

УДК 616.248-053.2/. 5:616-097

DOI: 10.26565/2617-409X-2018-1-10

ДИАГНОСТИКА АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИГЕНОВ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ СИСТЕМЫ

В. Г. Чернуский, Н. Н. Попов, О. Л. Говаленкова, А. В. Летяго, В. Л. Кашина-Ярмак, Т. В. Евдокимова.

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Украина

В работе предоставлены данные по выявлению аутоиммунного процесса в бронхолегочной системе у детей, больных бронхиальной астмой БА, в возрасте от 5 до 14 лет в периоде обострения. Группу сравнения составили 25 здоровых детей в возрасте от 7 до 14 лет. Показано, что липополисахаридные антигены из межтканевой соединительной ткани бронхолегочных структур, полученные от случайно погибших детей, обладают более высокой специфичностью по сравнению с белковыми антигенами и позволяют идентифицировать морфологические изменения в бронхолегочной системе, степень тяжести течения и осуществлять контроль эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, белковые антигены, липополисахаридные антигены, аутоиммунный процесс.

Введение

Согласно современным представлениям бронхиальная астма (БА) рассматривается как хроническое аллергическое воспаление в бронхолегочной системе, в развитии которого основное значение отводится иммунопатологическим реакциям в клеточнотканевых структурах трахеобронхиального дерева [1, 2, 3]. В связи с этим в патогенезе БА у детей, определенную роль отводят аутоиммунным реакциям в клеточно-тканевых структурах бронхолегочной системы. Поэтому одним из перспективных направлений совершенствования иммунодиагностики БА в последнее время признано создание тканевых антигенов из структур бронхолегочной системы и их использование в диагностических тестах с целью выявления нарушений в структуре трахеи, бронхов и легочной ткани при развитии данного заболевания [4, 5]. В литературе приведены сведения о бронхолегочных антигенах, используемых в эксперименте и клинике для диагностики БА. При этом в условиях сравнительного сопоставления испытаний установлено, что диагностическая ценность антигенов, полученных из бронхолегочных структур, пропорциональна антигенной чистоте препарата [2, 4, 6].

Целью данного исследования было изучение роли антигенов бронхолегочной системы в диагностике аутоиммунного процесса при бронхиальной астме у детей.

Материал и методы

Проведено исследование уровня аутоантител в сыворотке крови у 97 детей, больных БА в периоде обострения, находящихся на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Дорожной клинической больницы ст. Харьков ЮЖД. Методология и методика исследования основывалась на положениях консенсуса по медицинской биоэтике и принципах доказательной

медицины (Directive 2010/63/EU от 22.10.2010). Возраст обследованных детей был от 5 до 14 лет в периоде обострения. Группу сравнения составили 25 здоровых детей в возрасте от 7 до 14 лет. В основной группе с неаллергической формой БА (НАБА) было 35 детей, с атопической (АТБА) – 32 ребенка и со смешанной (СМБА) – 30 детей. Диагноз заболевания устанавливали согласно с классификацией, принятой съездом педиатров и утвержденной приказом МЗ Украины № 04.01.12-8-1178 от 14.12.2009 и МКБ-10. Исследуемые группы были репрезентативными, рандомизированы по возрасту, полу, формам и степени тяжести течения заболевания.

Белковые водно-солевые антигены из эпителиальных клеток слизистой бронхов получали по методу Е.Ф. Чернушенко [7]. Антигенным материалом для проводимых исследований служили секционные образцы бронхов, полученные от случайно погибших детей с I (0) группой крови через 2-4 часа от момента гибели. В качестве тканевых антигенов использовали: супернатанты, микросомы, ядра, митохондрии, полученные из эпителиальных клеток слизистой бронхов.

Антигенную активность тканевых антигенов устанавливали по количественному определению белка по методу Е.Ф. Чернушенко [7]. Липополисахаридные антигены с гомологичных клеточнотканевых структур трахеи, бронхов и легочной ткани получали по методу В.Д. Яковенко [8]. Уровень аутоантител в сыворотке крови к белковым водносолевым антигенам определяли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) по методу Е.Ф. Чернушенко, Л.С. Когосовой [7]. Количественное определение аутоантител к белковым и липополисахаридным антигенам проводили с помощью нефелометрической реакции Уанье в модификации В.В. Квирикадзе с соавт. [9]. Математическая обработка результатов исследования проведена с помощью общепринятых методов статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Несмотря на многоплановое диагностическое применение тканевых антигенов при оценке клинических форм и степеней тяжести течения БА, мы исходили из того, что они способны, прежде всего, отражать аутоиммунные реакции, сопутствующие или определяющие патогенез заболевания. В этой связи нами для выявления аутоиммунного процесса в бронхолегочной системе был применён один из методов иммунологического исследования – реакция пассивной гемагглютинации (РПГА).

Установлено, что полученные диагностикумы характеризуются слабо выраженными преципитогенными свойствами, вследствие чего они принципиально не могут быть использованы в реакции РПГА для диагностических целей (табл.1). Об этом, прежде всего, свидетельствует низкий процент положительно реагирующих сывороток крови, детей больных БА (23,7 % - 58,1 %). Установлено, что для двух из четырёх испытуемых диагностикумов (антигенов ядерной субстанции и митохондрий) клеток слизистой бронхов частота положительных результатов с сывороткой крови здоровых детей контрольной группы были значительно выше, чем у детей больных, БА. Сопоставление с данными клинико-лабораторного обследования детей, больных БА (клинический анализ крови, общий белок и белковые фракции сыворотки крови, иммунограммы), с титрами антител с изучаемыми антигенами из клеток слизистой бронхов показало их неспособность в серологических реакциях выявлять аутоиммунные нарушения у данного контингента детей. Следует также подчеркнуть, что за исключением диагностикума, представляющего собой супернатанты и митохондрии клеток слизистой бронхов, все остальные антигены отличались и в реакции РПГА крайне низкой антигенной активностью, обеспечивая положительный результат (1:0,87-1:1,38), что полностью исключает их диагностическую значимость. Установлено, что данная группа диагностикумов, химически представленная белковыми компонентами по антигенной активности существенно не

различается между собой по способности реагировать с сывороткой крови детей, больных БА. Это также отрицательно характеризует их перспективность целевого использования. Показано, что антигены супернатанта и митохондрий клеток слизистой бронхов в РПГА с сыворотками крови детей, больных БА, выявили продукцию соответствующих специфических аутоантител в титрах: супернатанты – 1:75,4-1:108,2; митохондрии – 1:58,9-1:82,4. Поэтому, их нельзя отнести к диагностически перспективным, так как различия в группах больных БА оказались несущественными и, кроме того, значительно сниженными относительно данных в контрольной группе здоровых детей. Выводом из результатов проведенного исследования является то, что испытуемые в качестве диагностикумов белковые антигены клеток слизистой бронхов неспособны стимулировать выработку бронхолегочных аутоантител, участвующих в проявлениях аутоиммунного компонента у детей, больных БА.

**Специфическая активность белковых антигенов, полученных из эпителиальных клеток слизистой бронхов при БА у детей, в периоде обострения
(M ± m)**

Клинический диагноз	Титр РПГА							
	Супернатанты		Микросомы		Ядра		Митохондрии	
	кол-во полож. реагирующих, %	(M ± m)	кол-во полож. реагирующих, %	(M ± m)	кол-во полож. реагирующих, %	(M ± m)	кол-во полож. реагирующих, %	(M ± m)
Контрольная группа, n=25	0	0	23,7	1:0,96±0,89 E _x =0,018	63	1:3,74±1,98 E _x =0,022	100	1:122,3±63,2 E _x =0,35
НАБА, n=25	54,6	1:108,2±17,5* <0,05 E _x =0,38	32,5	1:1,24±0,19 <0,05 E _x =0,012	45,2	1:1,68±0,41 <0,05 E _x =0,016	57,4	1:68,7±20,0 <0,05 E _x =0,27
СМБА, n=30	50,2	1:87,2±20,3* <0,05 E _x =-0,32	37,9	1:1,08±0,21 <0,05 E _x =-0,014	43,7	1:1,94±0,52 <0,05 E _x =-0,016	56,2	1:82,4±19,6 <0,05 E _x =-0,26
АТБА, n=32	56,8	1:75,4±19,7* <0,05 E _x =0,29	35,6	1:0,96±0,18 <0,05 E _x =0,15	46,3	1:1,57±0,43 <0,05 E _x =0,17	58,1	1:69,5±17,2 <0,05 E _x =0,20

Примечания:

- * – достоверные отличия показателей от группы здоровых детей (P<0,05).
- E_x – показатель нормальности распределения выборки (E_x=0).

Наличие положительных результатов у клинически здоровых детей при постановке РПГА с данными тканевыми антигенами очевидно нуждается в своём объяснении. Можно предположить, что аутоантитела, выявляемые с используемыми тканевыми антигенами, относятся к группе так называемых нормальных (физиологических) аутоантител, регулирующих основные проявления морфофункции бронхиального дерева в условиях физиологической нормы. Тогда снижение титров этих аутоантител при БА у детей, по-видимому, можно оценить, как индикацию снижения общей иммунологической реактивности организма и развития вторичного иммунодефицитного состояния. Низкая диагностическая способность испытанных антигенов из клеток слизистой бронхов в РПГА, очевидно, связана и с тем, что БА у детей представляет собой хронический неспецифический воспалительный процесс, который формируется на основе первоначальных изменений в межуточной строме бронхолегочной системы. Известно, что клеточные элементы соединительной ткани ответственны за развитие воспалительного процесса, являющегося неспецифической реакцией организма, направленной на локализацию и элиминацию повреждающего фактора. От адекватности реактивного ответа элементов межуточной соединительной ткани и её рыхлых структур (микрофаги, макрофаги, эозинофилы, лимфоциты), принципиально зависит и характер иммунологических сдвигов, то есть они могут формировать иммунопатологические процессы, в основе которых составляет регулирующее влияние иммунологической системы на избыточную пролиферацию культивированных клеток соединительнотканых элементов бронхолегочной системы.

Это свидетельствует о том, что особенности развития БА у детей можно иммунологически выявить посредством использования в соответствующих тестах тканевых антигенов, полученных из межуточной соединительнотканной стромы бронхолегочной системы. Необходимо отметить, что элементы межуточной стромы человека отличаются строгой антигенной и химической специфичностью.

Для изучения этого вопроса нами были испытаны антигены трахеи, бронхов и легочной ткани, полученные из межуточной соединительной ткани данных структур бронхолегочной системы от случайно погибших детей с I (0) группой крови. В соответствии с методикой получения испытываемые антигены имели химический состав, компонентно представленный в основном липополисахаридами. Белки в составе антигенных препаратов отсутствовали, пептиды определялись лишь в виде следов.

Проведенное иммунологическое обследование с использованием метода фотометрического определения иммунных антител в сыворотке крови, показало, что липополисахаридные антигены трахеи, бронхов и легочной ткани в сравнении с белковыми антигенами клеточных структур слизистой бронхов, обладали высокой антигенной активностью и способностью выявлять дифференциально-диагностические различия клинических форм БА у детей (табл. 2).

Таким образом, проведенные исследования показали, что все клинические формы БА у детей характеризуются как иммунопатологический процесс, сформированный на основе первоначальных воспалительных изменений в бронхолегочной системе, индуктивно предопределённых различными, в том числе, инфекционными факторами.

Патогенетическую характеристику БА определяет продуктивный тип рецидивирующей воспалительной реакции, проявляющийся активацией и нерегулируемой пролиферацией элементов межуточной соединительной стромы бронхолегочных структур. Поэтому основной спектр иммунологических и иммунопатологических реакций при БА у детей имеет чёткую антигенную зависимость от воспалительно активированной межуточной стромы бронхолегочной

системы. Изменения со стороны клеточных структур слизистой бронхов не отличаются антигенной специфичностью. Поэтому бронхолегочные антигены белковой природы, полученные из различных структур клеток слизистой бронхов, как правило, не способны объективно диагностировать уровень присущих иммунопатологических нарушений при БА у детей.

Как установлено, липополисахаридные антигены, полученные из соединительнотканых структур трахеи, бронхов и легочной ткани, способны чётко выявлять при клинико-иммунологическом обследовании наличие и выраженность аутоиммунного процесса, воспалительно-пролиферативных изменений в бронхолегочной системе.

Этим определяется их целесообразность использования в клинической практике для иммунодиагностики клинических форм БА.

Таблица 2

Сравнительная активность белковых и липополисахаридных антигенов из эпителиальных клеток слизистой бронхов в реакциях количественного определения аутоантител в сыворотке крови детей, больных БА, в периоде обострения ($M \pm m$), усл. ед.

Вид бронхолегочных антигенов	Клинические формы			
	Контрольная группа, n=25	НАБА, n=35	СМБА, n=30	АТБА, n=32
	n = 25	n = 35	n = 30	n = 32
Белковые антигены из эпителиальных клеток слизистой бронхов				
Супернатанты	0,032±0,006	0,067±0,012 <0,05 E _x =0,015	0,099±0,021* <0,05 E _x =0,017	0,069±0,015 <0,05 E _x =0,020
Микросомы	0,025±0,004	0,032±0,007 <0,05 E _x =0,011	0,028±0,008 <0,05 E _x =0,09	0,032±0,007 <0,05 E _x =0,010
Ядра	0,027±0,002	0,033±0,010 <0,05 E _x =0,06	0,030±0,005 <0,05 E _x =0,09	0,031±0,009 <0,05 E _x =0,014
Митохондрии	0,048±0,009	0,059±0,014 <0,05 E _x =0,021	0,061±0,010 <0,05 E _x =0,018	0,067±0,018 <0,05 E _x =0,029
Липополисахаридные антигены из бронхолегочных структур				
Антиген трахеи	0,030±0,007	0,109±0,021* <0,05 E _x =0,23	0,171±0,018@ <0,05 E _x =0,28	0,096±0,012* <0,05 E _x =0,06
Антиген бронхов	0,028±0,003	0,238±0,038# <0,05 E _x =-0,18	0,252±0,047 <0,05 E _x =-0,20	0,188±0,016@ <0,05 E _x =-0,19
Антиген легочной ткани	0,043±0,006	0,292±0,042* <0,05 E _x =0,25	0,265±0,039* <0,05 E _x =0,19	0,221±0,043* <0,05 E _x =0,31

Примечания:

1. Q_{ϕ} – показатель иммунных антител в условных единицах. $Q_{\phi}= 0,0004 - 0,1236$ – отрицательная реакция; $Q_{\phi}= 0,1634 - 0,6411$ – положительная реакция; $Q_{\phi}= 0,1237 - 0,1633$ – слабо положительная реакция; $Q_{\phi}= 0,6412 - 1,4248$ – резко положительная реакция.
2. * – достоверные отличия показателей от группы здоровых детей ($P<0,05$); @ – достоверные отличия показателей СМБА от АТБА ($P<0,05$). # – достоверные отличия показателей НАБА от АТБА ($p<0,05$).
3. E_x – показатель нормальности распределения выборки ($E_x=0$).

Выводы

1. Антигены, полученные из секционного материала бронхолегочной системы белковой природы не могут быть получены промышленным путем, так как они не стандартизированы по белку, не обладают стерильностью, что в значительной мере ограничивает их применение и снижает диагностическую ценность.
2. Многокомпонентный антигенный состав белковых гомогенатов, полученных из клеточно-тканевых структур бронхолегочной системы, не позволяет четко идентифицировать характер морфологических изменений при бронхиальной астме у детей.
3. Липополисахаридные антигены из бронхолегочных структур не содержат в своем составе белок, могут быть получены промышленно в стерильных условиях и храниться в лиофилизированном состоянии более двух лет, что позволяет широко использовать их в иммунодиагностике клинических форм и степеней тяжести течения БА у детей.

Литература

1. Баранов А. А. Детская аллергология: Руководство для врачей / А. А. Баранов, И. И. Балаболкин. – М.: ГЭОТАР-Медиа. - 2009. – 687 с.
2. Богданова А. В. Дифференциальная диагностика бронхиальной астмы у детей / А. В. Богданова // Педиатрия. – 1998. – № 1. – С. 66-68.
3. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Дранник – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 603 с.
4. Адо А. Д. Общая аллергология: / Адо А. Д.- М.: Медицина, 1978. – 468 с.
5. Караулова А. В. Клиническая иммунология / Караулова А. В. – М.: Медицина, 2002. – 651 с.
6. Резник И. Б. Особенности воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме у детей / И. Б. Резник [и др.] // Педиатрия. – 1997. – № 2. – С. 9-14.
7. Способ получения тканевого аллергена для диагностики аутоаллергических процессов при хроническом тонзиллите: а.с. 1084025 СССР, МК И 5, А 61 К 39/00/ В. Д. Яковенко, А. Д.
8. Чернушенко Е. Ф. Иммунологические исследования в клинике / Е. Ф. Чернушенко, К. С. Когосова. – Киев: Здоров'я, 1978. – 159 с.
9. Базавлук, Г. П. Черкасс, заяв. 11.10.82; опубл. 09.12.84// Бюлл. открыт. изобрет. – 1984. - №13. – С.19.

**ДІАГНОСТИКА АВТОІМУННОГО ПРОЦЕСУ ПРИ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ
З ВИКОРИСТАННЯМ АНТИГЕНІВ БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ СИСТЕМИ**

**В. Г. Чернуський, М. М. Попов, О. Л Говаленкова, Г. В. Летяго, В. Л. Кашіна-Ярмак,
Т. В. Євдокимова.**

В роботі надані дані щодо виявлення автоімунного процесу в бронхолегеневій системі у дітей, хворих на бронхіальну астму, віком від 5 до 14 років в періоді загострення. Групу порівняння склали 25 здорових дітей у віці від 7 до 14 років. Показано, що ліпополісахарідні антигени з проміжної сполучної тканини бронхолегневих структур, отримані від випадково загиблих дітей, мають більш високу специфічність у порівнянні з білковими антигенами і дозволяють ідентифікувати морфологічні зміни в бронхолегеневій системі, ступінь тяжкості перебігу та здійснювати контроль ефективності проведеної терапії.

Ключові слова: бронхіальна астма, діти, білкові антигени, ліпополісахарідні антигени, автоімунний процес.

THE DIAGNOSIS OF THE AUTOIMMUNE PROCESS IN BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN USING ANTIGENS OF THE BRONCHOPULMONARY SYSTEM

V. H. Chernuskiy, M. M. Popov, O. L. Hovalenkova, H. V. Letiaho, V. L. Kashina-Yarmak, T. V. Yevdokymova.

The paper presents data on the detection of an autoimmune process in the bronchopulmonary system in children with BA aged from 5 to 14 years in the period of exacerbation. The comparison group consisted of 25 healthy children aged from 7 to 14 years. It has been shown that lipopolysaccharide antigens from the interstitial connective tissue of bronchopulmonary structures obtained from accidentally killed children have a higher specificity than protein antigens and allow identifying morphological changes in the bronchopulmonary system, the severity of the course and monitoring the effectiveness of the therapy.

Key words: bronchial asthma, children, protein antigens, lipopolysaccharide antigens, autoimmune process

УДК: 579.841.1.017:544.023:[615.849.1+615.281.9

DOI: 10.26565/2617-409X-2018-1-11

ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ПОЛІРЕЗИСТЕНТНИМИ ШТАМАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПІД ВПЛИВОМ ОПТИЧНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ФІОЛЕТОВОГО СПЕКТРІВ

С. Г. Маланчук.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Робота присвячена вивченню впливу світлодіодного випромінювання синього та фіолетового спектрів на біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* in vitro

Здатність утворювати біоплівки визначали в полістиролових планшетах з попередньою синхронізацією періодичної культури досліджуваних штамів. Було показано, що при визначенні здатності до біоплівкоутворення полірезистентними нозокоміальними штамми *Pseudomonas aeruginosa* вплив світлодіодного випромінювання синього та фіолетового спектрів протягом 10 хвилин призводить до зменшення оптичної щільності первинних біоплівок у 4,8 рази за дії фіолетового та у 3,3 рази за дії синього спектрів, та пригнічує процес утворення вторинних

© Маланчук С.Г., 2018