

## Количественные критерии для оценки уровня контроля над бронхиальной астмой

Белорусский государственный медицинский университет

Статья посвящена разработке количественных критериев для оценки уровня контроля над бронхиальной астмой. Показатели концентрации интерлейкина-4 в сыворотке крови, ОФВ1 (%), процентного содержания в крови естественных регуляторных Т-клеток (CD4+CD25hi) и активированных клеток (CD25+) являются количественными критериями для оценки уровня контроля над бронхиальной астмой (общая вероятность верной классификации 100%).

Ключевые слова: бронхиальная астма, уровни контроля, критерии оценки, естественные регуляторные Т-клетки, активированные клетки, интерлейкин-4, ОФВ1.

*Zh.V. Antanovich*

*Quantitative criteria for an estimation of bronchial asthma control level*

*The article is devoted working out of quantitative criteria for an estimation of bronchial asthma control level. Indicators of serum interleukin-4 concentration, FEV1 (%), percentage in blood naturally occurring T-regulatory cells (CD4+CD25hi) and activated cells (CD25+) are quantitative criteria for an estimation of bronchial asthma control level.*

*Key words: bronchial asthma, control levels, criteria of an estimation, naturally occurring T-regulatory cells, activated cells, interleukin-4, FEV1.*

В настоящее время в основе определения уровня контроля над бронхиальной астмой (БА) лежат преимущественно клинические проявления заболевания и данные анамнеза [2]. Показатели спирометрии (ОФВ1) являются объективными критериями в диагностике БА, однако для неконтролируемой, частично контролируемой БА и обострения заболевания составляют менее 80% от должного значения или от наилучшего для данного пациента показателя и не позволяют дифференцировать эти состояния [2]. Последние исследования демонстрируют, что среди факторов, препятствующих достижению контроля над БА, одним из ведущих является неадекватная оценка контроля над заболеванием, а, следовательно, и назначение неадекватной противовоспалительной фармакотерапии, причем уровень контроля над БА переоценивают не только пациенты, но и их лечащие врачи [1, 3, 5, 6].

Правильная оценка уровня контроля над БА является обязательным условием для адекватной терапии заболевания, поэтому целью нашего исследования было разработать количественные критерии для точной оценки уровня контроля над БА.

Материал и методы.

В исследование включено 75 больных БА, возраст которых составил 46 лет (от 31 до 54 лет). По полу больные БА распределились следующим образом: 29% (22) мужчин и 71% (53) женщин. Длительность БА составила 9 лет (от 2 до 16 лет). У 21% (16) больных была диагностирована аллергическая, у 12% (9) –

неаллергическая и у 67% (50) – смешанная форма заболевания. Легкое течение БА наблюдалось у 25% (19), среднетяжелое – у 39% (29), тяжелое – у 36% (27) больных. Контролируемое течение БА отмечалось у 33% (25) больных, частично контролируемое течение – у 27% (20) больных, неконтролируемое течение – у 40% (30) больных. Группу контроля составили 34 практически здоровых лица (41% (14) мужчин и 59% (34) женщин). Средний возраст лиц контрольной группы был 43±2 года. Статистически значимых различий по возрасту, полу, форме БА между группами не было. Никто из больных не принимал системных глюкокортикостероидов, базисное лечение соответствовало «ступенчатой терапии БА»[2].

Исследование показателей функции внешнего дыхания (ФВД), проводилось на компьютерном спирографе «МАС-1» (Беларусь).

Определение Т-лимфоцитов (CD3+), Т-лимфоцитов-хелперов (CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), естественных киллерных клеток (CD16+), естественных киллерных клеток с фенотипом Т-лимфоцитов (CD3+CD16+), активированных клеток (CD25+), естественных регуляторных Т-клеток (CD4+CD25hi) проводилось в периферической крови на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с моноклональными антителами фирмы Beckman Coulter (США).

Концентрации цитокинов интерлейкина-4 (IL-4) и интерферона-γ (IFN-γ) определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, согласно рекомендации фирмы-производителя с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 7,0 и Statistica 8,0. Применялись критерии Шапиро-Уилка, Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни,  $\chi^2$  Пирсона, Фишера, параметрический однофакторный дисперсионный анализ (тест Шеффе), дискриминантный анализ. За критический уровень статистической значимости принимали вероятность безошибочного прогноза равную 95% ( $p < 0,05$ ) [4].

#### Результаты и обсуждение

Для выявления количественных признаков, имеющих наиболее существенные межгрупповые различия был проведен сравнительный анализ показателей клеточного иммунитета, концентраций цитокинов IFN-γ и IL-4, как важных составляющих в процессе воспаления при БА, а также показателей спирометрии.

Показатели ФВД у больных БА с разными уровнями контроля над заболеванием и практически здоровых лиц представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели функции внешнего дыхания у больных бронхиальной астмой с разными уровнями контроля над заболеванием и практически здоровых лиц.

| Параметр                               | Группа                               |   |                                    |                        |
|--|--------------------------------------|---|------------------------------------|------------------------|
|  | Больные с неконтролируемой БА (n=30) | Больные с частично контролируемой БА (n=20) | Больные с контролируемой БА (n=25) | Группа контроля (n=32) |
| ЖЕЛ, %, М ± m                          | 79 ± 3 *                             | 85 ± 5 **                                   | 103 ± 2                            | 105 ± 2                |
| ФЖЕЛ, %, М ± m                         | 68 ± 4 *                             | 80 ± 4 *                                    | 102 ± 2                            | 105 ± 2                |
| ОФВ <sub>1</sub> , %, М ± m            | 51 ± 3 ***                           | 66 ± 4 *                                    | 97 ± 2 §                           | 106 ± 2                |
| ОФВ <sub>1</sub> /ЖЕЛ, %, Me (25%-75%) | 51 (44-62) §§                        | 64 (58-75) **                               | 76 (71-82)                         | 80 (77-85)             |
| ОФВ <sub>1</sub> /ФЖЕЛ, %, М ± m       | 64 ± 3 *                             | 70 ± 2 **                                   | 81 ± 1 §                           | 88 ± 1                 |
| ПОСвыд, %, М ± m                       | 50 ± 3 *                             | 62 ± 4 *                                    | 92 ± 3                             | 94 ± 3                 |
| МОС <sub>25</sub> , %, М ± m           | 39 ± 4 *                             | 52 ± 5 *                                    | 89 ± 4                             | 99 ± 3                 |
| МОС <sub>50</sub> , %, М ± m           | 29 ± 3 *                             | 43 ± 5 *                                    | 79 ± 4 #                           | 101 ± 3                |
| МОС <sub>75</sub> , %, М ± m           | 25 (18-34) *                         | 36 (25-45) *                                | 60 (51-88) #                       | 94 (81-110)            |
| СОС <sub>2575</sub> , %, Me (25%-75%)  | 30 ± 3 §§                            | 47 ± 5 *                                    | 83 ± 4 #                           | 109 ± 2                |
| МВЛ, %, М ± m                          | 33 ± 2 *                             | 38 ± 3 ##                                   | 57 ± 4                             | 54 ± 3                 |

Примечания:

- \* -  $p < 0,001$  по сравнению с контролируемой БА и группой контроля;
- \*\* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролируемой БА и  $p < 0,001$  по сравнению с группой контроля;
- \*\*\* -  $p < 0,01$  по сравнению с частично контролируемой БА и  $p < 0,001$  по сравнению с контролируемой БА и группой контроля;
- § -  $p < 0,05$  по сравнению с группой контроля;
- §§ -  $p < 0,05$  по сравнению с частично контролируемой БА и  $p < 0,001$  по сравнению с контролируемой БА и группой контроля;
- # -  $p < 0,001$  по сравнению с группой контроля;
- ## -  $p < 0,01$  по сравнению с контролируемой БА и  $p < 0,05$  по сравнению с группой контроля.

Показатели клеточного иммунитета и концентрации цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-4 у практически здоровых лиц и больных БА с разными уровнями контроля над заболеванием представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели клеточного иммунитета и концентрации цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-4 у практически здоровых лиц и больных бронхиальной астмой с разными уровнями контроля над заболеванием

| Показатель   | Группа   |   |  |  |
|--|--|---|--|--|
|  | Неконтролируемая БА (n=21)<br>M ± m или Me (25%-75%) | Частично контролируемая БА (n=20)<br>M ± m или Me (25%-75%) | Контролируемая БА (n=21)<br>M ± m или Me (25%-75%) | Практически здоровые лица (n=30)<br>M ± m или Me (25%-75%) |
| T-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> , % клеток                                    | 67,78<br>(65,11 - 69,00)                             | 67,95<br>(66,81 - 70,27)                                    | 68,57<br>(66,05 - 72,23)                           | 68,49<br>(66,14 - 70,77)                                   |
| T-хелперы CD4 <sup>+</sup> , %   | 38,98<br>(37,25 - 41,77)                             | 38,07<br>(33,94 - 39,45)                                    | 40,61<br>(38,56 - 44,26)                           | 40,08<br>(36,93 - 41,72)                                   |
| T-цитотоксические CD8 <sup>+</sup> , %                                     | 23,45<br>(21,17 - 24,81)                             | 24,30<br>(22,67 - 27,16)                                    | 22,86<br>(20,74 - 24,26)                           | 23,55<br>(20,82 - 24,99)                                   |
| Активированные клетки CD25 <sup>+</sup> , %                                | 6,01<br>(5,46 - 7,35) ●                              | 7,39<br>(5,16 - 7,89) ●●                                    | 4,30<br>(3,45 - 5,15)                              | 5,49<br>(3,69 - 6,01)                                      |
| Естественные регуляторные Т-клетки CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> , % | 5,28 ± 0,21 ●●●                                      | 6,47 ± 0,29   | 6,42 ± 0,33  | 7,44 ± 0,30  |
| ИРИ  | 1,64 (1,48 - 1,84)                                   | 1,54 (1,38 - 1,77)  | 1,75 (1,63 - 1,89)                                 | 1,74 (1,61 - 1,85)   |
| Естественные киллеры CD16 <sup>+</sup> , %                                 | 14,23<br>(11,07 - 16,23)                             | 14,62<br>(13,25 - 16,80)                                    | 12,78<br>(9,69 - 15,16)                            | 14,08<br>(11,35 - 16,93)                                   |
| T-клетки с киллерной активностью CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , %    | 7,56 (4,80; 10,78)                                   | 7,67 (5,52; 9,30)   | 5,48 (3,27; 8,29)                                  | 5,06 (3,87; 8,91)  |
| IFN-γ, пг/мл   | 13,01 *<br>(11,01-16,3)                              | 14,62 *<br>(12,79-16,51)                                    | 12,77 *<br>(11,68-14,46)                           | 2,35<br>(1,44-3,99)  |
| IL-4, пг/мл  | 221,76 **<br>(191,29-277,45)                         | 141,79 ***<br>(121,63-170,00)                               | 95,17 *<br>(66,96-107,03)                          | 1,53<br>(0,96-1,99)  |
| IFN-γ/IL-4   | 0,061 **<br>(0,047-0,071)                            | 0,104 #<br>(0,084-0,120)                                    | 0,145 *<br>(0,109-0,202)                           | 1,44<br>(1,17-1,69)  |

Примечания:

- - p<0,05 по сравнению с контролируемой БА и группой практически здоровых лиц;
- - p<0,01 по сравнению с контролируемой БА и p<0,05 по сравнению с группой практически здоровых лиц;
- - p<0,05 по сравнению с частично контролируемой и контролируемой БА и p<0,001 по сравнению с группой практически здоровых лиц;
- \* - p<0,001 по сравнению с группой практически здоровых лиц;
- \*\* - p<0,001 по сравнению с частично контролируемой БА, контролируемой БА и группой практически здоровых лиц;
- \*\*\* - p<0,001 по сравнению с контролируемой БА и группой практически здоровых лиц;
- # - p<0,05 по сравнению с контролируемой БА и p<0,001 по сравнению с группой практически здоровых лиц.

С целью выявления наиболее информативных количественных признаков для отнесения пациента к одной из 3-х групп больных с разными уровнями контроля над БА выполнялся дискриминантный анализ. Поскольку результаты анализа трех групп планируется использовать для предсказания принадлежности новых членов к той или иной группе, проведение подобного исследования подразумевает наличие двух выборок: анализируемой и проверочной. Анализируемая выборка – это часть общей выборки, которая используется для

вычисления дискриминантной функции, в свою очередь проверочная выборка используется для проверки результатов расчета на основании анализируемой выборки. В нашем случае общий массив данных случайным образом был разбит на две части в отношении 80%:20%, одна служит анализируемой выборкой, другая используется для проверки. При этом разделение совокупности производится для каждой из анализируемых групп в указанном соотношении. Таким образом, тестовая выборка включила 12 пациентов, по 4 из каждой группы.

В качестве группирующей переменной выступал качественный признак, определяющий принадлежность пациента к одной из трех групп: 1 – «контролируемая БА», 2 – «частично контролируемая БА», 3 – «неконтролируемая БА». К независимым были отнесены признаки, имеющие групповые различия по результатам t-критерия

Стьюдента или критерия Манна-Уитни: показатель ОВФ1 (%), показатели процентного

содержания в крови CD25+-, CD4+CD25hi-клеток, показатель концентрации IL-4.

В результате выполнения дискриминантного анализа получены следующие основные

параметры вычислительной процедуры: количество переменных в модели – 4, значение статистики Уилкса  $\lambda=0,29042$ , приближенное значение статистики F-критерия, соответствующее  $\lambda$  Уилкса  $F(8,84) = 8,9841$  и рассчитанный для него уровень значимости  $p<0,001$ , что свидетельствует о приемлемом качестве дискриминации. В качестве проверки корректности анализируемой выборки оценивались результаты матрицы классификации, приведенные в таблице 3.

Таблица 3 – Матрица классификации (число и доля объектов исследования)

|          | % правильной классификации | группа 1<br>$p=0,31373$ | группа 2<br>$p=0,47059$ | группа 3<br>$p=0,21569$ |
|----------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| группа 1 | 87,50000                   | 14                      | 1                       | 1                       |
| группа 2 | 68,75000                   | 2                       | 11                      | 3                       |
| группа 3 | 81,25000                   | 0                       | 3                       | 13                      |
| Всего    | 79,16666                   | 16                      | 15                      | 17                      |

Из классификационной матрицы следует вывод, что 10 из 48 объектов были неправильно отнесены к соответствующим группам. В этой связи возникает задача получения корректной обучающей выборки путем исключения из нее тех объектов, которые по своим показателям не соответствуют большинству объектов, образующих однородную группу. Для этого с помощью метрики Махаланобиса определяется расстояние от всех объектов до центра тяжести каждой группы (вектор средних), определяемых по анализируемой выборке. Отнесение  $i$ -го объекта в  $j$ -ую группу считается ошибочным, если расстояние Махаланобиса от объекта до центра его группы значительно выше, чем от него до центра других групп, а апостериорная вероятность попадания в свою группу ниже критического значения. В этом случае объект считается некорректно отнесенным и должен быть исключен из выборки. Процедура исключения наблюдений продолжается до тех пор, пока общий коэффициент корректности в классификационной

матрице не достигнет 100%, то есть все наблюдения анализируемой выборки будут

правильно отнесены к соответствующим группам.

В таблице 4 приведена статистика переменных, содержащихся в модели, после ее уточнения.

Таблица 4 – Итоговая таблица анализа дискриминантных функций после уточнения модели

статистика Уилкса  $\lambda = 0,09686$ ,  $F(8,64)=17,705$   $p<0,001$

|   | Статистика Уилкса | Частная статистика Уилкса | F-отношение (2,32) | p-уровень | толерантность | 1-толерантность (R-квадрат) |
|---|-------------------|---------------------------|--------------------|-----------|---------------|-----------------------------|
| <b>IL-4</b>                             | 0,176533          | 0,548693                  | 13,16022           | 0,000067  | 0,916492      | 0,083508                    |
| <b>ОФВ<sub>1</sub></b>                  | 0,157327          | 0,615677                  | 9,98763            | 0,000426  | 0,882247      | 0,117753                    |
| <b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup></b> | 0,136607          | 0,709058                  | 6,56517            | 0,004082  | 0,870390      | 0,129610                    |
| <b>CD25<sup>+</sup></b>                 | 0,130259          | 0,743614                  | 5,51653            | 0,008741  | 0,969130      | 0,030870                    |

Поскольку в нашем случае имеется три группы, то в процессе анализа могут быть вычислены две дискриминантные функции и, в дальнейшем, выполнен канонический анализ для более детальной их оценки.

В таблице 5 приведены показатели, характеризующие значимость полученных дискриминантных функций.

Таблица 5 – Значимость дискриминантных функций

| Корни      | Собственное значение | Коэффициент канонической корреляции | Статистика Уилкса | Статистика $\chi^2$ | p-уровень |
|------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|-----------|
| <b>Все</b> | 5,844772             | 0,924069                            | 0,096862          | 78,20454            | 0,000000  |
| <b>2</b>   | 0,508293             | 0,580516                            | 0,663001          | 13,76779            | 0,003239  |

Как следует из таблицы 5, обе функции статистически значимы на уровне  $p<0,01$ .

Первая строка таблицы показывает значимость всех корней (дискриминантных функций), вторая – оставшихся после удаления первого (наиболее значимого) корня. Коэффициент канонической корреляции показывает, какая доля дисперсии зависимой переменной может быть объяснена полученной моделью. В данном случае доля объясненной дисперсии для всех корней составляет 92%, только для второго корня – 58%.

Анализ стандартизованных коэффициентов дискриминантных функций (табл. б) показывает, что наибольший вклад в дискриминантную функцию 1 вносят признаки IL-4,

ОФВ1 и CD4+CD25hi, в дискриминантную функцию 2 – CD25+.

Таблица 6 – Стандартизованные коэффициенты дискриминантных функций

|  | <b>Корень 1</b>  | <b>Корень 2</b>  |
|--|------------------|------------------|
| <b>IL-4</b>                                    | <b>0,689753</b>  | <b>-0,505687</b> |
| <b>ОФВ<sub>1</sub></b>                         | <b>-0,649998</b> | <b>-0,471271</b> |
| <b>CD4+CD25<sup>hi</sup></b>                   | <b>-0,581056</b> | <b>0,369325</b>  |
| <b>CD25<sup>+</sup></b>                        | <b>0,228493</b>  | <b>0,807921</b>  |
| <b>Собственное значение</b>                    | <b>5,844772</b>  | <b>0,508293</b>  |
| <b>Кумулятивная доля объясненной дисперсии</b> | <b>0,919992</b>  | <b>1,000000</b>  |

Повторную классификацию объектов, не попавших в анализируемую выборку, можно проводить на основе полученных дискриминантных функций:

где X1 – показатель IL-4;

X2 – показатель ОФВ1;

X3 – показатель CD4+CD25<sup>hi</sup>;

X4 – показатель CD25<sup>+</sup>.

С помощью этих функций можно будет в дальнейшем классифицировать новые случаи. Новые объекты будут относиться к той группе, для которой классифицированное значение будет максимальным.

При определении принадлежности объектов тестовой выборки к выделенным группам при помощи рассчитанных классификационных функций установлено, что все 12 объектов тестовой выборки были правильно отнесены к соответствующей группе.

Таким образом, приведенные функции могут быть использованы для дальнейшего применения, как обеспечивающие общую вероятность верной классификации 100%.

## Выводы

1. Неконтролируемая БА характеризуется снижением содержания в крови естественных регуляторных Т-клеток (CD4+CD25<sup>hi</sup>), повышением концентрации IL-4, снижением соотношения концентраций IFN- $\gamma$ /IL-4 и ОФВ1 (%) по сравнению с частично контролируемой, контролируемой БА и группой контроля, а также повышением содержания активированных клеток (CD25<sup>+</sup>) по сравнению с контролируемой БА и группой контроля. Для частично контролируемой БА характерно повышение содержания CD25<sup>+</sup>-клеток и концентрации IL-4, а также снижение соотношения концентраций IFN- $\gamma$ /IL-4 и ОФВ1 (%) по сравнению с контролируемой БА и группой контроля. Контролируемая БА характеризуется отсутствием статистически значимых различий по уровню CD4+CD25<sup>hi</sup>- и CD25<sup>+</sup>-клеток от группы контроля, повышением концентрации IL-4 и снижением соотношения концентраций IFN- $\gamma$ /IL-4 и ОФВ1 (%) по сравнению с группой контроля.
2. Количественными критериями для определения уровня контроля над бронхиальной астмой являются показатели концентрации IL-4 в сыворотке крови, ОФВ1 (%), процентного содержания в крови естественных регуляторных Т-клеток (CD4+CD25<sup>hi</sup>) и активированных клеток (CD25<sup>+</sup>), как вносящие

наибольший вклад в дискриминантные функции (общая вероятность верной классификации 100%).

#### Литература

1. Белевский, А. С. Взгляд на пациента с точки зрения пациента: исследование INSPIRE / А. С. Белевский // *Consilium medicum*. 2007. № 3. С. 40–44.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Пересмотр 2006 г. / под ред. А. Г. Чучалина. М.: «Атмосфера», 2007. 104 с.
3. Ненашева, Н. М. Контроль над БА и возможности его достижения / Н. М. Ненашева // *Пульмонология*. 2008. № 3. С. 91–96.
4. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. М.: Медиасфера, 2002. 312 с.
5. Чучалин, А. Г. Бронхиальная астма в России: результаты национального исследования качества медицинской помощи больным бронхиальной астмой / А. Г. Чучалин [и др.] // *Пульмонология*. 2006. № 6. С. 94–102.
6. Partridge, M. R. Attitudes and actions of asthma patients on regular maintenance therapy: the INSPIRE study / M. R. Partridge [et al.] // *BMC Pulm. Med.* 2006. № 6. P. 13.