



УДК 616.155.2:616.2-022.6]-053.2

Л.П. Малежик, М.С. Малежик, Д.Ц. Нимаева, В.Б. Цырендоржиева

АГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ У ДЕТЕЙ, ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ПРИ ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНОВ TOLL-4 (ASP299GLY) И TOLL-6 (SER249PRO) РЕЦЕПТОРОВ

Читинская государственная медицинская академия, 672090, ул. Горького, 39а,
тел. 8-(3022)-35-43-24, факс 8-(3022)-32-30-58, e-mail: pochta@chitgma.ru, г. Чита

Резюме

В статье приведены данные об изменении агрегационной активности тромбоцитов у детей, часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией, при полиморфизме генов Toll-4 (Asp299Gly) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов. Показано, что при полиморфизме Toll-4 (Asp299Gly) рецепторов спонтанная агрегационная активность у больных детей не изменена. АДФ, адреналин и коллаген увеличивают степень и скорость агрегации тромбоцитов при всех полиморфных вариантах гена Toll-4 рецептора и уменьшают агрегационную активность тромбоцитов при полиморфизме Toll-6 рецептора, особенно у гетерозигот (Ser249Pro) и мутантных гомозигот (249Pro).

Ключевые слова: острая респираторная вирусная инфекция, агрегация тромбоцитов, полиморфизм генов Toll-like рецепторов.

L.P. Malezhik, M.S. Malezhik, D.Ts. Nimaena, V.B. Tsyrendorzhiev

AGGREGATIONAL ACTIVITY OF THROMBOCYTES IN CHILDREN WITH FREQUENT RESPIRATORY VIRAL INFECTION AND GENES POLYMORFISM TOLL-4 (ASP299GLY) AND TOLL-6 (SER249PRO) RECEPTORS

Chita State Medical Academy, Chita

Summary

The article presents data on the changes of aggregational platelet activity in children frequently, suffering from acute respiratory viral infection with, gene polymorphism Toll-4 (Asp299Gly) and Toll-6 (Ser249Pro) receptors. It has been shown that the Toll-4 polymorphism (Asp299Gly) receptors spontaneous aggregation activity in children is not changed. ADP, epinephrine and collagen increase the degree of platelet aggregation rate for all polymorphic variants of Toll-4 receptor gene and reduces platelet aggregation in polymorphism of Toll-6 receptor, particularly in heterozygotes (Ser249Pro) and mutant homozygotes (249Pro).

Key words: acute respiratory viral infection, platelet aggregation, polymorphism of Toll-like receptor genes.

Способность тромбоцитов образовывать агрегаты лежит в основе образования тромбоцитарной пробки, перекрывающей кровоток в мелких сосудах. В норме тромбоциты свободно циркулируют в кровотоке, не контактируя друг с другом. При любой патологии в кровотоке появляются биологически активные вещества, которые активируя тромбоциты, вызывают экспрессию на поверхности кровяных пластинок рецепторов, лигандами для которых являются фибриноген, коллаген, фибронектин, фактор Виллебранда и ряд других соединений [1-3]. Тромбоциты при этом адгезируют, образуют тромбоцитарные агрегаты с выде-

лением огромного количества белков, принимающих участие в процессах гемостаза, воспаления, иммунной защиты, ангиогенезе и т.д. [3-5].

При вирусной инфекции появляется множество причин для активации тромбоцитов, и, в первую очередь, нейраминидаза вируса, к которой есть рецепторы на поверхности тромбоцитов [6]. Циркуляция в крови больших количеств тромбоцитарных агрегатов способна вызвать ухудшение серологических свойств и, соответственно, расстройство микроциркуляции [7]. Однако агрегационная активность тромбоцитов при острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) не

изучалась, и тем более неизвестно, насколько она изменяется при генетических дефектах в Toll-рецепторах. С помощью этих рецепторов тромбоциты контактируют с патогенами, активируются и секретируют собственные соединения.

Материалы и методы

Отбор для клинической группы осуществляли на базе областной детской инфекционной больницы в первые трое суток от момента госпитализации (период начальных проявлений заболевания). Обследовано 190 детей обоего пола от 1 до 3 лет, часто болеющих ОРВИ. Из числа обследуемых детей методом ПЦР у 49 % был диагностирован грипп, у 25 % – парагрипп, у 5 % – аденовирусная инфекция, у 4 % – респираторно-синциальный вирус. У остальных детей этиология ОРВИ осталась нерасшифрованной. Критериями включения в исследование являлось число эпизодов заболевания не менее 6 раз в году, первые три дня заболевания вирусной инфекцией, наличие характерной клинической картины (лихорадка, интоксикация, выраженные катаральные явления). В исследование не включали детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями (бронхиальная астма, рецидивирующий бронхит), пороками развития или опухолями дыхательной системы. В контрольную группу вошли 25 клинически здоровых детей (не более 4 эпизодов ОРВИ в году), сопоставимые по возрасту и полу с часто болеющими.

Из обследованных часто болеющих детей 90 являлись носителями полиморфизма генов Toll-4 (Asp-299Gly) рецепторов, 100 больных обладали полиморфизмом Toll-6 (Ser 249Pro) рецепторов. Выделение

Цель исследования – изучить спонтанную и индуцированную агрегацию у детей, часто болеющих ОРВИ и являющихся носителями полиморфизма генов Toll-4 и Toll-6 рецепторов.

ДНК осуществляли при помощи наборов «ДНК-экспресс кровь» (НПФ «Литех, Россия»). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен НПФ «Литех». Выявление мутаций проводили методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

Оценку агрегационной способности тромбоцитов осуществляли турбидиметрическим методом с помощью лазерного анализатора агрегации «Биола» (НПФ «Биола», Москва). Исследовали спонтанную АДФ, адреналин- и коллаген-индуцированную агрегацию с использованием соответствующих реактивов, выпускаемых ООО «Технология-стандарт» (Барнаул).

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных между собой наблюдений с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6,0 (StatSoftInc., США). Перед началом анализа вариационные ряды тестировали на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении применяли параметрические методы статистики – критерий Стьюдента (t-тест). Показатели представлены в виде средних величин со стандартным отклонением (M±SD).

Результаты и обсуждение

Установлено, что у больных с генетическими дефектами в Toll-4 рецепторах спонтанная агрегация не изменена (табл. 1). АДФ-индуцированная агрегация вызывает увеличение скорости и степени агрегации в зависимости от наличия или отсутствия генетических дефектов в Toll-4 рецепторах. Размер образованных агрегатов увеличивался у гомозигот Asp 299 до 5,8±2,3, у гомозигот 299Gly – до 7,8±2,6. Следовательно, при аномальных вариантах Toll-4 рецепторов АДФ индуцирует скорость и степень агрегации сильнее, чем у носителей нормальной аллели Asp299. Возможно, у тромбоцитов с генетическими дефектами в Toll-4 рецепторах увеличена экспрессия рецепторов к индукторам агрегации, к числу которых относится АДФ.

При индукции адреналином степень агрегации тромбоцитов с генетически изменёнными Toll-4 рецепторами была максимальна у гетерозигот Asp 299Gly (8,2±2). Скорость агрегации у гомозигот 299Asp была увеличена в 2 раза (7,2±4) по сравнению с тромбоцитами здоровых детей (3,4±0,9), в 5 раз – у гетерозигот (17,6±5,5) и в 4 раза у гомозигот 299Gly. При стимуляции коллагеном тромбоциты больных ОРВИ детей без генетических дефектов в Toll-4 рецепторах (299Asp) увеличивали максимальный радиус агрегатов до 6,6±0,9 (в контроле -4,0±0,9). При аномалии в этих рецепторах степень агрегации оказалась выше (7,8±2,2; 7,3±1,5), чем в группе детей без генетических нарушений в тромбоцитарных рецепторах.

Таблица 1

Максимальный радиус агрегатов (отн. ед.) и максимальный наклон (отн. ед. в мин.) кривых агрегации тромбоцитов у пациентов носителей полиморфных вариантов Asp299Gly в гене Toll-4 рецепторов (M±SD)

		Контрольная группа (n=25)	299Asp (n=40)	Asp-299Gly (n=18)	299Gly (n=32)
Спонтанная	макс. знач.	1,9±0,6	1,9±1,2	1,2±0,2	1,3±0,4
	макс. накл.	1,3±0,6	1,4±2,5	1,2±0,1	1,6±0,5* p<0,05
АДФ	макс. знач.	3,5±0,7	5,8±1,3* p<0,05	9,8±1,7*# p<0,05 p*<0,05	7,8±1,2*# p<0,05 p*<0,05
	макс. накл.	3,8±0,6	11,3±2,4* p<0,05	25,8±4,3*# p<0,05 p*<0,05	24,2±2,4* p<0,05
Адреналин	макс. знач.	3,7±0,8	6,1±1,7* p<0,05	8,2±2*# p<0,05 p*<0,05	6,8±3* p<0,05
	макс. накл.	3,4±0,9	7,2±4* p<0,05	17,6±2,5*# p<0,05 p*<0,05	14,5±2,2*# p<0,05 p*<0,05
Коллаген	макс. знач.	4±0,9	6,6±0,9* p<0,05	7,8±2,2*# p<0,05 p*<0,05	7,3±1,5*# p<0,05 p*<0,05
	макс. накл.	3,9±0,9	14,3±1,5	12,6±2,6* p<0,05	18,3±1,6*# p<0,05 p*<0,05

Примечание. *p<0,05 – различия достоверны по сравнению с контролем; #p<0,05 – различия достоверны по сравнению с гомозиготами 299Asp.

Полиморфные варианты гена Toll-4 рецептора отличались и по скорости индуцированной агрегации. Коллаген увеличивал скорость агрегации в крови здоровых детей с $1,3 \pm 0,6$ до $3,9 \pm 0,9$. Тромбоциты больных детей агрегировали значительно быстрее. В группе детей-носителей нормальной аллели Asp/Asp агрегация увеличивалась с $1,49 \pm 2,5$ до $14,3 \pm 7,5$; у гетерозигот Asp299Gly – до $18,3 \pm 5,6$.

Тромбоциты с аномальными Toll-6 рецепторами (табл. 2) отвечали на индукцию АДФ уменьшением скорости агрегации. Особенно низка была скорость агрегации у гомозигот 249Pro ($7,1 \pm 6,0$). При этом максимальный размер образованных агрегатов уменьшался у гетерозигот Ser249Pro ($6,4 \pm 1,2$) гомозигот 249Pro ($7,6 \pm 2,7$) по сравнению с гомозиготами 249Ser ($9,7 \pm 1,9$). При индукции адреналином и коллагеном тромбоциты с полиморфизмом гена Toll-6 рецептора отвечали снижением скорости и степени агрегации.

Резюмируя сказанное, следует отметить, что генетические дефекты в Toll-4 и Toll-6 рецепторах по-разному отражались на индуцированной агрегации. При изменениях в гене, кодирующих Toll-4 рецепторы, индукция АДФ, адреналином и коллагеном увеличивали способность тромбоцитов к агрегации. При генетических изъянах в Toll-6 рецепторах индукция теми же агонистами уменьшали агрегационные свойства кровяных пластинок. Мы считаем, что эффекты индуцированной агрегации связаны с количеством экспрессированных к ним рецепторов и путей трансмембранной сигнализации. Согласно данным литературы, различные сигнальные рецепторы имеют свои пути внутриклеточной активации, которые опосредуются через последовательное подключение адапторных белков, протеинкиназ и транскрипционных факторов [8-10]. В итоге экспрессируется разное количество генов,

кодирующих рецепторы к различным биологически активным веществам. Если это так, то реакция генетически аномальных Toll-4 рецепторов сопровождается увеличением экспрессии рецепторов к АДФ, адреналину, коллагену. При полиморфизме генов Toll-6 рецепторов, напротив число экспрессируемых рецепторов агрегации уменьшается.

Таблица 2

Максимальный радиус агрегатов (отн. ед.) и максимальный наклон (отн. ед. в мин.) кривых агрегации тромбоцитов у пациентов носителей полиморфных вариантов Ser249Pro в гене Toll-6 рецепторов (M $\pm$ SD)

		Контрольная группа (n=25)	249Ser (n=25)	Ser249Pro (n=50)	249Pro (n=25)
Спонтанная	макс. знач.	$1,9 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,1$
	макс. накл.	$1,1 \pm 1,1$	$1,3 \pm 0,2^*$ $p < 0,05$	$1,4 \pm 0,1^*$ $p < 0,05$	$1,5 \pm 0,4$
АДФ	макс. знач.	$3,5 \pm 0,7$	$9,7 \pm 1,9^*$ $p < 0,05$	$6,4 \pm 1,2^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$	$7,6 \pm 2,7^*$ $p < 0,05$
	макс. накл.	$3,8 \pm 0,6$	$30,2 \pm 3,3^*$ $p < 0,05$	$16,2 \pm 1,8^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$	$7,1 \pm 6^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$
Адреналин	макс. знач.	$3,7 \pm 0,8$	$6,9 \pm 1,5^*$ $p < 0,05$	$5,3 \pm 1,3^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$	$4,9 \pm 1,6^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$
	макс. накл.	$3,4 \pm 0,9$	$12,3 \pm 2,8^*$ $p < 0,05$	$7,4 \pm 1,7^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$	$4,3 \pm 1,2^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$
Коллаген	макс. знач.	$4 \pm 0,9$	$8,2 \pm 1,4^*$ $p < 0,05$	$6,4 \pm 0,8^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$	$7,5 \pm 1,5^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$
	макс. накл.	$3,9 \pm 0,9$	$22,9 \pm 2,3^*$ $p < 0,05$	$17,3 \pm 2^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$	$9,9 \pm 1,3^{*#}$ $p < 0,05$ $p^* < 0,05$

Примечание. * $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с гомозиготами 299Asp.

Выводы

1. При полиморфизме генов Toll-4 (Asp299Gly) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов диаметрально изменяются агрегационные свойства тромбоцитов.

2. Уровень агрегационной активности тромбоцитов, по всей вероятности, определяется экспрессией тромбоцитарных рецепторов и внутриклеточными путями активации тромбоцитов

Литература

1. Баркаган З.С. Гемостаз. В кн.: Руководство по гематологии / под ред. А.И. Воробьева. – М.: Ньюдиамед, 2005. – С. 9-147.
2. Бельченко Д.И., Есипова А.В., Кривошеина Е.Л. Активация межклеточных взаимодействий в циркулирующей крови и микроциркуляции // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2005. – № 4 (16). – С. 53-57.
3. Березовская Г.А. Апоптоз тромбоцитов: причины недостаточной эффективности антиагрегационных препаратов // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Т. 32, № 4. – С. 17-27.
4. Бурячковская Л.И. Гетерогенность тромбоцитов человека и животных. Связь морфологических особенностей с функциональным состоянием: автореф. ... дис. д-а биол. наук. – М., 2007. – 46 с.
5. Козлов И.Г. Сигнальные рецепторы врожденного иммунитета: новая молекулярная мишень для диагностики и терапии воспалительных заболеваний // Вестник РАМН. – 2011. – № 1. – С. 42-50.

6. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.
7. Соколов Е.И., Бурячковская Л.И., Зыкова А.А., Голобородова И.В. Динамика морфологических структур тромбоцитов у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от уровня жирных кислот в крови // Кардиология. – 2011. – № 1. – С. 29.
8. Шитикова А.С. Тромбоцитопатии врожденные и приобретенные. – СПб., 2008. – 381 с.
9. Andonegyi G., Kenfoot S.M., McNaghy K. et al. Platelets express functional Toll-like receptor 4 // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 21417-21423.
10. Caamano G., Hunger C.A. NF-kb family of transcription factors central regulators of innate and adaptive immune functions // Cunction // Clin. Mikrobiol. Rev. – 2002. – Vol. 15, № 3. – P. 414-429.
11. Jamamoto U., Sato S., Hemmi H. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway // Science. – Vol. 301. – P. 640-643.

Literature

1. Barkagan Z.S. Hemostasis. Monograph «Guidelines for Hematology» edited by A.I. Vorobyov. – M.: Newdamed, 2005. – P. 9-147.
2. Belchenko D.I., Esipova A.V., Krivosheina E.L. Activation of intercellular interactions in the blood circulation and microcirculation // (Activation of cell-cell interactions in the blood circulation and microcirculation) // Regional blood circulation and microcirculation. – 2005. – № 4 (16). – P. 53-57.
3. Berezovskaya G.A. Platelet apoptosis: causes of insufficient antiplatelet drug effectiveness // Bulletin of SB RAMS. – 2011. – Vol. 32, № 4. – P. 17-27.
4. Buryachkovskaya L.I. Human and animal platelet distribution width. Relation between morphological features and functional state. Abstract of a thesis ... of a Doctor of Biological Sciences. – M., 2007. – 46 p.
5. Kozlov I.G. Signaling receptors of innate immunity: a new molecular target for the diagnosis and treatment of inflammatory diseases // Bulletin of RAMS. – 2011. – № 1. – P. 42-50.
6. Kuznik B.I. Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostatic system in health and disease. – Chita: Express Publishing, 2010. – 832 p.
7. Sokolov Ye.I., Buryachkovskaya L.I., Zyкова A.A., Goloborodova I.V. Dynamics of morphological structures of platelets in patients with coronary heart disease, depending on the fatty acid level in the blood // Cardiology. – 2011. – № 1. – P. 28-29.
8. Shitikova A.S. Thrombocytopathies: congenital and acquired. – SPb., 2008. – 381 p.
9. Andonegyi G., Kenfoot S.M., McNagny K. et al. Platelets express functional Toll-like receptor 4 // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 21417-21423.
10. Caamano G., Hunger C.A. NF-kb family of transcription factors central regulators of innate and adaptive immune functions // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15, № 3. – P. 414-429.
11. Yamamoto U., Sato S., Hemmi H. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway // Science. – Vol. 301. – P. 640-643.

Координаты для связи с авторами: Малежик Лидия Павловна – д-р мед. наук, профессор кафедры нормальной физиологии ЧГМА, тел. +7-924-506-50-27, e-mail: rita.malezhik@mail.ru; Малежик Маргарита Сергеевна – ассистент кафедры БЖД и МК ЧГМА, тел. +7-924-271-41-45, e-mail: rita.malezhik@mail.ru; Нимаева Дулма Цыбе-новна – доцент кафедры нормальной физиологии ЧГМА, тел. +7-924-276-89-38, e-mail: dulmanimaeva@yandex.ru.



УДК 613.2-053.4:334.722:373.2(571.63-25)

А.А. Важенина, Л.В. Транковская, Е.Б. Анищенко, Д.С. Яровова

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПИТАНИЯ ДЕТЕЙ, ОБУЧАЮЩИХСЯ В ЧАСТНЫХ ДОШКОЛЬНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ

Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690002, пр-т Острякова, 2,
тел. 8-(423)-245-17-83, г. Владивосток

Резюме

Изучено состояние фактического питания детей, являющихся воспитанниками частных дошкольных образовательных организаций. Получены данные о количественной и качественной структуре суточных рационов дошкольников. Рационы фактического питания не отвечают нормативным требованиям по продуктовому обеспечению, ряду показателей химического состава и энергетической ценности.

Ключевые слова: детское население, рационы питания, гигиеническая оценка.

A.A. Vazhenina, L.V. Trankovskaya, E.B. Anishchenko, D.S. Yarovova

HYGIENIC ASSESSMENT OF DIET FOR PRESCHOOL CHILDREN ATTENDING PRIVATE KINDERGARTENS

Pacific State Medical University, Vladivostok

Summary

We studied the diets of children who attend private kindergartens. Diet for preschoolers does not meet regulatory requirements in terms of recommended level of consumption, and chemical composition of diet is characterized by a pronounced imbalance of mineral elements.

Key words: children, diet, hygienic assessment.