

УДК 616.248-07-478.75

Ю. А. Бітюк

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, м. Київ

СПЕЦИФІЧНИЙ ІМУНІТЕТ ДО ЕНДОТОКСИНУ У ХВОРИХ З ЗАГОСТРЕННЯМИ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

У дослідження було включено 331 хворий на бронхіальну астму. 4 і більше загострень за останній рік вважали критерієм для фенотипу астми з частими та 3 і менше з нечастими загостреннями. Результати дослідження встановили, що у пацієнтів з частими загостреннями характерно превалювання жіночої статі, прийому комбінації інгаляційних кортикостероїдів і β_2 агоністів тривалої дії та наявності важкої бронхіальної обструкції в асоціації з підвищеним рівнем sCD14 в індукованому мокротинні.

Ключові слова: бронхіальна астма, ендотоксин, імунітет.

Бронхіальна астма (БА) з частими загостреннями відноситься до фенотипу, який характеризується важким перебігом і низькою ефективністю лікування, що пояснюється величезною різноманітністю варіантів хронічного запалення [13]. В одному дослідженні було показано, що у 40% госпіталізованих пацієнтів з загостренням астми спостерігається еозинофілія [10]. В іншій роботі було виявлено, що при важкому загостренні астми відбувається інфільтрація слизової бронхів нейтрофілами та еозинофілами [16]. Хронічне запалення при астмі розглядається як таке, що зумовлене активацією або дисрегуляцією таких компонентів імунної системи як Т-хелпери 1, 2, 9, 17, 22 типів, вроджених лімфоїдних клітин 1, 2, 3 типів (ILC-1, 2, 3 – innate lymphoid cell), Т-регуляторних клітин, NKT клітин, епітеліальних і дендритних клітин, опасистих клітин, еозинофілів, нейтрофілів та ін. [1, 11].

Ендотоксин (ЕТ) або ліпополісахарид (ЛПС) є одним з основних індукторів імунної відповіді. Ефекти ЕТ реалізуються через активацію рецепторного комплексу TLR-4/CD14, який експресується на поверхні моноцитів, макрофагів та гранулоцитів [18].

Було досліджено, що у пацієнтів з астмою та алергією на кліщі домашнього пилу тяжкість захворювання залежить тільки від рівня ендотоксину [6, 12]. Ендотоксин викликає гіпертрофію келихоподібних клітин, що підвищує продукцію слизу [14]. Низькі дози ЛПС призводять до інфільтрації еозинофілами слизової оболонки носа, шляхом активації ГМ-КСФ [15]. Було показано, що експресія CD14 рецептору в бронхах посилюється у хворих на астму після контакту з алергеном [19] і еозинофільне запалення посилює реакцію на ендотоксин [4]. Досліджено, що вдихання низьких доз ендотоксину (5 мкг) знижує експресію CD11b та фагоцитарну активність крові фагоцитів бронхів хворих на atopічну астму [5]. На мишачій моделі астми було показано, що введення низьких доз ЛПС активує антигенпрезентуючі дендритні клітини та Тх-2 відповідь шляхом передачі сигналів через TLR4 [14]. З іншої сторони, високі дози ЛПС стимулюють продукцію ІЛ-12 та Тх-1 відповідь [17]. В літературі в основному вивчаються динамічні зміни цитокинів *in vitro*, які були вивільнені під впливом стимуляції ендотоксину, але відсутні дані про стан специфічної відповіді імунної системи на ЛПС у хворих на БА з частими та нечастими загостреннями.

Метою роботи було вивчити стан антиендотоксинового імунітету у хворих з частими та нечастими загостреннями бронхіальної астми.

Матеріал та методи дослідження. У дослідження було включено 331 хворий на БА. Діагноз і лікування бронхіальної астми проводилися відповідно до критеріїв чинного наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. 4 і більше загострень за останній рік вважали критерієм для фенотипу БА з частими та 3 і менше з нечастими загостреннями [9]. Для ідентифікації загострення використовували 4 ступені тяжкості: легкий, середньої тяжкості, тяжкий та загрозу зупинки дихання у відповідності до наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. Рівні антиендотоксинових антитіл класів А, М, G (відповідно анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM і анти-ЕТ-IgG) визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу. Рівні анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM і анти-ЕТ-IgG виражали в умовних одиницях оптичної щільності кінцевого продукту ферментативної реакції [2].

Секреторний антиендотоксиновий імуноглобулін А (анти-ЕТ-sIgA) в індукованому мокротинні визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу за протоколами,

розробленими в лабораторії клінічної імунології ЦНДЛ ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгіївського» [3]. Рівень sCD14 в сироватці та індукованому мокротинні визначали методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням тест-системи «Hbt Human sCD14 ELISA Kit, Product Number: НК320» виробництва «Nucult biotechnology» (Голландія). Оптичну щільність визначали на аналізаторі «StatFax 2100» на довжині хвилі 450 нм. Зміст sCD14 в сироватці виражали в мкг/мл, в індукованій мокротинні – в нг/мл.

Групу контролю склали 92 практично здорових осіб Криму. Всі волонтери досліджувалися на предмет алергічної патології за допомогою вивчення анамнезу та проведення шкірних алерготестів. Для проведення шкірних «прик» тестів використовували алергени виробництва «Імунолог», м Вінниця. Всі отримані результати піддані статистичній обробці для параметричних і непараметричних критеріїв з використанням програми «Minitab 16». При аналізі перевірки розподілу на нормальність використовували тест Колмогорова-Смірнова, порівняння центральних тенденцій двох незалежних вибірок з використанням U-критерію Манна-Уїтні і порівняння середніх двох незалежних вибірок за критерієм Стюдента. Кількісні змінні представлені у вигляді середніх значень і середньоквадратичних відхилень для параметричних методів і медіани з 1 і 3 квартилем для непараметричних. При множинному порівнянні показників антиендотоксिनного імунітету використовували критерій Краскала-Уолліса. Для всіх пацієнтів і волонтерів отримано добровільну письмову згоду на участь в науковому дослідженні, на який є дозвіл комісії з біоетики.

Результати дослідження та їх обговорення. У нашій роботі було виявлено 219 пацієнтів з нечастими та 112 з частими загостреннями БА. Характеристика основних клініко-анамнестичних параметрів в залежності від розділення пацієнтів на субтипи з частими та нечастими загостреннями БА представлена в таблиці 1.

Таблиця 1

Клініко-анамнестичні параметри у пацієнтів з частими та нечастими загостреннями

Параметри	БА з частими загостреннями, n=112	БА з нечастими загостреннями, n=219	P
Вік, роки (95 % ДІ)	53,40 (51,60-55,18)	51,43 (49,96-52,90)	0,096
Стать (Ч/Ж)	32/80	87/132	0,045
ІМТ, (95 % ДІ)	26,14 (25,42-26,87)	26,11 (25,61-26,62)	0,943
Вік початку БА, роки (95 % ДІ)	34,64 (32,62-36,67)	32,74 (31,49-33,98)	0,115
Тривалість БА, роки (95 % ДІ)	18,75 (16,49-21,01)	18,69 (17,16-20,23)	0,968
Пневмонія, n (%)	44 (39,29%)	53 (31,93%)	0,004
ІХС, n (%)	38 (33,93%)	53 (31,93%)	0,061
ЕГ, n (%)	47 (41,96%)	77 (54,23%)	0,275

Примітка: ІХС – ішемічна хвороба серця, ЕГ – есенціальна гіпертензія, P – достовірність відмінностей.

Таблиця 2

Використання медичних ресурсів та контролюючих препаратів у пацієнтів з частими та нечастими загостреннями

Параметри	БА з частими загостреннями, n=112	БА з нечастими загостреннями, n=219	P
Використання медичних ресурсів			
АСQ, бали, Ме (95 % ДІ)	3,00 (2,88-3,29)	2,43 (2,14-2,71)	<0,001
Типи контролюючих препаратів			
МЛ (n, %)	2 (1,78%)	30 (13,70%)	<0,001
Низькі дози ІКС (n, %)	1 (0,89%)	62 (28,31%)	<0,001
Середні дози ІКС (n, %)	8 (7,14%)	19 (8,68%)	0,630
Низькі дози ІКС +ЛАВА (n, %)	15 (13,39%)	39 (17,81%)	0,742
Середні дози ІКС +ЛАВА (n, %)	46 (41,07%)	55 (25,11%)	0,003
Високі дози ІКС+ЛАВА (n, %)	2 (1,78%)	12 (5,48%)	0,114
Високі дози ІКС+ЛАВА +оральні стероїди (n, %)	37 (33,04%)	3 (1,37%)	<0,001

Примітка: МЛ – модифікатори лейкотриєнів, ІКС – інгаляційні кортикостероїди, АСQ – Asthma Control Questioner, ЛАВА – β_2 агоністи тривалої дії, ДІ – довірчий інтервал.

По таким показникам (таблиця 1) як вік, ІМТ, вік початку та тривалість БА, субтипи з частими та нечастими загостреннями достовірно не відрізнялись між собою. В групі з частими загостреннями БА спостерігалось достовірне (P=0,045) превалювання жінок (71,43%) в порівнянні з іншим субтипом (60,27%). Порівняння анамнезу життя в досліджуваних субтипах встановило достовірне збільшення (P=0,004) кількості пневмоній в групі з частими загостреннями.

По рівню контролю БА (таблиця 2) було встановлено, що у пацієнтів з частими загостреннями медіана балів ACQ була достовірно більшою ($P < 0,001$) в порівнянні з іншою групою. Пацієнти з нечастими загостреннями астми частіше приймали МЛ та монотерапію низькими дозами ІКС, а для групи з частими загостреннями БА характерним був прийом середніх доз ІКС+ LABA та високих доз ІКС+LABA +оральні стероїди. Виявлені клінічні відмінності між субтипами можуть впливати на ступінь бронхіальної обструкції (таблиця 3). При порівнянні спірометричних показників між субтипами було встановлено, що у пацієнтів з частими загостреннями БА спостерігається достовірне зниження ОФВ1 та ФЖЄЛ як до так і після прийому бронходилататору. Отже, клініко-інструментальний аналіз встанови, що для субтипу з частими загостреннями характерно превалювання жіночої статі в асоціації з прийомом ІКС+LABA та наявності важкої бронхіальної обструкції. Виявлені характеристики даних субтипів можуть впливати на стан антиендотоксिनного імунітету. Показники цього імунітету у пацієнтів з частими та рідкісними загостреннями та здорових волонтерів представлені в таблиці 4.

Таблиця 3

Спірометричні показники у пацієнтів з частими та рідкісними загостреннями

Параметри	БА з частими загостреннями, n=112	БА з рідкісними загостреннями, n=219	P
Pre ОФВ1% (95 % ДІ)	62,26 (59,54-64,98)	74,62 (72,42-76,81)	<0,001
Pre ФЖЄЛ % (95 % ДІ)	77,09 (74,60-79,59)	85,92 (84,09-87,75)	<0,001
Pre ОФВ1/ФЖЄЛ% (95 % ДІ)	62,86 (61,30-64,42)	67,83 (66,66-69,00)	<0,001
Post ОФВ1% (95 % ДІ)	71,91 (68,96-74,85)	84,74 (82,44-87,03)	<0,001
Post ФЖЄЛ % (95 % ДІ)	83,37 (80,70-86,03)	90,91 (89,15-92,68)	<0,001
Post ОФВ1/ФЖЄЛ% (95 % ДІ)	67,30 (65,73-68,86)	72,87 (71,67-74,08)	<0,001
Δ ОФВ1 (Ме, 95 % ДІ)	0,280 (0,240-0,300)	0,290 (0,260-0,320)	0,192
Δ ОФВ1 % (95 % ДІ)	16,17 (14,78-17,56)	14,28 (13,30-15,26)	0,0291

Примітка: Δ Л – різниця ОФВ1 до і після інгаляції салбутамолу, ДІ – довірчий інтервал.

Таблиця 4

Показники антиендотоксिनного імунітету у пацієнтів з частими та рідкісними загостреннями та здорових волонтерів

Показники	Контроль (n=92)	БА з частими загостреннями, n=112	БА з рідкісними загостреннями, n=219	P, T, K-U
Анти-ЕТ-IgA (од.опт.щ.)	0,266 (0,184-0,354)	0,260 (0,201-0,333)	0,252 (0,197-0,313)	0,695
Анти-ЕТ-IgM (од.опт.щ.)	0,322 (0,203-0,400)	0,403a (0,315- 0,471)	0,409b (0,328-0,483)	<0,001
Анти-ЕТ-IgG (од.опт.щ.)	0,357 (0,261-0,442)	0,971a (0,693-1,298)	1,038b (0,755-1,305)	< 0,001
Анти-ЕТ-sIgA (од.опт.щ.)	0,178 (0,119-0,217)	0,155 (0,120- 0,203)	0,154b (0,114-0,192)	0,0458
sCD14, сироватка (мкг/мл)	4,99 (3,53-6,90)	5,91 (4,06-7,77)	5,48 (3,94-7,39)	0,082
sCD14, індуковане мокротиння (нг/мл)	6,7 (4,3-9,3)	10,2a (7,0-17,08)	8,5 b, c (5,5-11,6)	<0,001

Примітка: а – достовірність відмінностей контролю та БА з частими загостреннями, $p < 0,05$; b – достовірність відмінностей контролю та БА з рідкісними загостреннями, $p < 0,05$; c – достовірність відмінностей БА з частими загостреннями та з рідкісними загостреннями; T, K-U – тест Краскела-Уолліса.

Рівні анти-ЕТ-IgA та сироваткового sCD14 (таблиця 4) достовірно не відрізнялись ($P > 0,05$) від контролю в обох субтипах.

Вміст анти-ЕТ-IgM та анти-ЕТ-IgG був достовірно вище ($P < 0,05$) контролю для пацієнтів з частими та рідкісними загостреннями БА. Концентрація анти-ЕТ-sIgA була достовірно нижчою тільки для субтипу з рідкісними загостреннями. Рівень sCD14 в індукованому мокротинні був достовірно вище ($P < 0,05$) контролю в обох групах. У пацієнтів з частими загостреннями в порівнянні з іншим субтипом рівень sCD14 в індукованому мокротинні був достовірно ($P < 0,05$) вищим. В затвердженому протоколі Європейської академії алергології та клінічної імунології наголошується, що загострення астми з однієї сторони пов'язано з вірусною інфекцією та дефіцитом вродженого імунітету, а з іншої існує доказ про синергізм вірусного та алергічного механізму, який збільшує ризик загострень [7]. Результати нашого дослідження вказують про підвищену активацію неспецифічної та вродженого ланки імунної відповіді на ендотоксин у пацієнтів з частими загостреннями БА. Високий рівень sCD14 в індукованому мокротинні може бути додатковим критерієм загострення астми.

Шахматов

У пацієнтів з частими загостреннями характерно превалювання жіночої статі, прийому комбінації інгаляційних кортикостероїдів і β_2 агоністів тривалої дії та наявності важкої бронхіальної обструкції в асоціації з підвищеним рівнем sCD14 в індукованому мокротинні.

Список літератури

1. Бережная Н. М. Семейство интерлейкинов 17 / Н. М. Бережная, Р. И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. - 2015. - Том. 16, №. 1. - С. 154–164.
2. Гордієнко А. І., Білоглазов В. О. Патент 70193 А Україна МКІ 7 А61К31/01 Спосіб визначення антитіл до ліполісахаридів грам негативних бактерій; Завл. 29.12.2003; Опубл. 15.09.2004, Бюл. № 9.
3. Гордиенко А. И. Использование твердофазного иммуноферментного анализа для определения общего и антиэндоксинового секреторного Iga человека / А. И. Гордиенко // Таврический медико-биологический вестник. - 2009. - Том. 12, No. 3. - P. 82–89.
4. Alexis N. CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: role of atopy / N. Alexis, M. Eldridge, W. Reed [et al.] // Journal of allergy and clinical immunology. - 2001. - Vol. 107, No. 1. - P. 31–35.
5. Alexis N. E. Effect of inhaled endotoxin on airway and circulating inflammatory cell phagocytosis and CD11B expression in atopic asthmatic subjects / N. E. Alexis, M. W. Eldridge, D. B. Peden // Journal of allergy and clinical immunology. - 2003. - Vol. 112, No. 2. - P. 353–361.
6. Cândida Rizzo M. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children / M. Cândida Rizzo, C. K. Nasipitz, E. Fernández-Caldas [et al.] // Pediatric allergy and immunology. - 1997. - Vol. 8, No. 3. - P. 121–126.
7. Custovic A. EAACI position statement on asthma exacerbations and severe asthma / A. Custovic, S. L. Johnston, I. Pavord [et al.] // Allergy. - 2013. - Vol. 68, No. 12. - P. 1520–1531.
8. Eisenbarth S. C. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like receptor 4–dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen / S. C. Eisenbarth, D. A. Piggott, J. W. Huleatt [et al.] // The Journal of experimental medicine. - 2002. - Vol. 196, No. 12. - P. 1645–1651.
9. Haldar P. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes / P. Haldar, I. D. Pavord, D. E. Shaw [et al.] // American journal of respiratory and critical care medicine. - 2008. - Vol. 178, No. 3. - P. 218–224.
10. Hasegawa K. Prevalence of eosinophilia in hospitalized patients with asthma exacerbation / K. Hasegawa, S. J. Stoll, J. Ahn [et al.] // Respiratory medicine. - 2015. - Vol. 111 – P.325–333.
11. Lambrecht B. N. The immunology of asthma / B. N. Lambrecht, H. Hammad // Nature immunology. - 2015. - Vol. 16, No. 1. - P. 45–56.
12. Michel O. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. / O. Michel, J. Kips, J. Duchateau [et al.] // American journal of respiratory and critical care medicine. - 1996. - Vol. 154, No. 6. - P. 1641–1646.
13. Moore W. C. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program / W. C. Moore, D. A. Meyers, S. E. Wenzel [et al.] // American journal of respiratory and critical care medicine. - 2010. - Vol. 181, No. 4. - P. 315–323.
14. Nadel J. A. Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies / J. A. Nadel // CHEST Journal. - 2000. - Vol. 117, No. 5, Suppl 2. - P. 386S–389S.
15. Peden D. B. Eosinophil influx to the nasal airway after local, low-level LPS challenge in humans / D. B. Peden, K. Tucker, P. Murphy [et al.] // Journal of allergy and clinical immunology. - 1999. - Vol. 104, No. 2. - P. 388–394.
16. Qiu Y. Bronchial mucosal inflammation and upregulation of cxc chemoattractants and receptors in severe exacerbations of asthma / Y. Qiu, J. Zhu, V. Bandi [et al.] // Thorax. - 2007. - Vol. 62, No. 6. - P. 475–482.
17. Siwiec J. Evaluation of th1/th2 lymphocyte balance and lipopolysaccharide receptor expression in asthma patients / J. Siwiec, T. Zaborowski, O. Jankowska [et al.] // Pneumonologia I Alergologia Polska. - 2009. - Vol. 77, No. 2. - P. 123–130.
18. Sheehan W. J. School endotoxin exposure is associated with increased asthma morbidity / W. J. Sheehan, C. R. Petty, B. Coull [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. - 2014. - Vol. 189. - P. 2288 p.
19. Viksman M. Y. Expression of activation markers on alveolar macrophages in allergic asthmatics after endobronchial or whole-lung allergen challenge / M. Y. Viksman, B. S. Bochner, R. S. Peebles [et al.] // Clinical Immunology. - 2002. - Vol. 104, No. 1. - P. 77–85.

Реферати

**СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУНИТЕТ К ЭНДОТОКСИНОУ
У БОЛЬНЫХ С ОБОСТРЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ
АСТМЫ**

Бисюк Ю. А.

В исследование было включено 331 больной бронхиальной астмой. 4 и более обострений за последний год считали критерием для фенотипа астмы с частыми и 3 и менее с редкими обострениями. Результаты исследования установили, что у пациентов с частыми обострениями характерно превалирование женского пола, приема комбинации ингаляционных кортикостероидов и β_2 агонистов длительного действия и наличия тяжелой бронхиальной обструкции в ассоциации с повышенным уровнем sCD14 в индуцированном мокроте.

Ключевые слова: бронхиальная астма, эндотоксина, иммунитет.

**SPECIFIC IMMUNITY TO ENDOTOXIN IN
PATIENTS WITH EXACERBATIONS OF
BRONCHIAL ASTHMA**

Bisyuk Yu.A.

The study included 331 patients with asthma. 4 or more exacerbations during the last year were considered a criterion for frequent asthma phenotype and 3 or less with infrequent exacerbations. Results of the study found that patients with frequent exacerbations characterized by the prevalence of female which were taking combination of inhaled corticosteroids and long-acting β_2 agonists and the presence of severe bronchial obstruction in association with high levels of sCD14 in induced sputum.

Key words: bronchial asthma, endotoxin, immunity.

Стаття надійшла 4.09.2015 р.

Рецензент Катеринчук І.П.