

УДК: 616.248-053.2-085.281:575

О.К. Колоскова,

Г.А. Білик

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

РЕЗУЛЬТАТИ КЛАСТЕРНОГО АНАЛІЗУ В ПРОГНОЗУВАННІ РЕМОДЕЛІНГУ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ ШКОЛЯРІВ

Ключові слова: бронхіальна астма, діти, ремоделювання бронхів.

Резюме. У роботі на підставі комплексного обстеження 117 дітей шкільного віку, які страждають на бронхіальну астму, показані клінічно-параклінічні відмінності, які асоціюють із різним варіантом ремоделювання дихальних шляхів. Установлено, що для пацієнтів із тяжким перебігом фенотипу астми "пізнього початку" і нейтрофільним запальним процесом у бронхах, за наявності в них генотипу $GSTT1+GSTM1+$, характерний високий ризик ремоделінгу бронхів, що потребує додаткового лабораторно-інструментального обстеження і посилення базисного протизапального лікування за принципом "step up". У пацієнтів за умови наявності делеційного поліморфізму генів $GSTT1$ чи $GSTM1+$, раннього дебюту захворювання, досягнутого контролю над астмою, високих результатів бронходилятаційної проби з сальбутамолом, низького вмісту в сироватці крові ІЛ-13, високої концентрації в надосадковій рідині MMP-9 і низької концентрації VEGF, частіше виявляється низький ризик щодо ремоделінгу бронхів, тому базисна контролююча терапія в них може проводитися за принципом "step down".

Вступ

Останніми роками в науковій літературі накопичені результати вивчення ключових особливостей бронхіальної астми в дитячому віці, зокрема маркерів атопії, гіперсприйнятливості дихальних шляхів до прямих і непрямих бронхоспазмогенних чинників, а також характеру й активності місцевого запального процесу дихальних шляхів [3, 5]. Це стало результатом, у тому числі, широкого впровадження в практику дитячої алергології доступних і водночас неінвазивних методик обстеження [11], оптимізації підходів до моніторингу гіперсприйнятливості дихальних шляхів і впровадження сучасних статистичних методів аналізу одержаних результатів.

Так, за допомогою кластерного аналізу накопичених фактичних даних встановлені фенотипові особливості бронхіальної астми [6, 10], а проведення подальшого кластерного аналізу в групах указаних фенотипів дозволило встановити наявність дрібніших субтипів у межах окремих фенотипів захворювання. Мабуть, це свідчило про співіснування в межах певних фенотипів захворювання низки окремих ендотипів, або про відсутність у такому аналізі відомостей про базисні, але ще невідомі або невраховані характеристики [2, 14, 15]. Останнє, можливо, пов'язане з відсутністю чи недостатністю в клінічній медицині знань відносно біомаркерів перебігу захво-

рування, що проілюстровано на прикладі пошкодження епітеліально-мезенхімального комплексу чи формування незворотніх змін у процесі ремоделінгу бронхів [4].

З ремоделюванням дихальних шляхів (РДШ), що тісно пов'язане з їх хронічним запаленням, частково пов'язують недостатню ефективність регламентованого базисного контролюючого лікування астми та її неконтрольований перебіг. Ціла низка різноманітних морфологічних, біохімічних та імунологічних біомаркерів використовується на даний час в якості показників РДШ, серед яких варто відзначити інтерлейкіни (-4,-5,-6,-13,-17, 1β та інш.), фактор некрозу пухлин- α , судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), окремі матричні металопротеїнази, зокрема MMP-9 [8-9]. У цьому відношенні доволі цікавим представляється вивчення вмісту даних біомаркерів безпосередньо у вогнищі алергічного запалення, а інформативним біосубстратом у такому дослідженні може виступати конденсат повітря, що видихається (КПВ).

Мета дослідження

Для покращення менеджменту бронхіальної астми у дітей шкільного віку виділити групи підвищеного ризику щодо формування ремоделінгу бронхів на підставі комплексного дослідження запальних маркерів у периферичній крові та кон-

денсаті повітря, що видихається.

Матеріал і методи

В умовах пульмоалергологічного відділення Обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці з дотриманням принципів біоетики та за поінформованої згоди батьків обстежено 117 хворих на бронхіальну астму (БА) школярів, середній вік яких становив ($11,5 \pm 0,29$) року (95%ДІ 10,93-12,07 року). Тривалість захворювання на БА становила в обстежених дітей у середньому ($5,4 \pm 0,33$ року) (95%ДІ 4,78-6,09 року). Розподіл за статтю виявився наступним: хлопчиків серед обстежених було 65,25%, а частка дівчаток становила 34,75%, що повністю узгоджувалося з даними досліджень гендерних особливостей перебігу БА [13].

У сироватці крові за допомогою імуноферментного аналізу досліджували концентрацію інтерлейкіну-6, інтерферону-гамма та фактору некрозу пухлин -альфа (реактиви "Вектор БЕСТ", РФ), а ІЛ-13 - методом ELISA (реактиви "eBioscience", Austria) в імунологічній лабораторії Обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці.

Конденсат видихуваного повітря отримували в кількості 1,5-2 мл у позанападному періоді за допомогою власноруч спроектованого конденсора. Протеолітичну активність КПВ визначали за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколагену за методикою Веремєєнка К.Н. та співавт. (2001), а вміст метаболітів оксиду азоту за Ємченком Н.Л. та співавт. (1994) у модифікації Гоженка А.І. (2002).

Мокротиння, отримане в результаті спонтанного відкашлювання, чи індуковане інгаляціями гіпертонічних розчинів натрію хлориду, готували до цитохімічного дослідження згідно рекомендацій [12], та в мукоспіні визначали вміст гранулоцитів, а у надосадковій рідині - концентрацію VEGF імуноферментним методом, реактиви "Вектор БЕСТ"Б РФ) та MMP-9 (методом Sandwich ELISA, реактиви "eBioscience", Austria).

Виявлення делецій у генах GSTT1 та GSTM1 здійснювали методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), для чого загальну геномну ДНК виділяли з периферичної крові згідно стандартного протоколу з використанням протеїнази К та додецилсульфату натрію як детергенту. Як позитивний контроль успішності полімеразно-ланцюгової реакції використовували ампліфікацію фрагментів гена BRCA1, а її аналіз здійснювали за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі (Маниатис і др., 1984). Для візуалізації фрагментів ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом та фотографували

в ультрафіолетовому світлі на установці GelDoc 2000 (BioRad, США). Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва). Очікувані довжини фрагментів ДНК (431 нп для GSTT1 та 120 нп для GSTM1) розраховували за допомогою пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із використанням послідовностей генів GSTT1 та GSTM1, які наявні в базі даних Genbank. Гомозиготні форми із делецією обох копій генів GSTT1 та GSTM1 ідентифікували за відсутністю відповідного фрагменту на електрофореграмі та позначали як T1del і M1del. Наявність вказаних фрагментів на електрофореграмах свідчила про гомо- або гетерозиготність по нормальній копії гена, і генотип таких пацієнтів позначали як T1+ та M1+.

Для спірографічних досліджень застосовували портативний спірограф MicroLab SN (Англія, серійний №445501). У позаприступному періоді визначали реакцію бронхів на дозоване фізичне навантаження з наступною інгаляцією сальбутамолу, виражаючи її у вигляді індексу лабільності бронхів (ІЛБ), представленого сумою його складових - індексу бронхоспазму (ІБС) та бронходиляції (ІБД).

Одержані результати дослідження аналізувалися за допомогою комп'ютерних пакетів "STATISTICA" StatSoft Inc. та Excel XP для Windows на персональному комп'ютері з використанням параметричних і непараметричних методів обчислення, а також методу кластерного аналізу. Для виділення в обстеженій загальній вибірці груп подібних хворих БА, які суттєво відрізнялися між собою за показниками ремоделінгу дихальних шляхів і, таким чином, виступали як групи ризику щодо несприятливих наслідків захворювання, використовували кластерний аналіз результатів комплексного обстеження.

Обговорення результатів дослідження

З урахуванням даних наукових джерел щодо зв'язку тяжкості перебігу БА із виразністю фібротичних змін у дихальних шляхах [1], нами проаналізовано особливості розподілу хворих за тяжкістю процесу та вміст у цих підгрупах окремих маркерів ремоделінгу бронхів. Так, тяжкий перебіг БА мала в 45 хворих (38,14%), середньотяжкий - у 50 дітей (42,37%), легке персистування - у 16 пацієнтів (13,56%) та інтермітуючий перебіг - у решти 5,93% спостережень. Вміст у сироватці крові інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) у середньому становив ($9,39 \pm 1,55$) пг/мл (95% ДІ: 6,31-12,47 пг/мл), а ІЛ-13 - ($30,47 \pm 3,92$) пг/мл (95% ДІ: 22,68-38,30

пг/мл). Концентрація в периферичній крові інтерферону-гамма (γ -ІФН) у середньому становила $(31,76 \pm 3,63)$ пг/мл (95% ДІ: 24,56-38,97 пг/мл), а фактору некрозу пухлин-альфа (TNF- α) - $(2,36 \pm 0,41)$ пг/мл (95% ДІ: 1,55-3,18 пг/мл).

На рисунку показаний розподіл сироваткової концентрації маркерів ремоделінгу бронхів відповідно тяжкості персистування БА в обстежених дітей. Наведені результати демонструють тенденцію до поступового наростання вмісту у

сироватці крові концентрації інтерлейкіну-13 та ІFN- γ , із зниженням вмісту останнього конкордантно до концентрації TNF- α , який, у свою чергу, мабуть відображував тенденцію до накопичення даного цитокіну в підслизовому шарі бронхів [1] у бронхоальвеолярному лаважу [7].

З цієї точки зору цікавим представлявся аналіз вмісту інших маркерів ремоделінгу бронхів (VEGF та MMP-9) у надосадковій рідині мокротиння хворих. Так, середній вміст у даному

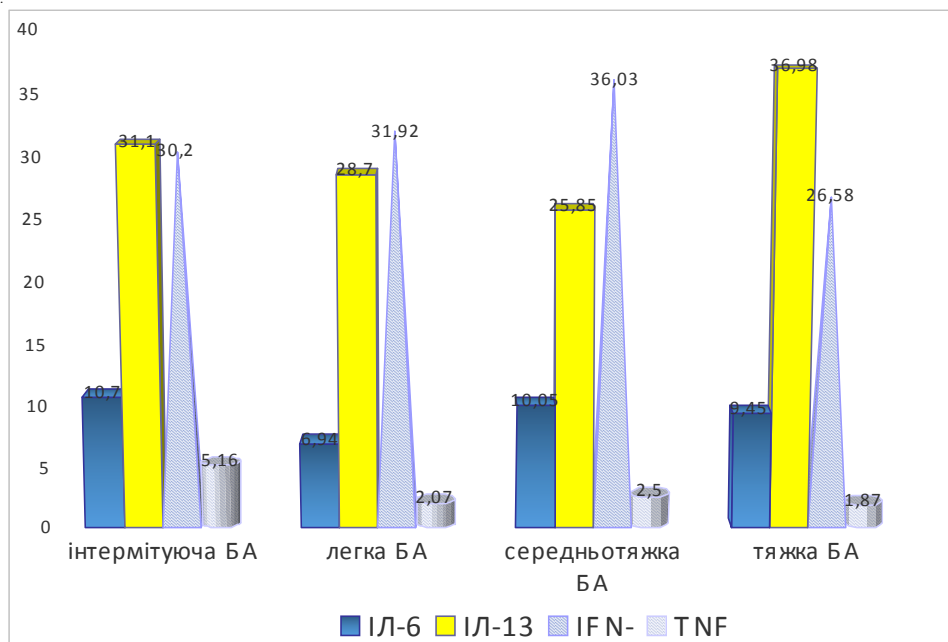


Рисунок. Сироватковий вміст маркерів ремоделювання бронхів (у пг/мл) залежно від тяжкості персистування астми в обстежених дітей

біоматеріалі VEGF у когорті обстежених хворих становив $(123,88 \pm 11,79)$ пг/мл (95% ДІ 100,38-147,38 пг/мл), а MMP-9 - $(5,85 \pm 0,69)$ нг/мл (95% ДІ 4,49-7,22 нг/мл). У таблиці 1 наведений вміст даних цитокінів у надосадковій рідині мокротиння з різної тяжкості персистування БА в обстежених дітей. З наведених даних випливає припущення, що за персистувального перебігу БА

у вогнищі алергічного запалення вірогідно зростає вміст VEGF, який контролюється переважно середніми та високими дозами інгаляційних глюкокортикостероїдних препаратів, що узгоджується з даними інших дослідників [13]. Стосовно матричної металопротеїнази-9, то ця тенденція залишається аналогічною при збереженні помірного тренду до зростання вмісту MMP-9 у над-

Таблиця 1

Вміст VEGF та MMP-9 у надосадковій рідині мокротиння за різного ступеня тяжкості перебігу астми

Маркер ремоделінгу	Інтермітуюча БА	Тяжкість персистування БА			P 1:2-4
		Легка	Середньотяжка	Тяжка	
VEGF (пг/мл)	64,25 \pm 16,82	179,44 \pm 38,10	112,76 \pm 15,67	130,58 \pm 22,16	<0,05
MMP-9 (нг/мл)	6,1 \pm 1,58	4,91 \pm 1,07	5,88 \pm 1,36	6,22 \pm 0,84	>0,05

садковій рідині мокротиння по мірі наростання тяжкості перебігу БА.

З урахуванням домінування цитокінових характеристик ремоделювання бронхів за допомогою кластерного аналізу виділено 3 кластери хворих на бронхіальну астму (табл. 2), які визначали різний ризик формування незворотніх змін у брон-

хах. Так, виділено I кластер, що визначає помірний ризик розвитку ремоделювання бронхів; II кластер, який асоціює з високим ризиком ремоделінгу, та кластер III з низькою вірогідністю розвитку незворотніх змін дихальних шляхів. Так, з високим ризиком ремоделінгу асоціювали жіноча стать, тяжкий перебіг БА, дебют захворювання

Таблиця 2

Результати кластерного аналізу результатів комплексного обстеження дітей, хворих на бронхіальну астму

	1-й кластер	2-й кластер	3-й кластер
VEGF (пг/мл)	153,3333	400,0000	56,25000
MMP-9 (пг/мл)	2,8333	3,0000	6,87500
IFN-γ (пг/мл)	71,6667	12,0000	25,00000
ІЛ-6 (пг/мл)	4,2667	0,3000	2,50000
ІЛ-13 (пг/мл)	40,0000	90,0000	33,75000
TFN-α (пг/мл)	0,0000	0,8000	1,00000
Метаболіти оксиду азоту (мкмоль/мл)	61,9300	59,6000	63,91000
Протеолітична активність за лізисом азоальбуміну КВП (мл/год)	1,5200	1,6400	1,37000
Протеолітична активність за лізисом азоказеїну КВП (мл/год)	1,4667	1,2400	1,30000
Протеолітична активність за лізисом азоколу КВП (мл/год)	0,1200	0,1600	0,24000
Генотипи <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i>	1,6667	1,0000	1,75000
Стать	1,0000	2,0000	1,50000
Тяжкість БА	3,3333	4,0000	3,75000
Дебют захворювання	1,6667	3,0000	1,50000
Контроль БА	15,6667	17,0000	20,50000
ІБС (%)	3,1000	47,7000	11,67500
ІБД (%)	17,3000	9,8000	26,50000
ІЛБ (%)	20,4000	57,5000	38,17500
Вміст еозинофілів у мокротинні	6,0000	20,0000	7,25000
Вміст нейтрофілів у мокротинні	45,3333	60,0000	45,75000

після 6-річного віку, значне підвищення вмісту VEGF у надосадковій рідині мокротиння, значно зменшена сироваткова концентрація IFN-g та зростання вмісту ІЛ-13, підвищений лізис низько дисперсних білків у КВП, схильність до вираженого бронхоспазму у відповідь на фізичне навантаження та тлі ригідності дихальних шляхів у пробі з сальбутамолом з відповідним зменшенням ІБС, переважання гіпергранулоцитарного варіанту запалення бронхів, а також генотип хворих *GSTT1+GSTM1+*.

Висновки

Таким чином, попри показники контролю перебігу БА, пацієнтки з тяжким перебігом фенотипу астми "пізнього початку" і нейтрофільним за-

пальним процесом у бронхах, за наявності в них генотипу *GSTT1+GSTM1+*, потребують додаткового лабораторно-інструментального обстеження з метою встановлення ризику ремоделінгу дихальних шляхів і посилення базисного протизапального лікування за принципом "step up". Пацієнти шкільного віку незалежно від статі і тяжкості захворювання, але за умови наявності делеційного поліморфізму генів *GSTT1* чи *GSTM1+*, раннього дебюту захворювання, досягнутого контролю над астмою, високих результатів бронходилатативної проби з сальбутамолом, низького вмісту в сироватці крові ІЛ-13, високої концентрації в надосадковій рідині MMP-9 та низької концентрації VEGF, належать до групи низького ризику щодо ремоделінгу бронхів, тому базисна

контролююча терапія в них може проводитися за принципом "step down".

Перспективи подальших досліджень

У подальшому будуть вивчені впливи та взаємозв'язки чинників ремоделювання дихальних шляхів із клінічним перебігом і прогнозування тяжкості бронхіальної астми в дітей шкільного віку.

Література. 1. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression / J. Chakir, J. Shannon, S. Molet [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2003. - Vol. 111, Iss. 6. - P. 1293-1298. 2. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome / G. Lotvall, S.A. Akdis, L.B. Bacharier [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2011. - Vol. 127. - P. 355-360. 3. Brannan J.D. Bronchial hyperresponsiveness in the assessment of asthma control. Airway hyperresponsiveness in asthma: its. Measurement and clinical significance // *J.D. Brannan // Chest.* - 2010. - Vol. 138 (2) (Suppl.). - P. 11-17. 4. Bronchial asthma and airway remodeling markers / S. Jehan, F. Mohamed, Jehane Osman // *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis.* - 2013. - Vol. 62. - P. 545-548. 5. Busse W.W. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation. Airway hyperresponsiveness in asthma: its. Measurement and clinical significance / W.W. Busse // *Chest.* - 2010. - Vol. 138 (2) (Suppl.). - P. 4-10. 6. Cluster analyses and clinical asthma phenotypes / P. Haldar, I.D. Pavord, D.E. Shaw [et al.] // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* - 2008. - Vol. 178, N. 3. - P. 218-224. 7. Elevated Release of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interferon-gamma by Bronchoalveolar Leukocytes from Patients with Bronchial Asthma / M. Cembrzynska-Nowak, E. Szklarz, A.D. Inglot [et al.] // *American Review of Respiratory Disease.* - 2003. - Vol. 147, N. 2. - P. 291-295. 8. Fahy John V. Eosinophilic and Neutrophilic Inflammation in Asthma. Insights from Clinical Studies / John V. Fahy // *Proc Am Thorac Soc.* - 2009. - Vol. 6. - P. 256-259. 9. Jeffery P.K. Remodeling and Inflammation of Bronchi in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease / Peter K. Jeffery // *Proc Am Thorac Soc.* - 2004. - Vol. 1. - P. 176-183. 10. Identification of asthma phenotypes using cluster analyses in the severe asthma research program / W.C. Moore, D.A. Meyer, S.E. Wenzel [et al.] // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* - 2010. - Vol. 181. - P. 315-323. 11. Pavord I.D. Inflammometry: the current state of play / I.D. Pavord, P.G. Gibson // *Thorax.* - 2012. - Vol. 67, N. 3. - P. 191-192. 12. Saravia-Romanholo B.M. Comparison of three methods for differential cell count in induced sputum / B.M. Saravia-Romanholo, V. Barnabe, A. Carvalho [et al.] // *Chest.* - 2003. - Vol. 124. - P. 1060-1066. 13. Therapeutic implications of sex differences in asthma and atopy / M. Osman // *Arch. Dis. Child.* - 2003. - Vol. 88. - P. 587-590. 14. Untangling asthma phenotypes and endotypes / I. Agashe, C. Akdis, M. Jutel [et al.] // *Allergy.* - 2012. - Vol. 67, N. 7. - P. 835-846. 15. Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes / S. Wenzel // *Clin. Exp. Allergy.* - 2012. - Vol. 42, N. 5. - P. 650-658.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РЕМОДЕЛИНГА ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ ШКОЛЬНИКОВ

Е.К. Колоскова, Г.А. Билик

Резюме. В работе на основании комплексного обследования 117 детей школьного возраста, страдающих бронхиальной астмой, показаны клинически параклинические различия, которые ассоциируют с различными вариантами ремоделирования дыхательных путей. Установлено, что для пациентов с тяжелым течением фенотипа астмы "позднего начала" и нейтрофильным воспалительным процессом в бронхах, при наличии у них генотипа GSTT1 + GSTM1 +, характерен высокий риск ремоделинга бронхов, что требует дополнительного лабораторно-инструментального обследования и усиления базисного противовоспалительного лечения по принципу "step up". У пациентов при наличии делецийного полиморфизма генов GSTT1+ или GSTM1 +, раннего дебюта заболевания, достигнутого контроля над астмой, высоких результатов бронходилатационной пробы с салбутамолом, низкого содержания в сыворотке крови ИЛ-13, высокой концентрации в надосадочной жидкости MMP-9 и низкой концентрации VEGF, чаще оказывается низкий риск по ремоделингу бронхов, поэтому базовая контролирующая терапия в них может проводиться по принципу "step down".

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, ремоделирование бронхов.

THE RESULTS OF CLUSTER ANALYSIS OF REMODELING AIRWAYS OF SCHOOL-AGE PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

O.K. Koloskova, G.A. Bilyk

Abstract. The article showed clinical paraclinic differences, associated with different variants of airway remodeling based on the complete examination of 117 school-age children with bronchial asthma. It has been found that a high risk of remodeling of the bronchi, which requires additional laboratory and instrumental examination and increase of the basic anti-inflammatory treatment by the principle "step up" for patients with severe asthma phenotype "late start" and neutrophilic inflammation in the bronchi with genotype GSTT1 + GSTM1 +, characterized by Patients which had deletion gene polymorphism GSTT1+ or GSTM1 +, early onset of the disease, obtained control of asthma, high results of reversibility testing with salbutamol, low serum levels of IL-13, high concentration in the supernatant of MMP-9 and low concentrations of VEGF, often had low risk of the remodeling of the bronchi. That is why the basic anti-inflammatory therapy can be carried out on the principle of "step down".

Key words: bronchial asthma, children, the remodeling of bronchi.

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №4 (54).-P.58-62.

Надійшла до редакції 27.11.2015

Рецензент – проф. Т.В. Сорокман

© О.К. Колоскова, Г.А. Билик, 2015