

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
”ПОЛЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ“

Кафедра биотехнологии

Допущен к защите
Заведующий кафедрой

_____ Е.М. Волкова

_____ 2022

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему:

”Полиморфизм генов иммунной системы, участвующих в развитии сепсиса“ (на материалах ГУ ”Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии“)

Студент-дипломник
БТ, 5 курс, гр. 17БТ-1

_____ Виктория Васильевна Коляда

(подпись)

_____ 2022

Научный руководитель
Доцент, канд. биол. наук

_____ Светлана Николаевна Лекунович

(подпись)

_____ 2022

ПИНСК 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 39 страниц, 1 таблица, 9 рисунков, 34 источника литературы.

Ключевые слова: СЕПСИС, СЕПТИЧЕСКИЙ ШОК, ЦИТОКИНЫ, ГЕН, ПОЛИМОРФИЗМ.

Цель работы – оценка полиморфизма генов иммунной системы, участвующих в развитии сепсиса среди населения Минской области.

Предмет исследования: полиморфизмы генов.

Объект исследований: образцы периферической крови.

Задачи:

1. Отработать методику выявления полиморфизмов генов иммунной системы, участвующих в развитии сепсиса;

2. Изучить распределение полиморфизмов генов иммунной системы, участвующих в развитии сепсиса среди населения Минской области.

Методы исследований: молекулярно-генетические.

Полученные результаты: установлено, что гомозиготные аллели встречаются в 53,3% случаев, а гетерозиготные – 46,7% случаев. Преобладающим является аллель "мутантного" типа G, частота встречаемости которого составила 76,7%, что подтверждает, что исследованные генетические вариации однонуклеотидных полиморфизмов генов TNF- β , TNF- α и IL-4 могут влиять на развитие у пациентов сепсиса.

Среди исследуемой группы добровольцев установлено, что 11 респондентов (55%) являются гомозиготными по аллелю G. Гетерозиготными по аллелям G и A были 9 исследованных лиц (45%). Исходя из полученных результатов было установлено, что гомозиготные респонденты по аллелю G имеют более высокую предрасположенность к возникновению сепсиса.

Область применения: молекулярная генетика, медицина.

ABSTRACT

Graduate work: 39 pages, 1 table, 9 pictures, 34 sources of literature.

Keywords: SEPSIS, SEPTIC SHOCK, CYTOKINE, GENE, POLYMORPHISM.

The purpose of the research – assessment of polymorphism of immune system genes involved in the development of sepsis among the population of the Minsk region.

The subject of the research is gene polymorphisms.

The object of the research are peripheral blood samples.

Tasks:

1. To develop a method for identifying polymorphisms of immune system genes involved in the development of sepsis;

2. To study the distribution of polymorphisms of the immune system genes involved in the development of sepsis among the population of the Minsk region.

The methods of the research: molecular genetics.

Obtained results: it was found that homozygous alleles occur in 53.3% of cases, and heterozygous alleles – in 46.7% of cases. The allele of the “mutant” type G is predominant, the frequency of which was 76.7%, which confirms that the studied genetic variations of single nucleotide polymorphisms of the TNF- β , TNF- α , and IL-4 genes can affect the development of sepsis in patients.

Among the studied group of volunteers, it was found that 11 respondents (55%) are homozygous for the allele G. Heterozygous for alleles G and A were 9 studied individuals (45%). Based on the obtained results, it was found that homozygous respondents for the G allele have a higher predisposition to sepsis.

The area of application: molecular genetics, medicine.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ И ТЕРМИНОВ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Сепсис	7
1.1.1 Классификация	7
1.1.2 Причины развития	8
1.1.3 Симптомы	9
1.1.4 Профилактика	9
1.1.5 Диагностика и клиническое ведение	10
1.1.6 Осложнения	10
1.1.7 Лечение	11
1.2 Полиморфизм генов	11
1.3 Иммунологические аспекты сепсиса	13
1.4 Иммунологические маркеры – предвестники септических осложнений, развития сепсиса и его исходов	14
1.5 Фактор некроза опухоли- β	18
1.6 Фактор некроза опухоли- α	18
1.7 Интерлейкин-4	19
1.8 Полимеразная цепная реакция	21
1.9 Детекция результатов ПЦР: метод гель-электрофореза	23
ГЛАВА 2	24
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	24
2.1. Объекты исследований	24
2.2 Материалы и реагенты	24
2.3 Забор периферической крови для исследования	24
2.4 Исследование показателей иммунного статуса	24
2.5 Иммунофенотипирование клеток периферической крови	25
2.6 Методика определения генетической предрасположенности к сепсису	25
2.7 Экстракция ДНК	26
2.8 Оценка генетической предрасположенности к сепсису	27
2.9 Условия ПЦР	27
ГЛАВА 3	29
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	29
3.1 Фактор некроза опухоли- β	29
3.2 Фактор некроза опухоли- α	31
3.3 Интерлейкин-4	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	37

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительный прогресс в понимании молекулярных основ взаимоотношений хозяин-патоген и связанных с ними иммунологических реакций, сепсис остается проблемой во всем мире, связанной с полиорганной дисфункцией и повышенной смертностью [1, с. 1547]. Сепсис описывают как комплексный клинический синдром, который является результатом опасного повреждающего ответа организма на инфекцию. Сепсис развивается, когда начальный соответствующий ответ организма на инфекцию усиливается и становится неконтролируемым. Клинические проявления включают лихорадку, спутанное сознание, кратковременную гипотензию, уменьшение диуреза или тромбоцитопению. При отсутствии соответствующего лечения у пациента может развиваться дыхательная или почечная недостаточность, нарушения свертывания крови и сильная гипотензия. По данным американских и европейских обзоров, частота сепсиса колеблется от 2 до 11% от всех госпитализированных больных или больных, находившихся в палатах интенсивной терапии. Несмотря на наличие современных терапевтических средств, летальность от сепсиса составляет приблизительно 30%, для пожилых пациентов – 40%, а у пациентов с более тяжелым синдромом (септическим шоком) – 50% и выше [2, с. 109], [3, с. 1304]. Генетически обусловленные различия в иммунных реакциях могут объяснить, почему некоторые люди заболевают и умирают при встрече с патогеном, в то время как другие остаются совершенно здоровыми [4, с. 12].

Актуальность. На сегодняшний день изучение полиморфизма генов является актуальным и перспективным направлением во всем мире. В Республике Беларусь подобные исследования у пациентов с сепсисом не проводились, что представляет огромный научный интерес, так как полученные результаты позволят установить "критические" аллели генов, определяющих развитие сепсиса, его осложнений и исход.

Разработанный алгоритм прогнозирования неблагоприятного течения сепсиса у детей, основанный на комплексной оценке трех молекулярно-генетических маркеров, позволит уменьшить частоту летальных исходов, снизить частоту развития осложнений (в частности, септического шока).

Цель дипломной работы – оценка полиморфизма генов иммунной системы, участвующих в развитии сепсиса среди населения Минской области.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Отработать методику выявления полиморфизмов генов иммунной системы, участвующих в развитии сепсиса;
2. Изучить распределение полиморфизмов генов иммунной системы, участвующих в развитии сепсиса в популяции белорусов, проживающих на территории Минской области.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 / G.S. Martin [et al.] // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol. 348, №16. – P. 1546-1554.
2. Alberti, C. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. / C. Alberti, C. Brun-Buisson, H. Burchardi // *Intensive Care Med.* – 2002. – Vol. 28, №4. – P. 108-121.
3. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care / D.C. Angus [et al.] // *Crit Care Med.* – 2001. – Vol. 29, №7. – P. 1303-1310.
4. De Maio, A. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation and sepsis / A. De Maio, M.B. Torres, R.H. Reeves – 2005. – Vol. 23, №1. – P. 11-17.
5. Диагностика и лечение сепсиса [Электронный ресурс] / Областная клиническая больница №1, Тюменская область. – Режим доступа: <https://www.tokb.ru/patsientam/uslugi/lechenie-sepsisa/>. – Дата доступа: 02.03.2022.
6. Сепсис [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/sepsis/>. – Дата доступа: 02.03.2022.
7. Сепсис у взрослых: симптомы, причины, лечение [Электронный ресурс] / Клиника Академика Ройтберга. – Режим доступа: <https://www.medicina.ru/patsientam/zabolevanija/sepsis/>. – Дата доступа: 02.03.2022.
8. The itaconate pathway is a central regulatory node linking innate immune tolerance and trained immunity / J. Dommguez-Andrs [et al.] // *Cell Metabolism.* – 2018. – Vol. 29, №1. – P. 155-413.
9. Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically ill patients / I. Nachtigall [et al.] // *Journal of International Medical Research.* – 2014. – Vol. 42, №1. – P. 93-110.
10. Antonopoulou, A. Immunomodulation in sepsis: state of the art and future perspective / A. Antonopoulo, E. J. Giamarellos-Bourboulis // *Immunotherapy.* – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 117-128.
11. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study / J. L. Vincent [et al.] // *Crit. Care. Med.* – 2006. – Vol. 34, №2. – P. 344-353.
12. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock / R. P. Dellinger [et al.] // *Int. Care Med.* – 2008. – Vol. 36, №1. – P. 296-327.
13. Wagner, J. A. Biomarkers and surrogate end points for fit-for-purpose development and regulatory evaluation of new drugs / J. A. Wagner, S.A.

- Williams, C.J. Webster // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2007. – Vol. 81, №1. – P. 104-107.
14. Prentice, R. L. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework / R. L. Prentice // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2001. – Vol. 69, №3. – P. 89-95.
 15. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis: a report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable / J. C. Marshall [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2003. – Vol. 31, №5. – P. 1560-1567.
 16. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery / T. Hensler [et al.] // *Int. Immunol.* – 1997. – Vol. 65, №6. – P. 2283-2291.
 17. Circulating immune parameters predicting the progression from hospital-acquired pneumonia to septic shock in surgical patients / V. Von Dossow [et al.] // *Crit. Care.* – 2005. – Vol. 9, №6. – P. 662-669.
 18. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock / G. Monneret [et al.] // *Intensive Care Med.* – 2006. – Vol. 32, №8. – P. 1175-1183.
 19. Association of a TNFbeta gene polymorphism with complications after major abdominal operations / J. Riese [et al.] // *Shock* 2003. – Vol. 19, №1. – P. 1-4.
 20. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients / M. Majetschak [et al.] // *Ann. Surg.* – 1999. – Vol. 230, №2. – P. 207-214.
 21. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study / J. P. Mira [et al.] // *JAMA.* – 1999. – Vol. 282, №6. – P. 561-568.
 22. Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis / H. Weighardt [et al.] // *Ann. Surg.* – 2002. – Vol. 235, №4. – P. 560-567.
 23. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection / C. Gogos [et al.] // *Crit. Care.* – 2010. – Vol. 14, №3. – P. 94-98.
 24. Brauner, J. S. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor: early predictors of mortality in patients with septic shock / J. S. Brauner, L. E. Rohde, N. Clausell // *Intensive Care Med.* – 2000. – Vol. 26, №3. – P. 305-313.
 25. IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries / M. Frink [et al.] // *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* – 2009. – Vol. 17, №9. – P. 49.
 26. Si-Tahar, M. Innate immunity and inflammation – two facets of the same anti-infectious reaction / M. Si-Tahar, L. Touqui, M. Chignard // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Vol. 156, №2. – P. 194-198.
 27. A tumour necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insulin-dependent diabetes mellitus / F. Pociot [et al.] // *Scand J Immunol.* – 1991. – Vol. 33, №1. – P. 37-49.

28. Majetschak, M. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. / M. Majetschak, S. Flohe, U. Obertacke // *Ann Surg.* – 1999. – Vol. 230, №2. – P. 207.
29. Sashio, H. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively / H. Sashio, K. Tamura, R. Ito // *Immunogenetics.* – 2002. – Vol.53, №12 – P. 1020-1027.
30. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study / A.C. Gordon [et al.] // *Genes Immun.* – 2004. – Vol.5, №8. – P. 631-640.
31. Are postoperative complications genetically determined by TNF- α NcoI gene polymorphism / V. Kahlke [et al.] // *Surgery.* – 2004. – Vol. 135, №4. – P. 365-373.
32. Kahlke, V. Early interleukin-4 treatment improves survival and enhances immune function only in males after hemorrhage and subsequent sepsis / V. Kahlke, C. Dohm, T. Mees // *Shock.* – 2002. – Vol.18, №1 – P. 24-28.
33. IL-10 polymorphism is associated with increased incidence of severe sepsis / S. Qiang [et al.] // *Chin Med J.* – 2003. – Vol. 116, №11. – P. 1756-1759.
34. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР): методическое пособие / ООО "ДНК-технология". // Москва. – 151 с.