

УДК: 575.174.015.3 : 612.017.1 : 616.9

Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Витковский Ю.А.

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РОЖИ

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Цель исследования: на основе полученных лабораторных показателей построить математическую модель прогноза и выявить персонафицированные критерии развития и течения рожи.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 104 больных рожей и 94 здоровых резидента. В работе использованы данные лабораторных методов исследования: иммунологические, коагулологические, генетические (TNF α (G308A), IL-1 β (T31C), IL-1 β (T511C), IL-1 β (C3953T), IL-1 β (G1473C), CD14 (C159T), TF (A603G), TF (C1322T), TF (C1812T), TF (G1442C), TLR4 (Asp299Gly), TLR4 (Thr399Ile)). Предсказания значений ряда зависимых переменных по известным значениям других переменных осуществлялись с помощью множественного регрессионного анализа (STATISTICA).

Результаты. Многомерный пошаговый регрессионный анализ показателей выявил, что наиболее близко связанным с развитием рожи у пациентов оказалось определение гомозиготной мутации гена IL-1 β (G1473C). Точность предсказания увеличивалась при добавлении генотипа -3953C/C гена IL-1 β , генотипа -299Asp/Asp гена TLR4, экспрессии тканевого фактора, содержания TNF α . При добавлении других показателей в дополнение к уже отобранному нарастание значимой прогностической мощности не отмечалось. Значение множественного коэффициента корреляции составило 0,839, коэффициент детерминации (R-квадрат) – 0,704, а уровень значимости регрессионной модели составил <0,000001. Относительный риск исследуемых показателей также выявил высокую прогностическую ценность последних.

Заключение. Информативным показателем развития рожи является выявление генотипов -1473C/C гена IL-1 β , -3953C/C гена IL-1 β , -299Asp/Asp гена TLR4, определение экспрессии тканевого фактора и содержания TNF α .

Ключевые слова: рожа; прогностические факторы; генетический полиморфизм; TLR;

Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A.

MODERN ASPECTS OF PREDICTION OF ERYSIPELAS

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

The aim was to construct a mathematical forecasting model and to reveal the personified criteria of development of erysipelas on the basis of the revealed laboratory indicators.

Methods. The study was performed in 104 patients with erysipelas and 94 healthy residents. The following laboratory test data were used: immunological, coagological, genetic (TNF α (G308A), IL-1 β (T31C), IL-1 β (T511C), IL-1 β (C3953T), IL-1 β (G1473C), CD14 (C159T), TF (A603G), TF (C1322T), TF (C1812T), TF (G1442C), TLR4 (Asp299Gly), TLR4 (Thr399Ile)). The multiple regression analysis (STATISTICA) was used for prediction of the range of the dependent variables with use of the known values of other variables

Results. The multifactorial step-by-step regression analysis identified that development of homozygous mutation of gene IL-1 β (G1473C) was associated with the inflammatory complications. Accuracy of prediction increased with addition of the data about genotype -3953C/C of gene IL-1 β , genotype -299Asp/Asp of gene TLR4, expression of tissue factor and concentration of TNF α . The addition of other indicators to the selected ones did not increase the significant predictive power. The value of the multiple correlation coefficient was 0,839, the determination coefficient (R-square) – 0,704 and the level of significance of the regression model was less than 0,000001.

Conclusion. The identification of genotype -1473C/C of gene IL-1 β , -3953C/C of gene IL-1 β , -299Asp/Asp of gene TLR4, determination of tissue factor expression and concentration of TNF α is the informative indicator of development of the erysipelas.

Keywords: erysipelas; prognosis factors; gene polymorphism; TLR;

Известно, что в структуре первичных форм стрептококкозов рожа занимает одно из доминирующих положений (4 место в структуре инфекционной патологии). Заболеваемость в России колеблется от 100 до 250 на 100 тыс. населения в год [1]. Высокая распространен-

ность рожи в популяции, тенденция к формированию рецидивирующего течения после первичного эпизода заболевания, появление трофических, долго незаживающих язв, развитие гнойно-воспалительных осложнений, слоновости, некрозов, абсцессов и др. способствует последующей частичной или полной утрате трудоспособности [2].

Таким образом, прогнозирование возможного развития данного заболевания является важным аспектом современной медицины.

Цель исследования – поиск персонализированных критериев для объективного выявления значимых факторов развития и течения рожи.

Материалы и методы. В проспективное (когортное, продольное) исследование включены больные рожей (по МКБ-10 рубрики, А-46) в возрасте от 34 до 52 лет (средний возраст $47,5 \pm 3,0$ года) (49 мужчин и 55 женщин). Критерием включения явилась рожа: эритематозной, эритематозно-буллезной, эритематозно-геморрагической, буллезно-геморрагической форм; первичного и рецидивирующего течения; с локализацией в области лица, верхних и нижних конечностей. Критерии исключения из настоящего исследования: повторная и послеродовая формы рожи, сахарный диабет 1 и 2 типов, острые и хронические вирусные инфекции, кишечные инфекции, пневмония, острые сердечно-сосудистые заболевания, беременность. Верификацию диагноза проводили на основании клинико-anamnestических данных согласно классификации В.Л. Черкасова (1986) [3]. Контрольную группу составили 94 практически здоровых доноров, не имеющих острых и хронических инфекционных и аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций. Группы сопоставимы по полу и возрасту. Все обследованные – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края. В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы согласно Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki) (1964, 2013 – поправки) и Правилам клинической практики в Российской Федерации (Приказ Минздрава РФ от 19.06.2003 г., № 266).

Для исследования использовали цельную кровь больных рожей и здоровых доноров. Образцы крови пациентов коллекционировали в начале разгара заболевания в 1-2 день поступления в стационар.

Регрессионная модель охватывала данные о распределении генотипов полиморфных маркеров генов *TNF α* (*G308A*), *IL-1 β* (*T31C*), *IL-1 β* (*T511C*), *IL-1 β* (*C3953T*), *IL-1 β* (*G1473C*), *CD14* (*C159T*), *TF* (*A603G*), *TF* (*C1322T*), *TF* (*C1812T*), *TF* (*G1442C*), *TLR4* (*Asp299Gly*), *TLR4* (*Thr399Ile*).

Определение SNP генов осуществлялось методом ПЦР с использованием стандартных наборов НПФ «Литех» (Москва). Амплификацию фрагментов гена *TLR4* проводили в термоциклере (модель «Бис»-M111, ООО «Бис-Н», Новосибирск). Анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», затем проводилась реакция амплификации. Детекцию продукта амплификации проводили в 3% агарозном геле [1, 4].

Иммунологическая и коагулогическая составляющие в регрессионной модели включали некоторые параметры иммунной системы – содержание *TNF α* , *IL-1 β* в плазме крови, а также данные об экспрессии тканевого фактора моноцитами периферической крови. Исследование экспрессии тканевого фактора моноцитами осуществляли по методу, предложенному R.A. Santucci et al. (2000) [1]. Измерение концентрации цитокинов проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) [1, 4].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 10. Предсказание значений ряда зависимых переменных по известным значениям других переменных осуществлялось с помощью множественного регрессионного анализа (при построении многофакторной модели применялся F-критерий Фишера) [5].

Результаты и обсуждение. Результаты данного многофакторного пошагового регрессионного анализа показали, что наиболее близко связанным с развитием рожи оказалось определение гомозиготной мутации гена *IL-1 β* (*G1473C*) (шаг 1). Точность предсказания уве-

личивалась при добавлении генотипа *-3953C/C* гена *IL-1 β* (шаг 2), генотипа *-299Asp/Asp* гена *TLR4* (шаг 3), экспрессии тканевого фактора (шаг 4), содержания TNF α (шаг 5). При добавлении других показателей, в дополнение к уже отобраным, нарастания значимой прогностической мощности не отмечалось (табл. 1).

Таблица 1

Прогностическое значение показателей в многофакторной модели развития рожи

N=198	β	Std. Err. of β	B	Std. Err. B	p
Св. член			2,303245	0,166970	0,00000
<i>-1473C/C</i> гена <i>IL-1β</i>	0,414892	0,041675	0,269652	0,027755	0,0001
<i>-3953C/C</i> гена <i>IL-1β</i>	-0,292665	0,041219	-0,176079	0,031194	0,0003
<i>-299Asp/Asp</i> гена <i>TLR4</i>	-0,467545	0,043634	-0,439013	0,040971	0,0005
Экспрессия тканевого фактора	0,394324	0,044319	0,205359	0,030922	0,004
Концентрация TNF α	0,318041	0,044888	-0,300683	0,045286	0,007

Примечание: n – количество наблюдений; β – регрессионный коэффициент; Std. Err. of β – стандартная ошибка β ; B – свободный член (отрезок); Std. Err. B – стандартная ошибка B; p – уровень статистической значимости (достоверен при $p < 0,05$);

Значение множественного коэффициента корреляции составило 0,839, говорит о значительной линейной зависимости между факторами влияния и откликом; коэффициент детерминации (R-квадрат) – 0,704, что свидетельствует о высокой степени соответствия регрессионной модели эмпирическим данным; уровень значимости регрессионной модели составил меньше 0,000001, что подтверждает ее высокую чувствительность и достоверность [5].

Проведение молекулярно-генетических исследований с целью диагностики различных осложнений является немаловажным фактором персонализации в современной медицине [4].

Известно, что сочетание нескольких генетических полиморфизмов, ассоциированных с предрасположенностью к заболеванию, увеличивают риск его развития [6, 7]. При этом не только качественное изменение молекулы, но и ее количественное содержание в реализации иммунного ответа может быть фактором, располагающим к развитию болезни.

Так, в предыдущих исследованиях нами установлено, что аллель C, генотипы G/C и C/C промотора гена *IL-1B* (*G1473C*) предрасполагают к развитию рожи, причем гомозиготный вариант C/C промотора гена *IL-1B* (*G1473C*) увеличивает риск развития рецидивирующего течения заболевания [8]. Также обнаружено, что полиморфизм *G1473C* гена *IL-1B* влияет на уровень IL-1B в крови больных рожей. При этом развитие рецидива заболевания не связано с концентрацией этого цитокина [8].

В другой нашей работе мы установили, что аллели гена Toll-подобного рецептора-4 - *299Asp* и *-399Thr* и генотипы *Asp299Asp* и *Thr399Thr* предрасполагают к развитию рожи, а наличие минорных аллелей снижает риск возникновения заболевания [9, 10]. Однако в рассматриваемой регрессионной модели наибольшей значимостью обладает участок *Asp299Gly* *TLR4* (о чем свидетельствует отрицательный β -коэффициент в рассматриваемой регрессионной модели – отсутствие мутации повышает риск развития рожи).

Также в нашем предыдущем исследовании установлено, что полиморфизм *rs1800629* гена *TNF α* влияет на уровень TNF α в крови больных рожей. Однако изменение концентрации исследуемого цитокина не является прогностическим фактором развития рецидива рожи, равно как и полиморфизм гена *TNF α* в регионе *rs1800629* [11]. При этом в многофакторном анализе наибольшую связь с развитием заболевания демонстрирует содержание провоспалительного цитокина, нежели полиморфизм одноименной молекулы.

Точечный полиморфизм Toll-подобного рецептора-4 связан с восприимчивостью к инфекционному агенту и риском развития воспалительных процессов [12]. Установлено, что SNP *Asp299Gly*, локализованный в третьем экзоне гена *TLR4*, и SNP *Thr399Ile* гена *TLR4* ассоциированы с некоторыми инфекциями [13].

Полученные нами данные согласуются с мнением А.С. Симбирцева и соавт. [14] о том, что генетически обусловленный перевес в сторону выработки IL-1Ra в системе IL-1/IL-

1 α влияет на воспалительный ответ, делая его более продолжительным, а процесс – хроническим.

По мнению ряда авторов, продукция цитокинов под влиянием стрептококкового токсина коррелирует с тяжестью течения заболевания [14]. Поэтому биологические эффекты TNF α зависят от его концентрации, что позволяет ему выступать в роли медиатора защитной реакции [14].

Тканевой фактор является главным физиологическим инициатором гемокоагуляции. Чрезмерная экспрессия тканевого фактора в циркулирующей крови, в основном на поверхности моноцитов, связана с большим риском развития тромбоза при различных заболеваниях, в том числе и роже [15]. Выраженная активация иммунных и гемостазиологических реакций может предрасполагать больных с рожистым воспалением к различным осложнениям.

Исходя из вышесказанного, изучение взаимосвязи качественных (определение полиморфизмов) и количественных (экспрессия тканевого фактора, содержание цитокинов) показателей дает возможность выявления признаков, обладающих высокой прогностической значимостью в диагностике рожи.

Вывод. Высокую прогностическую ценность имеет выявление генотипов *-1473C/C* гена *IL-1 β* , *-3953C/C* гена *IL-1 β* , *-299Asp/Asp* гена *TLR4*, экспрессии тканевого фактора и содержания TNF α , что, в свою очередь, повысит достоверность прогнозирования развития рожи, а также положительно скажется на лечебно-профилактических и диагностических мероприятиях данного инфекционного процесса.

Литература:

1. Емельянова А.Н., Витковский Ю.А. Рожа (патогенез, особенности течения). Томск: Иван Федоров, 2014. 132 с.
2. Ермакова Л.А., Гопаца Г.В., Титирян К.Р., Журавлев А.С. Современные взгляды на патогенетическую терапию рожи. Международный научно-исследовательский журнал. 2018. 6 (72). 69-72.
3. Черкасов В.Л. Рожа. Л.: Медицина, 1986. 200 с.
4. Мироманов А.М., Трубицын М.В., Миронова О.Б., Мироманова Н.А. Персонализированные аспекты развития воспалительных осложнений при переломах костей конечностей. Политравма. 2017. 2. 37-41.
5. Михалевич И.М. Регрессионный анализ (использование в медицинских исследованиях с применением ППП Statistica): пособие для врачей. Иркутск: РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2012. 32 с.
6. Pasińska M, Soszyńska K, Runge A, Dabrowska A, Juraszek A, Janiszewska T, Olga H. Molecular diagnostic tests for thrombophilia in patients referred to genetic counseling clinic because due to recurrent pregnancy failure. One center's experience. Ginekol Pol. 2012. 83(3). 178-182.
7. Фролова Н.И., Белокриницкая Т.Е., Страмбовская Н.Н. Молекулярно-генетические предикторы осложнений беременности у молодых здоровых женщин. Дальневосточный медицинский журнал. 2015. 3. 29-30.
8. Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А. Полиморфизм промотора гена *IL1B* (*G1473C*) и его влияние на содержание интерлейкина 1 в крови больных рожей. Медицинская генетика. 2017. 8. 32-35.
9. Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Витковский Ю.А. Генетический полиморфизм Toll-подобного рецептора-4 у больных рожей. Молекулярная медицина. 2017. 5. 54-57.
10. Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А. Полиморфизм промоторного региона *rs1800629* гена TNF α и его влияние на содержание фактора некроза опухолей альфа в крови здоровых лиц и больных рожей. Медицинская иммунология. 2018. 3. 411-416.
11. Tellería-Oriols JJ., García-Salido A., Varillas D., Serrano-González A., Casado-Flores J. TLR2-TLR4/CD14 polymorphisms and predisposition to severe invasive infections by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. Medicina Intensiva. 2014; 38 (6): 356–362.

12. Beran O., Potměšil R., Holub M. Differences in Toll-like receptor expression and cytokine production after stimulation with heat-killed Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Folia Microbiologica*. 2011. 3. 283-287.
13. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., МIRONШИЧЕНКОВА А.М., ГАНКОВСКИЙ В.А. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека. *Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье"*. 2012. 2. 147-153.
14. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. *Медицинский академический журнал*. 2013. 3. 17-41.
15. Емельянова А.Н., Витковский Ю.А. Провоспалительные цитокины, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия и экспрессия тканевого фактора у больных рожистым воспалением. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2009. 5. 117-121.

References

1. Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A. Erysipelas (pathogenesis, features of course). Tomsk: Ivan Fedorov, 2014, 132 p. in Russian.
2. Ermakova L.A., Gopaca G.V., Titiryan K.R., Zhuravlev A.S. Modern views on the pathogenetic therapy of erysipelas. *International Research Journal*. 2018. 6 (72). 69-72. In Russian.
3. Cherkasov V.L. Erysipelas. Leningrad: Medicine, 1986, 200 p. in Russian.
4. Miromanov A.M, Trubitsyn M.V, Mironova O.B, Miromanova N.A. Personalized aspects of the development of inflammatory complications of limb bone fractures. *Polytrauma*. 2017. 2. 37-41. In Russian.
5. Mihalevich I.M. Regression analysis (use in medical researches with application of Statistica): the manual for doctors. Irkutsk: ISMA Publ., 2012. 32 p. In Russian.
6. Pasińska M, Soszyńska K, Runge A, Dabrowska A, Juraszek A, Janiszewska T, Olga H. Molecular diagnostic tests for thrombophilia in patients referred to genetic counseling clinic because due to recurrent pregnancy failure. One center's experience. *Ginekol Pol*. 2012. 83(3). 178-182.
7. Frolova N.I., Belokrinitckaya T.E., Strambovskaya N.N. Molecular genetic predictors of pregnancy complications in young healthy women. *Far Eastern Medical Journal*. 2015. 3. 29-30. in Russian.
8. Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Pushkarev, B.S., Vitkovsky Yu.A. Promoter gene IL1B (G1473C) polymorphism and its influence on interleukin 1B concentration in blood of patients with erysipelas. *Meditinskaya genetika*. 2017. 8. 32-35. in Russian.
9. Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A. Genetic polymorphism of Toll-like receptor-4 in patients with erysipelas. *Molecular medicine*. 2017. 5. 54-57. in Russian.
10. Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Pushkarev B.S., Vitkovsky Yu.A. Polymorphism of the promoter region rs1800629 of the TNF α gene and its effect on the content of tumor necrosis factor alpha in the blood of healthy individuals and patients with erysipelas. *Medical immunology*. 2018. 3. 411-416. in Russian.
11. Tellería-Oriols JJ., García-Salido A., Varillas D., Serrano-González A., Casado-Flores J. TLR2-TLR4/CD14 polymorphisms and predisposition to severe invasive infections by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Medicina Intensiva*. 2014; 38 (6): 356–362.
12. Beran O., Potměšil R., Holub M. Differences in Toll-like receptor expression and cytokine production after stimulation with heat-killed Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Folia Microbiologica*. 2011. 3. 283-287.
13. Kovalchuk L.V., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Mironshichenkova A.M., Gankovskiy V.A. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis of human infectious diseases. *Kursk scientific and practical bulletin "Man and his health."* 2012. 2. 147-153. in Russian.
14. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of human infectious and non-infectious diseases. *Medical Academic Journal*. 2013. 3. 17-41. in Russian.
15. Emelyanova, AN, Vitkovsky, Yu.A. Proinflammatory cytokines, lymphocyte-platelet adhesion and expression of tissue factor in patients with erysipelatous inflammation. *Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2009. 5. 117-121. in Russian.