

УДК 616.248-07-478.74+412.5

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОТИПОВ АСТМЫ С ПОМОЩЬЮ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИХ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭНДОТОКСИН-ЗАВИСИМОГО ВОСПАЛЕНИЯ

*БИСЮК Ю.А., КУРЧЕНКО А.И., ДУБОВОЙ А.И., КОНДРАТЮК В.Е.*

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца

Сегодня насчитывается около 300 миллионов больных бронхиальной астмой (БА), и к 2025 г. этот показатель может составить 400 миллионов [GINA, 2014]. По данным кросс-секционного исследования [1] в более чем 70 странах, распространенность астмы, которая была диагностирована врачом, составляет 4,3%, с наибольшей частотой в Австралии – 21%; в Украине этот показатель составляет 2,77%.

В последние годы астму рассматривают не как единое заболевание, а как большое количество клинических, иммунологических и генетических вариантов проявления воспалительных заболеваний дыхательных путей, исторически объединённых определением «бронхиальная астма» [2]. Эти варианты в литературе обозначаются как фенотипы, эндотипы или субтипы бронхиальной астмы. Фенотипы в основном обозначают клинические варианты бронхиальной астмы, а эндотипы отображают патофизиологические особенности различных фенотипов [3].

Одной из наиболее дискутируемой теорий, объясняющих увеличение аллергических заболеваний, является «гигиеническая»; она была впервые описана David P. Strachan в 1989 г. [4] По наблюдениям данного автора, количество больных с сенной лихорадкой и контактным дерматитом было значительно меньше у детей в больших семьях. Эти явления были объяснены повышенным контактом детей с микроорганизмами окружающей среды, что имеет важное значение в формировании иммунного ответа.

Последующие исследования в данной области объяснили «гигиеническую» теорию чрезмерным влиянием инфекционных агентов на модификацию иммунного ответа посредством активации Т-хелперов 1 типа и угнетением Т-хелперов 2. Другими словами, «стерильные» условия созревания иммунной системы у детей приводят к выживанию фетальных Т-хелперов 2 типа, которые вызывают повышение синтеза IgE [5]. Исследования в данной области проводятся на протяжении более чем 25 лет и значительно расширили наше понимание о патогенезе астмы. Модификация иммунного ответа с вовлечением Т-хелперов 1, 2, 9, 17, 22 типов и регуляторных Т-лимфоцитов может происхо-

дить под воздействием эндотоксина грамотрицательных бактерий [6].

Эндотоксин или липополисахарид (ЛПС) при попадании в организм связывается со специфическим белком LBP (Lipopolysaccharide binding protein) с последующим присоединением к рецепторам CD14 и TLR-4 на поверхности моноцитов, макрофагов и гранулоцитов. Активация данных рецепторов приводит к синтезу провоспалительных цитокинов, которые в основном усиливают нейтрофильное, а в некоторых случаях и эозинофильное воспаления в бронхах [7].

В процессе созревания иммунной системы эндотоксин, очевидно, обладает протективными свойствами по отношению к развитию БА, но чрезмерное поступление его в организм как ингаляционно, так и путём транслокации в кишечнике может вызвать обратный эффект и привести к ухудшению течения данного заболевания [6]. Было установлено, что при лёгкой интермиттирующей, атопической БА отмечается дисбаланс местного антиэндотоксинового иммунитета, что проявляется снижением секреторного анти-ЭТ-sIgA в 1,7-1,8 раза ниже уровня нормы ( $p < 0,01$ ) и существенным повышением концентрации LBP в мокроте от 5,1 до 5,6 раз ( $p < 0,01$ ). СИТ аллергенами приводит к повышению уровня анти-ЭТ-sIgA в мокроте в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ) [8].

Таким образом, дуальный эффект эндотоксина, возможно, связан с полиморфизмом генов, кодирующих рецепторы к эндотоксину. Ген, кодирующий CD14 рецептор, локализован в длинном плече 5 хромосомы в близости к локусу 5q31-q33, в котором находятся гены, ответственные за синтез IgE [9]. Наиболее часто изучаемым полиморфизмом гена рецептора CD14 является 159 позиция промоторного участка с замещением цитозина (C-cytosine) на тимин (T-Thymine) и присутствием в популяции гомозигот по цитозину и тимину (CC, TT) и гетерозиготы цитозин-тимин (CT). Присутствие C аллеля в 159 позиции промоторного участка гена CD14 рецептора коррелирует с увеличением уровня IgE, при этом TT генотип не связан с атопией и сопровождается возрастанием концентрации растворимой формы CD14 рецептора (sCD14). [10]

Ген TLR4 розположен в хромосоме 9q32-33. Поліморфний участок Asp299Gly (rs4986790) гена TLR4 представляє собою однонуклеотидну заміну аденина (A) на гуанін (G) в положенні +896 екзона 3, приводящу до амінокислотної заміни аспарагінової кислоти на гліцин в 299 положенні поліпептидної ланки рецептора [11]. У жителів Полтавської області частота алелю G у дітей, страждаючих атопічної БА, склала 7,54 %, алелю A – 92,45 %, що достовірно відрізняється (ОШ 1,059, ДІ 0,9989–1,122,  $p = 0,049$ ) від контролю (G – 2,11 %, A – 97,89 %), крім того наявність мутантної алелю G більш ніж в 4 рази збільшувало ймовірність неконтрольованого перебігу атопічної бронхіальної астми (ОШ = 4,13; ДІ 95% 1,05–1,44;  $p = 0,02$ ) [12].

Аналіз метааналізу [13], а також результати наших досліджень, показали, що поліморфізм рецептора CD14 (C159T) не пов'язаний з ризиком розвитку бронхіальної астми. Однак, при стратифікації пацієнтів з астмою на атопічний і неатопічний фенотип було показано, що генотип TT на 33% і СТ на 20% менше пов'язаний з розвитком атопічної астми порівняно з СС генотипом. По даним метааналізу оснований на 9 дослідженнях і порівнянні 1838 випадків астми і 1765 контролю не було виявлено достовірної зв'язки між Asp299Gly поліморфізмом і астмою [14].

Слід зауважити, що для проведення метааналізів використовуються дані різних популяцій, що значно збільшує гетерогенність бронхіальної астми, і, відповідно, результати даних аналізів не можуть екстраполюватися в популяції конкретного регіону.

Очевидно, що для в'яснення ролі антиендотоксинного імунітету в асоціації з поліморфізмом генів рецепторів CD14/TLR-4 в розвитку бронхіальної астми, просте поділення пацієнтів на атопічний або неатопічний фенотип або др., не враховує зв'язок великої кількості клінічних, інструментальних і імуногенетических параметрів в контексті вивченої проблеми.

В останні роки, при розв'язанні цієї задачі, використовується кластерний аналіз [15], за допомогою якого можна виділити кластери, які є фенотипами захворювання, враховуючи як клінічні, так і патофізіологічні параметри.

В популяції АР Крим досліджень по ідентифікації фенотипів бронхіальної астми за допомогою кластерного аналізу клінічних і імуногенетических параметрів ендотоксинного запалення не проводились.

**Ціль дослідження** – провести кластерний аналіз клінічних і імуногенетических

параметрів ендотоксин-залежного запалення при бронхіальній астмі в популяції АР Крим.

#### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

В дослідження було включено 331 хворий БА. Діагноз і лікування бронхіальної астми проводились в відповідності з критеріями діючого наказу МЗ України № 128 від 19.03.2007 г [16]. Дослідження проводились на базі ГУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського» і ГУ «Клінічна лікарня станції Сімферополь» ГП «Придніпровська залізниця» в 2012-2014 гг.

Спирометричні дослідження проводились в відповідності з критеріями Американського торакального товариства і Європейського респіраторного товариства (ATS/ERS 2005) 2005 року [17] з використанням пристрою Jaeger FlowScreen®V2.2.2 (серійний номер 38210212). Всім пацієнтам була проведена проба на оборотність з використанням 4 інгаляцій сальбутамолу (400 мкг). Постбронходилататорна спірометрія проводилась через 15 хвилин від початку інгаляції сальбутамолу. Для оцінки бронхіальної обструкції були використані наступні спірометричні параметри: ОФВ1 (до і після інгаляції сальбутамолу), ФЖЕЛ (до і після інгаляції сальбутамолу), ОФВ1/ФЖЕЛ (до і після інгаляції сальбутамолу).

Рівень контролю астми оцінювали за допомогою опросника по контролю симптомів бронхіальної астми (АСQ). На використання опросника було отримано дозвілля Елізабет Джуніпер (Elizabeth Juniper). Верхньої границею контролюваної астми вважали середній бал – 0,75, що згідно рекомендаціям Elizabeth Juniper означає, що 85% ймовірності того, що астма повністю контролюється. Середній бал 1,50 – 88% ймовірності, що БА частково контролюється або неконтрольована.

Критеріями для атопічного фенотипу були позитивний алергоанамнез і кожні алерготести з пильцевими або побутовими алергенами з розміром папули більш ніж 3 мм. Відсутність даних критеріїв підтвердило неатопічний варіант БА. Проведення кожних «прик» тестів проводилось з використанням мікст алергенів №1 (беріза, ольха клейка, лещина звичайна, дуб), №2 (гречица збірна, тонконога лугова, пажитниця багаторічна, костриця лугова, лисохвіст лугова), №3 (костір прямий, пирей повзучий, рожь посівна, тимофеевка лугова), №4 (полінь, амброзія, марь, подсолнух), №5 (домашня пиль обогачена кліщами *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farina*, *Acarus*

siro и пером подушки) производства «Иммуно-лог», г. Винница.

Для анализа полиморфизма гена CD14 (C159T) был использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. Выделение ДНК осуществлялось из цельной крови пациентов с БА и здоровых добровольцев с помощью набора «ДНК-экспресс кровь» («Литех», РФ) согласно инструкции производителя. Постановка аллель-специфической ПЦР осуществлялась с помощью наборов «Мутация антигена дифференцировки моноцитов C-159T» («Литех», РФ) согласно инструкции производителя. Идентификация продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза с помощью готового набора производства «Литех», РФ.

Уровни антиэндотоксиновых антител классов А, М, G (соответственно анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG) в сыворотке и секреторного антиэндотоксинового иммуноглобулина А (анти-ЭТ-sIgA) в индуцированной мокроте определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа по протоколам, разработанным в лаборатории клинической иммунологии ЦНИЛ ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского» [18-19]. Уровни анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG выражали в условных единицах оптической плотности конечного продукта ферментативной реакции.

Уровень sCD14 в сыворотке и индуцированной мокроте определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «Hbt Human sCD14 ELISA Kit, Product Number: НК320» производства «Nycult biotechnology» (Голландия). Оптическую плотность определяли на анализаторе «StatFax 2100» на длине волны 450 нм. Содержание sCD14 в сыворотке выражали в мкг/мл, в индуцированной мокроте – в нг/мл.

Воспалительные фенотипы определяли с помощью подсчёта процентного соотношения клеток (макрофаги, эозинофилы, нейтрофилы, эпителиоциты) в индуцированной мокроте. Проводился подсчёт 500 клеток с помощью иммерсионного объектива при световой микроскопии (об.х100, ок.10). Адекватными считались мазки, где количество интактных неразрушенных клеток было более 50% и количество клеток плоского эпителия менее 20%. Критерии воспалительных фенотипов: нейтрофильный – количество нейтрофилов более 76 %, эозинофилов менее 3 %; эозинофильный – количество нейтрофилов менее 76 %, эозинофилов более 3 %; малогранулоцитарный – количество нейтрофилов менее 76 %, эозинофилов менее 3 % [20].

Группу контроля для генетического исследования составили 285, а для оценки анти-эндотоксинового иммунитета 92 практически здоровых лиц АР Крым. Все волонтеры исследовались на предмет аллергической патологии посредством изучения анамнеза и проведения кожных алерготестов.

Общий объем данных был представлен 88 переменными, что требовало редукиции их количества для проведения кластерного анализа. Переменные, которые были клинически избыточными (множественные данные спирометрии, сезонность аллергии и др.) были редуцированы путём выбора наиболее релевантных и репрезентативных физиологических параметров. Бинарные переменные и категориальные были трансформированы в индикативные переменные с двоичным кодом. Таким образом, для проведения кластерного анализа были использованы 42 переменные – клинико-инструментальные и анамнестические параметры (пол, возраст, рост, вес, индекс массы тела, продолжительность и возраст начала заболевания, количество обострений за последний год, наличие пневмоний, статус курильщика и количество пачка/лет, атопический статус, использование ингаляционных кортикостероидов или модификаторов лейкотриенов или комбинации ИКС+БАДД или оральных стероидов), данные спирометрии (Pre FVC %, Pre FEV1 %, Pre FEV1/FVC, Post FVC %, Post FEV1 %, Post FEV1/FVC, Δ FEV1 L, Δ FEV1 %), показатели антиэндотоксинового иммунитета (анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM, анти-ЭТ-IgG, анти-ЭТ-sIgA и sCD14 в сыворотке и индуцированной мокроте), генотипы (CC-C159T, CT-C159T, TT-C159T, AA-Asp299Gly, AG-Asp299Gly, GG-Asp299Gly), цитологический профиль индуцированной мокроты (процентное содержание нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов и др. клеток).

Для проведения кластерного анализа использовалась программа Minitab16. Иерархический кластерный метод Уорда с минимальной вариацией был проведён с использованием агрегативного подхода и связи Уорда. На каждом этапе кластеризации, пациенты объединялись в большие кластеры, чтобы минимизировать внутри-кластерную сумму квадратов или максимизировать между-кластерную сумму квадратов. Для определения различий между кластерами были использованы ANOVA, Краскала-Уоллеса и хи-квадрат тесты для параметрических, непараметрических и категориальных переменных соответственно. При анализе проверки распределения на нормальность использовали тест Колмогорова-Смирнова. Количественные переменные представлены в виде средних значений с 95 % доверительным интервалом для параметрических методов и медианы

с 95 % доверительным интервалом для непараметрических. Для установления распределения генотипов соответственно закону Харди-Вайнберга использовали точный тест Фишера и 2. Для определения разницы в частоте генотипов и аллелей контроля и больных с бронхиальной астмой была использована логистическая регрессия с помощью on-line калькулятора (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

В нашей работе риск по аллелю G подразумевал доминантную модель G, когда частота генотипа AG объединяется с генотипом GG и сравнивается с генотипом AA. Подсчёт частоты аллеля A проводили по следующей формуле: частота аллеля A =  $n_{AA} / 2 + n_{AG}$ , где  $n_{AA}$  – количество исследуемых с генотипом AA,  $n_{AG}$  – количество исследуемых с генотипом AG; для аллеля G использовалась аналогичная формула: частота аллеля G =  $n_{GG} / 2 + n_{AG}$ , где  $n_{GG}$  – количество исследуемых с генотипом GG,  $n_{AG}$  – количество исследуемых с генотипом AG. Риск по аллелю T подразумевал доминантную модель T, когда частота генотипа СТ объединяется с генотипом ТТ и сравнивается с генотипом СС. Для модели с

риском по аллелю С генотип СС объединяется с генотипом СТ и сравнивается с генотипом ТТ. Подсчёт частоты аллеля С проводили по следующей формуле: частота аллеля С =  $n_{CC} / 2 + n_{CT}$ , где  $n_{CC}$  – количество исследуемых с генотипом СС,  $n_{CT}$  – количество исследуемых с генотипом СТ; для аллеля Т использовалась аналогичная формула: частота аллеля Т =  $n_{TT} / 2 + n_{CT}$ , где  $n_{TT}$  – количество исследуемых с генотипом СС,  $n_{CT}$  – количество исследуемых с генотипом СТ.

Для всех пациентов и волонтеров получено добровольное письменное согласие на участие в научном исследовании, на которое есть разрешение комиссии по биоэтике ГУ «КГМУ имени С.И. Георгиевского».

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведённого статистического анализа удалось идентифицировать 3 кластера, которые мы обозначили как кластеры А, В и С. Основные клинические и спирометрические характеристики кластеров, а также данные по использованию медицинских ресурсов представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

### Клинические и спирометрические параметры кластеров

Параметры	Кластер А, n=113	Кластер В, n=184	Кластер С, n=34	P
Возраст (95 % ДИ)	49,82# (47,53-52,12)	52,76 (51,42-54,10)	56,06# (52,64-59,48)	0,005
Пол (М/Ж)	56/57	57/127	6/28	0,003
ИМТ (95 % ДИ)	25,97 (25,20-26,74)	26,23 (25,69-26,78)	26,04 (24,96-27,13)	0,838
Возраст начала БА (95 % ДИ)	33,39# (31,58-35,20)	31,71#& (30,37-33,05)	42,41#& (39,13-45,67)	0,001
Продолжительность БА, (95 % ДИ)	16,43* (14,39-18,47)	21,05*,& (19,33-22,77)	13,65& (10,05-17,25)	0,001
Атопия (Да/Нет)	97/16	177/7	1/33	0,001
Pre FEV1% (95 % ДИ)	86,09*,# (84,34-87,87)	62,30* (60,19-64,42)	62,42# (59,05-65,80)	0,001
Pre FVC % (95 % ДИ)	93,62*,# (91,85-95,39)	77,86* (75,89-79,84)	74,87# (71,55-78,19)	0,001
Pre FEV1/FVC% (95 % ДИ)	72,56*,# (71,23-73,90)	62,43* (61,26-63,59)	64,97# (62,49-67,44)	0,001
Post FEV1% (95 % ДИ)	96,51*,# (94,57-98,45)	71,82* (69,60-74,03)	73,26# (68,89-77,62)	0,001
Post FVC % (95 % ДИ)	97,83*,# (96,12-99,55)	83,76* (81,76-85,77)	81,74# (77,27-86,22)	0,001
Post FEV1/FVC% (95 % ДИ)	77,78*,# (76,45-79,12)	66,99* (65,82-68,17)	70,00±7,92# (67,22-72,75)	0,001
ΔL FEV1 (95 % ДИ)	0,34* (0,30-0,38)	0,29* (0,27-0,31)	0,31 (0,25-0,37)	0,033
ΔL FEV1 % (95 % ДИ)	12,37*,# (11,05-13,40)	16,03* (15,01-17,06)	17,34# (14,36-20,32)	0,001

Примечание: \* – достоверность отличий группы А от В, # – достоверность отличий группы А от С, & – достоверность отличий группы В от С.

Таблиця 2

**Использование медицинских ресурсов и контролирующих препаратов**

Параметры	Кластер А, n=113	Кластер В, n=184	Кластер С, n=34	Р
<b>Использование медицинских ресурсов</b>				
Кол-во обострений Ме (95 % ДИ)	2*,# (2-3)	3*,& (3-3)	5#& (5-6)	0,001
АСQ Ме (95 % ДИ)	1,86*,# (1,71-2,14)	2,86*,& (2,71-3,00)	3,43#& (3,41-3,62)	0,001
<b>Типы контролирующих препаратов</b>				
МЛ (n, %)	30 (26%)*,#	1 (0,5%)*,&	0#&	<0,001
Низкие дозы ИКС (n, %)	55 (49%)*,#	8 (4,5%)*,&	0#&	<0,001
Средние дозы ИКС (n, %)	25 (22%)*,#	3 (2%)*,&	0#&	<0,001
Низкие дозы ИКС+LABA (n, %)	2 (2%)*,#	52 (28%)*,&	0#&	<0,001
Средние дозы ИКС+LABA (n, %)	1 (1%)*,#	100 (54%)*,&	0#&	<0,001
Высокие дозы ИКС+LABA (n, %)	0*,#	14 (8%)*,&	0#&	0,003
Высокие дозы ИКС+LABA +Оральные стероиды (n, %)	0*,#	6 (3%)*,&	34 (100%)#&	

Примечание: \* – достоверность отличий группы А от В, # – достоверность отличий группы А от С, & – достоверность отличий группы В от С.

113 пациентов с БА составили кластер А (таблица 1, 2). Для этого кластера было практически одинаковым количество женщин и мужчин. У пациентов данной группы преобладала атопическая астма с нормальными спирометрическими показателями. Монотерапия модификаторами лейкотриенов и низкими/средними дозами ИКС в большинстве случаев составляла базовое лечение данного кластера. По количеству обострений за последний год и среднему значению баллов АСQ, у пациентов данного кластера зафиксировано неконтролируемое течение астмы.

Идентифицированный кластер В (таблица 1, 2) оказался самым большим в исследуемой популяции и составил 184 пациента, 127 (69%) из которых составили женщины. Для данного кластера характерно самая большая продолжительность заболевания и атопический статус астмы. По данным спирометрии у пациентов наблюдается снижение ОФV1 менее 80 % от должного и соотношения ОФV1/ФЖЕЛ менее 70%, что соответствует параметрам фиксированной обструкции. Более 80% больных принимали низкие или средние дозы ИКС в комбинации с 2-агонистами длительного действия (БАДД).

Самым немногочисленным оказался кластер С. В данную группу было определено только 34 пациента, в основном женского пола (80%). Характерным для данного кластера является более пожилой возраст и позднее начало (после 40 лет) заболевания, неатопический статус, тяжёлое неконтролируемое течение, частые обострения и фиксированная обструкция. Все пациенты кластера С получали высокие дозы ИКС+БАДД в комбинации с оральными стероидами.

Анализ клинических и инструментальных параметров в идентифицированных кластерах выявил совершенно новые фенотипы БА, которые учитывают несколько основных параметров, таких как тяжесть и начало заболевания, пол пациента, атопический статус, спирометрию, а также принимаемое лечение.

Выявленные клинико-инструментальные отличия в исследуемых группах, возможно, связаны с полиморфизмом генов, которые кодируют рецепторы к эндотоксину.

Различия в частоте генотипов и аллелей CD14 (C159T) рецептора здоровых волонтеров и больных БА в популяции АР Крым представлены в таблице 3.

Таблиця 3

**Частота распределение генотипов CD14 (C159T) рецептора у пациентов с различными кластерами и здоровых волонтеров (n, %)**

Генотип	Контроль	Кластер А	Кластер В	Кластер С
Распределение генотипов				
CC	97 (34%)	32 (28%)	55 (30%)	18 (53%)
CT	146 (51%)	64 (57%)	93 (50%)	12 (35%)
TT	42 (15%)	17 (15%)	36 (20%)	4 (12%)
		P=0,529	P=0,338	P=0,093
Риск по аллелю Т ([CC]<->[CT+TT])				
CC	97 (34%)	32 (28%)	55 (30%)	18 (53%)
CT+TT	188 (66%)	81 (72%)	129 (70%)	16 (47%)
		ОШ= 1,306, ДИ=[0,811-2,104] p=0,272	ОШ= 1,210, ДИ=[0,812-1,805] p=0,349	ОШ= 0,459, ДИ=[0,224-0,939] p=0,029
Риск по аллелю С ([CC+CT]<->[TT])				
CC+CT	243 (85%)	96 (85%)	148 (80%)	30 (88%)
TT	42 (15%)	17 (15%)	36 (20%)	4 (12%)
		ОШ= 0,976, ДИ=[0,530-1,798] p=0,937	ОШ= 0,711, ДИ=[0,435-1,160] p=0,170	ОШ=1,296, ДИ=[0,434-3,869] p=0,641
Разница частот аллелей [C]<->[T] и [T]<->[C]				
С	340 (60%)	128 (57%)	203 (55%)	48 (71%)
Т	230 (40%)	98 (43%)	165 (45%)	20 (29%)
		ОШ= 1,132, ДИ=[0,829-1,546] ОШ= 0,884, ДИ=[0,647-1,207], p=0,436	ОШ=1,202, ДИ=[0,922-1,566] ОШ=0,832, ДИ=[0,639-1,085], p=0,174	ОШ= 0,616, ДИ=[0,356-1,065] ОШ= 1,624, ДИ=[0,939-2,808], p=0,081

Примечание: ОШ – отношение шансов, ДИ – 95% доверительный интервал.

Частота распределения генотипов CC, CT и TT у пациентов с кластерами А, С и В (таблица 3) достоверно не отличалась (P>0,05) от контроля. Анализ генотипов в зависимости от риска по аллелю С и разницы частот обеих аллелей также не выявил достоверных отличий (P>0,05). Од-

нако, для пациентов с кластером С, риск по аллелю Т оказался достоверно снижен (ОШ=0,45, p=0,029) по сравнению с контролем.

Результаты распределения частоты генотипов Asp299Gly TLR-4 у больных БА в сравнении с контролем представлены в таблице 4.

Таблиця 4

**Частота распределение генотипов Asp299Gly TLR-4 у пациентов с различными кластерами и здоровых волонтеров**

Генотип	Контроль	Кластер А	Кластер В	Кластер С
Распределение генотипов				
AA	242 (85 %)	90 (80%)	140 (76%)	31 (91%)
AG	40 (14 %)	23 (20%)	40 (22%)	3 (9%)
GG	3 (1 %)	0	4 (2%)	0
		P=0,174	P= 0,052	P=0,574
Риск по аллелю G ([AA]<->[AG+GG])				
AA	242 (85 %)	90 (80%)	140 (76%)	31 (91%)
AG+GG	43 (15 %)	23 (20%)	44 (24%)	3 (9%)
		ОШ= 1,438, ДИ=[0,821-2,521] p=0,203	ОШ= 1,769, ДИ=[1,107-2,827] p=0,016	ОШ=0,545, ДИ=[0,159-1,861] p=0,326
Разница частот аллелей [A]<->[G] и [G]<->[A]				

Продолжение табл. 4

Генотип	Контроль	Кластер А	Кластер В	Кластер С
А	524 (92 %)	203 (90%)	320 (87%)	65 (96%)
G	46 (8 %)	23 (10%)	48 (13%)	3 (4%)
		ОШ=1,291, ДИ=[0,763-2,184] ОШ=0,775, ДИ=[0,458-1,311], p=0,341	ОШ=1,709, ДИ=[1,114-2,621] ОШ= 0,585, ДИ=[0,382-0,898], p=0,013	ОШ=0,526, ДИ=[0,159-1,739] ОШ= 1,902, ДИ=[0,575-6,290], p= 0,284

Примечание: ОШ – отношение шансов, ДИ – 95% доверительный интервал.

У пациентов с кластером В (таблица 4) частота генотипов АА, АG и GГ отличалась от контроля на уровне достоверности 0,052. Частота встречаемости генотипов АG+GГ (24%) и аллеля G (13%) достоверно выше (p<0,05) контроля (АG+GГ – 15 %; G – 8 %) для кластера В. Достоверных отличий (P>0,05) для кластера А и С не

было выявлено.

Лоцированные отличия в полиморфизме изучаемых генов могут влиять на состояние иммунитета к эндотоксину. Параметры антиэндотоксिनного иммунитета представлены в таблице 5.

Таблица 5

Показатели антиэндотоксिनного иммунитета у пациентов с различными кластерами

Показатели	Контроль (n=92)	Кластер А, n=113	Кластер В, n=184	Кластер С, n=34	P, Т. К-У
Анти-ЭТ-IgA (ед. опт. пл.)	0,266 (0,184-0,354)	0,269 (0,197-0,337)	0,248 (0,198-0,311)	0,249 (0,202-0,316)	0,588
Анти-ЭТ-IgM (ед. опт. пл.)	0,322 (0,203-0,400)	0,397Δ (0,317-0,506)	0,415Δ (0,329-0,474)	0,342Δ (0,272-0,497)	<0,001
Анти-ЭТ-IgG (ед. опт. пл.)	0,357 (0,261-0,442)	1,038Δ (0,704-1,302)	1,034Δ,& (0,808-1,311)	0,899Δ,& (0,627-1,206)	<0,001
Анти-ЭТ-sIgA (ед. опт. пл.)	0,178 (0,119-0,217)	0,153Δ (0,114-0,196)	0,158 (0,119-0,199)	0,140Δ (0,102-0,165)	0,036
sCD14, сыворотка (мкг/мл)	4,99 (3,53-6,90)	5,22 # (4,17-7,29)	5,48 & (3,78-7,37)	7,36Δ, #, & (5,82-8,97)	0,006
sCD14, индуцированная мокрота (нг/мл)	6,7 (4,3-9,3)	8,4Δ, # (5,5-11,7)	8,6Δ,& (5,7-11,5)	19,6Δ, #, & (14,5-23,9)	<0,001

Примечание: Δ – достоверность отличий контроля и групп А, В, С, p<0,05; \* – достоверность отличий группы А от В, # – достоверность отличий группы А от С, & – достоверность отличий группы В от С; Т. К-У – тест Краскела-Уоллиса.

Уровни антиэндотоксिनных антител класса А (таблица 5) у пациентов с кластерами А, В и С достоверно не отличались (p>0,05) от значений контрольной группы. Содержание Анти-ЭТ-IgM было достоверно выше (p<0,05) контроля для больных всех кластеров, при этом достоверных отличий (p>0,05) между кластерами не было выявлено. Концентрация Анти-ЭТ-IgG у пациентов всех кластеров была достоверно выше (p<0,05) контроля, однако, в кластере С уровень этого иммуноглобулина был достоверно ниже (p<0,05) по сравнению с кластерами А и В. Содержание секреторного Анти-ЭТ-sIgA у больных с кластером А и С было достоверно ниже (p<0,05) контроля, а для кластера В достоверно не отличалось (p>0,05). Уровень сывороточного sCD14 был достоверно выше контроля (p<0,05)

только для пациентов принадлежащих кластеру С. В свою очередь, содержание этого медиатора в индуцированной мокроте достоверно отличалось (p<0,05) от контроля у всех кластерах, но для кластера С зафиксированы самые высокие значения, которые достоверно выше (p<0,05) значений кластера А и В.

В результате подсчёта клеток в индуцированной мокроте было выявлено: в кластере А – 14 (12%) пациентов с нейтрофильной, 52 (46%) с эозинофильной и 47 (42%) с малогранулоцитарной; кластере В – 16 (9%) пациентов с нейтрофильной, 88 (48%) с эозинофильной и 80 (43%) с малогранулоцитарной; кластере С – 30 (88%) пациентов с нейтрофильной, 3 (9%) с эозинофильной и 1 (3%) с малогранулоцитарной астмой. Частота воспалительных эндотипов в

кластере А достоверно не отличалась ( $p=0,59$ ) от кластера В. Но в кластере С превалирование нейтрофильной астмы достоверно отличалось ( $p<0,05$ ) по сравнению с кластером А и В.

По данными исследований китайских учёных [21] было установлено, что у пациентов с астмой и ТТ (С159Т) генотипом наблюдается возрастание сывороточного уровня sCD14, при этом отсутствует корреляция данного показателя с уровнем общего IgE и ОФВ1. Аналогичные результаты были получены в популяции Польши [22] и Германии [23].

Очень интересные данные были получены в одном когортном исследовании [24], по результатам которого было обнаружено, что дети, которые получают грудное молоко с высокой концентрацией sCD14, имеют низкий риск развития астмы, хотя в другом исследовании было показано, что возраст или пол не влияют на продукцию sCD14 в семьях с астмой [25].

Эффекты эндотоксина имеют доза-зависимый характер. В исследовании *in vitro*, было показано, что у детей с астмой и гомозиготным генотипом ТТ высокая доза эндотоксина, используемая для стимуляции периферических мононуклеаров, приводит к увеличению концентрации IgE и усилению цитокинового профиля Т-хелперов 2 типа [26]. Стимуляция аллергенами периферических мононуклеаров в бронхоальвеолярном смыве также приводит к возрастанию sCD14 с наибольшей концентрацией через 42 часа, аналогичные результаты были получены при использовании в качестве стимулятора лейкотриен D4 [27].

Исследователи из Чехии [28], Кореи [29], Китая [30], Австралии [31] и Германии [32] установили, что полиморфизм С159Т не связан с риском развитием БА, а популяционные исследования в Бразилии [33], Тунисе [34], Пакистане [35] и Польше [36] показали зависимость данного полиморфизма и бронхиальной астмой.

Результаты нашего исследования согласуются с данными исследователей Польши [36]. По результатам этого исследования риск развития атопической БА был достоверно выше у лиц с генотипом АG по сравнению с АА (ОШ = 2,33; 95% ДИ = 1,033–5,261;  $p < 0,05$ ). Повышенный риск развития атопической БА у лиц с гетерозиготным генотипом АG (Asp299Gly) связывают с ответом иммунной системы на эндотоксин [37]. Так у пациентов с астмой, уровень эндотоксин-индуцированной секреции ИЛ-12 значительно ниже при АG генотипе, чем АА, что создаёт условия для активации Т-хелперов 2 типа и переключения иммунного ответа на синтез IgE.

Таким образом, обобщая результаты нашего исследования, можно заключить, что использование кластерного анализа позволило нам выявить новые фенотипы БА в популяции АР Крым

с учётом как клинических так иммуногенетических критериев. Первое, что вытекает с проведённого анализа это то, что практически у всех пациентов неконтролируемое течение БА. Второе, весь пул исследуемых можно разделить по уровню ОФВ1, для кластера А это больше 80 % от должного, а для кластера В и С менее 80%. Третье, для кластера С характерно неатопический статус и нейтрофильное воспаление в бронхах с дисбалансом антиэндотоксинового иммунитета и сниженным риском развития данного фенотипа заболевания при СТ+ТТ генотипе, а для кластера В – атопический статус с повышенным риском развития астмы при наличии мутантного аллеля G.

Выявленные фенотипы могут использоваться как для прогнозирования риска развития и тяжести течения БА, так и для возможного дифференцированного назначения базовой противовоспалительной терапии.

## **ВЫВОДЫ**

Проведение кластерного анализа с использованием клинико-инструментальных критериев в комбинации с иммуногенетическими параметрами эндотоксин-зависимого воспаления в популяции АР Крым позволило нам выявить 3 фенотипы бронхиальной астмы: 1 фенотип (кластер А) – неконтролируемая, преимущественно атопическая с обратимой обструкцией; 2 фенотип (кластер В) – неконтролируемая, преимущественно атопическая с фиксированной обструкцией и повышенным риском развития астмы (ОШ = 1,709,  $p=0,013$ ) при наличии мутантного аллеля G (Asp299Gly) гена TLR-4; 3 фенотип (кластер С) – неконтролируемая, преимущественно неатопическая, нейтрофильная с фиксированной обструкцией в ассоциации с дисбалансом антиэндотоксинового иммунитета и сниженным риском (ОШ = 0,459,  $p=0,029$ ) развития при СТ+ТТ (С159Т-CD14) генотипе.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey / T. To, S. Stanojevic, G. Moores [et al.] // *BMC Public Health*. – 2012. – Vol. 12, No. 1. – P. 204.
2. Wenzel S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches / S. E. Wenzel // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18, No. 5. – P. 716-725.
3. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome / J. Lötvall, C. A. Akdis, L. B. Bacharier [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2011. – Vol. 127, No. 2. – P. 355-360.

4. Strachan D. P. Hay fever, hygiene, and household size. / D. P. Strachan // *BMJ: British Medical Journal*. – 1989. – Vol. 299, No. 6710. – P. 1259-1960.
5. Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? / B. Leynaert, C. Neukirch, D. Jarvis [et al.] // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2001. – Vol. 164, No. 10. – P. 1829-1834.
6. Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the Th2 hypothesis / Y.-M. Kim, Y.-S. Kim, S. G. Jeon, Y.-K. Kim // *Allergy, Asthma & Immunology Research*. – 2013. – Vol. 5, No. 4. – P. 189-196.
7. Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. / J. C. Celedón, D. K. Milton, C. D. Ramsey [et al.] // *Journal of allergy and clinical immunology*. – 2007. – Vol. 120, No. 1. – P. 144-149.
8. Белоглазов В. А. Местный и системный антиэндотоксиновый иммунитет при специфической иммунотерапии бронхиальной астмы / В. А. Белоглазов, Л. К. Знаменская // *Астма та алергія*. – №. 1-2. – С. 6-10.
9. CD14 is an essential mediator of LPS-induced airway disease. / D. M. Brass, J. W. Hollingsworth, E. McElvania-Tekippe [et al.] // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2007. – Vol. 293, No. 1. – P. 77-83.
10. A polymorphism\* in the 5 flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. / M. Baldini, I. Carla Lohman, M. Halonen [et al.] // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 1999. – Vol. 20, No. 5. – P. 976-983.
11. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. / I.A. Yang, S.J. Barton, S. Rorke [et al.] // *Genes Immun*. – 2004. – Vol. 5, N.1. – P. 41–45.
12. Крючко Т.А. Роль генетических факторов в развитии тяжелой атопической бронхиальной астмы у детей. / Т.А. Крючко, Ю.А. Вовк, О.Я. Ткаченко // *Журнал «Здоровье Ребенка»*. – 2012. – Том 5, №40. – С. 58–62.
13. The- 159C/T polymorphism in the CD14 gene and the risk of asthma: a meta-analysis / Y. Zhang, C. Tian, J. Zhang [et al.] // *Immunogenetics*. – 2011. – Vol. 63, No. 1. – P. 23-32.
14. Chen S. Association between the TLR4 +896A>G (Asp299Gly) Polymorphism and Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. / S. Chen // *J Asthma*. – 2012. – Vol. 49, N. 10. – P. 999–1003.
15. 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.
16. Наказ МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія». – К.: 2007. — 146 с.
17. Standardisation of spirometry / M. R. Miller, J. Hankinson, V. Brusasco [et al.] // *Eur respir J*. – 2005. – Vol. 26, No. 2. – P. 319–38.
18. Гордиенко А. И. Использование твердофазного иммуноферментного анализа для определения общего и антиэндотоксинового секреторного IgA человека / А. И. Гордиенко // *Таврический медико-биологический вестник*. – 2009. – Том. 12, № 3. – С. 82-89.
19. 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.
20. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation / F. N. Schleich, M. Manise, J. Sele et al. // *BMC pulmonary medicine*. – 2013. – Vol. 13, N. 1. – P. 11.
21. The C- 159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children / T. F. Leung, N. L. Tang, Y. M. Sung [et al.] // *Pediatric allergy and immunology*. – 2003. – Vol. 14, No. 4. – P. 255–260.
22. Analysis of -675 4 g/5 g serpine1 and C-159T CD14 polymorphisms in house dust mite-allergic asthma patients / K. Kowal, A. Bodzenta-Lukaszyk, A. Pampuch [et al.] // *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. – 2008. – Vol. 18, No. 4. – P. 284–292.
23. A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases / M. Kabesch, K. Hasemann, V. Schickinger [et al.] // *Allergy*. – 2004. – Vol. 59, No. 5. – P. 520–525.
24. Breastfeeding, soluble CD14 concentration in breast milk and risk of atopic dermatitis and asthma in early childhood: birth cohort study / D. Rothenbacher, M. Weyermann, C. Beermann, H. Brenner // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2005. – Vol. 35, No. 8. – P. 1014–1021.
25. CD14 promoter polymorphisms in atopic families: implications for modulated allergen-

- specific immunoglobulin E and G1 responses / D. R. Jackola, S. Basu, C. L. Liebeler [et al.] // International archives of allergy and immunology. – 2006. – Vol. 139, No. 3. – P. 217–224.
26. The effect of CD14 C159T polymorphism on in vitro IgE synthesis and cytokine production by PBMC from children with asthma / C. Sackesen, E. Birben, O. U. Soyer [et al.] // Allergy. – 2011. – Vol. 66, No. 1. – P. 48–57.
27. sCD14 in bronchoalveolar lavage 18, 42 and 162 hours after segmental allergen provocation / P. Julius, C. Grosse-Thie, M. Kuepper [et al.] // Scandinavian journal of immunology. – 2010. – Vol. 71, No. 4. – P. 304–311.
28. Two CD14 promoter polymorphisms and atopic phenotypes in Czech patients with IgE-mediated allergy. / D. Bucková, L. I. Hollá, M. Schüller [et al.] // Allergy. – 2003. – Vol. 58, No. 10. – P. 1023–1026.
29. TNF- $\alpha$  (-308 g/a) and CD14 (-159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma. / S.-J. Hong, H.-B. Kim, M.-J. Kang [et al.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2007. – Vol. 119, No. 2. – P. 398–404.
30. CD14 promoter polymorphisms have no functional significance and are not associated with atopic phenotypes. / X. H. Liang, W. Cheung, C. K. Heng [et al.] // Pharmacogenetics and genomics. – 2006. – Vol. 16, No. 4. – P. 229–236.
31. The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population. / M. A. Kedda, F. Lose, D. Duffy [et al.] // Thorax. – 2005. – Vol. 60, No. 3. – P. 211–214.
32. Promoter polymorphisms of the CD14 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. / A. Heinzmann, H. Dietrich, S.-P. Jerkic [et al.] // European journal of immunogenetics. – 2003. – Vol. 30, No. 5. – P. 345–348.
33. Association of TGF-beta1, CD14, IL-4, IL-4r and adam33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. / I. C. de Faria, E. J. de Faria, A. A. Toro [et al.] // Jornal de pediatria. – 2008. – Vol. 84, No. 3. – P. 203–210.
34. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children / J. Lachheb, I. B. Dhifallah, H. Chelbi [et al.] // Tissue Antigens. – 2008. – Vol. 71, No. 5. – P. 417–425.
35. Promoter polymorphisms of the CD14 gene are associated with atopy in Pakistani adults. / S. Micheal, K. Minhas, M. Ishaque [et al.] // Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. – 2011. – Vol. 21, No. 5. – P. 394.
36. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on the occurrence of atopic and non-atopic asthma. / T. Zaborowski, K. Wojas-Krawczyk, P. Krawczyk [et al.] // Adv Clin Exp Med. – 2011. – Vol. 20, No. 4. – P. 413–421.
37. Lipopolysaccharide-induced immune responses in relation to the TLR4 (Asp299Gly) gene polymorphism. / Lundberg A., Wikberg L.A., Ilonen J. et al. // Clin Vaccine Immunol. – 2008. – Vol. 15, N.12. – P. 1878–1883.

## РЕЗЮМЕ

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОТИПОВ АСТМЫ С ПОМОЩЬЮ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИХ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭНДОТОКСИН-ЗАВИСИМОГО ВОСПАЛЕНИЯ

БИСЮК Ю.А., КУРЧЕНКО А.И., ДУБОВОЙ А.И.,  
КОНДРАТЮК В.Е.

Национальный медицинский университет  
имени А. А. Богомольца

В популяции АР Крым исследований по идентификации фенотипов бронхиальной астмы с помощью кластерного анализа клинических и иммуногенетических параметров эндотоксин-зависимого воспаления не проводились.

Цель исследования – провести кластерный анализ клинических и иммуногенетических параметров эндотоксин-зависимого воспаления при бронхиальной астме в популяции АР Крым.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 331 больной бронхиальной астмой. Группу контроля для генетического исследования составили 285 волонтеров, а для оценки антиэндотоксинового иммунитета 92 практически здоровых лиц АР Крым.

Для проведения кластерного анализа были использованы 42 переменные – клинико-инструментальные и анамнестические параметры (пол, возраст, рост, вес, индекс массы тела, продолжительность и возраст начала заболевания, количество обострений за последний год, наличие пневмоний, статус курильщика и количество пачка/лет, атопический статус, использование ингаляционных кортикостероидов или модификаторов лейкотриенов или комбинации ИКС+БАДД или оральных стероидов), данные спирометрии (Pre FVC %, Pre FEV1 %, Pre FEV1/FVC, Post FVC %, Post FEV1 %, Post FEV1/FVC,  $\Delta$  FEV1 L,  $\Delta$  FEV1 %), показатели антиэндотоксинового иммунитета (анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM, анти-ЭТ-IgG, анти-ЭТ-sIgA и sCD14 в сыворотке и индуцированной мокроте), генотипы (CC-C159T, CT-C159T, TT-C159T, AA-Arg299Gly, AG-Arg299Gly, GG-Arg299Gly), цитологический профиль индуцированной мокроты (процентное содержание нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов и др. клеток).

Для проведення кластерного аналізу використовувалась програма Minitab16.

**РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБСУЖДЕНИЕ.** По результатам проведеного статистичного аналізу удалось ідентифікувати 3 кластера, які ми позначили як кластери А, В і С.

113 пацієнтів з БА склали кластер А. Ідентифікований кластер В виявився найбільшим в досліджуваній популяції і склав 184 пацієнта, 127 (69%) з яких склали жінки. Найменш численним виявився кластер С. В дану групу було визначено тільки 34 пацієнта, в основному жіночої статі (80%).

Частота розподілу генотипів СС, СТ і ТТ у пацієнтів з кластерами А, С і В достовірно не відрізнялася ( $P > 0,05$ ) від контролю. Аналіз генотипів в залежності від ризику по алелю С і різниці частот обох алелів також не виявив достовірних відмінностей ( $P > 0,05$ ). Однак, для пацієнтів з кластером С, ризик по алелю Т виявився достовірно знижений ( $OR = 0,45$ ,  $p = 0,029$ ) порівняно з контролем.

У пацієнтів з кластером В частота генотипів АА, АГ і ГГ відрізнялася від контролю на рівні достовірності 0,052. Частота зустрічальності генотипів АГ+ГГ (24%) і алеля Г (13%) достовірно вище ( $p < 0,05$ ) контролю (АГ+ГГ – 15%; Г – 8%) для кластера В. Достовірних відмінностей ( $P > 0,05$ ) для кластера А і С не було виявлено.

Вміст Анти-ЕТ-IgM був достовірно вище ( $p < 0,05$ ) контролю для хворих всіх кластерів, при цьому достовірних відмінностей ( $p > 0,05$ ) між кластерами не було виявлено. Концентрація Анти-ЕТ-IgG у пацієнтів всіх кластерів була достовірно вище ( $p < 0,05$ ) контролю, однак, в кластері С рівень цього іммуноглобуліну був достовірно нижче ( $p < 0,05$ ) порівняно з кластерами А і В. Вміст секреторного Анти-ЕТ-sIgA у хворих з кластером А і С був достовірно нижче ( $p < 0,05$ ) контролю, а для кластера В достовірно не відрізнявся ( $p > 0,05$ ). Рівень сировотного sCD14 був достовірно вище контролю ( $p < 0,05$ ) тільки для пацієнтів належних кластеру С. В свою чергу, вміст цього медіатора в індукованій мокроті достовірно відрізнявся ( $p < 0,05$ ) від контролю у всіх кластерах, але для кластера С зафіксовані найвищі значення, які достовірно вище ( $p < 0,05$ ) значень кластера А і В.

**ВИВОДИ.** Проведення кластерного аналізу з використанням клініко-інструментальних критеріїв в комбінації з іммуногенетичними параметрами ендотоксин-залежного запалення в популяції АР Крим дозволило нам виявити 3 фенотипи бронхіальної астми: 1 фенотип (кластер А) – неконтрольована, переважно атопічна з обратимою обструкцією; 2 фенотип (кластер В) – неконтрольована, переважно атопічна з фіксованою обструкцією і підвищеним ризиком розвитку астми ( $OR = 1,709$ ,  $p = 0,013$ ) при наявності мутантного алеля G (Arg299Gly) гена TLR-4; 3 фенотип (кластер С) – неконтрольована, переважно неатопічна, нейтрофільна з фіксованою обструкцією в асоціації з дисбалансом ан-

тиендотоксинного імунітету і зниженим ризиком ( $OR = 0,459$ ,  $p = 0,029$ ) розвитку при СТ+ТТ (С159Т-СД14) генотипі.

## РЕЗЮМЕ

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ ФЕНОТИПІВ АСТМИ ЗА ДОПОМОГОЮ КЛАСТЕРНОГО АНАЛІЗУ КЛІНІЧНИХ ТА ІМУНОГЕНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ЕНДОТОКСИН-ЗАЛЕЖНОГО ЗАПАЛЕННЯ

*Бісюк Ю.А., Курченко А.І., Дубовий А.І., Кондратюк В.Є.*

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

У популяції АР Крим досліджень з ідентифікації субтипів бронхіальної астми за допомогою кластерного аналізу клінічних та іммуногенетичних параметрів ендотоксин-залежного запалення не проводилися.

Мета дослідження – провести кластерний аналіз клінічних та іммуногенетичних параметрів ендотоксин-залежного запалення при бронхіальній астмі в популяції АР Крим.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** У дослідження було включено 331 хворий на бронхіальну астму. Групу контролю для генетичного дослідження склали 285 волонтерів, а для оцінки антиендотоксинного імунітету 92 практично здорових осіб АР Крим.

Для проведення кластерного аналізу були використані 42 змінні – клініко-інструментальні та анамнестичні параметри (стать, вік, зріст, вага, індекс маси тіла, тривалість і вік початку захворювання, кількість загострень за останній рік, наявність пневмоній, статус курця і кількість пачка/років, атопічний статус, використання інгаляційних кортикостероїдів або модифікаторів лейкотрієнів або комбінації ІКС + LABA або оральних стероїдів), дані спірометрії (Pre FVC%, Pre FEV1%, Pre FEV1 / FVC, Post FVC%, Post FEV1%, Post FEV1 / FVC,  $\Delta$  FEV1 L,  $\Delta$  FEV1%), показники антиендотоксинного імунітету (анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM, анти-ЕТ-IgG, анти-ЕТ-sIgA і sCD14 в сироватці та індукованому мокротинні), генотипи (СС-С159Т, СТ-С159Т, ТТ-С159Т, АА-Arg299Gly, АГ-Arg299Gly, ГГ-Arg299Gly), цитологічний профіль індукованої мокроті (процентний вміст нейтрофілів, еозинофілів, макрофагів і ін. клітин). Для проведення кластерного аналізу використовувалася програма Minitab16

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** За результатами проведеного статистичного аналізу вдалося ідентифікувати 3 кластера, які ми позначили як кластери А, В і С.

113 пацієнтів з БА склали кластер А. Ідентифікований кластер В виявився найбільшим в досліджуваній популяції і склав 184 пацієнта, 127 (69%) з яких склали жінки. Самим нечисленним виявився кластер С. В дану групу було визначено тільки 34 пацієнта, в основному жіночої статі (80%).

Частота розподілу генотипів СС, СТ і ТТ у пацієнтів з кластерами А, С і В достовірно не відрізнялася ( $P > 0,05$ ) від контролю. Аналіз генотипів залежно від ризику по алелю С і різниці частот обох алелів також не виявив достовірних відмінностей ( $P > 0,05$ ). Однак, для пацієнтів з кластером С, ризик по алелю Т виявився вірогідно знижений ( $OR = 0,45$ ,  $p = 0,029$ ) порівняно з контролем.

У пацієнтів з кластером В частота генотипів АА, АГ і GG відрізнялося від контролю на рівні достовірності 0,052. Частота генотипів АГ + GG (24%) і алеля G (13%) достовірно вище ( $p < 0,05$ ) контролю (АГ + GG - 15%; G - 8%) для кластера В. Достовірних відмінностей ( $P > 0,05$ ) для кластера А і С не було виявлено.

Вміст анти-ЕТ-IgM був достовірно вище ( $p < 0,05$ ) контролю для хворих всіх кластерів, при цьому достовірних відмінностей ( $p > 0,05$ ) між кластерами не було виявлено. Концентрація анти-ЕТ-IgG у пацієнтів всіх кластерів була достовірно вище ( $p < 0,05$ ) контролю, однак, в кластері С рівень цього імуноглобуліну був достовірно нижче ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з кластерами А і В. Вміст секреторного Анти-ЕТ-sIgA у хворих з кластером А і С було достовірно нижче ( $p < 0,05$ ) контролю, а для кластера В достовірно не відрізнялося ( $p > 0,05$ ). Рівень сироваткового sCD14 був достовірно вище контролю ( $p < 0,05$ ) тільки для пацієнтів належать кластеру С. У свою чергу, вміст цього медіатора в індукованій мокротинні достовірно відрізнявся ( $p < 0,05$ ) від контролю у всіх кластерах, але для кластера С зафіксовані найвищі значення, які достовірно вище ( $p < 0,05$ ) значень кластера А і В.

**ВИСНОВКИ.** Проведення кластерного аналізу дозволило нам виявити 3 фенотипи бронхіальної астми. 1 фенотип (кластер А) – неконтрольована, переважно атопічна з оборотною обструкцією астма. 2 фенотип (кластер В) – неконтрольована, переважно атопічна з фіксованою обструкцією і підвищеним ризиком розвитку астма (відношення шансів = 1,709,  $p = 0,013$ ) при наявності мутантного алеля G (Arg299Gly) гена TLR-4. 3 фенотип (кластер С) – неконтрольована, переважно неатопічна, нейтрофільна з фіксованою обструкцією астма в асоціації з дисбалансом антиендотоксину імунітету і зниженим ризиком (відношення шансів = 0,459,  $p = 0,029$ ) розвитку при СТ + ТТ (С159Т-CD14) генотипі.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, ендотоксин, поліморфізм Arg299Gly-TLR-4 та С159Т-CD14, кластерний аналіз.

## SUMMARY

### IDENTIFICATION OF ASTHMA PHENOTYPE BY CLUSTER ANALYSIS OF CLINICAL AND IMMUNOGENETIC PARAMETERS OF ENDOTOXIN-DEPENDENT INFLAMMATION

Bisyuk Yu.A., Kurchenko A.I., Dubovyi A.I., Kondratiuk V.E.

O.O. Bogomolets National Medical University

In a population of Crimea studies on the identification of asthma subtypes using cluster analysis of clinical and immunogenetic parameters of endotoxin-dependent inflammation were not carried out.

The purpose of research – to carry out cluster analysis of clinical and immunogenetic parameters of endotoxin-dependent inflammation in asthma in the population of Crimea.

**MATERIALS AND METHODS.** There were included 331 patients with bronchial asthma. The control group included 285 volunteer for genetic research and 92 healthy individuals to assess the anti-endotoxin immunity.

To perform cluster analysis were used 42 variables – clinical and instrumental and anamnestic parameters (gender, age, height, weight, body mass index, duration, age at onset, number of exacerbations in the last year, the presence of pneumonia, smoking status, and number of pack/years atopic status, the use of inhaled corticosteroids or Leukotriene modifiers or combination of ICS + LABA or oral steroids), spirometry (Pre FVC%, Pre FEV1%, Pre FEV1/FVC, Post FVC%, Post FEV1%, Post FEV1 / FVC,  $\Delta$  FEV1 L,  $\Delta$  FEV1%), indicators of anti-endotoxin immunity (anti-ET-IgA, anti-ET-IgM, anti-ET-IgG, anti-ET-sIgA and sCD14 in the serum and induced sputum) genotypes (SS-S159T, ST-S159T, S159T TT, AA-Arg299Gly, AG-Arg299Gly, GG-Arg299Gly), cytological profile of induced sputum (the percentage of neutrophils, eosinophils, macrophages, and others. cells). To perform cluster analysis program was used Minitab16.

**RESULTS AND ITS DISCUSSION.** According to results of the statistical analysis we have identified 3 clusters, which we have designated as cluster A, B and C.

113 patients with asthma composed cluster A. Cluster B was identified as the biggest in the study population and included 184 patients, 127 (69%) of whom were women. The most the few proved to cluster C. This group was identified only 34 patients, mostly female (80%).

The frequency distribution of the genotypes CC, CT and TT in patients with clusters A, B and C were not significantly different ( $P > 0.05$ ) from controls. Analysis of genotypes depending on the risk of allele C and the difference frequencies of the two alleles also showed no significant differences ( $P > 0.05$ ). However, for patients with cluster C, the risk allele T was significantly reduced (OR = 0.45,  $p = 0.029$ ) compared to the control.

Patients with cluster in the frequency of genotypes AA, AG and GG are different from controls at a confidence level of 0.052. The frequency of genotypes AG + GG (24%) and allele G (13%) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) of control (АГ + GG - 15%; G - 8%) for Cluster B. No significant differences ( $P > 0.05$ ) for the cluster A and C were detected.

The content of anti-ET-IgM was significantly higher ( $p < 0.05$ ) compare to the control of all the clusters of patients, with significant differences ( $p > 0.05$ ) between the clusters were detected. Concentration of anti-ET-IgG in patients of all clusters was significantly higher ( $p < 0.05$ ) of control, however, in a cluster of immunoglobulin levels was significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared with the clusters A and B. The content of the secretory Anti-ET-sIgA in patients with cluster A and C was significantly lower ( $p < 0.05$ ) compare to control, and for cluster B did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). The level of serum sCD14 was significantly higher than controls ( $p < 0.05$ ) only for patients belonging to the cluster C. In turn, the content of the mediator in induced sputum was significantly differ ( $p < 0.05$ ) from the control of all the clusters, but in cluster C recorded the highest value that was significantly higher ( $p < 0.05$ ) values compare to the cluster A and B.

**CONCLUSIONS.** A cluster analysis allowed us to identify the three phenotypes of asthma. 1 phenotype (cluster A) – uncontrolled, mostly with reversible ob-

structive atopic asthma. 2 phenotype (Cluster B) – uncontrolled, mainly atopic fixed obstruction and an increased risk of asthma (OR = 1.709, p = 0.013) in the presence of the mutant allele G (Arg299Gly) of TLR-4 gene. Phenotype 3 (cluster C) – uncontrolled, mostly non-atopic, neutrophilic asthma with fixed obstruction in association with the imbalance of anti-endotoxin immunity and reduced risk (OR = 0.459, p = 0.029) of

disease development in presence of CT + TT (C159T-CD14) genotype.

**Key words:** bronchial asthma, endotoxin, Arg-299Gly-TLR-4 and C159T-CD14 polymorphism, cluster analysis.

УДК 616.36+616.12]-092:616.34-008.87:612.017.1

## ДИСБІОЗ КИШЕЧНИКА ТА ІМУННА МОДУЛЯЦІЯ У ФОРМУВАННІ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ МІЖ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПЕЧІНКИ ТА СЕРЦЯ: МЕТОД КОРЕКЦІЇ

*КОНДРАТЮК В.Є., МАНЖАЛІЙ Е.Г., ПАЛАМАРЬ Б.І., БАКА О.М.*

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Київська міська клінічна лікарня № 3

Лікарня для вчених Національної Академії наук України

Останніми роками дисбіоз кишечника розглядається як фактор ризику формування та прогресування таких серцево-судинних захворювань як хронічна серцева недостатність (СН), гострий коронарний синдром, мозкові інсульти. Накопичено достатня кількість доказів, які свідчать про взаємозв'язок між ураженням серцево-судинної системи (ССС) і захворюваннями печінки (ЗП) [3,25]. Разом з цим частота розвитку, фактори ризику і механізми формування ураження ССС при захворюваннях шлунково-кишкового тракту (ШКТ), особливо при цирозі печінки (ЦП), ще недостатньо вивчені [9, 15]. Одним із таких чинників є порушення складу кишкової мікрофлори. В цьому контексті стає зрозумілим необхідність визначення впливу дисбіозу кишечника на системну та інтракардіальну гемодинаміку при ЗП. Дисбіоз кишечника характеризується зниженням детоксикаційної функції мікробіоти, що детермінує підвищення навантаження на ферментативні системи печінки, обумовлюючи метаболічні та структурні зміни останньої. Дисбіоз кишечника є основним джерелом ендотоксикемії [2]. В нормі захисний бар'єр слизової оболонки (СО) кишечника дозволяє попередити трансепітеліальну міграцію бактерій. Бактеріальна транслокація (БТ) - це перенос життєздатних мікроорганізмів або бактеріальних продуктів (бактеріальних ліпосахаридів, пептидогліканів та ліпопептидів, бактеріальної ДНК) із просвіту кишечника в мезентеріальні лімфатичні вузли, селезінку, печінку, нирки і систему кровообігу. Для здорових людей притаманний низький рівень БТ [10]. При зна-

чній кількості адгезованих бактерій та їх продуктів БТ набуває патологічного характеру. При ЦП значний об'єм портальної крові скидується в системний кровотік, оминаючи печінку по портокавальних і печінкових анастомозах внаслідок підвищеного портального тиску, в результаті чого збільшується число циркулюючих в крові мікроорганізмів та їх токсинів. Найбільш часто проникають через СО кишечника та приводять до БТ, насамперед, грамнегативні мікроорганізми родини Enterobacteraceae (Escherichia coli та Klebsiella spp.), ентерококи та стрептококи. Особливе значення мають ліпополісахариди клітинної стінки грамнегативних бактерій, які взаємодіють з компонентами неспецифічного імунного захисту CD14 та CD28 та індують за рахунок активаторів транскрипції NF-κB синтез макрофагами цитокінів та ензимів [1, 2, 18, 24]. Бактеріальні ендотоксини не тільки приймають участь у вторинному пошкодженні печінки, але і стимулюють печінкові макрофаги до надмірного синтезу прозапальних цитокінів: інтерлейкіна (ІЛ) - 1β, ІЛ-6, фактору некроза пухлин-α (TNF-α), для яких характерна місцева і системна дія. Висуваються теорії, які пов'язані з дисфункцією В-рецепторів, з виділенням кардіодепресивних субстанцій — цитокінів, оксиду азота (NO), ендотоксинів. Особливий інтерес викликає гіпотеза щодо синтезу кардіодепресивних субстанцій у хворих на гепатит та ЦП з дисбіозом кишечника. Вважається, що одним із механізмів, які відповідають за синтез цитокінів — фактору некроза пухлин-α, інтерлейкінів 1, 6, та NO, є синдром надмірного бактеріального росту в тонкій