrupu viendabīgumu un apzināties citu iespējamo riska faktoru ietekmi uz pētāmo rezultātu (piem., septiskā šoka attīstību vai mirstību ITN).

2.tabula. Demogrāfiskā un klīniskā informācija par kopējās pētījuma grupas slimniekiem

Raksturlielums	Mērvienība, prezentācijas veids	Vērtība
Dzimums	Vīrieši, n (%)	77 (74,8%)
Vecums	gados, vidējais (\pm SD),	58,7 (\pm 13,4)
MODS smaguma pakāpe	SOFA punktu mediāna vērtība (IQR)	7 (4-10)
Mirstība	n (%)	44 (42,7%)
Ārstēšanas ilgums ITN	dienas, mediāna vērtība (IQR)	11 (4-17)
Septiskā šoka incidence	n (%)	25 (24,3%)

Pētījumā tika analizēta arī primārā infekcijas procesa lokalizācija (1.attēls) un ierosinātāju mikrobioloģiskais profils (3.tabula).



1.attēls. Pētījuma slimnieku sadalījums pēc primārās infekcijas lokalizācijas

3.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

Lai apzinātos citu riska faktoru potenciālo ietekmi uz sagaidāmo rezultātu, pētāmās apakšgrupās salīdzināti svarīgākie demogrāfiskie un klīniskie raksturlielumi (4.tabula un 5.tabula).

4.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	Mann-Whitney U tests
MODS smagums, SOFA skalas punktu mediāna (IQR)	6 (4-8)	9 (6-12)	0,002	Mann-Whitney U tests
Septiskais šoks, n (%)	10 (17%)	15 (34%)	0,045	Pīrsona χ^2 tests

TNFα, mediāna (IQR), pg/ml	26 (18-40)	40 (28-63)	0,002	<i>Mann-Whitney U tests</i>
IL-6, mediāna (IQR), pg/ml	190 (95-430)	450 (235-790)	0,003	<i>Mann-Whitney U tests</i>
IL-10, mediāna (IQR), pg/ml	1 (1-7)	2 (1-39)	0,027	<i>Mann-Whitney U tests</i>

5.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 (15,7)	58,5 (12,7)	0,87	t-tests
ITN ārstēšanas ilguma mediāna (IQR), dienas	12 (2-19)	11 (6-17)	0,76	<i>Mann-Whitney U tests</i>
MODS smagums, SOFA skalas punktu mediāna (IQR)	12 (10-15)	6 (4-8)	<0,01	<i>Mann-Whitney U tests</i>
Miruši, n (%)	15 (60%)	29 (37%)	0,045	Pīrsona χ^2 tests
TNFα, mediāna (IQR), pg/ml	51 (35-130)	29 (18-40)	0,001	<i>Mann-Whitney U tests</i>
IL-6, mediāna (IQR), pg/ml	680 (400-2000)	210 (100-440)	0,001	<i>Mann-Whitney U tests</i>
IL-10, mediāna (IQR), pg/ml	12 (1-42)	1 (1-7)	0,014	<i>Mann-Whitney U tests</i>

Ģenētisko polimorfismu biežumu analīze

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). Novērotā pētāmo polimorfismu frekvence attēlota 6.tabulā.

6.tabula. Novērotās pētāmo polimorfismu un alēļu frekvences kopējā pētījuma populācijā

Polimorfisms	Izplatītākā alēle	Retākā alēle	Novērotā polimorfisma frekvence	Novērotā rētākās alēles frekvence	H-W tests, p vērtība
TNF (-308)	G	A	0,36	0,19	0,51
IL-6 (-174)	G	C	0,71	0,45	0,84
IL-10 (-1082)	A	G	0,69	0,42	0,51

Novērotā pētāmo polimorfismu un retāko alēļu frekvence apakšgrupās attēlota 7.tabulā.

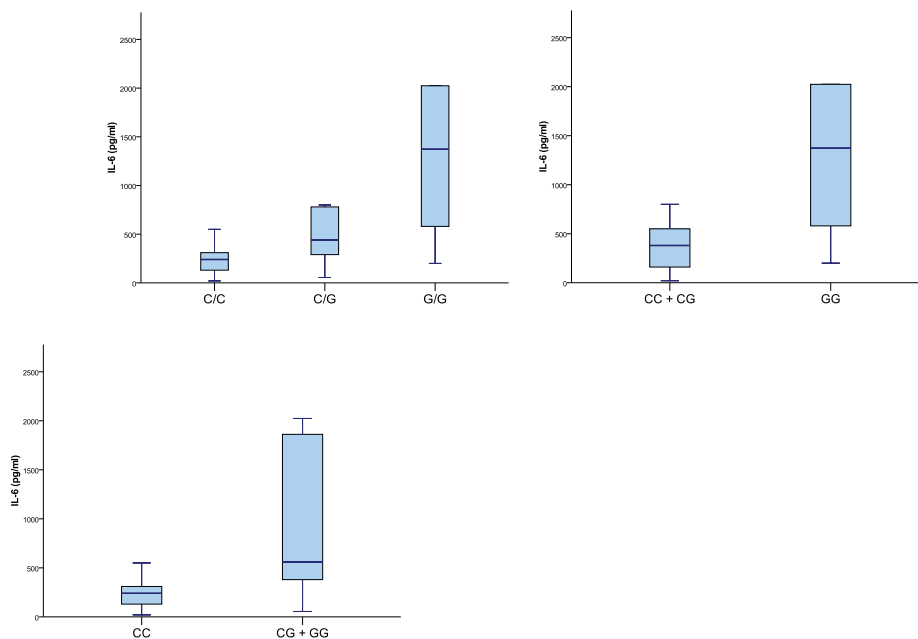
7.tabula. Novērotās pētāmo polimorfismu un alēļu frekvences apakšgrupās

	TNF -308 A/G	TNF -308 A	IL-6 -174 C/G	IL-6 -174 C	IL-10 -1082 G/A	IL-10 -1082 G
„ar šoku“	0,38	0,19	0,76	0,48	0,72	0,42
„bez šoka“	0,36	0,21	0,69	0,44	0,68	0,42
Izdzīvojušiem	0,38	0,20	0,66	0,39	0,61	0,40
Mirušiem	0,34	0,18	0,77	0,53	0,80	0,46

Saistība „polimorfisms – citokīnu līmenis”

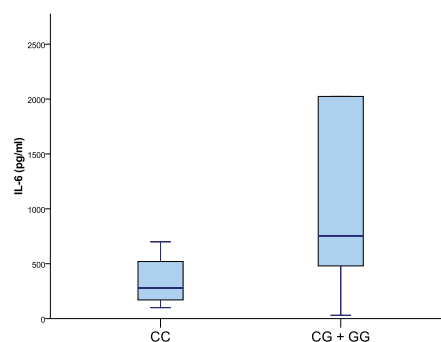
Salīdzinot citokīnu sistēmisko koncentrāciju pēc attiecīgā polimorfisma genotipa sadalītās grupās, kā arī dominantajā (retākās alēles nēsātāji pret biežākās alēles homozigotām) un recesīvajā modelī (retākās alēles homozigotas pret biežākās alēles nēsātājiem), kopējā pētījuma populācijā nenovēroja testējamo polimorfismu saistību ar cirkulējošo citokīnu līmeni.

Tajā pat laikā mirušo slimnieku grupā novēro būtiski zemāku IL-6 līmeni IL-6 - 174 C/G polimorfisma nēsātājiem, testējot saistību vairākos ģenētiskos modeļos (2.attēls).



2.attēls. IL-6 līmenis mirušiem slimniekiem dažādos IL -174 C/G ģenētiskos modeļos

IL-6 -174 C/G polimorfisma saistību ar IL-6 sistēmisko koncentrāciju novēroja arī septiskā šoka slimniekiem recesīvajā ģenētiskajā modelī (3.attēls).



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

TNF -308 A/G un IL-10 -1082 A/G polimorfismu saistību ar attiecīgā citokīna koncentrāciju apakšgrupās nenovēro.

Saistība „polimorfisms – septiskais šoks”

Analizējot pētamo polimorfismu saistību ar septiskā šoka incidenci starp sepses slimniekiem ar un bez šoka pazīmēm, salīdzinājām alēļu un genotipu sadalījumu dažādos ģenētiskos modeļos.

Nevienā testā nav novērota polimorfismu saistība ar septiskā šoka incidenci (analīze veikta gan kopējā pētījuma populācijā, gan mirušo/izdzīvojušo slimnieku apakšgrupā).

Saistība „polimorfisms – klīniskais iznākums”

Pētāmo polimorfismu saistību ar klīnisko iznākumu analizējām salīdzinot alēļu un genotipu sadalījumu starp mirušiem un izdzīvojušiem slimniekiem.

IL-6 -174 C/G polimorfismam saistību novēroja gan kopējā pētījuma populācijā, gan sepes slimniekiem bez septiskā šoka pazīmēm (8.tabula un 9.tabula).

8.tabula. IL-6 -174 polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos kopējā pētījuma populācijā

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pīrsona χ^2 tests)	OR (CI 95%)
C/G	47/41	46/72	0,04	1,79 (1,03-3,14)
CC+CG/GG	34/10	39/20	0,22	1,74 (0,72-4,24)
CC/CG+GG	13/31	7/52	0,03	3,12 (1,12-8,65)

9.tabula. IL-10 -174 polimorfisma saistība ar klīnisko iznākumu dažādos ģenētiskos modeļos slimniekiem bez septiskā šoka

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pīrsona χ^2 tests)	OR (CI 95%)
C/G	33/25	36/62	0,014	2,27 (1,17-4,41)
CC+CG/GG	23/2	31/18	0,008	6,68 (1,41-31,7)
CC/CG+GG	10/19	5/44	0,009	4,63 (1,39-15,4)

IL-10 -1082 A/G polimorfismam saistību novēroja gan kopējā pētījuma populācijā, gan arī slimniekiem ar septisko šoku (10.tabula un 11.tabula).

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

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pīrsona χ^2 tests)	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)

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

	Mirušie	Izdzīvojušie	P (Pīrsona χ^2 tests)	OR (95% CI)
G/A	16/14	5/15	0,047	3,41 (0,992-11,884)
GG+GA/AA	14/1	4/6	0,007 ¹	21 (1,9-229)
GG/GA+AA	2/13	1/9	0,802	1,39 (0,108-17,7)

¹ Fisher's Exact tests

TNF -308 polimorfismam saistība ar klīnisko iznākumu nav novērota ne kopējā pētījuma grupā, ne arī slimniekiem ar/bez septiskā šoka pazīmēm.

Diskusija

Darbā analizēta TNFA -308 A/G, IL-6 -174 C/G, IL-10 -1082 G/A polimorfismu asociācija ar attiecīgo citokīnu (TNF α , IL-6, IL-10) sistēmisko līmeni, septiskā šoka incidences un mirstības raksturlielumiem. Definētās saistības analizētas gan kopējā pētījuma populācijā (ITN sepses slimniekiem), gan saskaņā ar pētījuma uzdevumiem izvēlētajās apakšgrupās (slimniekiem ar/bez šoka pazīmēm un mirušiem/izdzīvojušiem).

Kopējās pētījuma populācijas svarīgākie demogrāfiskie raksturlielumi būtiski neatšķiras no līdzšinējo epidemioloģisko pētījumu rezultātiem, kas liecina par izvēlētas populācijas, diagnostisko kritēriju un ārstēšanas taktikas līdzību un sniedz iespēju salīdzināt iegūtos rezultātus (Angus, Linde-Zwirble et al. 2001; Martin, Mannino et al. 2003; Vincent, Sakr et al. 2006).

Izvēlētajās apakšgrupās arī nenovēro būtisku demogrāfisko raksturlielumu atšķirību, kas izslēdz vecuma un dzimuma ietekmi uz analizējamiem parametriem. Tajā pat laikā septiskā šoka slimniekiem un mirušo apakšgrupā novēroja smagāku multiorgānu mazspējas sindroma gaitu, ko raksturo augstāks SOFA skalas punktu skaits. Līdzīgi apakšgrupās novēroja statistiski nozīmīgas atšķirības pētamo citokīnu koncentrācijās. Augstākās TNF α , IL-6 un IL-10 koncentrācijas novēroja septiskā šoka, kā arī mirušo slimnieku apakšgrupās, kas saskan ar līdzšinējo publikāciju rezultātiem. Tajā pat laikā būtu jāpiebilst, ka, neskatoties uz statistiskos testos sasniegto būtiskuma līmeni ($p < 0,05$), novērotās citokīnu līmeņa atšķirības būtu jāvērtē arī no klīniskā nozīmīguma viedokļa. Klīniski nozīmīga šķiet IL-6 koncentrāciju starpība analizējamās apakšgrupās – vairāki simti pg/ml. TNF α cirkulējošās koncentrācijas klīniskais

lietderīgums ir apsverams, jo apakšgrupās novērotā sistēmisko līmeņu starpība nepārsniedz 30 pg/ml. IL-10 cirkulējošo koncentrāciju starpība apakšgrupās neizskatās klīniski nozīmīga, tā nepārsniedz 15 pg/ml.

Pētījumā novērotās TNF -308, IL-174, IL-10 -1082 polimorfismu frekvences atbilst novērotām līdzšinējos pētījumos (12.tabula).

12.tabula. Pētāmo polimorfismu un alēļu līdzšinējos pētījumos novērotās frekvences

Polimorfisms	Novērotā SNP frekvence	Līdzšinējās publikācijās (intervāls)	Novērotā retākās alēles frekvence	Līdzšinējās publikācijās (intervāls)
TNF (-308)	0,36	0,23-0,39 ¹	0,19	0,12-0,21 ¹
IL-6 (-174)	0,71	0,69-0,74 ²	0,45	0,41-0,49 ²
IL-10 (-1082)	0,69	0,46-0,93 ³	0,42	0,26-0,60 ³

¹ Mira, Cariou et al. 1999; Tang, Huang et al. 2000; Gordon, Lagan et al. 2004

² Schluter, Raufhake et al. 2002; Michalek, Svetlikova et al. 2007

³ Lowe, Galley et al. 2003; Shu, Fang et al. 2003; Schaaf, Boehmke et al. 2003; Stanilova, Miteva et al. 2006

Novērotā pētāmo polimorfismu prevalences līdzība citu autoru pētījumiem kopā ar demogrāfisko un klīnisko raksturlielumu līdzību zināmā mērā norāda uz pētāmo populāciju līdzību (līdzīgiem atlasē kritērijiem) un sniedz iespēju savstarpēji salīdzināt pētījumos iegūtos kvantitatīvos parametrus.

Saistība „*polimorfisms – citokīna līmenis*” pētījumā novērota tikai IL-6 -174 C/G polimorfismam. Alternatīvas IL-6 -174 alēles nēsātājiem novēroja saistību ar zemāko IL-6 sistēmisko koncentrāciju. Jāatzīmē, ka IL-6 līmeņu atšķirība ir gan statistiski, gan arī klīniski nozīmīga. 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. Kopējā 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).

Tomēr novēroto IL-6 polimorfisma saistību ar IL-6 sistēmisko koncentrāciju būtu jāinterpretē uzmanīgi. Diskutējams jautājums par IL-6 -174 polimorfisma cēlonisko saistību ar izmaiņām IL-6 cirkulējošā līmenī. Šī pētījuma metodoloģija nesniedz precīzu

atbildi uz šo jautājumu, proti, 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.

Pētījumā novēroto asociāciju trūkumu ar citokīna koncentrāciju TNF un IL-10 gēnu polimorfismiem varētu izskaidrot, ņemot vērā metodoloģiskās īpatnības, kas pazemina veiktā pētījuma jutību šo efektu novērošanā.

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 multifaktoriālo slimību gadījumos, 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 pārāk 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, kam 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 TNFa koncentrācijas dinamika var izteikti mainīties 24h pēc eksperimentālas endotoksīna ievadīšanas (Kovar, Marsik et al. 2007).

Ņemot vērā, ka vairāki ar pētījuma metodoloģiju saistīti faktori varēja mazināt tā jutību uz polimorfisma efekta atklāšanu, nav iespējams korekti noraidīt hipotēzi par pētāmo kandidātpolimorfismu ietekmi uz citokīnu sistēmisko koncentrāciju.

Saistība „*polimorfisms – klīniskais iznākums*” pētījumā novērota IL-6 -174 C/G un IL-10 -1082 A/G polimorfismiem.

Saskaņā ar mūsu 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 (13.tabula).

13.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 polimorfisma frekvences, p vērtība un miršanas OR izdzīvojušiem un mirušiem kopējā pētījuma populācijā	IL-6 -174 polimorfisma frekvences, p vērtība un miršanas OR izdzīvojušiem un mirušiem slimniekiem bez šoka pazīmēm
Autora pētījums	Latvija, ITN sepses slimnieki, n=103	43% (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)
<i>Schluter, Raufhake et al. 2002</i>	Vācija, ITN sepses slimnieki, n=50	50% (n=25)	0,56 un 0,92 P=0,004 OR 9,04 (1,7-46,9)	Atsevišķa analīze pētījumā nav veikta

Novērojām IL-6 -174 polimorfisma saistību ar prognozi slimniekiem *bez šoka pazīmēm*. Mūsu pētījuma apakšgrupa „sepses slimnieki bez šoka pazīmēm” visvairāk atbilst *Schluter* pētīmai ITN sepses slimnieku populācijai (līdzīga mirstība, genotipu sadalījumi, OR utt.). 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).

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. Jāatzīmē, ka kopējās 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 (14.tabula).

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

Autors	Populācija	Novērotā 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	Kopējā 43% Septiskā šoka 60%	0,61 un 0,79 P=0,04 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, Boehmke et al. 2003</i>	Vācija, pneimokoku infekcijas slimnieki, n=69	7%	0,20 un 0,60 P=0,65 OR 2,40 CI 95% (0,25-22,7)	Mirstības dati nav norādīti atsevišķi
<i>Stanilova, Miteva et al. 2006</i>	Bulgārija, ITN sepses slimnieki, n=33	64%	0,33 un 0,57 P=0,18 OR 2,67 TI 95% (0,61-11,7)	Septiskā šoka slimnieki atsevišķi nav analizēti
<i>Lowe, Galley et al. 2003</i>	Lielbritānija, ITN slimnieki, n=67	33%	Saistība nav novērota (genotipu sadalījumi publikācijā nav norādīti)	Septiskā šoka slimnieki atsevišķi nav analizēti
<i>Shu, Fang et al. 2003</i>	Ķīna, sepses slimnieki, n=116	Nav ziņots	~0,5 un ~0,5	Septiskā šoka slimnieki atsevišķi nav analizēti

Kaut gan autora un kolēģu 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 veiktajā 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 rezultātiem šajā apakšgrupā miršanas izredžu attiecība polimorfisma nēsātājiem ir vismaz 1,9 reizes augstāka nekā parastā genotipa nēsātājiem.

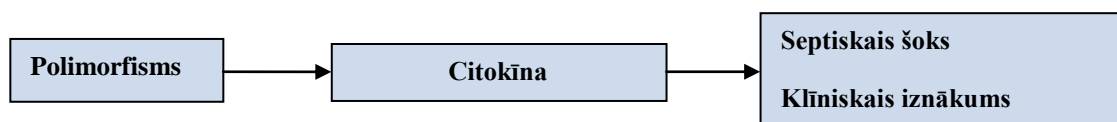
Kopumā pētījumā IL-6 un IL-10 kandidātpolimorfismiem novēroja saistību ar klīnisko iznākumu apakšgrupās. Atrades interpretāciju apgrūtinā fakts, ka tieši šajās apakšgrupās polimorfismu saistību ar citokīnu koncentrāciju nenovēro. Hipotēzē izteiktais polimorfisma funkcionālā nozīmīguma patoģenētiskais mehānisms (spēja ietekmēt citokīna koncentrāciju) nav apstiprinājies (iespējamie iemesli ir apskatīti

iepriekš). Ja pieņem, ka polimorfismi neietekmē attiecīgo citokīnu koncentrāciju, būtu jāsecina, ka tie ir saistīti ar klīnisko iznākumu caur citiem neidentificētiem patoģenētiskiem mehānismiem. Viens no iespējamiem izskaidrojumiem varētu būt, ka pētāmie polimorfismi tiek nelīdzsvaroti pārmantoti kopā ar citiem (neidentificētiem) funkcionāli nozīmīgiem ģenētiskiem variantiem, kas tieši ietekmē citokīnu gēnu ekspresiju.

Nevienam no pētījuma kandidatpolimorfismiem nav novērota saistība ar septiskā šoka attīstību. Septiskā šoka patoģenēzē nozīmīga loma ir vairākiem efektoriem mehānismiem, tajā skaitā arī TNF α 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. Jāatzīmē tomēr, ka klīniski nozīmīgas atšķirības novēroja tikai IL-6 (210 un 680 pg/ml), bet TNF α (51 un 29 pg/ml) un IL-10 (12 un 1 pg/ml) koncentrācijas atšķirības, kaut gan ir bijušas statistiski ticamas, bet klīniski maznozīmīgas. Ņemot vērā, ka efektoro citokīnu koncentrācijas slimniekiem ar un bez šoka atšķiras maznozīmīgi, būtu loģiski arī pieņemt, ka citokīnu kodējošo gēnu variācijas šajā gadījumā arī būtiski neietekmē septiskā šoka attīstību.

Kaut gan ir iespējams arī cits variants, ka saistība pastāv, bet nav detektēta. Šo versiju atbalsta pētījumi, kur TNF α 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 šā pētījuma rezultātiem var secināt, ka saistību nenovēroja, bet apgalvot, ka saistība nepastāv, tomēr nav iespējams.

Pētījuma izvīrītā 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*”, 4.attēls.



4.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 (15.tabula).

15.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

Izvirzītā pētījuma hipotēze par ģenētisko polimorfismu saistību ar citokīnu sistēmisko koncentrāciju, septiskā šoka attīstību un klīnisko iznākumu daļēji apstiprinājās IL-6 -174 G/C polimorfismam, kam izdevās noteikt 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.

Secinājumi

IL-6 -174 G/C polimorfisms sepses slimniekiem ir saistīts ar zemāku IL-6 cirkulējošo koncentrāciju un augstāku nelabvēlīgā iznākuma risku ITN ārstēšanas laikā, bet nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci.

IL-10 -1082 G/A polimorfisms ir saistīts ar augstāku miršanas risku ITN posmā, bet nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci un augstāku IL-10 cirkulējošo koncentrāciju.

TNF A -308 A/G polimorfisms nav saistīts ar paaugstinātu septiskā šoka incidenci, augstāku TNF α sistēmisko koncentrāciju un sliktāku izdzīvošanas prognozi ITN sepses slimniekiem.

Darba rezultāti norāda uz IL-6 un IL-10 promotera polimorfismu saistību ar sepses gaitu un iznākumu ITN slimniekiem.

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.

IL-6 -174G/C un IL-10 -1082 G/A polimorfismu tipēšanas izmantošana kopā ar citām prognostiskām skalām var uzlabot sepses slimnieku atlasīšanu komplicētām

monitorēšanas un ārstēšanas metodēm, kā arī uzlabot stratifikāciju iekļaušanai klīniskos pētījumos.

Publikācijas un ziņojumu saraksts par darba tēmu

Publikācijas

1. O. Sabelņikovs, L. Nikitina-Zake, I. Vanags „Association of interleukin 6 promoter polymorphism (-174G/C) with IL-6 level and outcome in severe sepsis”, *Proc Latvian Acad. Sci. Section B, Vol. 62 (2008), No. 4/5, 162-164*
2. O. Sabelņikovs, I. Jaunalksne, I. Vanags, P. Ošs “sTNF-R2 un TNF α attiecības saistība ar slimības iznākumu pacientiem ar smago sepsi” RSU Zinātnisko rakstu krājums, 2006, 160.-162. lpp.
3. O. Sabelņikovs, I. Vanags, L. Nikitina-Zake, I. Jaunalksne, P. Oss, A. Krauze “Association of TNF -308 A/G polymorphism with TNF α level, illness severity and outcome in septic patient” „Latvijas Ķirurģijas žurnāls”(„Acta Chirurgica Latviensis”) 2006(6) 86.-88. lpp.
4. O.Sabelņikovs. „Role of TNF and TNF receptors interactions in regulation of systemic inflammation” „Latvijas Ķirurģijas žurnāls”(„Acta Chirurgica Latviensis”) 2005(5) 59.-61.lpp.

Patents

G01N35/50 13496, 14.06.2006. O.Sabelņikovs „Method of evaluating severity of patients condition”; „Patenti un preču zīmes” 2006; N10; p.1386

Tēzes

1. O. Sabelņikovs, L. Nikitina-Zake, J.Zhuravleva, E.Sama, I. Vanags „Association of IL-10 promoter polymorphism -1082 G/A with adverse outcome in severe sepsis and septic shock”, *Critical Care, 2009, Vol 13, Suppl. 1, p S144-145.*
2. O. Sabelņikovs, L. Nikitina-Zake, I. Vanags “Association of interleukin 6 promoter polymorphism -174C/G with outcome in severe sepsis”, *Critical Care, 2008, Vol 12, Suppl. 2, p S181.*
3. O. Sabelņikovs, I. Vanags, L. Nikitina-Zake, I. Jaunalksne, P. Oss “Association of TNF -308 A/G polymorphism with TNF α level, illness severity and outcome in septic patient” *EJA, Volume 24, Suppl. 39, p. 149, 2007*
4. O.Sabelņikovs, I.Jaunalksne, I.Vanags, P.Oss. „Association of sTNF-R2/TNF α ratio with clinical outcome in severe sepsis”. 2.Starptautiskā Baltijas anestezioloģijas, intensīvas terapijas kongresa (2006.g.) tēzes.
5. O.Sabelņikovs, P.Oss „Septisko stāvokļu marķēšana” 1.Starptautiskā Baltijas anestezioloģijas, intensīvas terapijas kongresa (2005.g.) tēzes.

Darba aprobācija

1. Promocijas darba apspriešana RSU Anestezioloģijas un reanimatoloģijas katedras sēdē (Rīga, Latvija, 2010.g.).
2. Promocijas darba prezentācija un apspriešana Latvijas biomedicīnas pētījumu centrā asociētā projekta „Sepses imunogēnētika” ietvaros (Rīga, Latvija, 2010.g.).

3. „Association of IL-10 promoter polymorphism -1082 G/A with adverse outcome in severe sepsis and septic shock” stenda referāta prezentācija Starptautiskajā simpozijā „29th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine” (Brussels, Belgium, 2009).
4. “The Role of Gene in Sepsis”, referāta prezentācija 4. Starptautiskajā Baltijas anestezioloģijas, intensīvās terapijas kongresā (Rīga, Latvija, 2008.g.)
5. “Association of interleukin 6 promoter polymorphism -174C/G with outcome in severe sepsis” stenda referāta prezentācija Starptautiskajā simpozijā „28th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine” (Brussels, Belgium, 2008).
6. „What’s new in the diagnosis of sepsis?”. Referāta prezentācija 3. Starptautiskajā Baltijas anestezioloģijas, intensīvās terapijas kongresā (Vilnius, Lithuania, 2007).
7. “Association of TNF -308 A/G polymorphism with TNF α level, illness severity and outcome in septic patient” stenda referāta prezentācija ESA kongresa “Euroanaesthesia 2007” (Munich, Germany, 2007).
8. „Association of sTNF-R2/TNF α ratio with clinical outcome in severe sepsis” referāta prezentācija 2. Starptautiskajā Baltijas anestezioloģijas, intensīvās terapijas kongresā (Tallinn, Estonia, 2006).
9. „Septisko stāvokļu marķēšana” stenda referāta prezentācija 1. Starptautiskajā Baltijas anestezioloģijas, intensīvās terapijas kongresā (Rīga, Latvija, 2005.g.)

Teksta lietotie saīsinājumi

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

DNS - Dezoksiribonukleīnskābe

H-W - Hārdija-Veinberga līdzsvars (*Hardy-Weinberg equilibrium*)

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

ITN – Intensīvās terapijas nodaļa

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

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

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

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

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

TNF α - Audzēju nekrozes faktors alfa (angļu val., *Tumor necrosys factor α*)