



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 12.07.2021)
Пошлина: учтена за 6 год с 12.01.2017 по 11.01.2018. Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2012101127/15](#), 11.01.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.01.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.01.2012

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2013 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: [27.10.2013](#) Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2120635 С1, 20.10.1998. ГОРЕМЫКИН К.В. и др. Секрция паракринных факторов стимулированными аналогом аденозина дендритными клетками человека. Сборник статей XII Российского Конгресса Молодых ученых с международным участием "Науки о человеке". Томск: СибГМУ, 26-27 мая 2011 г.С.21-23 [Найдено 07.05.2013] [он-лайн], Найдено из Интернет: URL:

<http://www.tele-conf.ru/files/KSNM/KSNM-2011.pdf>. NOVITSKIY S.V. et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. Blood. 2008 Sep 1; 112(5):1822-1831. Epub 2008 Jun 17 [Найдено 07.05.2013] [он-лайн], Найдено из Интернет: URL: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/112/5/1822.full.pdf+html>. МАЧАРАДЗЕ Д.Ш. Дифференциальная диагностика тяжелой бронхиальной астмы у детей. Лечащий врач; 2002, 9:20-24 [Найдено 07.05.2013] [он-лайн], Найдено из Интернет: URL: <http://www.lvrach.ru/2002/09/4529640/>. US 2003099979 A1, 29.05.2003.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, Московский тракт, 2, ГБОУ ВПО СибГМУ, Отдел ИС и В, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):

Рыжов Сергей Вячеславович (US),
Сазонов Алексей Эдуардович (RU),
Юрьева Ксения Сергеевна (RU),
Горемыкин Константин Викторович (RU),
Короткая Елена Владимировна (RU),
Салтыкова Ирина Владимировна (RU),
Яковлева Юлия Андреевна (RU),
Куликов Евгений Сергеевич (RU),
Федорова Ольга Сергеевна (RU),
Кремер Елена Эдуардовна (RU),
Огородова Людмила Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации" (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России) (RU)

(54) СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ дифференциальной диагностики тяжелой бронхиальной астмы, включающий определение вентиляционной функции легких и исследование мононуклеаров, выделенных из венозной крови больного, с последующим расчетом индекса, характеризующего воспалительный процесс. Моноциты культивируют в дендритные клетки. К половине культур добавляют N-этилкарбоксамидоаденозин (NECA). Полученные дендритные клетки собирают и анализируют на содержание мРНК ИЛ-8 при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Выполняют расчет вероятности Р отнесения индивида к группе больных тяжелой бронхиальной астмой по системе уравнений. При $P > 0,5$ диагностируют тяжелую бронхиальную астму. Изобретение позволяет дифференцировать тяжелую бронхиальную астму от бронхиальной астмы других степеней тяжести. 4 ил., 2 табл., 3 пр.

Изобретение относится к области медицины, а именно к клинической иммунологии, и может быть использовано для дифференциальной диагностики тяжелой бронхиальной астмы (БА).

Несмотря на детальную разработку представлений о клинических признаках и вариантах течения тяжелой БА, до сих пор остаются неизвестными механизмы,

обуславливающие клинические особенности течения тяжелых форм БА и различный ответ на терапию.

Тяжелая БА является гетерогенным заболеванием, в структуре которого выделяют несколько клинических вариантов течения (фенотипов), существенно различающихся по клинической характеристике. Необходимо подчеркнуть, что ввиду недостатка фундаментальных знаний, классификация тяжелой астмы основывается на клинических признаках, а не на определенных патофизиологических либо генетических механизмах.

В настоящее время активно исследуются отдельные клетки - продуценты медиаторов воспаления, играющие основные роли в развитии и поддержании воспаления при бронхиальной астме: тучные клетки, дендритные клетки, эозинофилы, нейтрофилы (1).

Известен способ диагностики степени тяжести БА у детей (в период обострения).

Способ основан на определении прокагулянтной активности плазменных фосфолипидных мембран крови. В случае, если каолиновое время свертывания составляет $123,8 \pm 4,6$ с, диагностируют тяжелую БА (RU №2265854 опубл. 10.12.2005). Данный способ обладает ограниченной областью применения, так как определены критерии для его использования только у детей. Также, известный способ обладает недостаточной чувствительностью и информативностью.

Известен способ оценки степени тяжести БА, основанный на сочетанной оценке клинических признаков синдрома вегетативной дистонии, вторичного иммунодефицита, определения содержания иммуноглобулина класса Е в сыворотке крови. При наличии симпатoadреналовой формы синдрома вегетативной дистонии, комбинированного Т-клеточно-моноцитарного иммунодефицита диагностируют тяжелую форму БА (RU №2268001 опубл. 20.01.2006).

Известен способ, позволяющий сделать оценку степени тяжести БА за счет сопоставления показателей бронхиальной проходимости и обратимости бронхиальной обструкции при их мониторинге. Оценка проходимости бронхиального дерева проводили по данным пикфлоуметрической кривой; оценку бронхиальной обструкции - путем измерения пиковой скорости выдоха (ПСВ) до употребления бронхолитика и через 30 минут после употребления бронхолитика. Затем полученные значения величин заносили в формулу, по которой вычисляли индекс. Если индекс достигал порогового значения, диагностировали тяжелую БА (RU №2348352, опубл. 10.03.2009).

Наиболее близким к предлагаемому является способ дифференциальной диагностики БА. Способ заключается в том, что определяют соотношение количества теofilлинрезистентных лимфоцитов к количеству теofilлинчувствительных лимфоцитов в нагрузочном тесте с теofilлином, а также оценивают уровень сывороточных иммуноглобулинов классов G, A, M. Рассчитывают суммарный индекс, включающий все эти факторы, и при его превышении относительно порогового значения, диагностируют тяжелую БА (RU №2120635, опубл. 20.10.1998).

Однако недостатком известных способов является их недостаточная точность и информативность, обусловленная тем, что не учитывается чувствительность дендритных клеток (ДК) к действию аденозина.

Новая техническая задача - повышение точности, информативности и чувствительности способа.

Для решения поставленной задачи в способе дифференциальной диагностики тяжелой бронхиальной астмы, включающем определение вентиляционной функции легких и исследование мононуклеаров, выделенных из венозной крови больного, с последующим расчетом индекса, характеризующего воспалительный процесс, исследуют моноциты, для чего их культивируют в дендритные клетки, при этом к половине культур добавляют N-этилкарбоксамидоаденозин (NECA), далее, при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией определяют уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных и не стимулированных NECA, после этого выполняют расчет вероятности Р отнесения индивида к группе больных тяжелой БА по системе уравнений:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

где [мРНК ИЛ-8 с NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β-актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β-актина в этих клетках, И при $P > 0,5$ диагностируют тяжелую бронхиальную астму.

В научно-технической литературе отсутствуют данные об исследованиях, в результате которых были бы установлены взаимосвязи между наличием у больных

БА моноцитов или ДК, модифицируемых аденозином или же каким-либо из его аналогов и формированием тяжелой БА. Также, не обнаружено предлагаемой совокупности признаков для дифференциальной диагностики тяжелой БА. Таким образом, изобретение соответствует критериям «новизна» и «существенные отличия».

Способ апробирован в клинических условиях и, таким образом, соответствует критерию «промышленная применимость».

Способ осуществляют следующим образом.

У индивида, для которого проводят определение степени тяжести БА:

1. Проводят спирометрическое определение величины ОФВ1 (7).

2. Проводят забор 20 мл крови из локтевой вены. Из крови выделяют мононуклеары при помощи фикола (8). Затем из полученной массы мононуклеаров получают моноциты на двойном градиенте перколла (9). Моноциты культивируют в дендритные клетки, как было описано ранее (6). При этом к половине культур добавляют НЕСА в концентрации 30 мкМ (6). Полученные ДК собирают и анализируют на содержание мРНК ИЛ-8 при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (Ю).

3. Определяют индекс, численно равный вероятности Р отнесения индивида к группе больных тяжелой БА. Для этого производят расчет по системе уравнений:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

где [мРНК ИЛ-8 с НЕСА, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных НЕСА, выраженный в % от уровня β-актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без НЕСА, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не стимулированных НЕСА, выраженный в % от уровня β-актина в этих клетках.

При $P > 0,5$ диагностируют тяжелую бронхиальную астму.

Предпосылками создания предлагаемого способа дифференциальной диагностики тяжелой БА послужили проведенные исследования последних лет, которые свидетельствовали о том, что одна из ведущих ролей в генерации первичного иммунного ответа при БА и развитии легочного воспаления принадлежит дендритным клеткам (ДК) (3, 4). Эндогенный метаболит аденозин оказывает на дендритные клетки ряд эффектов, которые, в том числе, могут опосредовать тяжелое течение БА (5, 6). Действие аденозина на клетки, как правило, исследуют с использованием его метаболически стабильного аналога - N-этилкарбоксамидоаденозина (НЕСА).

Знание механизмов развития БА в настоящее время является недостаточным для разработки лекарственных препаратов селективного действия, способных помочь больным с некоторыми тяжелыми разновидностями БА, в частности, больным стероид-резистентной БА. Существует предположение, что аденозин может быть ключевым участником патологических процессов, приводящих к стероид-резистентности. Возможно, что аденозин опосредует стероид-резистентность не у всех пациентов, но у значительного их числа. В настоящее время уже ведется разработка лекарственных препаратов - селективных антагонистов аденозина (аденозиновых рецепторов), потенциально способных помочь при бронхиальной астме. Необходимо было разработать способ, позволяющий дифференцировать тяжелую БА от легкой и среднетяжелой на основании чувствительности пациента к аденозину. Удобным объектом исследования для определения степени чувствительности к аденозину могут стать дендритные клетки.

Предлагаемый способ основан на анализе данных клинических наблюдений.

Всего было обследовано 26 человек обоего пола в возрасте от 18 до 50 лет, проживающих г.Томске и Томской области.

Исследуемые были разбиты на группы:

1 - больные легкой и среднетяжелой БА (n=13);

2 - больные тяжелой БА (n=13);

Примечание:

Фармакотерапевтические режимы согласно степени тяжести заболевания:

* - Легкая степень тяжести: ФП - 250 мкг/сут по ФП

** - Средняя степень тяжести: Сальметерол/ФП - 500 мкг/сут по ФП

*** - Тяжелая астма: Сальметерол/ФП - 1000 мкг/сут по ФП

Пациенты включались в исследование при условии соответствия следующим критериям:

Критерии включения в обе группы:

- возраст пациентов от 18 до 50 лет, обоего пола;

- Получение от исследуемого до участия в исследовании письменного информированного согласия, подписанного с указанием даты;

Критерии включения в группу 1 (больные легкой и среднетяжелой БА):

- документированные сведения об обратимости обструкции при проведении пробы

с β_2 -агонистом $\geq 15\%$;

- пациенты с установленным диагнозом бронхиальная астма легкой или средней степени тяжести, подтвержденным данными медицинской документации, а также данными: анамнеза, клинических симптомов, физикальных, инструментальных методов обследования - компьютерная спирография и проба с бронхолитиком, пикфлоуметрия в соответствии с формулярной системой и рекомендациями версии GINA 2006 г.:

- легкое персистирующее течение (симптомы 1-3 раза в месяц; ночные симптомы 0-1 раз в месяц; ОФВ₁ (ПСВ) $>70-80\%$; суточная лабильность бронхов 0-20%);

- среднетяжелое персистирующее течение (симптомы >1 раза в неделю, но не ежедневно; ночные симптомы 1-2 раза в неделю; ОФВ (ПСВ) 60-80%; суточная лабильность бронхов 20-30%);

- подтвержденный ранее синдром атопии (отягощенный семейный атопический анамнез, уровень IgE сыворотки крови >100 МЕ/мл, положительные результаты кожного аллерготестирования);

- отсутствие обострений БА в течение 4-х недель до визита;

- отсутствие острых респираторных заболеваний в течение 4-х недель до визита.

Критерии включения в группу 2 (больные БА тяжелой степени тяжести):

- пациенты с установленным диагнозом бронхиальная астма тяжелой степени, подтвержденным данными медицинской документации, а также данными: анамнеза, клинических симптомов, физикальных, инструментальных методов обследования (компьютерная спирография и проба с бронхолитиком, пикфлоуметрия) в соответствии с формулярной системой и рекомендациями версии GINA 2006 г.

(симптомы несколько раз в неделю; ночные симптомы ежедневно; ОФВ (ПСВ) $<60\%$; суточная лабильность бронхов $>30\%$);

- документированные сведения об обратимости обструкции при проведении пробы с β_2 -агонистом $\geq 15\%$;

- отсутствие обострений БА в течение 4-х недель до визита;

- отсутствие острых респираторных заболеваний в течение 4-х недель до визита.

Критерии исключения для обеих групп:

- несогласие пациентов участвовать в исследовании;

- больные другими заболеваниями бронхолегочной системы: хроническая обструктивная болезнь легких, дефицит α_1 -антитрипсина, бронхэктатическая болезнь, буллезная эмфизема легких, кисты легких (по данным анамнеза);

- больные с тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, которые, по мнению исследователя, могут повлиять на результаты исследования;

- наличие психических заболеваний;

- потенциальная опасность от проведения функциональных тестов и инструментального обследования (по мнению врача исследователя),

- неспособность больного правильно осуществлять ингаляции исследуемого препарата, самостоятельно проводить пикфлоуметрию и заполнять дневник самонаблюдения;

- использование препаратов, эффект которых может повлиять на эффективность терапии астмы (например β -блокаторы, ингибиторы АПФ, НПВП и т.п., по мнению врача исследователя).

- Длительная (с общей продолжительностью всех эпизодов не менее 1 мес) терапия системными кортикостероидами в любой дозе в течение 6 мес перед включением в исследование и в любое время в течение исследования.

У всех обследуемых забирали по 20 мл крови из локтевой вены при помощи систем вакуумного забора крови «Vacutest КИМА» с гепаринатом лития, по 9 мл каждая («КИМА», Италия). Из крови на градиенте Фиколла выделяли мононуклеарные клетки крови (8); затем из их массы выделяли моноциты на градиенте Перколл (9).

Процентное содержание CD14⁺ клеток (моноцитов) в выделенной фракции оценивали при помощи проточного цитофлюориметра FACSCalibur. Моноциты дифференцировали в дендритные клетки в среде RPMI-1640, содержащей 10% ЭБС («Sigma-Aldrich», США), 50 мкМ β -меркаптоэтанол («Sigma-Aldrich», США), 2 мМ L-глутамин («Панэко», Россия), 50000 ед./литр пенициллина («Панэко», Россия), 50 мг/л стрептомицина («Панэко», Россия), 11 мг/л пирувата натрия («Панэко», Россия) с добавлением ИЛ-4 и ГМ-КСФ (6). К половине культур также добавляли аналог аденозина (NECA). По прошествии 38 часов культивирования дендритные клетки анализировали на уровни экспрессии поверхностных маркеров: CD1a, CD14, CD209 при помощи проточной цитофлюориметрии (6); оценивали содержание мРНК аденозинового рецептора типа A_{2A}, а также мРНК интерлейкина 8 (ИЛ-8) с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (10) с обратной транскрипцией (12). Супернатанты, собранные с культур, анализировали на содержание белка фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (13).

Также, проводился объективный осмотр больных БА, сбор анамнеза, клиническое

и аллергологическое обследование, лабораторная диагностика, исследование функции внешнего дыхания.

Обработка первичных данных, полученных в результате клинико-лабораторного и инструментального обследования людей, страдающих бронхиальной астмой, а также первичных данных, полученных в результате лабораторного исследования дендритных клеток, равно как и полученных при компьютерном моделировании, производилась в пакете статистических программ "SPSS 17.0". Для проверки нормальности распределения всех анализируемых случайных величин использовался критерий Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В случае соответствия распределения нормальному выборочные средние независимых выборок сравнивались по непарному Т-критерию Стьюдента, выборочные средние зависимых выборок сравнивались при помощи парного Т-критерия Стьюдента. В случае, когда между собой сравнивались 3 независимые выборки, вначале использовался однофакторный дисперсионный анализ. В случае обнаружения статистически значимых различий между выборками использовался непарный t-критерий Стьюдента (14). Независимые случайные величины, не распределенные по нормальному закону, сравнивались при помощи U-критерия Манна-Уитни; зависимые случайные величины, не распределенные по нормальному закону, сравнивались при помощи критерия Вилкоксона. В случае, когда между собой сравнивались 3 независимые выборки, использовался критерий Краскела-Уоллиса. В случае обнаружения статистически значимых различий между выборками использовался U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (14).

Характеристика больных по возрасту и по результатам исследования функции внешнего дыхания представлена в Таблице 1. Между группами больных различий по возрасту и стажу заболевания обнаружено не было, при этом отличия имелись по:

количеству дневных симптомов за последние 7 дней, количеству ночных симптомов за последние 7 дней, а также таким функциональным характеристикам, как объем форсированного выдоха за первую секунду, пиковая скорость выдоха, форсированная жизненная емкость легких, мгновенная объемная скорость 25, мгновенная объемная скорость 50, мгновенная объемная скорость 75 (Табл.1).

Было принято решение применить в критерии, используемом для дифференцировки тяжелой БА, одну из вышеуказанных функциональных характеристик. При этом, исходя из факта, что эндогенный метаболит аденозин оказывает на дендритные клетки ряд эффектов (которые, в том числе, могут опосредовать тяжелое течение БА), также, было решено использовать индекс, вычисляемый на основе более чем одного фактора. С целью повышения точности и информативности способа было принято решение ввести фактор, учитывающий влияние аденозина на тяжесть течения БА.

При культивировании моноцитов в среде с добавлением ИЛ-4 и ГМ-КСФ в течение 38 часов они дифференцировались в ДК с преобладающим фенотипом $CD1a^+CD14^+CD209^+$. Известно, что при многих заболеваниях с воспалительным компонентом (в том числе при БА) в тканях наблюдаются повышенные концентрации аденозина (5). Добавление метаболически стабильного аналога аденозина (NECA) при культивировании ДК приводило к появлению у части из них альтернативного фенотипа $CD1a^{-low}CD14^+CD209^+$ (Фиг.1), что согласуется с проведенными ранее исследованиями на ДК с большим сроком культивирования (5-6 суток) (Novitskiy, 2008). Было показано, что ДК с таким фенотипом характеризуются повышенной секрецией ИЛ-6, ИЛ-8, ФРЭС (Novitskiy, 2008). Этот феномен наблюдался и в нашем исследовании уже после 38 часов культивирования.

При этом наблюдался также и эффект NECA на изменение фенотипа: наблюдалось статистически значимое повышение процентного содержания клеток с фенотипом $CD1a^{-low}CD14^+CD209^+$ под действием этого аналога аденозина в группах сравнения (Фиг.1).

Однако, между сравниваемыми группами различий в количестве клеток с фенотипом $CD1a^{-low}CD14^+CD209^+$ не наблюдалось, как без стимуляции, так и при стимуляции NECA (Фиг.1). Поэтому очевидно, что процентное содержание клеток с фенотипом $CD1a^{-low}CD14^+CD209^+$ не может служить критерием, на основании которого было бы возможно дифференцировать больных тяжелой бронхиальной астмой от больных астмой легкой и средней степеней.

В данном исследовании анализировали, также, количества мРНК аденозиновых рецепторов, содержащихся в дендритных клетках. Следует отметить, что под действием NECA уровень мРНК AP типа *aza* повышался в ДК больных БА - как легкой и средней, так и тяжелой степени (Фиг.2). Повышение уровня мРНК AP типа A_{2A} (в группах 1 и 2 - у обследуемых с активно протекающим воспалительным процессом при БА) под действием аналога аденозина NECA обнаружено впервые. При этом различий между группами легкой, среднетяжелой БА и тяжелой БА не наблюдалось. По этой причине был сделан вывод, что на основании количественного содержания мРНК AP типа *Azd* дифференцировать тяжелую БА не удастся.

Секреция фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) без стимуляции NECA была невысока в обеих исследуемых группах и колебалась в пределах 0,01-0,35 нг/мл. Стимуляция NECA приводила к многократному увеличению секреции ФРЭС - до 0,1-0,65 нг/мл (Фиг.3), на основании чего был сделан вывод о том, что для дифференциальной диагностики тяжелой БА этот показатель не годится, так как между группами различий по нему не наблюдалось.

Концентрация мРНК ИЛ-8 в ДК в нашем исследовании под действием аналога аденозина повышалась в группе больных легкой и среднетяжелой БА, но не в группе больных тяжелой БА, где наблюдалось слабое понижение (Фиг.4). Это может свидетельствовать о принципиально разных реакциях на аналог аденозина ДК, полученных от больных легкой и среднетяжелой БА, и ДК, полученных от практически здоровых людей.

Кроме того, при вычислении разницы концентраций мРНК ИЛ-8 в ДК при стимуляции NECA и без стимуляции NECA по формуле:

$$\Delta[\text{мРНК ИЛ-8, \%}] = [\text{мРНК ИЛ-8 с NRCA, \%}] - [\text{мРНК ИЛ-8 без NECA, \%}],$$

где [мРНК ИЛ-8 с NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках,

было обнаружено, что различия между обследуемыми с тяжелой БА и легкой или среднетяжелой БА по данному показателю $\Delta[\text{мРНК ИЛ-8, \%}]$ достоверны при уровне статистической значимости $\beta < 0,05$ (Табл.2).

В группе обследуемых с бронхиальной астмой легкой и средней степени (группа 1) ($n=13$), а разность количества мРНК ИЛ-8 с NECA и без NECA (выраженного в % от количества β -актина) - в пределах $7,33 \pm 2,88$. У обследуемых с бронхиальной астмой тяжелой степени (группа 2) ($n=13$), а разность количества мРНК ИЛ-8 с NECA и без NECA (в % от β -актина) составило - $3,58 \pm 4,60$.

Таким образом, был составлен список показателей - кандидатов на включение в уравнение для расчета индекса, позволяющего дифференцировать тяжелую БА. В список вошли: количество дневных симптомов за последние 7 дней, количество ночных симптомов за последние 7 дней; функциональные характеристики: объем форсированного выдоха за первую секунду, пиковая скорость выдоха, форсированная жизненная емкость легких, мгновенная объемная скорость 25, мгновенная объемная скорость 50, мгновенная объемная скорость 75; а также показатель, характеризующий вклад действия аденозина на ДК в патогенез БА - разность количества мРНК ИЛ-8 с NECA и без NECA. Далее был проведен логистический регрессионный анализ - для выбора из числа этих показателей группы показателей, позволяющих рассчитывать индекс, свидетельствующий об интенсивности воспалительного процесса, а также для составления из них уравнений по расчету этого индикатора и подбора коэффициентов в эти уравнения.

В результате регрессионного анализа из списка показателей - кандидатов на включение в уравнение для расчета индекса, позволяющего дифференцировать тяжелую БА, были последовательно исключены все показатели, за исключением ОФВ1 и $\Delta[\text{мРНК ИЛ-8, \%}]$. Были также составлены уравнения для расчета вышеуказанного индекса, подобраны коэффициенты.

В итоге была получена система уравнений:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

где [мРНК ИЛ-8 с NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках, при $P > 0,5$ диагностируют тяжелую бронхиальную астму.

При выполнении научных исследований было установлено, что ДК моноцитарного происхождения, полученные от больных тяжелой БА, отличаются от ДК, полученных от больных легкой и среднетяжелой БА, по изменению уровня мРНК интерлейкина 8 (ИЛ-8) под действием аналога аденозина - NECA. На основании анализа результатов научных исследований был сделан вывод о том, что дифференциальная диагностика тяжелой БА может проводиться на основе совместного определения величины объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ1) (это один из традиционно применяемых критериев для определения степени тяжести БА) при помощи спирометрии и величины изменения уровня мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках моноцитарного происхождения в ответ на стимуляцию аналогом аденозина - NECA при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Коэффициенты подобраны на основании анализа данных клинических и лабораторных исследований пациентов, проведенных на базе ГБОУ ВПО СибГМУ

Минздравсоцразвития России, с помощью логистического регрессионного анализа.

Также, были проведены исследования для установления чувствительности и специфичности предлагаемого способа диагностики тяжелой бронхиальной астмы (табл.2).

В таблице 2 представлены данные, отображающие доли истинно положительных и истинно отрицательных, а также ложноположительных и ложноотрицательных случаев.

На основании данных таблицы 2 были вычислены чувствительность и специфичность предложенного способа.

Чувствительность = Число истинно положительных случаев / (Число истинно положительных случаев + Число ложноотрицательных случаев) = $12/12+1=12/13=0,923=92,3\%$

Специфичность = Число истинно отрицательных случаев / (Число истинно отрицательных случаев + Число ложноположительных случаев) = $12/12+1=12/13=0,923=92,3\%$

Таким образом, предлагаемый способ обладает высокой чувствительностью (92,3%) и высокой специфичностью (92,3%).

Примеры выполнения способа.

Пример 1

Больной М., 35 лет, поступил в клинику с жалобами на приступы удушья, типичные для бронхиальной астмы, примерно 1 раз в неделю. Впервые симптомы появились 2 года назад в середине июля и сохранялись до конца августа. К врачам не обращался, лечился самостоятельно. Год назад к симптомам присоединились кашель и одышка. Предположено, что пациент страдает от бронхиальной астмы. Была проведена спирометрия (ОФВ1=82%), а также забор крови с выделением моноцитов и их последующим культивированием в дендритные клетки в присутствии NECA и без NECA. Затем определили содержание мРНК ИЛ-8 в этих дендритных клетках. В стимулированных NECA клетках уровень мРНК ИЛ-8 составил 10,34% от уровня β -актина, в не стимулированных 4,29%.

Полученные данные применили для расчета по формуле:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

где [мРНК ИЛ-8 с NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках.

Расчет показал отсутствие тяжелой бронхиальной астмы ($P=0,179$, т.е. $P<0,5$). На основании критериев GINA (Global Initiative for Asthma, 2006) (ОФВ1=82% от должного, увеличение ОФВ1 при пробе с бронхолитиком = 21%, суточная лабильность бронхов в пределах 20%, симптомы не чаще 3 раз в месяц) был поставлен диагноз: бронхиальная астма легкой степени тяжести, персистирующее неконтролируемое течение.

Пример 2

Больной К., 31 год, наблюдается в течение 3 лет с диагнозом: бронхиальная астма смешанного генеза средней степени тяжести. Госпитализирован по причине обострения в связи с острой респираторной вирусной инфекцией с жалобами на приступы удушья, повторяющиеся многократно в течение суток и частично купируемые ингаляторными β -адреномиметиками, нарушение сна из-за приступов, повышенное потоотделение, общую слабость.

Обследование согласно рекомендациям GINA (11) проведено на второй день пребывания в стационаре. Было определено наличие бронхиальной астмы средней степени тяжести, как и при первом обращении пациента к врачу (ОФВ1=64% от должного, увеличение ОФВ1 при пробе с бронхолитиком = 17%, суточная лабильность бронхов в пределах 30%). Параллельно был взят образец крови для выделения моноцитов и культивирования дендритных клеток для определения их реакции на NECA. В стимулированных NECA клетках уровень мРНК ИЛ-8 составил 3,91% от уровня β -актина, в не стимулированных 14,12%. Далее был проведен расчет по формуле:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

где [мРНК ИЛ-8 с NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не

стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках.

Расчет показал наличие тяжелой бронхиальной астмы ($P=0,998$, т.е. $P>0,5$). Было повторно проведено обследование согласно рекомендациям GINA (ОФВ1=59% от должного, увеличение ОФВ1 при пробе с бронхолитиком = 17%, суточная лабильность бронхов более 30%), был поставлен диагноз: бронхиальная астма смешанного генеза, тяжелое неконтролируемое течение, назначено соответствующее лечение.

Пример 3

Больная А., 48 лет. Наблюдается в течение 8 лет с диагнозом: бронхиальная астма смешанного генеза, тяжелое неконтролируемое течение. Присутствует хронический бронхит, а также поллиноз (аллерген - пыльца деревьев). При поступлении предъявляла жалобы на малопродуктивный приступообразный кашель, приступы затрудненного дыхания до 10 раз в сутки, одышку, потливость, заложенность носа, ринорею. Первые приступы затрудненного дыхания появились 10 лет назад. В настоящее время отмечает учащение приступов затрудненного дыхания, выраженную одышку при физической нагрузке, приступообразный кашель, заложенность носа.

Была проведена спирометрия (ОФВ1=56% от должного), а также забор крови с выделением моноцитов и их последующим культивированием в дендритные клетки в присутствии и NECA и без NECA. В стимулированных NECA клетках уровень мРНК ИЛ-8 составил 1,45% от уровня β -актина, в не стимулированных 5,27% ($\Delta[\text{мРНК ИЛ-8, \%}] = -3,82\%$).

Полученные данные применили для расчета по формуле:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

где [мРНК ИЛ-8 с NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β -актина в этих клетках.

Расчет показал наличие тяжелой бронхиальной астмы ($P=0,999$, т.е. $P>0,5$). На основании критериев GINA (ОФВ1=56% от должного, увеличение ОФВ1 при пробе с бронхолитиком = 17%, суточная лабильность бронхов более 30%) диагноз был в очередной раз подтвержден.

Таким образом, предлагаемый способ, основанный на определении реакции дендритных клеток, полученных в результате культивирования моноцитов, полученных от больных бронхиальной астмой, на метаболически стабильный аналог аденозина NECA, вместе с определением ОФВ1, позволяет дифференцировать тяжелую бронхиальную астму от бронхиальной астмы других степеней тяжести. Способ характеризуется высокой чувствительностью (92,3%) и высокой специфичностью (92,3%), что делает способ перспективным для широкого применения в клинической практике. Источники информации

1. Nassenstein C., Braun A., Erpenbeck V. J. et al. / The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma // J Exp Med. - 2003. - Vol.198, №3. - P.455-467.

2. Fahy J.V. / Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies // Proc. Am. Thorac. Soc. - 2009. - Vol.6, №3. - P.256-259.

3. Jahnsen F.L., Moloney E.D., Hogan T. et al. / Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge // Thorax. - 2001. - Vol.56, №11. - P.823-826.

4. van Rijt L. S., Jung S., Kleinjanet A. et al. / In vivo depletion of lung CD11c+dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma // J. Exp.Med. - 2005. - Vol.201, №6. - P.981-991.

5. Hasko G., Linden J., Cronstein B. et al. / Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases [текст] // Nature Rev Drug Discov. - 2008. - №9. - P.759-770.

6. Novitskiy S.V., Ryzhov S., Zaynagetdinov R / Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function // Blood. - 2008. - Vol.112, №5. - P.1822-1831.

7. Standardization of Spirometry, 1994 update. American Thoracic Society. Am. J. Respir. Crit. CareMed. - 1995. - Vol.152, №3. -P.1107-1136.

8. Boyum A / Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g // Scandinavian journal of din. lab. invest. - 1968. - Vol.21 (Suppl. 97). - P.77.

9. Ulmer A. H., Fled H.D / Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using percoll as gradient medium // Journal of immunological methods. - 1979. - №30. - P.1-10.

10. Porcher C., Malinge M.C., Picat C. et al. / A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer // *Biotechniques*. - 1992. - №1. - P.106-114.

11. Global strategy for Asthma management and prevention. Update 2006 [Электронный ресурс] / Электрон, дан. - Режим доступа: http://www.ginasthma.org/pdf/archived/GINA_Report_072007.pdf

12. Gerard, G. F. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA / G.F.Gerard, D.K.Fox, M.Nathan, J.M.D'Alessio // *Mol. Biotechnol.* - 1997. - №8. - P.61-77.

13. Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G / E.Engvall, P.Perlman // *Immunochemistry*. - 1971. - №9. - P.871-874.

14. Гланц, С.А. Медико-биологическая статистика / С.А.Гланц. - М.: Практика, 1998. - 459 с.

Приложение

Таблица 1. Сравнительная клинично-функциональная характеристика групп обследуемых, $M \pm m$, $Me (Q_1-O_3)$

Примечания:

ОФВ1 - объем форсированного выдоха за первую секунду

ПСВ - пиковая скорость выдоха

ФЖЕЛ - форсированная жизненная емкость легких

МОС25 - мгновенная объемная скорость 25

МОС50 - мгновенная объемная скорость 50

МОС75 - мгновенная объемная скорость 75

АСТ - тест по контролю над астмой, результат в баллах

*** - различия при сравнении с первой подгруппой (обследуемые с легкой и среднетяжелой бронхиальной астмой) достоверны при уровне статистической значимости $p < 0,001$;

Таблица 2. Таблица сопряженности, отображающая доли истинно положительных и истинно отрицательных, а также ложноположительных и ложноотрицательных случаев

Примечания:

БА - бронхиальная астма,

число на пересечении столбца «Отсутствие тяжелой БА» и строки «Отсутствие тяжелой БА» - число истинно отрицательных случаев,

число на пересечении столбца «Тяжелая БА» и строки «Тяжелая БА» - число истинно положительных случаев,

число на пересечении столбца «Отсутствие тяжелой БА» и строки «Тяжелая БА» - число ложноположительных случаев,

число на пересечении столбца «Тяжелая БА» и строки «Отсутствие тяжелой БА» - число ложноотрицательных случаев,

общее число обследованных пациентов, страдающих от бронхиальной астмы, - 26 человек.

Фиг 1. Процентное содержание CD14⁺/CD1a⁺/CD209⁺ клеток на начальных этапах дифференцировки моноцитов в дендритные клетки у больных БА при отсутствии стимуляции аналогом аденозина NECA и при стимуляции аналогом аденозина NECA, $M \pm m$.

Примечание:

БА - бронхиальная астма;

NECA - данные культуры дендритных клеток стимулировали растворенным в диметилсульфоксиде (DMSO) N-этилкарбоксамидоаденозином (метаболически стабильным аналогом аденозина, NECA) в концентрации 30 μ M;

- данные культуры дендритных клеток не стимулировали N-этилкарбоксамидоаденозином (NECA), но к ним добавляли растворитель - диметилсульфоксид (DMSO) в том же количестве, что был использован для растворения NECA в параллельном эксперименте.

Фиг.2. Уровни мРНК аденозинового рецептора типа A_{2A} в дендритных клетках больных бронхиальной астмой легкой и средней степеней тяжести, больных бронхиальной астмой тяжелой степени, $M \pm m$

Примечание:

БА - бронхиальная астма;

NECA - данные культуры дендритных клеток стимулировали растворенным в диметилсульфоксиде (DMSO) N-этилкарбоксамидоаденозином (метаболически стабильным аналогом аденозина, NECA) в концентрации 30 μ M;

- данные культуры дендритных клеток не стимулировали N-этилкарбоксамидоаденозином (NECA), но к ним добавляли растворитель - диметилсульфоксид (DMSO) в том же количестве, что был использован для растворения NECA в параллельном эксперименте.

Фиг.3. Уровни продукции фактора роста эндотелия сосудов дендритными клетками

больных бронхиальной астмой легкой и средней степеней тяжести, больных бронхиальной астмой тяжелой степени, $M \pm m$

Примечание:

БА - бронхиальная астма;

NECA - данные культуры дендритных клеток стимулировали растворенным в диметилсульфоксиде (DMSO) N-этилкарбоксамидоаденозином (метаболически стабильным аналогом аденозина, NECA) в концентрации 30 μ M;

- данные культуры дендритных клеток не стимулировали N-этилкарбоксамидоаденозином (NECA), но к ним добавляли растворитель - диметилсульфоксид (DMSO) в том же количестве, что был использован для растворения NECA в параллельном эксперименте.

Фиг.4. Уровни мРНК ИЛ-8, наблюдаемые в дендритных клетках больных бронхиальной астмой легкой и средней степеней тяжести, больных бронхиальной астмой тяжелой степени, $M \pm m$

Примечание:

БА - бронхиальная астма;

NECA - данные культуры дендритных клеток стимулировали растворенным в диметилсульфоксиде (DMSO) N-этилкарбоксамидоаденозином (метаболически стабильным аналогом аденозина, NECA) в концентрации 30 μ M;

- данные культуры дендритных клеток не стимулировали N-этилкарбоксамидоаденозином (NECA), но к ним добавляли растворитель - диметилсульфоксид (DMSO) в том же количестве, что был использован для растворения NECA в параллельном эксперименте.

Таблица 1		
Показатели	Группы обследуемых	
	Обследуемые с БА легкой и средней степени (группа 1) (n=13)	Обследуемые с БА тяжелой степени (группа 2) (n=13)
Средний возраст, лет	38,9 \pm 3,4	44,5 \pm 1,3
	48	46
	(25,0-43,5)	(43,5-47,5)
Стаж заболевания, лет	9,1 \pm 1,4	11,0 \pm 2,7
	10,0	9,0
	(5,0-10,0)	(2,0-16,5)
Кол-во дневных симптомов за последние 7 дней	1,5 \pm 0,9	16,6 \pm 3,0
	1,0	14,0
	(0-1,0)	(7,5-24,5)
Кол-во ночных симптомов за последние 7 дней		***
		2,9 \pm 0,7
	0,0	2,0
		(1,0-5,0)
ОФВ1, %		***
	97,5 \pm 4,8	64,5 \pm 2,3
	94,7	66,5
	(84,95-114,15)	(58,75-69,2)
ПСВ, %		***
	100,4 \pm 2,6	75,4 \pm 5,3
	100,6	76,5
	(94,25-106,75)	(63,45-84,1)
ФЖЕЛ, %		***
	106,2 \pm 3,5	88,6 \pm 2,8
	102,6	88,3
	(96,2-113,85)	(82,75-94,1)
МОС25, %		***
	81,4 \pm 6,6	43,7 \pm 5,8
	76,7	39,3
	(56,95-102,2)	(27,85-54,2)
МОС50, %		***
	68,3 \pm 8,5	31,3 \pm 3,0
	58,6	29,2
	(42,50-96,0)	(25,65-34,1)
МОС75, %		***
	57,6 \pm 8,6	26,6 \pm 2,4
	42,3	25,5
	(30,3-82,15)	(20,2-29,15)
АСТ		***
	21,8 \pm 1,5	13,2 \pm 1,2
	23,0	13,0
	(21,5-24,5)	(9,5-17,5)

Таблица 2

Согласно предлагаемому способу	Фактически (согласно критериям GINA, 2006)	
	Отсутствие тяжелой БА	Тяжелая БА
Отсутствие тяжелой БА	12	1
Тяжелая БА	1	12

Формула изобретения

Способ дифференциальной диагностики тяжелой бронхиальной астмы, включающий определение вентиляционной функции легких и исследование мононуклеаров, выделенных из венозной крови больного, с последующим расчетом индекса, характеризующего воспалительный процесс, отличающийся тем, что исследуют моноциты, для чего их культивируют в дендритные клетки, при этом к половине культур добавляют N-этилкарбоксамидоаденозин, далее полученные дендритные клетки собирают и анализируют на содержание мРНК ИЛ-8 при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и выполняют расчет вероятности Р отнесения индивида к группе больных тяжелой бронхиальной астмой по системе уравнений:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

где [мРНК ИЛ-8 с NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β-актина в этих клетках, [мРНК ИЛ-8 без NECA, %] - уровень мРНК ИЛ-8 в дендритных клетках, не стимулированных NECA, выраженный в % от уровня β-актина в этих клетках, и при $P > 0,5$ диагностируют тяжелую бронхиальную астму.

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

Увеличенное изображение (открывается в отдельном окне)

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **12.01.2014**

Дата публикации: [10.10.2014](#)

НФ4А Восстановление действия патента

Дата, с которой действие патента восстановлено: **10.06.2015**

Дата внесения записи в Государственный реестр: **25.05.2015**

Дата публикации: [10.06.2015](#)

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **12.01.2018**

Дата внесения записи в Государственный реестр: **02.11.2018**

Дата публикации и номер бюллетеня: [02.11.2018](#) Бюл. №31