

Результаты. Наибольшее содержание SFTPВ определялось у детей, у которых в дальнейшем была диагностирована бронхолегочная дисплазия (БЛД), у детей с повторными эпизодами обструктивных бронхитов, с диагностированной бронхиальной астмой. Низкое содержание SFTPВ в сыворотке было отмечено у детей без развития значимой бронхолегочной патологии. При изучении чувствительности и специфичности содержания SFTPВ показано его высокую диагностическую значимость для прогнозирования формирования БЛД (площадь AUC под ROC-кривой составила 0,775). Кроме того, низкий показатель среднего содержания SFTPВ определялся у пациентов с генотипом СС, частота распространения которого была снижена у пациентов с БЛД (28,57%) и бронхиальной астмой (16,66%) по сравнению с детьми без бронхолегочных поражений (50%). Самое высокое среднее содержание SFTPВ было у пациентов с бронхолегочной патологией и генотипом СТ, доля этих пациентов составляла 45% от общего числа обследованных, а среди детей без легочных поражений доля лиц с генотипом СТ составляла 30%.

Выводы. Установлена связь между такими факторами, как масса тела при рождении, гестационный возраст и продолжительность ИВЛ, и высоким содержанием SFTPВ в сыворотке крови. Их комбинация обуславливает более высокую вероятность развития БЛД у детей. Наиболее важным фактором, положительно влияющим на содержание SFTPВ в сыворотке крови, была масса тела при рождении; факторами, имевшими негативное влияние, были срок гестации и продолжительность ИВЛ в днях. Кроме того, содержание SFTPВ в сыворотке крови у детей без дальнейшего развития бронхолегочной патологии было значительно ниже. Также установлены высокая диагностическая значимость содержания SFTPВ для прогнозирования формирования БЛД и отсутствие достоверного влияния генетического полиморфизма на риск легочных заболеваний.

Ключевые слова: полиморфизм, сурфактантный протеин В, респираторные заболевания, дошкольники.

Вступ

Легеневий сурфактант є сумішшю фосфоліпідів та специфічних протеїнів, які є необхідними складовими для здійснення його біологічних функцій. Неможливість синтезувати достатню кількість сурфактанта внаслідок незрілості функціональної активності легеневої тканини є основною причиною розвитку респираторного дистрес-синдрому (РДС), який часто зустрічається у передчасно народжених дітей [7]. До складу сурфактанта входять чотири види білків, названих «сурфактантними протеїнами» — сурфактантний протеїн А, сурфактантний протеїн В, сурфактантний протеїн С та сурфактантний протеїн D (SFTPA, SFTPВ, SFTPC та SFTPD відповідно).

Важлива роль SFTPВ доведена у спостереженнях за новонародженими та експериментальними тваринами, які показали розвиток фатальної легеневої недостатності або важкого інтерстиційного ураження легень на тлі дефіциту цього білка [6,11]. Але зниження функціональної активності SFTPВ може відбуватися не тільки за рахунок зменшення його вмісту в загальній масі сурфактанта, але й за рахунок зниження функціональної активності білка, яка може виникнути в результаті однонуклеотидного поліморфізму гена SFTPВ. Доказом цього можуть бути результати спостереження за новонародженими, які показали, що поліморфний варіант у гені, що кодує синтез SFTPВ, частіше зустрічається в когорті новонароджених, які страждають від РДС, ніж у популяції здорових новонароджених [5]. Окрім того, описані ураження дихальної системи новонароджених у вигляді формування інтерстиційної хвороби легень, які також були асоційовані з поліморфізмом SFTPВ [11].

Не тільки неонатальні спостереження виявили закономірність між формуванням брон-

холегеневої патології та функціональними особливостями SFTPВ. Так, американські дослідники, показали, що сплайсингова мутація в 7 екзоні гена SFTPВ, за рахунок зсуву рамки зчитування та синтезу неповноцінного сурфактанта, сприяла розвитку легневих захворювань у дітей. Вказаний ефект посилювався за наявності у дітей поєднання мутації та деяких поліморфних варіантів за різними локусами гена [8]. L. Ge та ін. у експериментальному дослідженні показали, що наявність С алеля у гені SFTPВ є фактором ризику бактеріального ураження дихальної системи, зокрема *Pseudomonas aeruginosa*. Існують дослідження, у яких вивчали асоціацію поліморфного варіанту гена SFTPВ та ризик формування або загострення ХОЗЛ у дорослих пацієнтів [1,12]. Ще одне спостереження показало взаємозв'язок між поліморфним варіантом гена SFTPВ та ризиком розвитку дихальної недостатності у дорослих пацієнтів, які хворіли на негоспітальну пневмонію [9]. Але на даний момент недостатньо даних щодо взаємозв'язку між рівнем SFTPВ або генетичним поліморфізмом SFTPВ та розвитком бронхолегеневої патології у дітей.

Мета дослідження: встановити патогенетичну роль SFTPВ у формуванні бронхолегеневої патології у дітей.

Матеріал і методи дослідження

Було проведено проспективне дослідження на базі Вінницької обласної дитячої клінічної лікарні. Під спостереженням знаходилися 50 передчасно народжених дітей від моменту народження до 5-річного віку. Середній гестаційний вік дітей склав $31,6 \pm 2,6$ тижня, середня вага при народженні — $1743,4 \pm 454,3$ грама. Співвідношення дітей за статтю було однаковим — 25 дівчаток та 25 хлопчиків.

Нами аналізувалися особливості перебігу анте- та неонатального періоду. Надалі, у віці п'яти років, оцінювали стан здоров'я дітей. Залежно від стану здоров'я всіх дітей було розподілено на групи: хворі на астму, діти з повторними епізодами обструктивних бронхітів, бронхолегеневою дисплазією (БДЛ), а також діти без клінічно значущої бронхолегеневої патології. Клінічні діагнози виставляли згідно з Міжнародною класифікацією хвороб X перегляду. Обстеження дітей проводили відповідно до наказу МОЗ України № 484 «Про затвердження клінічного протоколу надання допомоги новонародженій дитині з дихальними розладами», наказу МОЗ України № 18 «Про затвердження Протоколів надання медичної допомоги дітям за спеціальністю «дитяча пульмонологія» та наказу МОЗ України № 767 «Про затвердження Протоколів діагностики та лікування алергологічних хвороб у дітей».

Вміст SFTPВ у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням набору Human HSP-27/HSPB1 (Heart Shock Protein 27) ELISA kit (Elabscience) відповідно до інструкції фірми-виробника.

Дітям також було проведено генетичне дослідження в молекулярно-генетичній лабораторії ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України». Геномну ДНК для молекулярно-генетичного дослідження виділяли з кількох крапель периферійної крові, висушеної на неонатальному бланку, за допомогою комерційного набору Quick-DNATM Universal Kit (Zymo Research, USA) відповідно до інструкції. Очищену ДНК використовували для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Для визначення поліморфного варіанту С1580Т гена SP-B (rs1130866) використовували модифіковані протоколи [10] з олігонуклеотидними праймерами із застосуванням методу ПЛР та наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ).

Специфічні фрагменти гена SP-B ампліфікували із застосуванням комерційного набору DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США). Продукт ампліфікації ДНК гена SP-B підлягав гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеази рестрикції TaaI (Thermo Scientific, США).

Стан рестрикційних фрагментів гена SP-B (С1580Т) аналізували в 3% агарозному гелі (агароза фірми Cleaver Scientific, Великобританія). Для оцінки розміру фрагментів викори-

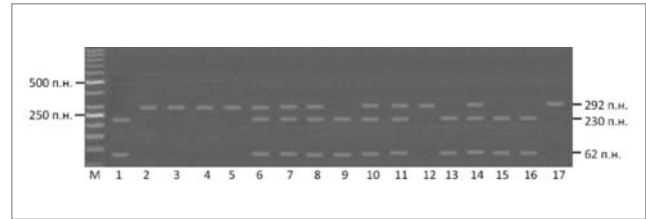


Рис.1. Електрофореграма розподілу рестрикційних фрагментів поліморфізму С1580Т гена SP-B:

- зразки 2–5, 12, 17 — генотип СС,
- зразки 6–8, 10, 11, 14 — генотип СТ,
- зразки 1, 9, 13, 15, 16 — генотип ТТ,
- М — маркер молекулярної ваги.

стовували маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, США). Гелі візуалізували за допомогою транслюмінатора, обробка отриманого зображення проводилася в комп'ютерній програмі Vitran.

На рис. 1 видно, що амплікони поліморфізму С1580Т гена SP-B підлягали гідролітичному розщепленню за наявності сайту рестрикції 5'-CAN↓GT-3', який з'являється в результаті нуклеотидної заміни С на Т у позиції 1580. Внаслідок цього утворювалися рестрикційні фрагменти з молекулярною вагою 230 п.н. та 62 п.н., що відповідає генотипу ТТ. За відсутності сайту рестрикції фрагмент залишався незмінним — 292 п.н. (генотип СС). У гетерозиготних носіїв поліморфного варіанту (генотип СТ) реєструвалися всі типи фрагментів: 292, 230 та 62 п.н.

Статистична обробка проведена за допомогою пакету даних Statistica 6.0. та SPSS 24.0.0.0. Було проведено оцінку розподілу даних, регресійний аналіз з визначенням коефіцієнта Пірсона, а також визначення чутливості та специфічності вмісту сурфактантного протеїну за допомогою ROC-кривих.

Таблиця 1

Клінічна характеристика дітей групи спостереження

Показник	Середнє значення	Стандартне відхилення	Min	Max
Маса тіла при народженні	1743,412	454,3146	800,0000	2750,000
Гестація	31,629	2,6312	25,0000	38,000
Вік матері	27,887	6,5126	16,0000	42,000
Тривалість ШВЛ (дні)	2,536	5,1681	0,0000	30,000
Тривалість СРАР (дні)	0,881	1,9599	0,0000	13,000
Тривалість оксигенотерапії (дні)	7,905	10,8601	0,0000	66,000
Сурфактантний протеїн, сироватка, нг/мл	90,490	72,5806	17,3000	258,000

Таблиця 2

Результати регресійного аналізу залежності рівня сурфактантного протеїну В у сироватці крові (нг/мл) від клінічних показників

Показник	β	Стандартна помилка В	В	Стандартна помилка В	t	p
Маса тіла при народженні	0,341443	0,170503	0,0558	0,0279	2,00257	0,048699*
Гестація	-0,477758	0,181755	-14,2971	5,4391	-2,62858	0,010323*
Вік матері	-0,106045	0,108065	-1,1137	1,1349	-0,98131	0,329474
Тривалість ШВЛ (дні)	-0,272474	0,132345	-3,6963	1,7953	-2,05882	0,042850*
Тривалість оксигено терапії (дні)	0,125946	0,134290	0,8131	0,8669	0,93787	0,351207

Примітки: R=0,34391769, R²=0,11827938, об'єднаний R²=0,06175882, F(5,78)=2,0927, p<0,07512; стандартна похибка оцінки: 67,909; * – різниця статистично значуща.

Результати дослідження

Клінічна характеристика групи дітей, які знаходилися під спостереженням, наведена в таблиці 1. Як видно з таблиці, середній вміст SFTPВ у сироватці крові передчасно народжених дітей становив 90,5 нг/мл (мін 17,3 нг/мл – мах 258,0 нг/мл).

Було проаналізовано різноманітні чинники, які мали вплив на організм дитини протягом неонатального періоду, особлива увага приділялася штучній вентиляції легень (ШВЛ) та оксигенотерапії як найбільш впливовим факторам, що сприяють пошкодженню дихальних шляхів та можуть мати значення для подальшого формування та розвитку бронхолегеневої патології у дітей і пов'язані з рівнем SFTPВ. Регресійний аналіз залежності рівня SFTPВ у сироватці крові від клінічних показників наведено у табл. 2.

Надалі було проаналізовано залежність вмісту SFTPВ від нозологічних груп, у які були розподілені всі діти групи спостереження. Як видно з рис. 2, найвищий вміст SFTPВ спостерігався у дітей з діагностованою в подальшому БЛД (164,0 нг/мл), у дітей з повторними

епізодами обструктивних бронхітів (70,8 нг/мл), з діагностованою бронхіальною астмою (49,0 нг/мл). Найнижчий вміст SFTPВ було відмічено у дітей без розвитку значущої бронхолегеневої патології (43,55 нг/мл).

Найважливішим фактором, що мав позитивний вплив на вміст SFTPВ у сироватці крові, за даними спостереження, була маса тіла при народженні ($\beta=0,341443$, $p=0,004$); негативний вплив мали термін гестації ($\beta=-0,477758$, $p=0,001$) та тривалість ШВЛ у днях ($\beta=-0,272474$, $p=0,004$).

У результаті проведеного генетичного дослідження поліморфізму С1580Т гена SFTPВ було виявлено всі три можливі генотипи: СС, СТ і ТТ. Серед усіх дітей генотип СС було визначено у 17 (34%) пацієнтів, генотип ТТ – у 12 (24%) пацієнтів, а генотип СТ – у 21 (42%) пацієнта.

Аналіз вмісту SFTPВ у сироватці крові залежно від генотипу показав, що середнє значен-

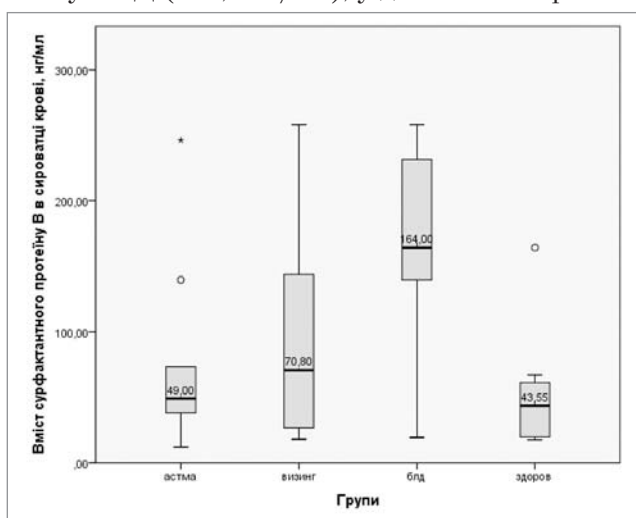


Рис. 2. Вміст сурфактантного протеїну В у сироватці крові (нг/мл) у групах спостереження

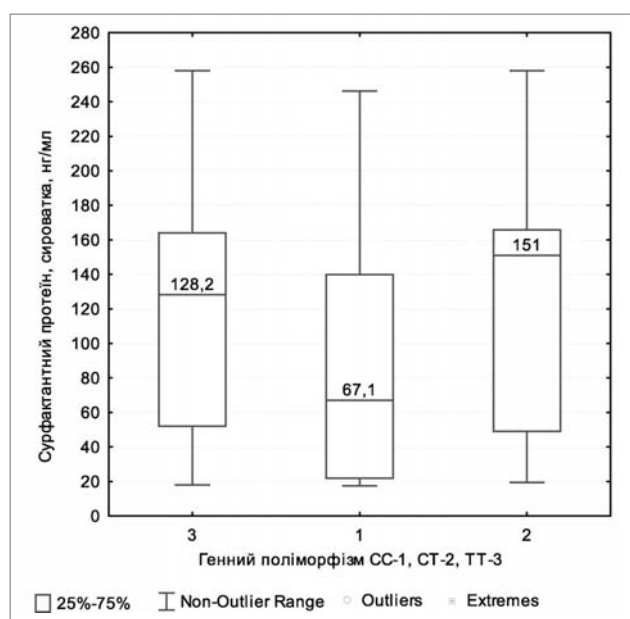


Рис. 3. Рівень сурфактантного протеїну В у сироватці крові (нг/мл) залежно від поліморфізму С1580Т гена сурфактантного протеїну В

Стан здоров'я дітей залежно від генотипу за поліморфним варіантом гена SP-B (відношення шансів, 95% довірчий інтервал)

Наявність легеневих захворювань	Генотип СС	Генотип СТ	Генотип ТТ
Астма	0,1953 [0,02227-1,713]	1,022 [0,2393-4,367]	3,886 [0,828-18,23]
Обструктивний бронхіт	3 [0,888-10,18]	1,353 [0,3373-5,426]	1,143 [0,2826-4,622]
БЛД	0,6 [0,1074-3,351]	2,451 [0,5159-11,64]	0,4571 [0,05004-4,176]
Здорові	0,9583 [0,2664-3,448]	1,714 [0,5066-5,801]	0,4444 [0,08363-2,362]

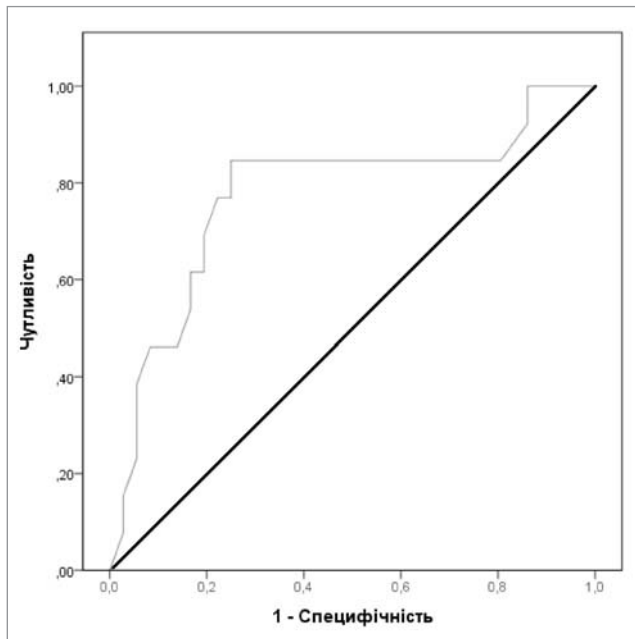


Рис. 4. ROC-крива прогностичної цінності дослідження сурфактантного протеїну В у розвитку БЛД

ня рівня показника у пацієнтів з генотипом СС склало 67,1 нг/мл, з генотипом СТ — 151 нг/мл, а у пацієнтів з генотипом ТТ — 128,2 нг/мл відповідно (рис. 3). Показники середніх значень не мали достовірних відмінностей.

Визначення ризику розвитку бронхолегеневих ускладнень залежно від генотипів за поліморфізмом С1580Т SFTPВ не показало достовірного впливу генетичного поліморфізму на ризик розвитку таких захворювань (табл. 3).

Нами було також проаналізовано показники специфічності та чутливості вмісту SFTPВ для прогнозування розвитку астми, повторних епізодів обструктивних бронхітів, БЛД та відсутності уражень дихальної системи за допомогою ROC-кривих. Результати обчислення площ ROC-кривих (AUC) відповідно до перерахованих станів легеневої системи були наступними: 0,404, 0,458, 0,775 та 0,287 відповідно. Площа ROC-кривої (AUC) для БЛД склала 0,775 [95% ДІ: 0,608–0,941], стандартна помилка 0,085, $p=0,004$.

На рис. 4 наведено ROC-криву, отриману для БЛД. З графічного зображення видно, що

визначення SFTPВ мало прогностичне значення для оцінки ризику майбутнього розвитку БЛД.

Обговорення

Найважливішими факторами, що мали вплив на вміст SFTPВ у сироватці крові, за даними спостереження, були маса тіла при народженні ($\beta=0,341443$, $p=0,004$), термін гестації ($\beta=-0,477758$, $p=0,001$) та тривалість ШВЛ у днях ($\beta=-0,272474$, $p=0,004$). Слід враховувати також, що найвищий вміст SFTPВ у сироватці крові спостерігався у дітей з групи БЛД. Дані літератури свідчать про те, що причиною підвищення вмісту сурфактантних протеїнів у сироватці крові може бути запальний процес, внаслідок чого підвищується проникність бронхолегеневих судин для макромолекул, у тому числі сурфактантних протеїнів [3,4]. Підвищення їх вмісту частково може пояснюватися посиленням локального синтезу сурфактантного протеїну недиференційованими епітеліальними клітинами, які з'являються в результаті запального процесу [13]. Отже, БЛД, як патологія, при якій ураження альвеол та епітелію дихальних шляхів є структурально найбільш значущим, чітко показує найвищий вміст SFTPВ. А виявлений зв'язок між такими факторами, як маса тіла при народженні, гестаційний вік та тривалість ШВЛ, і вищим вмістом SFTPВ у сироватці крові відповідає вищій імовірності розвитку БЛД у цих дітей. Тому закономірно, що площа AUC під ROC-кривою склала 0,775, що свідчить про високе діагностичне значення вмісту SFTPВ для прогнозування формування БЛД. З іншого боку, вміст SFTPВ у сироватці крові дітей, що не мали у подальшому бронхолегеневої патології, був значно нижчим.

Аналіз особливостей взаємозв'язку генетичного поліморфізму SFTPВ та вмісту протеїну в сироватці крові виявив кілька цікавих фактів. По-перше, найнижчий показник середнього вмісту SFTPВ було визначено у пацієнтів з генотипом СС, частота розповсюдження якого

була знижена у пацієнтів з БЛД (28,57%) та бронхіальною астмою (16,66%) порівняно з дітьми без бронхолегеневих уражень (50%). Але протективний ефект до розвитку цих станів у даному дослідженні не був доведений у зв'язку із невеликою кількістю чисельністю пацієнтів у вибірці. Окрім того, середній вміст SFTPВ у сироватці пацієнтів з генотипом ТТ був відповідно вищим, але ці показники достовірно не відрізнялися. Найвищий середній вміст SFTPВ був у пацієнтів з бронхолегеневою патологією та генотипом СТ, частка яких становила 45% від загального числа обстежених, а серед дітей без легеневих уражень частка осіб з генотипом СТ склала 30%.

Перераховані особливості свідчать про те, що середній вміст SFTPВ у пацієнтів пов'язаний з багатьма чинниками, серед яких передчасне народження, знижена маса тіла при народженні та ШВЛ у неонатальному періоді.

Отже, носійство генотипу СС може бути потенційним чинником, який володіє проєктивними властивостями щодо розвитку захворювань бронхолегеневої системи у дітей. Слід зазначити, що проведене нами дослідження мало певні обмеження, оскільки загалом включало лише 50 дітей (мешканців Подільського регіону). Цілком очевидно, що отримані нами результати не можуть бути повністю екстрапольовані на всю українську популяцію дітей,

які були народжені передчасно, та асоційовану з ураженням дихальної системи. Необхідні подальші генетичні дослідження із розширенням групи спостереження та визначенням особливостей інших поліморфних варіантів гена SFTPВ для встановлення факторів спадкової схильності до розвитку бронхолегеневої патології у дітей.

Висновки

1. Найважливішим фактором, який має негативний вплив на вміст SFTPВ у сироватці крові, за даними спостереження, були термін гестації та тривалість ШВЛ у днях.

2. Зв'язок між такими факторами, як маса тіла при народженні, гестаційний вік та тривалість ШВЛ, і вищим вмістом SFTPВ у сироватці крові відповідає вищій імовірності розвитку БЛД у цих дітей.

3. Вміст SFTPВ у сироватці крові дітей без подальшого розвитку бронхолегеневої патології був значно нижчим.

4. Визначено високу діагностичну значущість вмісту SFTPВ для прогнозування формування БЛД.

5. Достовірного впливу генетичного поліморфізму на ризик легеневих захворювань не виявлено.

Автори статті декларують відсутність конфлікту інтересів.

ЛІТЕРАТУРА

- Association between surfactant protein B+ 1580 polymorphism and the risk of respiratory failure in adults with community-acquired pneumonia / Quasney M.W. [et al.] // *Critical care medicine*. — 2004. — Т.32, №5. — P.1115—1119.
- Clearance of different-sized proteins from the alveolar space in humans and rabbits / Hastings R.H., Grady M., Sakuma T. [et al.] // *J. Appl. Physiol.* 1992. — Vol.73. — P.1310—1316.
- Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory-distress syndrome / J. Floros, S.V. Veletza, P. Kotikalapudi [et al.] // *Biochem. J.* — 1995. — Vol.305. — P.583—590.
- Farrell P.M. Hyaline membrane disease / P.M. Farrell, M.A. Avery // *Am. Rev. Respir. Dis.* — 1975. — Vol.111. — P.657—688.
- Holtzman M.J. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens / M.J. Holtzman // *J. Clin. Invest.* — 2012. — Vol.122. — P.2741—2748.
- Nogee L.M. Genetic mechanisms of surfactant deficiency / L.M. Nogee // *Biol. Neonate*. — 2004. — №85. — P.314—318.
- Polymorphic Variation in Surfactant Protein B is Associated with COPD Exacerbations / Foreman M.G., DeMeo D.L., Hersh C.P. [et al.] // *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. — 2008. — Vol.32(4). — P.938—944. doi:10.1183/09031936.00040208
- Prolonged survival in hereditary surfactant protein B deficiency associated with a novel splicing mutation / Dunbar A.E. 3rd, Wert S.E., Ikegami M. [et al.] // *Pediatr Res.* — 2000. — №48. — P.275—282.
- Rossi F.P. Interstitial lung disease in a child heterozygous for the 1549C → GAA (121ins2) mutation of surfactant protein B / F.P. Rossi // *European Respiratory Journal*. — 2011. — №4. — P.985—987.
- Ruicheng H. Surfactant protein B 1580 polymorphism is associated with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Chinese Han population / H. Ruicheng, X. Yongjian, Z. Zhenxiang // *Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences*. — 2004. — Vol.24, №3. — P.216—218.
- Surfactant protein B polymorphisms are associated with severe respiratory syncytial virus infection, but not with asthma / Puthothu B., Forster J., Heinze J. [et al.] // *BMC Pulm. Med.* — 2007. — Vol.7. — P.6.
- Xu J. Expression of surfactant protein D in airways of asthmatics and interleukin-13 modulation of surfactant protein D in human models of airway epithelium / J. Xu, G.K. Singhera, D.R. Dorsheid // *Respir. Res.* 2015. — Vol.16. — P.26.

Сведения об авторах:

Яблонь Ольга Степановна — д.мед.н., проф., зав. каф. педиатрии №1 Винницкого НМУ имени Н.И. Пирогова. Адрес: г. Винница, ул. Пирогова, 56.
Заичко Наталья Валентиновна — д.мед.н., доц., зав. каф. биологической и общей химии Винницкого НМУ имени Н.И. Пирогова. Адрес: г. Винница, ул. Пирогова, 56.
Мазулов Александр Васильевич — ассистент каф. биологической и общей химии Винницкого НМУ имени Н.И. Пирогова. Адрес: г. Винница, ул. Пирогова, 56.
Россоха Зоя Ивановна — к.мед.н., директор ГУ «Референс-центр по молекулярной диагностике МЗ Украины». Адрес: г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9, комн. 701; тел. +38(044) 205-48-13.
Попова Елена Федоровна — зав. молекулярно-генетической лабораторией ГУ «Референс-центр по молекулярной диагностике МЗ Украины». Адрес: г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9, комн. 701; тел. +38(044) 205-48-13.

Статья поступила в редакцию 11.03.2017 г.