

Ю.А. Бісюк

СТАН СПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ ДО ЕНДОТОКСИНУ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ З ФІКСОВАНОЮ /ЗВОРотноЮ ОБСТРУКЦІЄЮ

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

У дослідження було включено 331 хворого на бронхіальну астму. Залежно від ступеня пост-бронходіляційного співвідношення $ОФВ_1/ФЖЄЛ$ було виявлено 151 пацієнта з фіксованою та 180 зі зворотною обструкцією. Рівні антиендотоксिनних антитіл класів А, М, G та sCD14 визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу. Результати дослідження показали, що вміст антиендотоксिनних антитіл класу G був вище ($p < 0,001$) контролю в обох групах, при цьому рівень цього імуноглобуліну був вище ($p < 0,05$) у пацієнтів з фіксованою обструкцією. Концентрація sCD14 в індукованому мокротинні була вище ($p < 0,001$) контролю в обох досліджуваних групах, хоча вміст цього медіатора в сироватці був вище ($p < 0,05$) контролю тільки в пацієнтів зі зворотною обструкцією.

Ключові слова: бронхіальна астма, ендотоксин, імунітет.

Клінічні симптоми бронхіальної астми (БА), як правило, пов'язані з обструкцією бронхів, яка може бути зворотною спонтанно або після призначення адекватної терапії [1]. У частини хворих на бронхіальну астму обструкція бронхів може бути незворотною незважаючи на оптимальну фармакотерапію. Дані про частоту такого фенотипу астми досить сильно різняться і в середньому становлять від 20 до 50 % від усіх хворих [2].

Фіксована обструкція на відміну від зворотної може бути асоційована з більш вираженим патологічним ремоделюванням бронхіальної стінки під дією різних запальних медіаторів, у тому числі тих, що виділяють еозинофіли, нейтрофіли та інші імунокомпетентні клітини [3]. Відомо, що ендотоксин грамнегативних бактерій є сильним стимулятором даних клітин, що в кінцевому результаті призводить до гіперпродукції прозапальних цитокінів, які підсилюють ремоделювання бронхів [4].

Ендотоксин (ЕТ), або ліпополісахарид (ЛПС), є головним компонентом зовнішньої мембрани грамне-

гативних бактерій. Наприклад, бактерійна стінка *E. coli* має приблизно 10^6 молекул ЛПС [5]. ЛПС складається з трьох компонентів: полісахаридний ланцюг (О-антиген), сердечник (core) і ліпід А, який закріплює молекулу ЛПС у зовнішній мембрані грамнегативних бактерій. Найбільша мінливість спостерігається в складі і кількості залишків цукру, що утворюють О-антиген. Більше 60 видів залишків цукру і 30 нецукрових елементів є компонентами О-антигену. До основних моносахаридів О-антигену відносять глюкозу, фруктозу, галактозу, манозу і рамнозу [6]. Розпізнавання ЛПС є багатоступінчастим процесом, що вимагає співпраці ряду білків, таких як ЛПС-зв'язувальний білок (ЛЗБ), CD14 рецептор і TLR4/MD-2 комплекс [7].

Мета роботи: вивчити стан антиендотоксिनного імунітету у хворих з частими та нечастими загостреннями бронхіальної астми.

Пацієнти і методи

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.

Ступінь обструкції визначали за ступенем пост-бронходіляційного співвідношення $ОФВ_1/ФЖЄЛ$. Для фіксованої обструкції співвідношення $ОФВ_1/ФЖЄЛ$ становило $< 0,7$ (70 %), а для зворотної $> 0,7$ (70 %) [2].

Рівні антиендотоксिनних антитіл класів А, М, G (відповідно анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM і анти-ЕТ-IgG) визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА), виражали в умовних одиницях оптичної щільності кінцевого продукту ферментативної реакції [8].

Секреторний антиендотоксिनний імуноглобулін А (анти-ЕТ-IgA) в індукованому мокротинні визначали методом твердофазного ІФА за протоколами, розробленими в лабораторії клінічної імунології ЦНДЛ ДУ «Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського» [9].

Рівень sCD14 у сироватці та індукованому мокротинні визначали методом твердофазного ІФА з використанням

тест-системи «Hbt Human sCD14 ELISA Kit, Product Number: HK320» виробництва «Hycult biotechnology» (Голландія). Оптичну щільність визначали на аналізаторі «StatFax 2100» на довжині хвилі 450 нм. Зміст sCD14 у сироватці виражали в мкг/мл, в індукованому мокротинні – в нг/мл.

Групу контролю склали 92 практично здорові особи. 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 квантилем для непараметричних. При множинному порівнянні показників антиендотоксину імунітету використовували критерій Краскела-Уолліса.

Для всіх пацієнтів і волонтерів отримано добровільну письмову згоду на участь в науковому дослідженні, на який є дозвіл комісії з біоетики.

Результати досліджень та їх обговорення

Залежно від ступеня постбронходилатційного співвідношення ОФВ₁/ФЖЄЛ було виявлено 151 пацієнта з фіксованою та 180 зі зворотною обструкцією. Основні клініко-анамнестичні параметри в досліджуваних субтипах представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Клініко-анамнестичні параметри у хворих на БА з фіксованою та зворотною обструкцією

Параметр	БА з фіксованою обструкцією, n=151	БА зі зворотною обструкцією, n=180	p
Вік, роки (95 % ДІ)	53,80 (52,41-55,20)	50,66 (48,93-52,40)	0,006
Стать (Ч/Ж)	47/104	72/108	0,094
ІМТ, (95 % ДІ)	26,02 (25,44-26,60)	26,21 (25,62-26,80)	0,646
Вік початку БА, роки (95 % ДІ)	33,05 (31,48-34,63)	33,66 (32,19-35,13)	0,578
Тривалість БА, роки (Me, 95 % ДІ)	20,00 (18,00-24,00)	14,00 (12,00-6,63)	0,001
Пневмонія, n (%)	45 (29,80 %)	52 (28,89 %)	0,856
ІХС, n (%)	49 (32,45 %)	42 (23,33 %)	0,065
ЕГ, n (%)	65 (43,05 %)	59 (32,78 %)	0,055

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

Вік пацієнтів з фіксованою обструкцією (табл. 1) був достовірно вище ($p=0,006$) порівняно з іншим субтипом. За такими параметрами як стать, ІМТ та вік початку симптомів БА достовірних відмінностей між досліджуваними групами встановлено не було. В свою чергу, тривалість БА у пацієнтів з фіксованою обструкцією була значно більшою ($p=0,001$) порівняно зі зворотною. Кількість випадків пневмоній, ІХС та ЕГ достовірно не відрізнялась у пацієнтів обох груп.

У пацієнтів з фіксованою обструкцією (табл. 2) кількість загострень та балів анкети АСQ були більше ($p<0,05$) порівняно з іншою групою. Пацієнти зі зворотною обструкцією частіше приймали МЛ та низькі дози ІКС, що достовірно їх відрізняло від субтипу з фіксованою обструкцією. В свою чергу, пацієнти з

фіксованою обструкцією частіше приймали низькі або середні дози ІКС у комбінації з β_2 -агоністами тривалої дії.

Отже, аналіз клінічних даних вказує на тяжчу форму захворювання у пацієнтів з фіксованою обструкцією, що може впливати на стан антиендотоксину імунітету (табл. 3).

Рівні анти-ЕТ-IgA та анти-ЕТ-sIgA (табл. 3) не відрізнялись від контролю. Концентрація анти-ЕТ-IgM була вище ($p<0,001$) контролю в обох субтипах, хоча не відрізнялась між цими групами. Вміст анти-ЕТ-IgG був вище ($p<0,001$) контролю в обох групах, при цьому рівень цього імуноглобуліну був вище ($p<0,05$) у пацієнтів з фіксованою обструкцією порівняно з іншим субтипом. Концентрація sCD14 в індукованому мокротинні була

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

вище ($p < 0,001$) контролю в досліджуваних субтипах, хоча вміст цього медіатора в сироватці був вище ($p < 0,05$) контролю тільки для пацієнтів із зворотною обструкцією.

Таблиця 2

Використання медичних ресурсів та контролюючих препаратів у пацієнтів з фіксованою та зворотною обструкцією

Параметр	БА з фіксованою обструкцією, n=151	БА зі зворотною обструкцією, n=180	p
Використання медичних ресурсів			
Кількість загострень, Me (95 % ДІ)	3 (3-4)	3 (2-3)	0,001
АСQ, бали, Me (95 % ДІ)	3,00 (2,86-3,14)	2,29 (1,86-2,57)	<0,001
Тип контролюючих препаратів			
МЛ (n, %)	4 (2,65 %)	28 (15,56 %)	<0,001
Низькі дози ІКС (n, %)	6 (3,97 %)	57 (31,67 %)	<0,001
Середні дози ІКС (n, %)	8 (5,30 %)	19 (10,56 %)	0,082
Низькі дози ІКС +LABA (n, %)	37 (24,50 %)	17 (9,44 %)	<0,001
Середні дози ІКС +LABA (n, %)	66 (43,71 %)	35 (19,44 %)	<0,001
Високі дози ІКС+LABA (n, %)	9 (5,96 %)	5 (2,78 %)	0,152
Високі дози ІКС+LABA +оральні стероїди (n, %)	21 (13,91 %)	19 (10,56 %)	0,352

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

Таблиця 3

Показники антиендотоксिनного імунітету у пацієнтів з фіксованою/зворотною обструкцією та здорових волонтерів

Показник	Контроль (n=92)	БА з фіксованою обструкцією, n=151	БА зі зворотною обструкцією, n=180	p, т. К-У
Анти-ЕТ-IgA (од.опт.щ.)	0,266 (0,184-0,354)	0,251 (0,191-0,312)	0,256 (0,207-0,324)	0,628
Анти-ЕТ-IgM (од.опт.щ.)	0,322 (0,203-0,400)	0,423 ^a (0,335-0,491)	0,391 ^b (0,313-0,474)	<0,001
Анти-ЕТ-IgG (од.опт.щ.)	0,357 (0,261-0,442)	1,057 ^a (0,817-1,377)	0,965 ^{b, c} (0,671-1,268)	<0,001
Анти-ЕТ-sIgA (од.опт.щ.)	0,178 (0,119-0,217)	0,153 (0,109-0,201)	0,155 (0,119-0,193)	0,0621
sCD14, сироватка (мкг/мл)	4,99 (3,53-6,90)	5,37 (3,43-7,34)	5,78 ^b (4,40-8,33)	0,0172
sCD14, індуковане мокротиння (нг/мл)	6,7 (4,3-9,3)	8,8 ^a (5,8-11,6)	9,7 ^b (6,1-14,6)	<0,001

Примітка: а – достовірність відмінностей контролю та БА з фіксованою обструкцією, $p < 0,05$; б – достовірність відмінностей контролю та БА зі зворотною обструкцією, $p < 0,05$; с – достовірність відмінностей БА з фіксованою та зворотною обструкцією; т. К-У – тест Краскела-Уолліса.

Хронічне запалення у хворих з фіксованою обструкцією може мати системний характер. Для з'ясування відмінностей між фенотипами з фіксованою та зворотною обструкцією було проведено дослідження у 74 пацієнтів дорослого віку, які не курять (>45 років). Всі пацієнти були розділені на 2 групи: в 1-у групу увійшли

ротною обструкцією було проведено дослідження у 74 пацієнтів дорослого віку, які не курять (>45 років). Всі пацієнти були розділені на 2 групи: в 1-у групу увійшли

34 особи, в яких спостерігалась фіксована обструкція (післябронходилатацийний $ОФВ_1 \leq 70\%$, $ОФВ_1/ФЖЄЛ < \text{норми}$); 2-у групу склали 40 пацієнтів з нормальною функцією легень. Результати дослідження показали, що для пацієнтів з фіксованою обструкцією порівняно з контрольною групою було характерне підвищення рівня системного запалення (зростання концентрації видихуваного оксиду азоту), порушення гомеостазу глюкози та центральне ожиріння. Для фіксованої обструкції також були характерними більша тривалість хвороби та часті респіраторні інфекції в дитинстві [10].

Результати нашого дослідження показали, що у пацієнтів з фіксованою обструкцією спостерігається підвищена активація специфічної і адаптивної (висока концентрація анти-ЕТ-IgG) та анергія системної і неспецифічної (нормальне значення сироваткового sCD14) ланки імунної відповіді на ЛПС.

Висновки

У пацієнтів з фіксованою обструкцією спостерігається підвищена активація специфічної і адаптивної та анергія системної і неспецифічної ланки імунної відповіді на ендотоксин.

Література

1. Fixed airways obstruction among patients with severe asthma: findings from the Singapore general hospital – severe asthma phenotype study / [A.C. Yip, G.L. Tan, K.L. Tan et al.] // BMC pulmonary medicine. – 2014. – Vol. 14, N 1. – P. 191.
2. Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: 5-year follow-up / [M. Contoli, S. Baraldo, B. Marku et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 125, N 4. – P. 830-837.
3. Lambrecht B.N. The immunology of asthma / B.N. Lambrecht, H. Hammad // Nature Immunology. – 2015. – Vol. 16, N 1. – P. 45-56.
4. Simpson A. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans / A. Simpson, F.D. Martinez // Clin. Exper. Allergy. – 2010. – Vol. 40, N 2. – P. 209-223.
5. Biswas S.K. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance / S.K. Biswas, E. Lopez-Collazo // Trends in immunology. – 2009. – Vol. 30, N 10. – P. 475-487.
6. O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells / [C.U. Durr, S.F. Zenk, C. Chassin et al.] // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5, N 9. – P. e1000567.

7. Czerkies M. Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: focus on TLR4 activation by lipopolysaccharide / M. Czerkies, K. Kwiatkowska // Advances in Cell Biology. – 2014. – Vol. 4, N 1. – P. 1-23.

8. Патент 70193 А Україна МКІ 7 А61К31/01 Спосіб визначення антитіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій / А.І. Гордієнко, В.О. Білоглазов. – Заявл. 29.12.2003; Опубл. 15.09.2004, Бюл. № 9.

9. Гордієнко А.И. Использование твердофазного иммуноферментного анализа для определения общего и антиэндотоксинового секреторного IgA человека / А.И. Гордієнко // Таврический мед.-биол. вестник. – 2009. – Т. 12, № 3. – P. 82-89.

10. Fixed airflow obstruction among nonsmokers with asthma: a case-comparison study / [P. Sexton, P. Black, L. Wu et al.] // J. Asthma. – 2013. – Vol. 50, N 6. – P. 606-612.

STATE OF SPECIFIC IMMUNITY TO ENDOTOXIN FOR PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA WITH THE FIXED/CIRCULATING OBSTRUCTION

Yu.A. Bisyuk

SUMMARY. *The study included 331 patients with asthma. Depending on the degree of post-bronchodilatation ratio of FEV1/FVC there were identified 151 patients with fixed and 180 with reversible obstruction. Levels of anti-endotoxin antibodies of A, M, G classes and sCD14 were determined by ELISA. The results showed that the level of anti-endotoxin IgG was significantly higher ($P < 0.001$) in both control groups, while the level of this immunoglobulin was significantly higher ($P < 0.05$) in patients with fixed obstruction compared to reversible one. A concentration of sCD14 in induced sputum was significantly higher ($P < 0.001$) compare to control in both study groups, although the level of this mediator in serum was significantly higher ($P < 0.05$) only in patients with reversible obstruction.*

Key words: *bronchial asthma, endotoxin, immunity.*

Отримано 25.11.2015 р.