

На правах рукописи

НИКИТИНА ЛИДИЯ ЮРЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ЭОЗИНОФИЛОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**

14.00.43 – пульмонология

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск – 2005 г.

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет
Росздрава

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Огородова Людмила Михайловна

Научный консультант:

кандидат медицинских наук, доцент Краюшкина Нина Петровна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Бодрова Тамара Николаевна

доктор медицинских наук, профессор Куделя Любовь Михайловна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Алтайский медицинский университет Росздрава

Защита состоится «___» _____ года в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «___» _____ 2005 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тюкалова Л.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Бронхиальная астма является распространенным хроническим заболеванием легких [Авдеев С.Н., 1999; Сидорова Л.И., 2000]. В настоящее время в мире насчитывается около 300 миллионов человек, страдающих данной патологией, что составляет от 5 до 15% населения в разных странах, по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ). Каждый 12-й житель России страдает бронхиальной астмой. За последние десятилетия количество заболевших удвоилось (ВОЗ). Так, в 1995 г. в США число больных бронхиальной астмой составляло 14,9 млн.; в 1980 г. их было только 6,7 млн. Финансовые затраты на лечение заболевания составляют более 60 миллиардов долларов в год и превышают таковые для ВИЧ и туберкулеза вместе.

В общей структуре заболевания тяжелая бронхиальная астма составляет 18% [Чучалин А.Г., 2000; Barnes P.J., 1996], оставаясь актуальной проблемой современной медицины. На лечение тяжелой астмы приходится 80% общей стоимости болезни (включая медикаментозное обеспечение, дорогостоящую экстренную медицинскую помощь, длительные периоды нетрудоспособности) [Медников Б.Л., 1998; Чучалин А.Г., 1997]. Тяжелая бронхиальная астма ассоциирована с частыми жизнеугрожающими состояниями и высоким риском смерти [Ayles J. G., 1998; Chung K. F., 1999]. Неблагоприятные исходы при астме регистрируются достаточно редко (1 на 2000 пациентов), однако в последнее время их количество существенно возросло и составляет 180 000 случаев в год [Чучалин А.Г., 2000; Hetzel M.R., 1997].

Согласно современным рекомендательным документам, целью лечения больных астмой является достижение контроля над заболеванием [Clark T.J., 2002]. Тем не менее, заболевание не контролируется у большинства больных тяжелой бронхиальной астмой [Rabe K.F., 2000; Chung K. F., 1999; Цой А.Н., 2000; Куделя Л.М., 2001]. Результаты проведенных в последние годы эпидемиологических исследований (AIRE, AIRCEE, AIA) продемонстрировали наличие контроля астмы только у 5 – 30 % пациентов.

При тяжелой астме проблема отсутствия контроля над заболеванием в большей мере обусловлена неадекватным степени тяжести лечением, в результате которого у пациента формируется резистентность к терапии. В основе неконтролируемой терапевтически-резистентной бронхиальной астмы лежит персистирующее эозинофильное воспаление воздухоносных путей, не восприимчивое к лечению препаратами базисной терапии в обычных дозах [Barnes P.J., 1999; Holgate S., 1999; Leung D., 2002]. Скопление эозинофилов в бронхах происходит вследствие изменений их гомеостаза, в частности, задержки физиологической программируемой гибели клеток – апоптоза [Duncan C.J., 2003; Kankaanranta H., 2000; Simon H.U., 1997].

Изучение дисбаланса в системе апоптоза эозинофилов при тяжелой астме представляется актуальным с точки зрения его роли в поддержании персистирующего воспаления дыхательных путей и формировании терапевтически-резистентной формы заболевания.

Цель исследования. Установить механизмы нарушения апоптоза эозинофилов при тяжелой бронхиальной астме и представить патогенетически обоснованные методы преодоления терапевтической резистентности.

Задачи исследования

1. Исследовать структуру БА тяжелого течения, степень контроля над заболеванием, качество ведения больных в России.
2. Проанализировать механизмы нарушения апоптоза эозинофилов периферической крови в зависимости от тяжести и периода БА. Изучить особенности нарушений апоптоза при тяжелой терапевтически-резистентной астме.
3. Исследовать особенности экспрессии транскрипционного фактора p53 и внешнего регулятора апоптоза ИЛ-5 при тяжелой БА. Определить их роль в нарушении программируемой гибели эозинофилов периферической крови и установить взаимосвязь этих нарушений с чувствительностью к противовоспалительной терапии.
4. Дать сравнительную оценку разных режимов комбинированной терапии с позиции клинико-функциональной эффективности и возможности преодоления терапевтической резистентности при тяжелой БА.

Научная новизна. Впервые выполнена комплексная оценка клинико-эпидемиологических данных, полученных в рамках многоцентрового ретроспективного Национального исследования Бронхиальной Астмы тяжелого Течения («НАБАТ», 2003). Установлено, что среди больных тяжелой БА преобладают женщины (соотношение мужчины/женщины 1:3), причем у женщин тяжелая БА характеризуется достоверно большим числом обращений за неотложной помощью и визитов по поводу ухудшения состояния.

Впервые показано, что в России частота пациентов с терапевтически резистентной формой заболевания достигает 63% от числа больных тяжелой БА. Зафиксированы достоверно худшие клинико-функциональные показатели течения болезни при терапевтически-резистентной форме заболевания.

Приоритетными являются результаты сравнительного анализа отдельных фенотипов терапевтически-резистентной астмы. Так, установлено, что заболевание протекает тяжелее ($p < 0,05$) у больных БА с фенотипом постоянной бронхиальной обструкции. Эти больные характеризуются низкими показателями функции внешнего дыхания (ОФВ₁, ФЖЕЛ), большей частотой дневных и ночных симптомов, большим количеством и продолжительностью госпитализаций, большей частотой использования скоропомощных препаратов, вызовов СМП, визитов к врачу по поводу ухудшения состояния и возникновения НЛЯ ($p < 0,05$). Дополнительное подтверждение в рамках национального эпидемиологического исследования нашли проблемы недостаточного внедрения в клиническую практику современных рекомендаций по ведению пациентов с БА. Одновременно установлена взаимосвязь между выполнением клинических рекомендаций по соблюдению шести частей ведения пациента (GINA, 2002) и более благоприятным в клинико-функциональном отношении течением астмы ($p < 0,05$).

Впервые с использованием современных высокоинформативных молекулярно-биологических методов проведена комплексная оценка экспрессии генов проапоптотических и антиапоптотических эффекторов, а также генов транскрипционных факторов в эозинофилах периферической крови больных с различной степенью тяжести БА в сравнении с таковыми у практически здоровых лиц. Установлена ассоциация изменений в системе апоптоза эозинофилов периферической крови (низкая экспрессия ядерного проапоптотического регулятора p53 и высокая активность мРНК антиапоптотических эффекторов bcl-2 и bcl-XL) с персистирующим воспалением дыхательных путей при БА.

Впервые исследована роль нарушения апоптоза в механизмах развития БА тяжелого течения, формировании резистентности к проводимой терапии. Изучен вклад транскрипционных факторов в процессы нарушения апоптоза и снижение чувствительности к ингаляционным кортикостероидам (ИКС) при тяжелой астме, определены характерные изменения в системе программируемой гибели эозинофилов: парадоксальное снижение экспрессии p53 на фоне проводимого лечения, высокая активность мРНК антиапоптотических эффекторов, стабильная гиперэкспрессия ИЛ-5.

Приоритетными являются данные относительно динамики показателей апоптоза на фоне использования различных фармакотерапевтических режимов при тяжелой БА. Применение комбинации Флутиказона пропионата (ФП) с Сальметеролом сопровождается достоверным уменьшением экспрессии антиапоптотических факторов (bcl-2, bcl-XL) с одновременным увеличением экспрессии проапоптотических эффекторов (bax, bcl-XS) уже к концу четвертой недели терапии. Увеличение экспрессии ядерного фактора p53 и снижение активности мРНК провоспалительного цитокина ИЛ-5 ($p < 0,05$ по сравнению с исходными показателями) зафиксировано по завершении 24-недельного лечебного периода. Таким образом, впервые получены доказательства того, что клиническая эффективность комбинированного фармакотерапевтического режима ФП + Сальметерол превосходит таковую при использовании монотерапии ФП и сочетания ФП + Теофиллин (Тео) ($p < 0,05$) в аспекте преодоления терапевтической резистентности при тяжелой бронхиальной астме, в том числе и посредством устранения нарушений апоптотического статуса эозинофилов.

Практическая значимость. Установлено, что при терапевтически-резистентной тяжелой БА нормализация экспрессии эффекторов апоптоза эозинофилов происходит по окончании 24-недельного курса активной базисной противовоспалительной терапии с использованием комбинации ФП+ Сальметерол. Следовательно, при наличии терапевтической резистентности необходимо применять указанный фармакотерапевтический режим в стабильно высоких дозах в течение как минимум 6 месяцев.

Полученные в настоящей работе знания об особенностях регуляции апоптоза эозинофилов при терапевтически-резистентной тяжелой БА позволяют рассматривать их в качестве дополнительных критериев эффективности лечения заболевания.

Патогенетически важные для БА маркеры системы апоптоза эозинофилов, выявленные в исследовании, представляют большой практический интерес в качестве потенциальных молекулярных мишеней для разработки новых фармакогенетических подходов к лечению бронхиальной астмы.

Результаты настоящей работы могут быть рекомендованы для включения в учебные программы дипломной и последипломной подготовки аллергологов, пульмонологов, иммунологов.

Положения, выносимые на защиту

1. В России количество женщин, страдающих тяжелой бронхиальной астмой, в три раза превышает показатель у мужчин. Заболевание протекает тяжелее у женщин: достоверно большее количество вызовов СМП, визитов по поводу ухудшения состояния. Распространенность резистентности к базисной терапии при тяжелой бронхиальной астме в России составляет 63%. Терапевтически-резистентная астма характеризуется достоверно большими нарушениями клинико-функциональных показателей течения болезни. Выявлено недостаточное

- внедрение в клиническую практику современных рекомендаций по ведению пациентов с тяжелой бронхиальной астмой в отдельных регионах России.
2. Нарушение программируемой гибели эозинофилов является важным механизмом персистирующего воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме. Пациенты с терапевтически-резистентной тяжелой астмой имеют специфические изменения регуляции программируемой гибели эозинофилов: парадоксальное снижение экспрессии гена p53 на фоне лечения, высокая активность мРНК антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-XL), стабильная гиперэкспрессия гена ИЛ-5.
 3. Преодоление терапевтической резистентности при тяжелой бронхиальной астме, в том числе посредством нормализации баланса в системе апоптоза эозинофилов, возможно при использовании в качестве базисной терапии комбинации ФП с Сальметеролом.

Внедрение в практику. Результаты работы применяются в учебном процессе кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ, в учебном процессе кафедры аллергологии и иммунологии Казанской государственной медицинской академии.

Апробация. Основные результаты работы доложены и обсуждены на конгрессе молодых ученых «Здоровье человека XXI век» (Томск, 2000), 59-й итоговой научной студенческой конференции СНО им. Н.И.Пирогова (Томск, 2000), Томском областном обществе иммунологов и аллергологов (Томск, 2000), Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2001), V международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2004), IV межрегиональной научно-практической конференции молодых учёных «Здоровье детей – наше будущее!» (Томск, 2004); клинических семинарах кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины, на проблемной комиссии по пульмонологии СибГМУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 5 публикаций «Перечня...» ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 184 страницах машинописного текста, содержит 42 таблицы, иллюстрирована 38 рисунками и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов исследования (глава 2), результатов исследования (главы 3, 4, 5), обсуждения (глава 6), выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Библиографический указатель содержит 169 источников литературы, из которых 27 на русском языке, 142 на английском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В диссертационную работу вошли данные, полученные от 615 пациентов с документально подтвержденным диагнозом БА. Из них 515, участники ретроспективного многоцентрового эпидемиологического исследования «НАБАТ», были проанкетированы в 2003г. Средний возраст этих пациентов составил $45,8 \pm 0,5$ лет. 100 больных, из которых 20 – с легкой персистирующей (средний возраст $34,25 \pm 3,04$ лет), 20 – со среднетяжелой (средний возраст $42,35 \pm 2,90$ лет) и 60 – с тяжелой БА (средний возраст $45,68 \pm 1,58$ лет), были включены в проспективное исследование, выполненное в 2003-2004гг. Возрастной диапазон всех обследованных, согласно критериям включения, был от 18 до 60 лет. Набор амбулаторных и стационарных пациентов для проспективного исследования осуществлялся на базе ОГУЗ «Областная клиническая больница» г. Томска: областной «Астма-центр», отделение аллергологии и пульмонологии. В проспективном исследовании в качестве контрольных были использованы данные 20 практически здоровых добровольцев среднего возраста $37,3 \pm 3,24$ лет. В соответствии с поставленными задачами, настоящая работа состояла из двух разделов:

- 1) ретроспективное изучение эпидемиологической характеристики тяжелой астмы в различных регионах России (материалы национального исследования «НАБАТ»);
- 2) проспективное клинико-фармакологическое исследование БА, включающее изучение экспрессии ведущих эффекторов апоптоза эозинофилов периферической крови (bcl-2, bcl-XL, bax, bcl-XS), а также определение активности мРНК транскрипционного фактора p53, внешнего регулятора апоптоза ИЛ-5.

1. Эпидемиологическое исследование тяжелой астмы

Изучение фармако-эпидемиологической характеристики тяжелой БА проводилось в рамках Национального эпидемиологического исследования Бронхиальной Астмы тяжелого Течения («НАБАТ»). В исследовании приняли участие 8 центров, расположенных в различных регионах России (табл. 1). Общее количество обследованных составило 515 человек.

Таблица 1

Центры, принимавшие участие в исследовании «НАБАТ»

Центры - участники исследования	Количество больных (n=515)
Казань	100
Иркутск	93
Саратов	50
Санкт-Петербург	60
Томск	100
Самара	37
Красноярск	50
Барнаул	25

Пациенты включались в исследование согласно следующим критериям:

- 1) Соответствие критериям тяжелой бронхиальной астмы:

А. ОФВ1 $\leq 60\%$ от должной величины; **и/или**

В. объем терапии для взрослых (дозы по БДП) более 1000 мкг, или при сохраняющихся симптомах на фоне проводимой терапии; **и/или**

С. необходимость постоянного (в течение не менее 6 месяцев до проведения исследования) применения системных кортикостероидов в любой дозе (с или без ингаляционных кортикостероидов).

Для диагностики тяжелой БА было достаточно наличия одного из перечисленных признаков (А, В, С) в течение 4 недель перед заполнением карты (при этом должны были использоваться только те данные, которые уже имелись в медицинской документации или были получены во время проведения спирометрии в рамках данного исследования, инициировать мониторинг пациента для получения этих данных не разрешалось), за исключением необходимости постоянного применения системных кортикостероидов.

- 2) Доказанная обратимость бронхиальной обструкции: повышение ОФВ₁ более чем на 200 мл и на 12% относительно показателя до применения бронходилататора, одновременное сочетание изменения ОФВ₁ на 200 мл и 12% обязательно, а также отсутствие сочетания ОФВ₁/ФЖЕЛ < 70% и ОФВ₁ < 80% от должного показателя после применения бронходилататора (400 мкг сальбутамола при помощи спейсера) (данные должны быть получены при проведении исследования ФВД в рамках данного исследования или документально подтверждены соответствующим исследованием, выполненным в течение предшествующих 12 мес).
- 3) Возраст 18 - 60 лет.
- 4) Отсутствие тяжелых сопутствующих соматических и инфекционных заболеваний в стадии декомпенсации.

Пациенты выполняли два визита в клинику. На первом визите их предупреждали о соблюдении определенных ограничений в применении препаратов, необходимых для адекватной оценки ФВД, необходимости принести соответствующую медицинскую документацию, ингаляторы. На втором визите исследователем оценивалось соответствие пациента критериям включения и исключения, проводилось спирометрическое исследование, проба с бронхолитиком, заполнение индивидуально регистрационной карты (ИРК). При проведении спирометрии и теста с бронходилататором использовались рекомендации ATS, 1995.

В рамках исследования «НАБАТ» на базе Областной клинической больницы г. Томска («Астма-центр», аллергологическое и пульмонологическое отделение) было обследовано и проанкетировано 100 амбулаторных и стационарных больных.

2. Клинико-фармакологическое исследование БА

В данном разделе работы было обследовано 100 амбулаторных и стационарных пациентов в возрасте от 18 до 60 лет, 20 из которых имели диагноз легкой персистирующей, 20 – среднетяжелой, 60 – тяжелой БА. Обследование больных проводилось на базе ОГУЗ «Областная клиническая больница» г.Томска. Данное учреждение обладает широкими возможностями для проведения необходимых дифференциально-диагностических мероприятий. Контрольную группу составили 20 практически здоровых добровольцев того же возраста, не страдающих БА, другими atopическими заболеваниями, гельминтозами. Дополнительным критерием включения в группу контроля служило отсутствие острых и обострение хронических заболеваний в течение трех месяцев, предшествующих процедуре обследования.

Методы обследования пациентов

- Клинико-anamnestические

Уровень контроля БА, а также оценка клинической эффективности противовоспалительной терапии определялись путем мониторинга клинико-функциональных показателей (табл. 2) согласно критериям проекта GOAL (**G**aining **O**ptimal **A**sthma **C**ontrol – достижение оптимального контроля астмы), разработанного членами Исполнительного комитета GINA. Оценка уровня контроля над симптомами астмы выполнялась на Визите 2 и 3.

Таблица 2

Критерии контроля над симптомами астмы (GOAL)

«Хороший контроль» (well-control)	«Полный контроль» (total-control)
<p><i>2 и более из следующих критериев:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>симптомы >1 но ≤2 дней в неделю;</i> • <i>использование β2-агонистов короткого действия в качестве средства скорой помощи ≤2 дней в неделю, но не больше 8 вдохов в неделю;</i> • <i>величина ПСВ, измеренная в утренние часы каждый день ≥80% от должного показателя;</i> <p><i>И все следующие критерии:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>нет симптомов БА в ночное время;</i> • <i>нет обострений БА;</i> • <i>нет необходимости обращения за неотложной медицинской помощью;</i> • <i>нет Нежелательных Лекарственных Явлений (НЛЯ), требующих изменений в проводимом лечении.</i> 	<p><i>Все следующие критерии:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>нет симптомов в дневные часы;</i> • <i>больной не применяет β2-агонистов короткого действия в качестве средства скорой помощи;</i> • <i>величина ПСВ, измеренная в утренние часы, каждый день ≥80% от должного показателя;</i> • <i>нет симптомов БА в ночное время;</i> • <i>нет обострений БА;</i> • <i>нет необходимости обращения за неотложной медицинской помощью;</i> • <i>нет НЛЯ, требующих изменений в проводимом лечении.</i>

Оценка тяжести симптомов астмы. Все больные БА с целью ежедневного мониторинга заболевания вели дневники самоконтроля, в которых регистрировались симптомы астмы и потребность в симптоматической терапии. Выраженность клинических симптомов оценивалась ежедневно в вечернее время, после проведения пикфлоуметрии и приема противоастматических средств; учитывались симптомы болезни за период с 22 часов предыдущего дня до 22 часов текущего дня.

Физикальный осмотр выполнялся при каждом посещении пациентами клиники.

➤ Функциональные

Пикфлоуметрия

С целью оценки функции легких в домашних условиях все пациенты выполняли измерение ПСВ (л/мин) с помощью пикфлоуметра «Мини-райт». Выполнялся расчет среднесуточной лабильности бронхов и индекса лабильности дыхательных путей.

Определение показателей функции внешнего дыхания, провокационный тест с метахолином проводилось на каждом визите (трижды) соответственно требованиям ATS Standardization of Spirometry, 1995 (анализ кривой поток-объем и показателей спирометрии) на аппарате MasterScope (“Erich Jaeger”, Германия).

➤ Аллергологические

Аллергологическое обследование проводилось всем больным и включало постановку кожных аллергопроб, определение общего IgE сыворотки крови методом ИФА. Для

диагностики использовались стандартные наборы аллергенов производственного объединения “Биомед” им. И.И.Мечникова и "Immunoteach", Испания. Кожные аллергопробы выполнялись с бытовыми, эпидермальными, грибковыми, пыльцевыми аллергенами.

➤ Цитоморфологические

Оценка морфофункциональных параметров гибели эозинофилов периферической крови

Анализ апоптотической гибели клеток проводился на препаратах, приготовленных из культуральной клеточной суспензии, по общепринятой методике. Мазки окрашивали по Нохта-Максимуму (азур II-эозин). При анализе использовали критерии, характеризующие кариопатологические и цитопатологические изменения в клетках. Морфологически апоптоз проявлялся в конденсации и маргинации хроматина, уменьшении объема клетки, пузырчатости и фрагментации клеточного ядра. При некротической гибели преобладали процессы «набухания» клетки, кариорексиса и кариолизиса с последующей ферментативной деградацией всей клетки. Анализ препаратов проводился на микроскопе «REICHERT» (Австрия) при увеличении об. 90 х ок. 10. Подсчёт велся на сто (100) клеток, показатель выражается в % (процентах).

➤ Молекулярные

Определение активности экспрессии мРНК про- (bax, bcl-XS) и антиапоптотических (bcl-2, bcl-XL) эффекторов, транскрипционного фактора p53, цитокина ИЛ-5

Материалом для данного исследования служила периферическая кровь больного, взятая по стандартной методике с соблюдением необходимых асептических условий из *venaе ulnaris* (в объёме 5 мл). Полученную кровь, смешанную с ЭДТА в соотношении 4:1, инкубировали 45-60 минут при 37°C. Образовавшийся над эритроцитами слой плазмы, собирали при помощи пастеровской пипетки и переносили в стерильную пробирку. Затем центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок использовали для дальнейшего исследования. Данное исследование выполнялось в лаборатории молекулярной биологии ЦНИЛ, СибГМУ (Зав. лабораторией Иванчук И.И.).

Тотальную РНК выделяли с помощью коммерческого набора TRIZOL™ (GibcoBRL, Life Technologies). Поли А-РНК получали на колонках с олиго-dT целлюлозой (ICN, США) и проводили реакцию обратной транскрипции в течение 1 ч при 37 °С. кДНК амплифицируют со специфическими праймерами (табл. 3).

Таблица 3

Специфические праймеры регуляторов апоптоза

Регуляторы апоптоза	Специфические праймеры	Регистрационный номер (Genbank)	Размер продукта (п.н.)
bax	5' - GGACCCGGTGCCTCAGGA; 3' - CAAAGATGGTCACGGTCTGC	M64310	495
bcl-2	5' - GATGTCCAGCCAGCTGCACCTG 3' - CACAAAGGCATCCCAGCCTCC	X57404	355
bcl-xL/S	5' - TTGGACAATGGACTGGTTGA; 3' - GTAGAGTGGATGG TCAGTG	M59293	800/600
ИЛ-5	5' - ATGCGCCTTTGCACTAATGGC; 3' - GCAAATTGCACGATCTGAC	U28501	475
p53	5' - CGACACTGCGTGAATGAA 3' - GCTGTGACGCACTTACTT	L40596	560

Определение экспрессии ГАФДГ (5' - GAAGCTCACTGGCATGGCCTTCC; 3' - CATGTGGGCCATGAGGTCCA) (глицеральдегид 3-фосфат дегидрагеназа, 320 п.н.) использовалось в качестве положительного контроля экспрессии мРНК. Детекцию продуктов амплификации проводили в 1,2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Оценку специфичности продуктов амплификации проводили с помощью «nested-ПЦР» с использованием «вложенных» праймеров (табл. 4)

Таблица 4

«Вложенные» праймеры регуляторов апоптоза

Регуляторы апоптоза	Внутренние праймеры
Bax	5' - GGACCCGGTGCCTCAGGA; 3' - GTTGGACGTCACCTGCTAATT
bcl-2	5' - GATGTCCAGCCAGCTGCACCTG 3' - ATGATAGGATAAAGGAGG
bcl-xL/S	5' - TTGGACAATGGACTGGTTGA; 3' - TAAATCCCCCTCACGACCC
ИЛ-5	5' - ATGCGCCTTTGCACTAATGGC; 3' - GACGGGCTCATGATGCCTCA
p53	5' - CGACACTGCGTGAATGAA 3' - CCATCACTTCCTTAGAGAATAAG

Полученные результаты выражали в процентах от экспрессии мРНК ГАФДГ, которую принимали за сто процентов.

➤ Статистические

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета программ «Statistica for Windows 6,0». Данные представлены в виде $X \pm x$, где X – среднее арифметическое, x – ошибка среднего. Для оценки различия средних в попарно несвязанных выборках применяли U-критерий Манна-Уитни, в связанных – критерий Вилкоксона. Для сравнения показателей в трех несвязанных группах проводили дисперсионный анализ ANOVA Крускала-Уоллиса. Степень взаимосвязи между признаками оценивали, вычисляя коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$. Данные группировались в соответствии с задачами исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Клинико-эпидемиологическая характеристика тяжелой бронхиальной астмы в России. Материалы Национального многоцентрового эпидемиологического исследования Бронхиальной Астмы тяжелого Течения «НАБАТ»

В рамках исследования НАБАТ проведен подробный анализ диагностики, мониторинга, особенностей течения и терапии тяжелой бронхиальной астмы, влияния заболевания на образ жизни пациентов и отношения пациента к проводимой терапии и используемым препаратам. Обследовано 515 больных с установленным диагнозом БА тяжелого течения, средний возраст которых составил $45,8 \pm 0,5$ лет. Группы обследованных пациентов всех центров были сопоставимы по полу и возрасту. Во всех городах среди участников исследования преобладали женщины.

1.1. Анализ клинико-функциональных показателей у пациентов с тяжелой БА в России

В табл. 5 представлена обобщенная клинико-функциональная характеристика БА тяжелого течения в России. Обращает внимание длительный, более 10 лет, стаж заболевания. Показатели функции внешнего дыхания укладывались в рамки тяжелого течения астмы (GINA, 2002). Зафиксирована высокая частота дневных и ночных симптомов, использования бронхолитиков, частые и длительные госпитализации, курсы СКС, частые визиты к врачу по поводу ухудшения состояния пациента, несмотря на использование препаратов базисной терапии в высоких дозах.

Таблица 5

Клинико-функциональная характеристика тяжелой БА

Показатели	Больные тяжелой БА (n=515) X±x
Стаж болезни, лет	13,7±0,4
ОФВ1, % от должного	67,7±0,8
ФЖЕЛ, % от должного	76,0±0,9
ΔОФВ1, %	26,0±0,7
Коэффициент Тиффно, %	73,8±0,6
Общий IgE сыворотки крови, МЕ/мл	260,2±22,4
Количество госпитализаций / год	1,1±0,1
Продолжительность госпитализации, дней	18,2±0,9
Количество курсов СКС / год	1,3±0,1
Продолжительность курса СКС, дней	26,8±2,5
Дневные симптомы / неделя	15,9±0,6
Ночные симптомы / неделя	6,4±0,3
Вызовы СМП / год	3,7±0,3
Запланированные визиты / год	5,4±0,2
Визиты из-за ухудшения / год	3,9±0,2
Визиты из-за НЛЯ / год	0,3±0,1
Доза ИКС на момент обращения (БДП)	1061,7±18,9
Доза ИКС при последней госпитализации (БДП)	1094,7±31,7
Доза ИКС регулярно на протяжении года (БДП)	1034,1±18,8
Потребность в бронхолитиках / последняя неделя	35,2±1,2

В структуре тяжелой БА зафиксировано существенное преобладание женщин, в целом соотношение мужчины/женщины было 1:3. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что тяжелая БА является заболеванием, связанным с полом, и не противоречат результатам проведенного в 2003г. в Европе многоцентрового исследования клинических фенотипов тяжелой астмы ENFUMOSA. Следует отметить, что у женщин заболевание протекало тяжелее: достоверно большая тяжесть симптомов, большее количество вызовов СМП, визитов по поводу ухудшения состояния (табл. 6).

Таблица 6

Сравнительная характеристика мужчин и женщин с тяжелой БА

Показатели	Мужчины (n=137)	Женщины (n=378)	Уровень p
Стаж болезни, лет	11,8±0,7	14,3±0,5	0,004
Тяжесть симптомов по 3-балльной шкале*	1,8±0,1	2,0±0,0	0,011
Вызовы СМП / год	2,9±0,8	4,0±0,4	0,008
Визиты при ухудшении состояния / год	3,1±0,4	4,2±0,3	0,002

Примечание. * - Тяжесть симптомов: 1 – легкие; 2 – среднетяжелые; 3 – тяжелые

1.2. Клинико-функциональная характеристика тяжелой терапевтически-резистентной астмы в России

В настоящем исследовании пациенты с тяжелой БА были разделены на две группы по характеру ответа на проводимую базисную терапию, с учетом существующих критериев [Barnes P.J., 1998; Chung K.F., 1999]: терапевтически-резистентную и терапевтически-чувствительную астму. Распространенность терапевтически-резистентной тяжелой БА составила 63% от общего числа обследованных больных. В табл. 7 представлен сравнительный анализ клинико-функциональных показателей пациентов с терапевтически-резистентной и терапевтически-чувствительной тяжелой БА.

Таблица 7

Сравнительная клинико-функциональная характеристика пациентов с чувствительной и резистентной к терапии тяжелой астмой

Показатели	Больные терапевтически-чувствительной БА (n=191)	Больные терапевтически-резистентной БА (n=324)	Уровень p
Стаж заболевания, лет	12,1±0,6	14,6±0,5	0,004
ОФВ1, % от должного	70,1±1,3	66,2±1,0	0,019
ΔОФВ1, %	24,5±1,1	27,0±0,9	0,006
ФЖЕЛ, % от должного	73,8±1,1	79,7±1,4	0,007
Уровень общего IgE сыворотки крови, МЕ/мл	342,4±55,0	224,9±21,2	0,034
Количество курсов СКС / год	1,0±0,1	1,5±0,1	<0,001
Длительность курса СКС, дней	12,9±1,7	31,6±4,5	<0,001
Количество госпитализаций / год	0,8±0,1	1,1±0,1	<0,001
Длительность госпитализации, дней	13,5±1,3	18,5±1,2	<0,001
Визиты при ухудшении состояния / год	3,2±0,4	4,4±0,3	<0,001

При терапевтически-резистентной форме заболевания отмечено достоверно большее количество и продолжительность курсов СКС, госпитализаций, большая частота

визитов к врачу по поводу ухудшения состояния, низкие показатели ФВД, достоверно более низкий уровень IgE сыворотки крови ($p < 0,05$).

1.3. Структура тяжелой терапевтически-резистентной БА в России. Сравнительная клинико-функциональная характеристика ее фенотипов

Терапевтически-резистентная астма является гетерогенным в клиническом отношении заболеванием. Существуют различные варианты течения болезни – так называемые клинические фенотипы. Выделение фенотипов терапевтически-резистентной астмы было проведено на основании материалов итогового документа рабочей группы экспертов по сложной астме Европейского респираторного общества (1999г.). В исследовании «НАБАТ» впервые произведена оценка распространенности отдельных клинических фенотипов терапевтически-резистентной астмы. (рис.1).

Фенотип 1 – резистентная к терапии БА, фенотип не уточнен;

Фенотип 2 – фатальная или близкая к фатальной БА;

Фенотип 3 – нестабильная БА (Brittle);

Фенотип 4 - БА с постоянной бронхиальной обструкцией.



Рис. 1. Распространенность фенотипов терапевтически-резистентной астмы в популяции больных тяжелой астмой, %

Первое место по распространенности и тяжести клинико-функциональных проявлений заболевания занял фенотип персистирующей астмы с постоянной бронхиальной обструкцией, требующей терапии СКС (кортикостероид-зависимая астма). Пациенты данного фенотипа характеризовались достоверно более низкими показателями функции внешнего дыхания (ОФВ1, ФЖЕЛ), более частыми дневными и ночными симптомами, большим количеством и продолжительностью госпитализаций, большей частотой использования бронхолитической терапии, вызовов СМП, визитов к врачу по поводу ухудшения состояния и возникновения НЛЯ ($p < 0,05$). Кроме того, заболевание протекало сравнительно тяжелее ($p < 0,05$) и при наличии у пациентов фатальной БА, которая характеризовалась достоверно более частыми дневными и ночными симптомами, большей частотой и продолжительностью госпитализаций и курсов СКС, визитов к врачу по поводу ухудшения состояния, большей потребностью в бронхолитической терапии.

1.4. Ведение пациентов с тяжелой БА в России

Изучение мониторинга и лечения тяжелой БА в отдельных регионах России выявило недостаточное внедрение в клиническую практику современных рекомендаций по ведению пациентов с данным заболеванием (6 частей по GINA, 2002). Одновременно показано положительное влияние качественного ведения больного (образование, исключение воздействия триггеров, мониторинг текущего состояния, лечение сопутствующей патологии, адекватная терапия) на течение болезни.

Среди сопутствующей патологии наибольшее влияние на течение тяжелой БА оказывала гастро-эзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ). При наличии сопутствующей ГЭРБ у пациентов зарегистрирована достоверно более выраженная симптоматика заболевания, большая потребность в бронхолитиках, количество и продолжительность госпитализаций, курсов СКС.

Таким образом, основными причинами широкой распространенности терапевтически-резистентной формы заболевания в популяции больных тяжелой БА являются: несоблюдение врачами принципов ведения пациентов с данной патологией, неадекватная тактика назначения современных базисных препаратов, а также высокая распространенность сопутствующей патологии, потенциально способной усугублять тяжесть течения астмы.

2. Особенности регуляции апоптоза эозинофилов периферической крови при БА

С целью изучения динамики клиничко-функциональных показателей болезни, а также основных закономерностей экспрессии генов эффекторов апоптоза эозинофилов, в рамках настоящей работы выполнено проспективное исследование пациентов с различной степенью тяжести БА.

Все обследованные посетили клинику четыре раза. В течение 14 дней после скринингового визита (Визит 0) пациенты ежедневно регистрировали показатели ПСВ (у/в) в дневнике самоконтроля, продолжая использовать базисную терапию в прежнем объеме, а также β 2-агонисты короткого действия в режиме «по требованию». По окончании двухнедельного периода наблюдения и обследования, на визите 2 была назначена терапия в соответствии со степенью тяжести заболевания (рис.2). Лечение больных БА осуществлялось препаратом ФП (Фликсотид, GSK). Использовался двукратный режим дозирования.

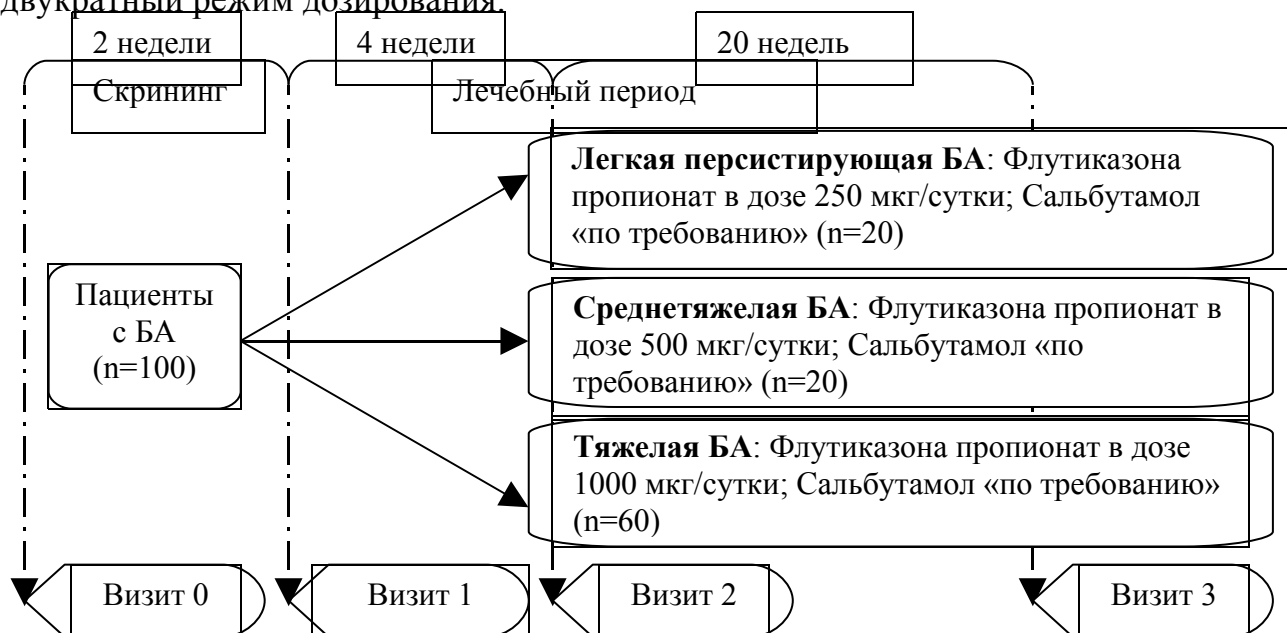


Рис.2. Дизайн проспективного исследования пациентов с БА различной степенью тяжести

Пациенты с легким персистирующим и среднетяжелым течением болезни получали монотерапию ФП. При тяжелой БА выполнялась конвертная рандомизация обследованных в три фармакотерапевтические группы с использованием ФП 1000 мкг/сутки в качестве монотерапии либо в комбинации с длительно действующими β 2-агонистами или теофиллином.

В течение 24 недель лечебного периода больные продолжали заполнять дневник самоконтроля и посещали клинику через 4 (Визит 2) и 24 (Визит 3) недели.

2.1. Динамика экспрессии эффекторов апоптоза эозинофилов у пациентов с различной степенью тяжести БА при использовании базисной противовоспалительной терапии

Оценка клинической эффективности лечения базировалась на следующих критериях: выраженность дневных и ночных симптомов (по 5-балльной шкале), суточная потребность в β_2 -агонистах, суточная вариабельность ПСВ (%), индекс лабильности дыхательных путей (ИЛДП, %), показатели ФВД и бронхиальной гиперреактивности (БГР).

Исходно (до назначения базисной терапии, Визит 1) представленные клинико-функциональные показатели соответствовали критериям классификации по степени тяжести заболевания, изложенной в GINA, 2002. По окончании 24-недельного лечебного периода хорошего и полного контроля болезни (GOAL) достигли все пациенты групп легкой персистирующей и среднетяжелой БА, причем статистически значимых различий между группами на Визите 3 по изучаемым показателям не выявлено. У пациентов с тяжелой БА динамика клинико-функциональных данных была несколько иной. Как и в группах, описанных ранее, при тяжелой астме отмечено статистически значимое улучшение клинического течения болезни. Однако на Визите 3 у пациентов с тяжелой БА все еще сохранялась достоверно большая в сравнении с легкой и среднетяжелой астмой потребность в β_2 -агонистах короткого действия, частота дневных и ночных симптомов, худшие показатели ФВД, больший уровень БГР.

Во всех группах сравнения период обострения заболевания сопровождался выраженной задержкой гибели эозинофилов по апоптотическому пути: уменьшением количества эозинофилов периферической крови с признаками апоптоза, увеличением экспрессии генов антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-XL), высокой активностью мРНК ИЛ-5, низкой экспрессией проапоптотического ядерного фактора p53. Указанные изменения были сопоставимы при всех степенях тяжести астмы.

В результате проведенного 24-недельного курса базисной терапии были определены 2 варианта ответа на лечение. Так, при легкой и среднетяжелой астме, наряду с достижением критериев контроля над заболеванием (GOAL), по окончании лечебного периода зарегистрирована нормализация изучаемых показателей апоптоза эозинофилов. В этих группах отмечено достоверное увеличение количества клеток периферической крови с морфологическими признаками апоптоза, сопоставимое с контрольными значениями экспрессии генов антиапоптотических факторов (bcl-2, bcl-XL), статистически значимое увеличение активности мРНК транскрипционного фактора p53, проапоптотических эффекторов (bax, bcl-XS), снижение экспрессии гена ИЛ-5. Отличительными особенностями тяжелой астмы были: монотонно низкая активность мРНК p53, высокая экспрессия антиапоптотических эффекторов bcl-2, bcl-XL ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и показателями групп сравнения, несмотря на проводимое лечение.

Таким образом, уменьшение интенсивности физиологической программируемой гибели эозинофилов является неотъемлемой компонентой аллергического воспаления при БА любой степени тяжести. С точки зрения динамики изучаемых показателей тяжелая астма представляет собой особую форму заболевания. В данном случае можно предположить существование специфических механизмов поддержания

персистирующего воспаления дыхательных путей. Вероятно, «блок» физиологической программируемой гибели эозинофилов является одним из таких механизмов.

Результаты корреляционного анализа клиничко-функциональных показателей и исследуемых факторов системы апоптоза эозинофилов

В табл. 8 представлены клиничко-патогенетические корреляции, установленные при выполнении настоящего исследования. Так, обнаружена ассоциация между тяжестью БА и экспрессией p53, bcl-2. Показатель функции внешнего дыхания ОФВ1, % отрицательно коррелировал с экспрессией ИЛ-5, положительно – с активностью мРНК p53, baх, а уровень ПСВ, % - с количеством эозинофилов с морфологическими признаками апоптоза. Кроме того, обнаружена обратная взаимосвязь экспрессии ИЛ-5 с количеством апоптотически измененных эозинофилов, положительные ассоциации между экспрессией данного цитокина и bcl-2, а также экспрессией p53 и количеством эозинофилов (%) с признаками апоптоза.

Таблица 8

Клиничко-патогенетические корреляционные взаимосвязи

Показатель // Показатель	R	p
Тяжесть астмы // экспрессия p53	-0,56	<0,001
Тяжесть астмы // экспрессия bcl-2	0,39	0,001
ОФВ1, % // экспрессия ИЛ-5	-0,23	0,02
ОФВ1, % // экспрессия p53	0,35	0,001
ОФВ1, % // экспрессия baх	0,31	0,001
ПСВ, % // количество эозинофилов с признаками апоптоза	0,26	0,008
Экспрессия p-53 // количество эозинофилов с признаками апоптоза	0,30	0,002
Экспрессия ИЛ-5 // количество эозинофилов с признаками апоптоза	-0,33	0,001
Экспрессия ИЛ-5 // экспрессия bcl-2	0,34	0,001

Вышеописанные клиничко-патогенетические корреляции служат подтверждением тесной взаимосвязи дисбаланса в системе апоптоза эозинофилов, ключевых клеток аллергического воспаления дыхательных путей при БА, с основными клиничко-функциональными характеристиками заболевания.

2.2. Особенности регуляции апоптоза при тяжелой БА в зависимости от чувствительности к терапии

Наибольшее внимание в настоящей диссертационной работе было уделено исследованию тяжелой БА. Интерес представляли возможные причины обнаруженной низкой чувствительности к терапии у пациентов с тяжелым течением заболевания. Результаты анализа клиничко-функциональных параметров данной группы выявили наличие в ее составе подгруппы терапевтически-резистентной астмы. К терапевтически-резистентной астме, согласно определению рабочей группы Европейского Респираторного Общества (1999г.), относят заболевание с сохраняющимися симптомами, несмотря на использование ИКС в дозе 2000 мкг/сутки по БДП в течение как минимум 6 месяцев. В последние годы выполнен ряд зарубежных и национальных исследований, благодаря которым были получены данные о клиничко-эпидемиологической характеристике тяжелой терапевтически-резистентной БА (ENFUMOSA, AIRE, AIRECEE, BRILLIANT I, BRILLIANT II, НАБАТ). Актуальность

и масштаб проблемы в социальном, клиническом, экономическом аспектах не вызывает сомнений.

Дизайн исследования пациентов с тяжелой БА в настоящей диссертационной работе представлен на рис. 3.

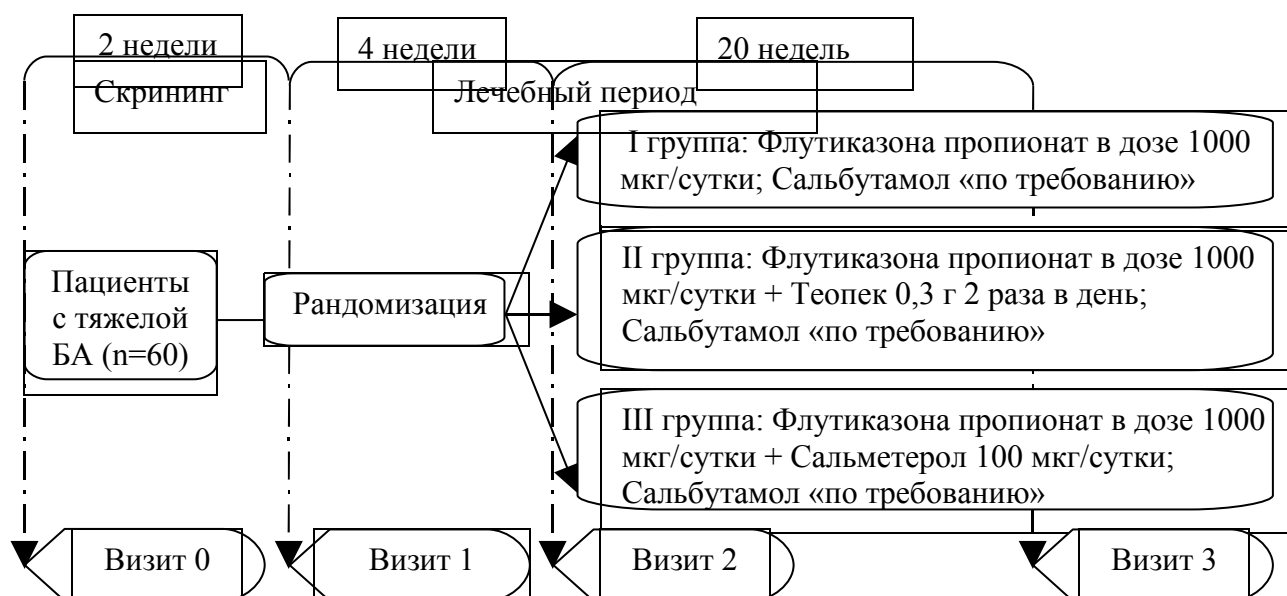


Рис. 3. Сравнительное проспективное рандомизированное исследование пациентов с тяжелой БА в параллельных группах

В группе пациентов с тяжелой БА распространенность терапевтически-резистентной формы заболевания по результатам лечения составила 40 % (n=24). Исходно обследованная категория больных с тяжелой астмой характеризовалась «гомогенной» клинической симптоматикой, сопоставимыми данными экспрессии изучаемых показателей системы апоптоза эозинофилов. Однако в дальнейшем, под действием противовоспалительной терапии, различия между подгруппами чувствительной и резистентной к лечению астмы стали очевидны. Подобно пациентам с легкой и среднетяжелой БА, обследованные с тяжелой терапевтически-чувствительной формой заболевания демонстрировали достоверную положительную динамику, как со стороны клинических проявлений болезни, так и со стороны показателей экспрессии эффекторов апоптоза. Напротив, терапевтически-резистентная астма была ассоциирована с выраженными симптомами, большей потребностью в бронхолитической терапии, низкими показателями функции легких (ОФВ₁, ФЖЕЛ) на протяжении всего лечебного периода.

В группе терапевтически-резистентной тяжелой БА установлен стойкий дисбаланс регуляции программируемой гибели эозинофилов. Выявлены специфические изменения в системе апоптоза эозинофилов, которые характеризовались парадоксальным снижением экспрессии p53 на фоне проводимого лечения, высокой активностью мРНК антиапоптотических эффекторов при неизменной на фоне лечения выработке проапоптотических факторов, стабильной гиперпродукцией ИЛ-5. Ниже приводится обсуждение возможного участия каждого из этих механизмов в формировании резистентности к базисной терапии.

1) Транскрипционный ядерный фактор p53 служит важнейшим регулятором апоптоза [Chiou S.K., 1994; Polyak K., 1997; Fridman J.S., 2003; Fukui T., 2003]. У пациентов с терапевтически-резистентным течением заболевания на фоне проводимой

адекватной (GINA, 2002) базисной терапии в течение 24 недель установлено снижение экспрессии гена p53 в эозинофилах периферической крови (рис. 4).

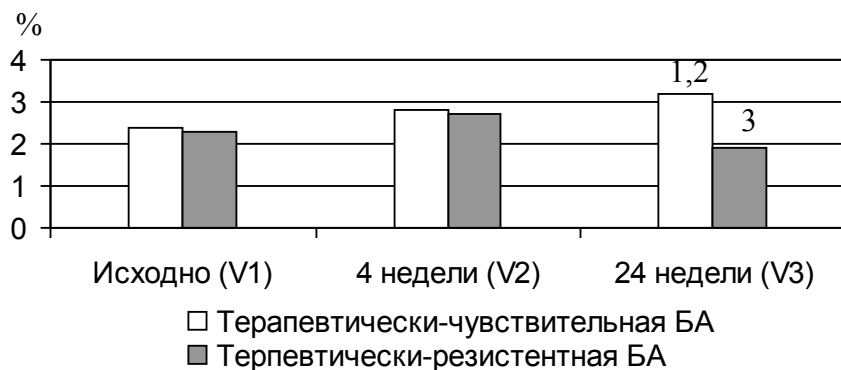


Рис. 4. Экспрессия гена p53 в эозинофилах периферической крови при различном течении тяжелой БА, ПЦР

Примечание:

- ¹ – p=0,002 по сравнению с группой терапевтически-резистентной БА на том же визите;
- ² – p=0,031 по сравнению с показателем на визите 1;
- ³ – p=0,046 по сравнению с показателем на визите 2.

При сохраненной чувствительности к терапии имело место достоверное, по сравнению с исходным, увеличение данного показателя в те же сроки. Гипотетическая схема, объясняющая вариабельность экспрессии фактора p53 представлена на рис. 5.

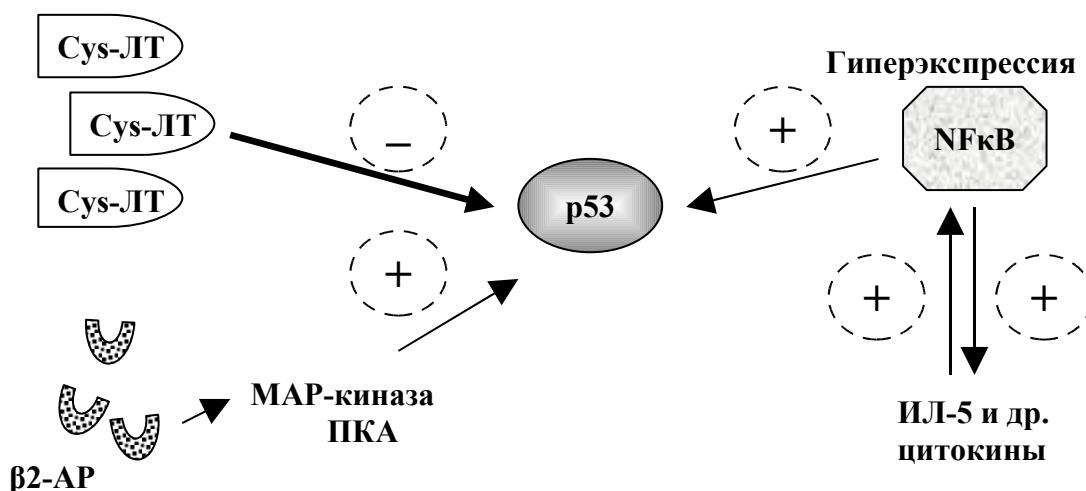


Рис. 5. Гипотетическая схема регуляции экспрессии мРНК p53 при тяжелой БА в отсутствие лечения

Согласно опубликованным данным, существуют три возможных пути регуляции экспрессии p53 в эозинофилах пациентов с тяжелой БА, не получающих противовоспалительную терапию. Во-первых, характерная для тяжелой БА гиперэкспрессия ядерного транскрипционного провоспалительного фактора NF-κB [Mendoza-Rodriguez С.А., 2001; Ryan К.М., 2000; Prives С., 1999], может приводить к некоторому повышению экспрессии гена p53 [Чумаков П.М, 2000]. Во-вторых, β2-агонисты, используемые для симптоматической терапии астмы, способны увеличивать экспрессию p53, возможно опосредованно, через активацию митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) и цАМФ-протеинкиназы А (цАМФ-ПКА) [Luo Y., 2001]. В-третьих, антагонистическим действием по отношению к вышеперечисленным стимулирующим экспрессию p53 факторам при тяжелой БА, обладают цистеиновые лейкотриены (cys-ЛТ), активно продуцируемые клетками

воспаления [Spinozzi F., 2004]. Таким образом, низкий уровень экспрессии гена p53 и связанное с этим угнетение процессов апоптоза эозинофилов при тяжелой БА в отсутствие базисной терапии могут быть следствием суммарного действия всех вышеперечисленных факторов с преобладанием подавляющего экспрессию p53 эффекта cys-ЛТ.

При терапевтически-резистентной БА, в большинстве случаев обусловленной формированием вторичной, т.е. приобретенной, кортикостероидной резистентности, парадоксальное снижение уровня p53 может быть результатом событий, представленных на рис. 6.

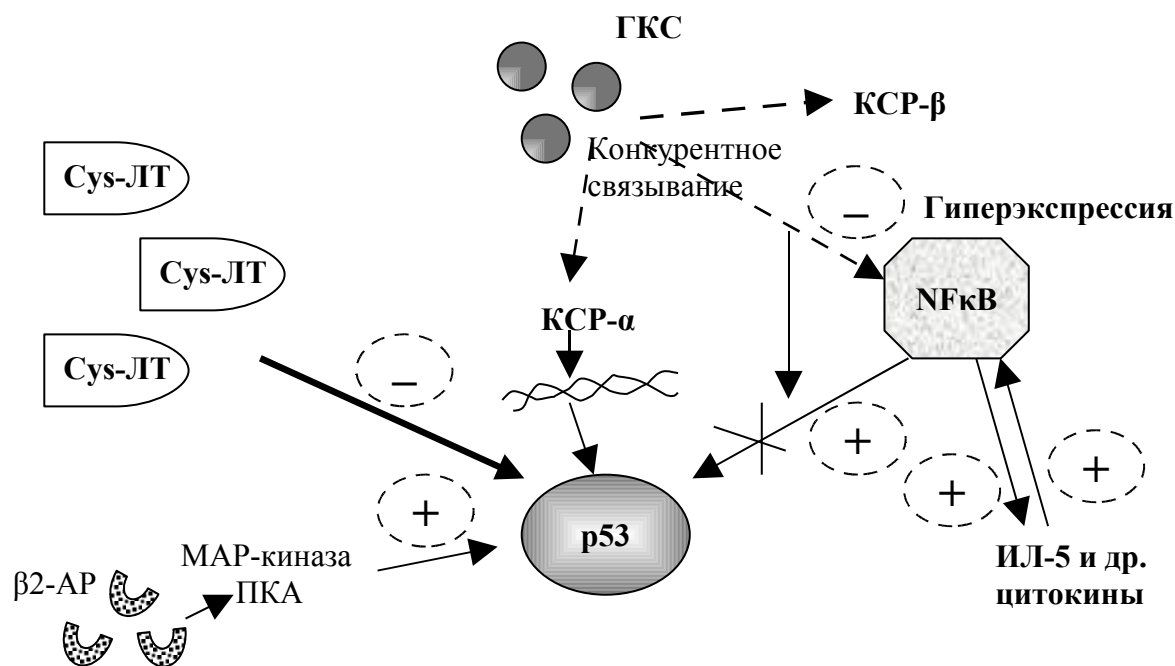


Рис. 6. Гипотетическая схема регуляции активности мРНК p53 при тяжелой терапевтически-резистентной БА на фоне лечения

Можно предположить, что у пациентов с терапевтически-резистентной астмой на фоне лечения кортикостероидами происходит конкурентное связывание ГКС с неактивным кортикостероидным рецептором β (КСР-β) и NFκB. При этом ГКС подавляют гиперэкспрессию NFκB, но не способны самостоятельно стимулировать внутриклеточную экспрессию p53. Таким образом, преобладающим становится негативное влияние cys-ЛТ, чем и объясняется более выраженное снижение экспрессии p53 при терапевтически-резистентной БА.

2) В настоящей работе показано, что следствием парадоксального снижения экспрессии гена p53 в эозинофилах периферической крови на фоне проводимой базисной терапии при терапевтически-резистентной астме являются соответствующие изменения механизмов регуляции апоптотического каскада (табл. 9). Так, уменьшение активности экспрессии антиапоптотических эффекторов было статистически значимым только к концу 24-недельного курса терапии. В то же время, при наличии терапевтической резистентности, вне зависимости от продолжительности лечения, не происходило увеличения активности мРНК проапоптотических факторов.

Динамика экспрессии мРНК про- и антиапоптотических факторов в эозинофилах периферической крови при тяжелой БА

Показатель/ Визит		Больные терапевтически-чувствительной тяжелой БА (n=36)	Больные терапевтически-резистентной тяжелой БА (n=24)	Группа контроля (n=20)
bcl-2	Визит 1	9,5±1,2	10,4±1,1	1,6±0,4
	Визит 2	7,0±0,8 ¹	11,7±1,3	
	Визит 3	5,9±0,8 ²	8,5±1,2 ^{2,3}	
bcl-XL	Визит 1	171,9±5,3	174,1±5,4	143,4±5,5
	Визит 2	156,4±5,3 ²	169,2±5,9	
	Визит 3	143,3±7,2 ^{2,3}	162,0±5,5 ²	
bax	Визит 1	82,4±4,1	84,5±4,9	89,9±4,7
	Визит 2	105,7±4,6 ^{1,2}	89,5±5,8	
	Визит 3	110,7±4,8 ²	98,1±6,2	
bcl-XS	Визит 1	14,3±1,1	13,7±1,4	28,6±1,4
	Визит 2	20,6±1,3 ^{1,2}	14,9±1,2	
	Визит 3	21,1±1,4 ^{1,2}	16,0±1,3	

Примечание:

¹ – p<0,02 по сравнению с группой терапевтически-резистентной БА на том же визите;

² – p<0,05 по сравнению с показателем на визите 1;

³ – p<0,04 по сравнению с показателем на визите 2

3) Третья особенность данной формы тяжелой БА - стабильно высокая экспрессия мРНК ИЛ-5 на протяжении всего лечебного периода, выявленная у пациентов с терапевтически-резистентной БА (рис. 7). Вероятно, данный феномен играет ключевую роль в реализации дистантного антиапоптотического действия на эозинофилы периферической крови из очага воспаления в бронхах.

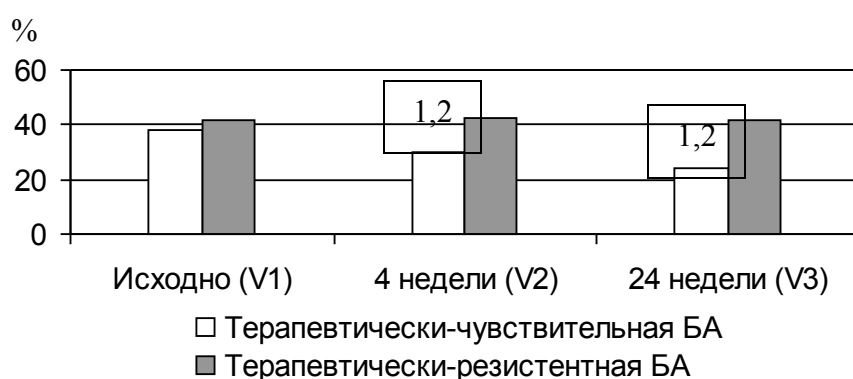


Рис. 7. Уровень ИЛ-5 в периферической крови при различном течении тяжелой БА, ПЦР

Примечание:

¹ – p<0,01 по сравнению с терапевтически-резистентной БА на том же визите;

² – p<0,03 по сравнению с показателем на визите 1.

Таким образом, при терапевтически-резистентной тяжелой БА выраженные клинические проявления болезни ассоциированы с изменениями механизмов регуляции апоптоза эозинофилов.

Результаты настоящей работы свидетельствуют, что ведущим механизмом этих изменений является угнетение экспрессии ядерного проапоптотического фактора p53 и высокая транскрипционная активность гена ИЛ-5. Полученные данные позволяют

предположить, что в основе парадоксально низкой чувствительности экспрессии гена p53 к воздействию кортикостероидов при терапевтически-резистентной астме лежит вторичная кортикостероидная резистентность. Этот феномен, являющийся следствием длительно текущего цитокин – опосредованного воспаления, достаточно широко распространен и по данным национального исследования «НАБАТ» достигает 63% в структуре тяжелой бронхиальной астмы. Терапевтическая резистентность – это не только низкая чувствительность к проводимой терапии, но также значительно худшее клиническое течение, в том числе большая частота обострений и обращений за неотложной помощью. Совокупность данных, включая полученные в настоящем исследовании, о механизмах, лежащих в основе измененной экспрессии p53, дает еще один повод для рекомендации максимально активной терапии тяжелой астмы, которая потенциально способна предотвратить развитие терапевтической резистентности или вернуть утраченную чувствительность к базисным препаратам.

2.3. Сравнительная характеристика различных фармакотерапевтических режимов базисной терапии тяжелой БА с позиций преодоления терапевтической резистентности и восстановления баланса в системе эффекторов апоптоза эозинофилов

Изучена клинико-функциональная характеристика заболевания и экспрессия эффекторов апоптотического каскада в эозинофилах периферической крови при назначении пациентам различных режимов базисного лечения. Всем пациентам (n=60), включенным в данное исследование, была назначена терапия ФП в дозах, соответствующих степени тяжести заболевания (GINA, 2002), сроком на 6 месяцев. Препарат использовался в качестве монотерапии, либо в комбинации с теофиллином и β2-агонистом длительного действия (см. рис. 3).

Наибольшая клиническая эффективность установлена при использовании комбинированного фармакотерапевтического режима ФП+Сальметерол. Соответствие критериям «полного» и «хорошего» контроля (GOAL) продемонстрировали 90% пациентов данной группы. Для сравнения, при использовании монотерапии ФП и сочетания ФП+Тео заболевание контролировалось только в 30% и 45% случаев соответственно (данные приведены на момент окончания лечебного периода). Ретроспективный анализ показал, что наибольший удельный вес пациентов, соответствовавших определению терапевтически-резистентной астмы, зарегистрирован в группах «ФП» и «ФП+Тео» (92%).

Изменения показателей системы программируемой гибели эозинофилов были следующими: большинство пациентов групп «ФП» и «ФП+Тео» демонстрировали характерный «патофизиологический фенотип» терапевтически-резистентной тяжелой БА (снижение экспрессии p53, высокая активность мРНК антиапоптотических эффекторов и стабильная гиперэкспрессия ИЛ-5 на фоне проводимого лечения). Этот факт объясняется тем, что именно в описанных группах было сосредоточено 92% обследованных с терапевтически-резистентной астмой.

При использовании комбинации ФП+Сальметерол отмечен регресс изменений в системе апоптоза эозинофилов. У пациентов данной подгруппы зарегистрировано уменьшение экспрессии антиапоптотических факторов с одновременным увеличением экспрессии проапоптотических эффекторов уже к концу четвертой недели терапии. По завершении 24-недельного лечебного периода выявлено статистически значимое увеличение экспрессии ядерного фактора p53 и нормализация продукции провоспалительного цитокина ИЛ-5.

Механизм индукции апоптоза ингаляционными кортикостероидами заключается в подавлении экспрессии в очаге воспаления основных факторов выживания эозинофилов (ИЛ-5, ИЛ-3, ГМ-КСФ) [Arai Y., 2000; White S.R., 2002]. Кроме того, ГКС обладают способностью непосредственно регулировать апоптотический каскад путем управления экспрессией ядерного фактора p53, антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-XL) [Zangrilli J., 2000; Li Z., 2001; Walsh G.M., 2003]. Однако, в данном случае доля прямого действия кортикостероида на эозинофилы периферической крови, безусловно, ничтожно мала. Вероятно, терапевтический эффект кортикостероидов, прежде всего, обусловлен его опосредованным действием через управление экспрессией мРНК провоспалительных цитокинов антиапоптотической направленности.

Высокая клиническая эффективность комбинации ФП+Сальметерол, согласно опубликованным в последние годы данным, обусловлена синергичным действием препаратов [Горячкина Л.А., 1999; Черняк Б.А., 2000; Barnes P.J., 1998; Woolcock A., 1996]. Известна способность β 2-агонистов длительного действия активировать рецепторы ГКС [Nelson H.S., 2003; Shrewbury S., 2000]. Сальметерол усиливает угнетающее влияние ГКС на аллерген-индуцированную активацию мононуклеарных клеток периферической крови, блокирует аллерген-индуцированную сосудистую проницаемость и высвобождение гистамина. Кроме того, в 1998г. Anenden с соавт. установили, что Сальметерол усиливает апоптоз эозинофилов, индуцированный ФП *in vivo*. В целом, описанные выше механизмы действия составляющих комбинации ФП + Сальметерол подтверждают полученные в настоящем исследовании результаты относительно высокой эффективности ее использования.

Таким образом, терапевтическая резистентность при тяжелой БА принципиально обратима, в том числе и посредством устранения дисбаланса в системе программируемой гибели эозинофилов, при условии назначения комбинированной терапии ФП+Сальметерол в адекватных дозах.

Выводы

1. Феномен терапевтической резистентности широко распространен в популяции больных тяжелой астмой в России (63%). При терапевтически-резистентной БА зафиксированы достоверно большие нарушения клинико-функциональных показателей течения заболевания. Различают несколько фенотипов тяжелой терапевтически резистентной астмы по характерным клиническим особенностям течения. Фенотип терапевтически-резистентной БА с постоянной бронхиальной обструкцией характеризуется более тяжелым течением заболевания ($p < 0,05$): низкие показатели функции внешнего дыхания (ОФВ₁, ФЖЕЛ), более частые дневные и ночные симптомы, большее количество и продолжительность госпитализаций, большая частота использования бронхолитической терапии, вызовов СМП, визитов к врачу по поводу ухудшения состояния и возникновения НЛЯ. Выявлено трехкратное преобладание женщин в структуре тяжелой БА («НАБАТ»). У женщин отмечено достоверно большее количество вызовов СМП, визитов по поводу ухудшения состояния.
2. Установлено недостаточное внедрение в клиническую практику современных рекомендаций по ведению пациентов с данным заболеванием. Одновременно показана ассоциация более легкого течения астмы с качественным ведением больного: образованием, исключением воздействия триггеров, мониторингом текущего состояния, лечением сопутствующей патологии, адекватной терапией.
3. Нарушение регуляции апоптоза эозинофилов периферической крови зафиксировано у всех больных БА в периоде обострения вне зависимости от степени тяжести заболевания. Этот процесс в большей степени обусловлен пониженной экспрессией гена ядерного проапоптотического регулятора p53 и увеличением экспрессии генов антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-XL).
4. Достижение контроля над заболеванием у пациентов с легкой и среднетяжелой астмой взаимосвязано с восстановлением активности мРНК эффекторов апоптоза. Тяжелая БА отличается стабильно низкой экспрессией p53 и отсутствием снижения экспрессии антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-XL) на фоне адекватной базисной терапии. Установлены специфичные изменения в системе программируемой гибели эозинофилов при терапевтически-резистентной астме. В основе данных изменений лежит выраженный и устойчивый к проводимой терапии дисбаланс про- и антиапоптотических факторов: парадоксальное падение экспрессии p53 на фоне проводимого лечения, высокая активность мРНК антиапоптотических эффекторов, стабильная гиперэкспрессия ИЛ-5.
5. Комбинированная фармакотерапия ФП+Сальметерол у пациентов с тяжелой БА превосходит по эффективности таковую при использовании монотерапии ФП и сочетания ФП+Тео ($p < 0,05$). Применение комбинации ФП+Сальметерол позволяет преодолевать терапевтическую резистентность, характерную для тяжелой астмы. Назначение в качестве базисной терапии комбинации ФП с Сальметеролом приводит к достоверному уменьшению экспрессии антиапоптотических факторов (bcl-2, bcl-XL) с одновременным увеличением экспрессии проапоптотических эффекторов (bax, bcl-XS) уже к концу четвертой недели терапии. По завершении 24-недельного лечебного периода отмечается статистически значимое увеличение экспрессии ядерного фактора p53 и снижение активности мРНК провоспалительного цитокина ИЛ-5.

Практические рекомендации

1. Пациентов с тяжелой бронхиальной астмой следует рассматривать как группу риска по формированию терапевтически-резистентной формы заболевания. Первоочередная задача врача в данном случае - своевременное назначение комбинированной терапии в объеме, соответствующем IV ступени. Предпочтительным является использование сочетания ингаляционных кортикостероидов с β_2 -агонистами длительного действия. Конечной целью лечения должно быть соответствие пациента критериям полного контроля астмы (GOAL).
2. При терапевтически-резистентной тяжелой БА восстановление баланса в системе апоптоза эозинофилов происходит по окончании 24-недельного курса активной базисной противовоспалительной терапии с использованием комбинации ФП с Сальметеролом. В связи с этим, при наличии терапевтической резистентности следует применять указанный фармакотерапевтический режим в стабильно высоких дозах в течение как минимум 6 месяцев.
3. Обнаруженные при выполнении настоящей работы особенности регуляции апоптоза эозинофилов при терапевтически-резистентной тяжелой бронхиальной астме могут использоваться в качестве дополнительных критериев эффективности ее лечения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Неинвазивные маркеры аллергического воспаления у больных бронхиальной астмой // Сборник трудов первой межрегиональной научно-практической конференции. – Томск, 2000. – С. 118-120.
2. Значение метода индуцированной мокроты для оценки эозинофильного воспаления дыхательных путей // Вестник СГМУ: ежеквартальное периодическое издание СМУ. – Томск, 2000. – №2. – С. 41-43.
3. Характеристика маркеров воспаления у больных бронхиальной астмой // Научная молодежь на пороге XXI века. Науки о человеке / Сборник статей молодых ученых и специалистов. – Томск, 2000. – С. 128-129. (Соавт. Кобякова О.С., Дубаков А.В.).
4. Характеристика взаимосвязи некоторых маркеров эозинофильного воспаления в семьях больных бронхиальной астмой // Сборник «Генетика человека и патология», выпуск 5. – Томск, 2000. – С. 321-325. (Соавт. Кобякова О.С., Дубаков А.В.).
5. Correlation of total IgE and bronchial hyperresponsiveness. Тезисы // European Respiratory Society Annual Congress 2000.
6. Применение Фликсотида у больных бронхиальной астмой // Материалы VI итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых. - Киров, 2000. – С.24. (Соавт. Кобякова О.С.).
7. Бронхиальная гиперреактивность – критерий эффективности терапии у больных бронхиальной астмой // Материалы III конгресса с международным участием «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении». - Анталия, 2000. – С.95. (Соавт. Кобякова О.С. Дубаков А.В., Абазова Ф.И.).

8. Эффективность флутиказона у больных среднетяжелой бронхиальной астмой // Тезисы докладов Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва, 2000. – С. 137. (Соавт. Кобякова О.С., Огородова Л.М.).
9. Стратегия профилактики бронхиальной астмы // Тезисы докладов I-й Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых медиков с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины». – Владивосток, 2000. – С. 183.
10. Уровень эозинофилов в индуцированной мокроте – характеристика воспаления при бронхиальной астме // Сборник научных статей по итогам межрегиональной научно-практической конференции студентов интернов и ординаторов педиатров «Здоровье детей – наше будущее!». – Томск, 2001. – С. 9-12.
11. Phenotypical particularities in asthmatic patients with different genotypes by C-703T (IL-5 gene) and A-80G (IL-5RA gene) polymorphisms. Тезисы // European Respiratory Society Annual Congress 2001 (Coauthor. Kobyakova O.S., Freidin M.B., Salnikov A.V.)
12. Эффективность и безопасность использования различных режимов комбинированной терапии у пациентов с тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой // Пульмонология. – 2003. - №1. – С. 75-79. (Соавт. Огородова Л.М., Кобякова О.С., Ханова Ф.М., Петровский Ф.И., Иванова У.В., Сметаненко Т.В., Краюшкина Н.П.).
13. Анализ смертности вследствие заболеваний органов дыхания в Томской области // Здравоохранение Российской Федерации. – 2004. - №1. – С. 45-46. (Соавт. Огородова Л.М., Головачев Б.В., Кобякова О.С., Федорова О.С.).
14. Базисная терапия тяжелой бронхиальной астмы у взрослых. Данные национального исследования НАБАТ // Пульмонология. – 2004. - №6. – С. 68-72. (Соавт. Чучалин А.Г., Огородова Л.М., Петровский Ф.И., Жестков А.В., Илькович М.М., Мартыненко Т.И., Ребров А.П., Терещенко Ю.А., Фассахов Р.С., Черняк Б.А., Куликов Е.С.).
15. Роль нарушения регуляции апоптоза эозинофилов при бронхиальной астме у детей // Сборник научных статей по итогам IV межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых-педиатров «Здоровье детей – наше будущее!», Томск, Изд. Томинформ, 2004. – С. 82-96. (Соавт. Деев И.А., Иванчук И.И., Сазонов А.Э., Агеева И.П., Козырицкая Д.В., Федорова О.С.).
16. The influence of eosinophil apoptosis on the severe asthma course. Тезисы // European Respiratory Society Annual Congress 2004.
17. Дифференциальная диагностика очаговых болезней легких. Актуальные вопросы лечения пневмоний // Учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов (рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России). – Томск, 2004. – 55с. (Соавт. Черногорюк Г.Э., Кобякова О.С., Краюшкина Н.П., Сметаненко Т.В.).
18. Мониторинг и лечение тяжелой бронхиальной астмы у взрослых: результаты многоцентрового национального исследования НАБАТ // Терапевтический архив. – 2005. - №3. – С. 36-43. (Соавт. Чучалин А.Г., Огородова Л.М., Петровский Ф.И., Жестков А.В., Илькович М.М., Мартыненко Т.И., Ребров А.П., Терещенко Ю.А., Фассахов Р.С., Черняк Б.А.).
19. Особенности нарушения апоптоза эозинофилов при тяжелой терапевтически-резистентной бронхиальной астме // Бюллетень сибирской медицины. - 2005. - №4. – С. 32-41. (Соавт. Петровский Ф.И., Иванчук И.И., Сазонов А.Э.).

Список сокращений

- БА – бронхиальная астма
БГР – бронхиальная гиперреактивность
БДП – беклометазона дипропионат
ГКС – глюкокортикостероиды
ИКС – ингаляционные кортикостероиды
ИЛ – интерлейкин
ИЛДП – индекс лабильности дыхательных путей
КАП – кожные аллергопробы
НЛБ – недельная лабильность бронхов
НЛЯ – нежелательные лекарственные явления
ОФВ1 – объем форсированного выдоха за 1 секунду
ПСВ – пиковая скорость выдоха
СКС – системные кортикостероиды
СЛБ – среднесуточная лабильность бронхов
СМП – скорая медицинская помощь
Тео - теofilлин
ФВД – функция внешнего дыхания
ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких
ФП – флутиказона пропионат
IgE – иммуноглобулин E