

Булавенко Ольга Василівна - д.мед.н., проф., завідувач кафедри акушерства і гінекології №2, ВНМУ ім М.І.Пирогова; +38(067)6231671; remedivin@gmail.com

Вознюк Андрій Вікторович - аспірант кафедри акушерства і гінекології №2 ВНМУ імені М.І.Пирогова; +38(067)8888921; dr.vozniuk@gmail.com

© Дудник В.М., Федчишен О.П.

УДК: 616.248-053.2:577.161.2-008.64

Дудник В.М., Федчишен О.П.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова, кафедра педіатрії №2 (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ПРОТИМІКРОБНОГО ПЕПТИДУ С-КІНЦЕВОГО hCAP18 КАТЕЛІЦИДИНУ LL-37 У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ

Резюме. В даній статті вивчалось діагностичне значення вмісту протимікробного пептиду С-кінцевого hCAP18 кателіцидину LL-37 у дітей, хворих на бронхіальну астму. Для досягнення поставленої мети нами було обстежено 200 дітей, хворих на БА віком від 6 до 18 років. Вміст катіонного протимікробного пептиду С-кінцевого hCAP18 кателіцидину LL-37 у пацієнтів із БА достовірно вищий ($p \geq 0,001$), ніж у групі здорових дітей. Встановлено, що вміст кателіцидину LL-37 вищий при неатопічному ($55,73 \pm 0,54$ нг/мл) та змішаному ($29,71 \pm 0,33$ нг/мл) варіантах БА, ніж при атопічному ($6,64 \pm 0,47$ нг/мл) її варіанті. Також відмічено, що зростання вмісту кателіцидину LL-37 достовірно асоціюється із важкістю перебігу та досягненням адекватного контролю БА. Так, при персистуючій важкій БА вміст кателіцидину LL-37 вищий на 39,58% та 10,87%, ніж при інтермітуючому та легкому персистуючому перебігу відповідно, а при неконтрольованій БА його вміст був вищий у 3,76 рази, ніж при контрольованому перебігу захворювання. Встановлено позитивний середньої сили взаємозв'язок із вмістом кателіцидину LL-37 та значеннями інтерлейкіну 1 ($r_{xy} = 0,398$ ($p = 0,02$)) та 6 ($r_{xy} = 0,178$ ($p = 0,034$)) у сироватці крові пацієнтів із БА. Визначення методів, спрямованих на можливість впливу на вміст кателіцидину LL-37 в сироватці крові у дітей, хворих на БА, дозволить краще контролювати перебіг та важкість захворювання, а також зменшити кількість ускладнень в подальшому.

Ключові слова: бронхіальна астма, діти, кателіцидин LL-37.

Вступ

Бронхіальна астма (БА) - хронічне алергічне захворювання дихальних шляхів, що проявляється нападами задишки або ядухи, сухим кашлем у відповідь на вплив алергену або на тлі простудного захворювання, фізичного навантаження, емоційного стресу [5].

Лікування захворювання - це тривалий процес, що вимагає постійного лікарського контролю і високої відповідальності хворого та спрямоване не на усунення причини захворювання (враховуючи, що встановити її достовірно майже неможливо), а на зняття нападів та їх профілактику [3]. Саме тому встановлення основної причини захворювання, провокуючого чинника є основним завданням учених усього світу.

На сучасному етапі БА прийнято розглядати як поліетіологічне захворювання, а роль у загостренні приділяється не лише IgE - опосередкованим алергічним реакціям. Важливим є розуміння того, що у патогенезі неатопічного варіанту БА значну роль відіграють інфекційні агенти, що стимулюють продукцію Т-хелперів 17-го типу, які у свою чергу продукують інтерлейкін 17, який спроможний індукувати експресію багатьох медіаторів запалення, в тому числі ?1-антитрипсину, інтерлейкіну 1, 6 та 8 [2]. Саме тому даний варіант БА погано піддається базисній терапії і потребує збільшення дози інгаляційних глюкокортикоїдів, а також використання комбінованих засобів. Діагностика атопічного варіанту БА IgE - опосередковано полягає у визначенні вмісту еозинофілів у крові та мокротинні,

вмісту загального та специфічних IgE, а також проведення шкірних алерго-тестів із різними групами алергенів. Що стосується підтвердження неатопічної форми БА, воно полягає у визначенні інфекційного агента, шляхом встановлення вмісту IgM, IgG до причинно значущого збудника, але найчастіше встановити його одразу майже неможливо.

Саме тому нами запропоновано визначення вмісту протимікробних пептидів, а саме С-кінцевого hCAP18 кателіцидину LL-37 людини, вироблення яких активується мікробними частинками шляхом зв'язування з Toll-рецепторами, однак, це не єдиний механізм. Їх дію можна порівняти з природними антибіотиками, які здатні вбивати бактерії. Дослідження на моделях тварин показали, що при пригніченні активності генів, відповідальних за синтез антимікробних пептидів, у тварин значно зростає чутливість до стрептококових інфекцій [6].

Відомі два сімейства антимікробних пептидів - кателіцидини та дефензини. Кателіцидини - група антимікробних білків, що володіють N-термінальним сигнальним білком, незмінною кателіновою частиною і структурно постійно змінюваними ділянками. Мають широкий спектр антимікробної та імунomodуючої активності [1].

Антимікробні пептиди, синтезовані в різних клітинах, можуть мати різні функції. Кателіцидин LL-37, який синтезується в клітинах екринних залоз, дихальних

шляхах та уrogenітальному тракці забезпечує його протимікробні властивості, а молекули LL-37, що виробляються в огрядних клітинах, сприяють їх активації і втягують їх у імунний процес. Поряд з прямою антимікробною здатністю цей білок взаємодіє з іншими білками, викликає міграцію нейтрофілів, моноцитів і Т-клітин, стимулює проліферацію ендотелію. У новонароджених вміст LL-37 підвищено, що компенсує недостатність адаптаційного імунітету [4].

Метою дослідження було встановити діагностичне значення вмісту протимікробного пептиду, а саме С-кінцевого hCAP18 кателіцидину LL-37, у пацієнтів із бронхіальною астмою.

Матеріали та методи

Нами було комплексно обстежено 200 дітей, хворих на бронхіальну астму віком від 6 до 17 років. Верифікацію діагнозу БА проводили згідно наказу МОЗ України №868 від 08.10.13 р. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги "Бронхіальна астма у дітей" проводився із урахуванням рекомендацій "Глобальної ініціативи по бронхіальній астмі" (Global Initiative for Asthma, GINA, 2016) та рекомендацій, затверджених на XII з'їзді педіатрів України (2010 р., м. Київ). Всі дослідження та лікувальні заходи проводились за згодою хворих дітей та їх батьків. Для верифікації діагнозу БА був застосований клініко-анамнестичний метод дослідження: вивчення скарг, анамнезу захворювання, анамнезу життя, даних об'єктивного обстеження.

При проведенні клінічного дослідження крові визначали кількість гемоглобіну за Салі, проводили підрахунок еритроцитів (Ер), досліджували їх морфологію, швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) визначали за Панченковим, морфологічне дослідження лейкоцитів проводилось з підрахунком лейкоцитарної формули, тромбоцитів. Результати гемограм у хворих порівнювали з результатами дослідження показників периферичної крові у 40 практично здорових дітей того ж віку. В загальному аналізі крові відмічали кількість еозинофілів: при рівні еозинофілів 5-10% діагностували незначну еозинофілію, при рівні 10-20% - помірну еозинофілію, при рівні більше 20% - високу еозинофілію.

У якості маркерів наявності запального процесу нами був визначений вміст в сироватці крові прозапальних цитокінів (інтерлейкін 1 та інтерлейкін 6), які визначали методом імуноферментного аналізу (ELISA) з використанням стандартних наборів фірми IMMUNOTECH (Франція) за загальноновизнаною методикою.

Вміст кателіцидину LL-37 у сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "Human Cathelicidin LL-37" (HK321, HUMAN LL-37 ELISA; Nycultbiotech, Нідерланди) у відповідності до інструкції фірми-виробника. Принцип методу полягає в тому, що моноклональні антитіла до кателіцидину LL-37 адсор-

бовані в комірках планшету. Кателіцидин LL-37 людини, що присутній в зразках або стандартах, зв'язується з антитілами, що сорбовані в комірках планшету. Біотинільовані моноклональні антитіла, що додаються до людського кателіцидину LL-37, зв'язуються з ним, захопленим сорбованими в комірках першими антитілами. Після інкубації та промивки з комірок видаляється незв'язаний біотиновий кон'югат антитіл до кателіцидину LL-37, і в комірки додається кон'югат стрептавідин-пероксидаза, що зв'язується з біотином, що вже попередньо кон'югований з антитілами до кателіцидину LL-37. Після інкубації та промивки з комірок видаляється не зв'язаний стрептавідиновий кон'югат і в комірки додається субстратний розчин, що взаємодіє з ферментним комплексом з утворенням забарвленого розчину. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації кателіцидину LL-37, що присутній у зразках. Реакція зупиняється додаванням кислоти у комірки та абсорбція вимірюється на довжині хвилі 450 нм. Концентрація кателіцидину LL-37 у зразках визначається по стандартній кривій, що побудована на 7 приготуваних розведень стандарту кателіцидину LL-37. Розподіл рівнів кателіцидину LL-37 здійснювали за допомогою статистичного методу поділу варіаційних рядів на квартилі: I квартиль (менше 17,55 нг/мл), II квартиль (17,56-33,70 нг/мл), III квартиль (33,71-51,87 нг/мл) та IV квартиль (більше 51,9 нг/мл).

В якості контрольної групи було обстежено 40 здорових дітей, яким було виконано весь спектр клінічного, біохімічного та інструментального дослідження. Статистична обробка отриманих результатів була проведена за допомогою програми IBM SPSS Statistics, версія 20 (2013 р.), із застосуванням параметричних і непараметричних методів оцінки отриманих результатів.

Результати. Обговорення

Враховуючи те, що підвищення рівня еозинофілів супроводжує більшість алергічних захворювань, у нашому дослідженні ми проаналізували рівні еозинофілів у периферичній крові. Рівень еозинофілів у дітей, хворих на БА, склав $8,56 \pm 2,42\%$, що є достовірно вищим ($p < 0,01$), ніж у групі здорових дітей ($2,88 \pm 1,30\%$). Встановлено, що при atopічному варіанті БА достовірно частіше відмічався високий вміст еозинофілів в периферичній крові (у $58,33 \pm 6,36\%$ випадків), а при неатопічній БА переважала мінімальна еозинофілія ($55,56 \pm 6,26\%$). Що стосується змішаної етіології захворювання не відзначалось достовірної різниці у рівні еозинофілів: у рівнозначних частинах відзначалась мінімальна, помірна та висока еозинофілія.

Вміст катіонного протимікробного пептиду С-кінцевого hCAP18 кателіцидину LL-37 у пацієнтів із БА ($33,64 \pm 0,33$ нг/мл) достовірно вищий ($p \leq 0,001$), ніж у групі здорових дітей ($7,74 \pm 0,27$ нг/мл).

Таблиця 1. Вміст протимікробного пептиду кателіцидину LL-37 в сироватці крові дітей, хворих на БА залежно від форми захворювання ($M \pm m$).

Форма БА		Вміст кателіцидину LL-37, нг/мл
Алергічна	Атопічна	6,64±0,47**
	Неатопічна	55,73±0,54*
Змішана		29,71±0,33*
Здорові діти		7,74±0,27

Примітки: * - $p \leq 0,001$ - різниця вірогідна показників здорових дітей; ** - $p \leq 0,001$ - різниця вірогідна відносно показників пацієнтів із неатопічною БА.

Таблиця 2. Вміст протимікробного пептиду кателіцидину LL-37 в сироватці крові дітей, хворих на БА залежно від перебігу захворювання ($M \pm m$).

Перебіг БА	Вміст кателіцидину LL-37, нг/мл
Інтермітуюча	25,72±4,13**
Персистуючий легкий	32,38±1,95*
Персистуючий середньоважкий	37,56±2,87*
Персистуючий важкий	35,90±21,45*
Здорові діти	7,74±0,27

Примітки: * - $p \leq 0,001$ - різниця вірогідна показників здорових дітей; ** - $p \leq 0,001$ - різниця вірогідна відносно показників пацієнтів із персистуючим перебігом БА.

Таблиця 3. Вміст протимікробного пептиду кателіцидину LL-37 в сироватці крові дітей, хворих на БА залежно від рівня контролю захворювання ($M \pm m$).

Рівень контролю БА	Вміст кателіцидину LL-37, нг/мл
Контрольована	9,46±3,11**
Частково-контрольована	33,15±3,01*
Неконтрольована	35,66±2,66*
Вперше встановлена	33,98±2,85*
Здорові діти	7,74±0,27

Примітки: * - $p \leq 0,001$ - різниця вірогідна показників здорових дітей; ** - $p \leq 0,001$ - різниця вірогідна відносно показників пацієнтів із іншими видами контролю БА.

Таблиця 4. Вміст прозапальних інтерлейкінів 1 та 6 в сироватці крові дітей, хворих на бронхіальну астму ($M \pm m$).

Прозапальні цитокіни	Діти, хворі на бронхіальну астму, МО/мл	Здорові діти, МО/мл
Інтерлейкін 1	27,95±0,19*	10,93±0,19
Інтерлейкін 6	22,27±0,22*	2,49±0,14

Примітки: * - $p \leq 0,001$ - вірогідна різниця показників здорових дітей.

Атопічний варіант БА не передбачає достовірної зміни вмісту протимікробних пептидів, зокрема кателіцидину LL-37, що і представлено у таблиці 1. Проте відмічається достовірна ($p \leq 0,001$) різниця між показниками кателіцидину LL-37 у пацієнтів із неатопічним та змішаним перебігом захворювання та показниками здорових дітей. Також встановлено, що вміст наведеного протимікробного пептиду вища при неатопічно-

му та змішаному варіантах БА, ніж при атопічному її варіанті (табл. 1).

Відповідно значення кателіцидину LL-37 в сироватці крові у пацієнтів із інтермітуючим перебігом БА становив 25,72±4,13 нг/мл, що достовірно відрізняється від значень здорових дітей, а також пацієнтів із персистуючим перебігом захворювання (37,56±2,87 нг/мл) (табл. 2).

Що стосується вмісту кателіцидину LL-37 у пацієнтів із різними рівнями контролю, то діти з контрольованим перебігом мали вміст наведеної речовини в сироватці крові достовірно ($p \leq 0,001$) нижчий, ніж пацієнти з неконтрольованим перебігом. Контрольований варіант БА єдиний, при якому не відмічається достовірної різниці вмісту кателіцидину LL-37 із групою здорових дітей, що підкреслює необхідність досягнення адекватного контролю у всіх пацієнтів із БА (табл. 3).

В якості маркерів запального процесу нами були визначені вміст інтерлейкіну 1 та 6. Вміст наведених речовин у сироватці крові дітей, хворих на БА, становив 27,95±0,19 нг/мл та 22,27±0,22 нг/мл відповідно, що має достовірну ($p \leq 0,001$) різницю із значеннями здорових (табл. 4).

Нами встановлено позитивний взаємозв'язок між вмістом протимікробного пептиду кателіцидину LL-37 та значеннями інтерлейкіну 1 ($r_{xy} = 0,398$ ($p = 0,02$)) та 6 ($r_{xy} = 0,178$ ($p = 0,034$)) у дітей із БА. Також відмічено негативний слабкої сили зв'язок між вмістом вітаміну D3 та рівнем протимікробного пептиду кателіцидину LL-37 в сироватці крові ($r_{xy} = -0,243$ ($p = 0,028$)).

Проводячи аналіз взаємозв'язків протимікробного пептиду та вмісту прозапальних цитокінів в залежності від форм БА встановлено, що існує негативний зв'язок між наведеними речовинами при неатопічному варіанті БА (для інтерлейкіну 1: $r_{xy} = -0,013$ ($p = 0,921$)) та для інтерлейкіну 6: $r_{xy} = -0,120$ ($p = 0,053$)), а також прямий зв'язок при атопічній (для інтерлейкіну 1: $r_{xy} = 0,106$ ($p = 0,027$)) та для інтерлейкіну 6: $r_{xy} = 0,516$ ($p = 0,014$)) та змішаній формі БА (для інтерлейкіну 1: $r_{xy} = 0,129$ ($p = 0,021$)) та для інтерлейкіну 6: $r_{xy} = 0,171$ ($p = 0,089$)).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. При розвитку БА у дітей, а особливо неатопічної чи змішаної її форми відбувається підвищення вмісту протимікробного поліпептиду кателіцидину LL-37 у порівнянні із здоровими дітьми у 7,2 та 3,8 рази відповідно, а також пацієнтами із атопічною формою захворювання відповідно у 8,4 та 4,8 рази.

2. Зростання вмісту наведеної речовини достовірно асоціюється із важкістю перебігу: при персистуючій важкій БА вміст кателіцидину LL-37 вищий на 39,58% та 10,87%, ніж при інтермітуючому та легкому персистуючому перебігу відповідно.

3. Рівень кателіцидину LL-37 залежав від можливості досягнення адекватного контролю: при неконт-

рольованій БА його вміст був вищий у 3,76 рази, ніж при контрольованому перебігу захворювання.

4. Встановлено позитивний середньої сили взаємозв'язок із вмістом кателіцидину LL-37 та значеннями інтерлейкіну 1 ($r_{xy}=0,398$ ($p=0,02$)) та 6 ($r_{xy}=0,178$ ($p=0,034$)) у сироватці крові пацієнтів із БА.

Перспективою подальших досліджень є визначення методів, спрямованих на можливість впливу на вміст кателіцидину LL-37 в сироватці крові у дітей, хворих на БА, що дозволить краще контролювати перебіг захворювання, а також зменшити кількість ускладнень у подальшому.

Список літератури

- Абатуров А.Е. Катионные антимикробные пептиды системы неспецифической защиты респираторного тракта: дефензины и кателіцидины. [Текст]: дефензины - молекулы, перерабатывающие ренессанс (часть 1) / А.Е. Абатуров // Здоровье ребенка. - 2011. - №7. - С. 161-170.
- Ортеменка Е.П. Діагностична цінність імунологічних маркерів крові та показників гіперсприйнятливості бронхів для верифікації типу запалення дихальних шляхів у школярів, хворих на бронхіальну астму / Е.П. Ортеменка // Совр. педиатрия. - 2010. - №3. - С.25-28.
- Уманец Т.Р. Бронхиальная астма и фенотипы свистящих хрипов у детей / Т.Р. Уманец, В.Ф. Лапшин // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. - 2010. - №2. - С.66-69.
- Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection / Robert Bals. // Respiratory Research. - 2010. - №1. - P.141-150.
- GINA-Report-2016 [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://ginaasthma.org>
- Steinstraesser L. Host defense peptides and their antimicrobial immunomodulatory duality / L. Steinstraesser // Immunobiology. - 2010; doi: 10.1016/j.imbio.

Дудник В.М., Федчишен А.П.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ПЕПТИДА С-КОНЦЕВОГО hCAP18 КАТЕЛИЦИДИНУ LL-37 У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Резюме. В данной статье изучалось диагностическое значение содержания противомикробного пептида С-концевого hCAP18 кателіцидину LL-37 у детей, больных бронхиальной астмой. Для достижения поставленной цели нами обследовано 200 детей, больных БА в возрасте от 6 до 18 лет. Содержание катионного противомикробного пептида С-концевого hCAP18 кателіцидину LL-37 у пациентов с БА достоверно выше ($p \geq 0,001$), чем в группе здоровых детей. Установлено, что содержание кателіцидина LL-37 выше при неатопическом ($55,73 \pm 0,54$ нг/мл) и смешанном ($29,71 \pm 0,33$ нг/мл) вариантах БА, чем при атопическом ($6,64 \pm 0,47$ нг/мл) ее варианте. Также отмечено, что рост содержания кателіцидина LL-37 достоверно ассоциируется с тяжестью течения и достижением адекватного контроля БА. Так, при персистирующей тяжелой БА содержание кателіцидина LL-37 выше на 39,58% и 10,87%, чем при интермиттирующей и легкой персистирующей течениях соответственно, а при неконтролируемой БА его содержание было выше в 3,76 раза, чем при контролируемом течении заболевания. Установлено положительную среднюю силы взаимосвязь с содержанием кателіцидина LL-37 и значениями интерлейкина 1 ($r_{xy}=0,398$ ($p=0,02$)) и 6 ($r_{xy}=0,178$ ($p=0,034$)) в сыворотке крови пациентов с БА. Определение методов, направленных на возможность влияния на содержание кателіцидина LL-37 в сыворотке крови у детей, больных БА, позволит лучше контролировать ход и тяжесть заболевания, а также уменьшить количество осложнений в дальнейшем.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, кателіцидин LL-37.

Dudnyk V.M., Fedchishen O.P.

DIAGNOSTIC VALUE OF THE CONTENT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE C-TERMINAL hCAP18 CATHELICIDIN LL-37 IN CHILDREN WITH ASTHMA

Summary. This article studied the diagnostic value content antimicrobial peptide C-terminal hCAP18 cathelicitidin LL-37 in children with asthma. To achieve this goal we examined 200 children with asthma aged from 6 to 18 years. The content of cationic antimicrobial peptide C-terminal hCAP18 cathelicitidin LL-37 in patients with asthma was significantly higher ($p \geq 0,001$), than in the group of healthy children. It is established that the content cathelicitidin LL-37 is higher at nonatopic ($55,73 \pm 0,54$ ng/ml) and mixed ($29,71 \pm 0,33$ ng/ml) versions of asthma than in atopic ($6,64 \pm 0,47$ ng/ml), its version. Content of cathelicitidin LL-37 was significantly associated with the severity and adequate control of asthma also noted. Thus, severe persistent asthma contents cathelicitidin LL-37 higher in 39,58% and 10,87% than the intermittent and mild persistent flow respectively, while content in uncontrolled asthma was 3,76 times higher than in a controlled flow disease. The positive correlation of medium strength cathelicitidin LL-37 containing and interleukin-1 values ($r_{xy}=0,398$ ($p=0,02$)) and 6 ($r_{xy}=0,178$ ($p=0,034$)) in the serum of patients with asthma. Definition of methods aimed at the possibility of influencing the content cathelicitidin LL-37 in the serum of children with asthma will allow better control of the course and severity of the disease and reduce the number of complications in the future.

Key words: asthma, children, cathelicitidin LL-37.

Рецензент - д.мед.н., проф. Токарчук Н.І.

Стаття надійшла до редакції 14.12.2016р.

Дудник Вероніка Михайлівна - д.мед.н., професор, завідувач кафедри педіатрії №2 ВНМУ ім. М.І. Пирогова, +38(067)7449148
Федчишен Олександр Петрович - асистент кафедри педіатрії №2 ВНМУ ім. М.І. Пирогова, +38(067)7089092