

На правах рукописи

**ДЕЕВ
Иван Анатольевич**

**МЕХАНИЗМЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ ЭОЗИНОФИЛОВ ПРИ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ**

14.00.09 – педиатрия

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

Томск - 2005

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор	Огородова Людмила Михайловна
Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор кандидат медицинских наук	Кравец Елена Борисовна Басарева Наталья Ивановна
Ведущая организация: ФГУ Научный центр здоровья детей РАМН	

Защита состоится « » _____ 2005 г. в ____⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д208.096.02 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Россия, Томск, Московский тр., 2)

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

Автореферат разослан « » _____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тюкалова Л.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Во всем мире отмечается тенденция к росту заболеваемости бронхиальной астмой (БА) и ее более тяжелому течению, в том числе и у детей [Геппе Н.А., 1997; 1999, Ревякина В.А., 2000, GINA, 2002]. Актуальность проблемы определяется не только ростом заболеваемости, но и особенностями клинического течения БА - частые жизнеугрожающие состояния и высокий риск смерти [Геппе Н.А., 2000]. В последние десятилетия предприняты меры по стандартизации методов диагностики и лечения пациентов с БА, основанные на данных широкомасштабных клинических исследований, результатом чего стало появление международного документа GINA и Национальной программы по ведению больных астмой [GINA, 2002; Бронхиальная астма у детей: диагностика, лечение, профилактика, 2004]. Несмотря на широкое внедрение регламентирующих документов в клиническую практику вопрос контроля хронического воспаления при БА остаётся открытым. Современные исследования демонстрируют, что использование адекватной базисной противовоспалительной терапии позволяет купировать симптомы БА уже к концу первой недели лечения. Однако достижение контроля заболевания не является критерием отсутствия воспаления. Воспалительный процесс остаётся активным на протяжении длительного времени, несмотря на проводимую противовоспалительную терапию: сохраняется высокий уровень бронхиальной гиперреактивности, продолжаются процессы ремоделирования бронхов [Pedersen S., 2004]. В этой связи исследование патогенетических основ болезни, а значит и совершенствование методов диагностики и лечения являются актуальными задачами современной медицины.

Концепция БА связана с персистирующим воспалением респираторного тракта, следствием которого являются типичные симптомы болезни – приступы экспираторного удушья, одышка, кашель. Выраженность и частота вышеуказанных симптомов рассматриваются как основные критерии при оценке степени тяжести заболевания. Воспаление дыхательных путей – это следствие гистотоксического эффекта провоспалительных медиаторов, высвобождаемых в первую очередь тучными клетками и эозинофилами. Эозинофилы являются ключевыми эффекторными клетками воспаления при БА. У больных БА их обнаруживают в крови, мокроте, бронхоальвеолярном лаваже, в стенке бронхов при биопсии и аутопсии [Короستовец Д.С., 1999]. По всей видимости существуют определённые механизмы, обуславливающие увеличение количества эозинофилов при БА и миграцию этих клеток в очаг воспаления. Эозинофильная инфильтрация зависит от ряда факторов, таких как селективная адгезия и миграция, а также повышение жизнеспособности в ответ на воздействие факторов роста (ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-6) [Огородова Л.М., 1999; Невзорова В.А., 2001; Сазонов А.Э., 2003]. Внутриклеточные медиаторы, высвобождаемые эозинофилами при БА, обладают гистотоксическим эффектом, вызывая повреждение тканей и воспаление дыхательных путей. Для ограничения этого повреждающего действия в нормальных условиях эозинофилы элиминируются путём апоптоза. Однако отмечено, что при бронхиальной астме эозинофилы гибнут преимущественно по некротическому пути (супрессия апоптоза), высвобождая медиаторы воспаления и провоспалительные цитокины [Abastado J.P., 1996;

Blaswell J., 2000]. В этой связи апоптотическая гибель эозинофилов рассматривается как важный механизм ограничения воспалительного процесса.

Среди внутриклеточных модуляторов апоптоза наиболее известны в настоящее время, по данным экспериментальных исследований, протоонкогены, которые разделяют на супрессоры (bcl-2, bcl-xL) и активаторы (bax, bcl-xS, p53) [Dewson G., 1999; Nakano K., 2001; Vander Heiden M.G., 2001]. Апоптозингибирующим действием обладает ИЛ-5, как регулятор экспрессии антагонистов апоптоза [Сазонов А.Э., 2003].

Однако, регуляция эозинофильного воспаления с учётом эффекторов апоптоза не изучена, что не позволяет обсуждать эти механизмы с достаточной степенью ясности при БА. В этой связи изучение роли механизмов апоптоза эозинофилов у детей, больных БА в формировании и поддержании хронического воспаления респираторного тракта является актуальной задачей современной педиатрии.

Цель

Изучить механизмы регуляции эозинофильного воспаления при бронхиальной астме у детей путём определения экспрессии анти- и проапоптотических факторов для оценки эффективности патогенетической терапии бронхиальной астмы.

Задачи

1. Оценить продукцию супрессоров (bcl-2, bcl-xl) и активаторов (bax, bcl-xs, p53) апоптоза у детей с разной степенью тяжести бронхиальной астмы в разные периоды течения заболевания в возрастном аспекте.
2. Установить взаимосвязь клинико-функциональных параметров бронхиальной астмы с активностью мРНК анти- и проапоптотических факторов эозинофилов.
3. Изучить продукцию ИЛ-5 у детей с различной степенью тяжести бронхиальной астмы в разные периоды заболевания и сопоставить с экспрессией генов антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-xl) в динамике на фоне лечения.
4. Установить влияние базисной противовоспалительной терапии на экспрессию мРНК антиапоптотических (bcl-2, bcl-xl) и проапоптотических (bax, bcl-xs) эффекторов при бронхиальной астме.
5. Дать сравнительную оценку разных фармакотерапевтических режимов у больных тяжёлой бронхиальной астмой с позиции клинической эффективности и воздействия на молекулярные механизмы эозинофильного воспаления.

Научная новизна

Впервые дана комплексная оценка взаимосвязи программируемой гибели эозинофилов и экспрессии мРНК анти- и проапоптотических эффекторов с клинико-функциональными параметрами бронхиальной астмы разной степени тяжести в возрастном аспекте у детей. Выявлена высокая активность мРНК проапоптотических эффекторов и конституционально низкая активность мРНК антиапоптотических факторов при бронхиальной астме у детей, независимо от возраста и степени тяжести заболевания. Установлена ассоциация низкой апоптотической активности эозинофилов с персистирующим воспалением дыхательных путей. Показано, что использование базисной противовоспалительной терапии сопровождается восстановлением регуляторных механизмов апоптоза эозинофилов и параллельно клинико-функциональных параметров заболевания. Наибольшая эффективность с позиций нормализации апоптотической активности эозинофилов у детей, больных бронхиальной астмой показана при использовании фармакотерапевтического ре-

жима Флутиказона пропионат 500 мкг/сутки + Сальметерол. Применение данной комбинации сопровождается достоверным снижением экспрессии антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-XL) с одновременным увеличением активности генов проапоптотических эффекторов (bax, bcl-XS) уже через четыре недели лечения. Снижение активности мРНК провоспалительного цитокина ИЛ-5 и увеличение экспрессии мРНК p53 зарегистрировано по окончании лечебного периода (24 недели). Таким образом, впервые получены доказательства того, что апоптоз эозинофилов при бронхиальной астме у детей занимает ключевые позиции в процессах формирования и поддержания хронического воспаления дыхательных путей.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты можно использовать с целью оценки эффективности лечения бронхиальной астмы (определение активности мРНК анти- и проапоптотических эффекторов в динамике на фоне проводимой терапии). Выявленные особенности регуляции системы апоптоза эозинофилов при бронхиальной астме могут быть использованы для разработки новой, более специфичной противовоспалительной терапии заболевания.

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

Положения, выносимые на защиту

1. Нарушение программируемой гибели эозинофилов является важным механизмом формирования и поддержания персистирующего воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме у детей. Нарушение апоптотической активности эозинофилов при бронхиальной астме характеризуется повышенной экспрессией антиапоптотических (ИЛ-5, bcl-2, bcl-xl) эффекторов и конституционально низкой активностью мРНК проапоптотических факторов (bax, bcl-xs, p53).
2. Использование базисной противовоспалительной терапии сопровождается восстановлением механизмов регуляции апоптоза эозинофилов. Противовоспалительный эффект кортикостероидов реализуется посредством регуляции экспрессии мРНК антиапоптотических эффекторов. Оптимальным фармакотерапевтическим режимом при тяжёлой бронхиальной астме у детей с позиции достижения контроля над заболеванием и восстановления апоптотической активности эозинофилов является комбинация высоких доз флутиказона пропионата с сальметеролом.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Европейском респираторном конгрессе (Берлин, 2001), X Национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2003), IV международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2004), Европейский респираторный конгресс (Глазго, 2004), V международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2005), V межрегиональной научно-практической конференции молодых учёных-педиатров «Здоровье детей – наше будущее!» (Томск, 2005), областном обществе детских аллергологов-иммунологов (Томск, 2005), со-вещании кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного

факультета СибГМУ (Томск, 2005), врачебной конференции ОГУЗ «Областная детская больница» (Томск, 2005).

Внедрение результатов исследований

Полученные результаты используются в работе отделения клинической иммунологии аллергологии ОГУЗ «Областная детская больница» г.Томска, областного «Астма-центра» ОГУЗ «ОДБ» и на базе отделения клинической иммунологии и аллергологии гордской больницы №4 г. Новокузнецка. Материалы проведенных исследований используются в учебном процессе на кафедре факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета для студентов лечебного и медико-биологического факультетов и в рамках цикла ФУВ «детская аллергология и иммунология» для интернов и ординаторов-педиатров.

Публикации

По теме диссертации опубликована 31 работа, в том числе 11 журнальных статей, из которых 6 - в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственных наблюдений и выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 8 таблицами. Список источников цитируемой литературы включает в себя 160 работ, из которых 40 отечественных и 120 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе кафедры факультетской педиатрии (с курсом детских болезней лечебного факультета) Сибирского государственного медицинского университета (зав. каф.- профессор, д.м.н. Л.М. Огородова), отделения функциональной диагностики областного детского центра клинической иммунологии-аллергологии ОГУЗ «Областная детская больница», г. Томск (зав.отд. –А.В. Чернов), Астма-центра ОГУЗ «Областная детская больница», г. Томск (гл. врач – В.А.Сальников), отдела биохимии (зав. отд.- к.м.н. А.Э. Сазонов) и отдела молекулярной биологии (зав. отд. - к.м.н. И.И. Иванчук) Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (зав. ЦНИЛ – профессор, д.м.н. А.Н. Байков).

В период 2003 - 2005 гг. на базе Областного центра клинической иммунологии-аллергологии было обследовано 120 детей в возрасте от 6 до 17 лет. Исследуемую группу составили 100 детей, больных БА: легкой персистирующей (n=20), среднетяжёлой (n=20) и тяжёлой БА (n=60), группу контроля составили здоровые дети (n=20). Исследование утверждено этическим комитетом ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава от 26 апреля 2003 года, протокол № 18. Все дети, включённые в исследование, посещали клинику четыре раза (рис. 1.), в течение первых двух недель (после визита 0 – V0) проводился мониторинг пиковой скорости выдоха (ПСВ) с целью верификации диагноза и степени тяжести БА. На каждом визите проводился объективный осмотр, исследование функции внешнего дыхания (ФВД) и уровня бронхиальной гиперреактивности (БГР) в метахолиновом тесте, определение количества эозинофилов периферической крови с признаками апоптотической гибели, а также экспрессии мРНК анти- и проапоптотических эффекторов (рис. 1.). Среди сопутствующих заболеваний преобладала патология пищеварительного тракта - 24% детей наблюдались у гастроэнтеролога с диагнозом хронический га-

стродуоденит, 17% страдали дискинезией желчевыводящих путей, у двух пациентов в анамнезе выявлено наличие язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, у 14% детей при последней госпитализации в стационар в качестве сопутствующего диагноза выявлен дисбиоз кишечника (в исследование целенаправленно были включены дети, не имеющие гельминтных инвазий). Пролапс митрального клапана и аномально расположенная хорда выявлены у 7% детей, включённых в исследование, 3% пациентов страдали экзогенно-конституциональным ожирением, только у 1 ребёнка в анамнезе отмечено наличие острого пиелонефрита (за 2 года до участия в данном исследовании). Наибольшее количество пациентов с сочетанной atopической патологией было среди детей с тяжёлой БА (82,4%), при этом большинство из них (86%) в качестве сопутствующей патологии страдали аллергическим ринитом.

Критерии включения пациентов с бронхиальной астмой

- Амбулаторные и стационарные пациенты.
 - Возраст пациентов от 6 до 17 лет.
 - Положительные результаты кожных аллергопроб.
 - IgE в сыворотке крови ≥ 150 МЕ/мл.
 - Пациенты, имеющие ранее подтверждённый диагноз бронхиальной астмы (GINA 2002), не использующие препараты базисной терапии в течение 4х последовательных недель до включения в исследование.
 - Отсутствие острых респираторных заболеваний в течение 4х недель до скринингового визита в клинику.
 - Умение правильно пользоваться ингалятором, пикфлоуметром, способность адекватно оценивать своё состояние, а также своевременно и верно заполнять дневники самоконтроля (ПСВ - утро, вечер; оценка дневных и ночных симптомов).
 - Пациенты, не получавшие (в течение последних 4х недель до включения в исследование) следующие препараты: глюкокортикостероиды (системные, ингаляционные, топические), антилейкотриеновые препараты, пролонгированные теофиллины, пролонгированные β_2 – агонисты, кромогликат натрия, недокромил натрия, омализумаб.
 - Пациенты, не имевшие острых респираторных заболеваний в течение предшествующих 4 недель.
- **1 группа:** лёгкая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы чаще, чем 1 раз в неделю, но реже чем 1 раз в день; ночные симптомы чаще 2 раз в месяц, но не чаще 1 раза в неделю; вариабельность ПСВ (ОФВ₁) 20 – 30%, при этом ОФВ₁ $\geq 80\%$ от должного и ПСВ $\geq 80\%$ от персонального лучшего (ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1 сек., ПСВ – пиковая скорость выдоха);
 - **2 группа:** среднетяжелая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы ежедневные; ночные симптомы чаще 1 раза в неделю; ежедневное использование короткодействующих β_2 -агонистов; вариабельность ПСВ

(ОФВ₁) более 30%, при этом ОФВ₁ 60 - 80% от должного и ПСВ 60 - 80% от персонального лучшего;

- **3 группа:** тяжёлая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков:
 - симптомы ежедневные; частые ночные симптомы; ограничение физической активности; вариабельность ПСВ (ОФВ₁) более 30%, при этом ОФВ₁ ≤ 60% от должного и ПСВ ≤ 60% от персонального лучшего (GINA 2002);
 - объём терапии для детей (дозы по беклометазона дипропионату) более 800 мкг/сутки;
 - объём терапии соответствует легкой персистирующей астме, симптомы на фоне терапии – среднетяжелой;
 - объём терапии соответствует легкой персистирующей астме, симптомы на фоне терапии – тяжелой;
 - объём терапии соответствует среднетяжелой астме, симптомы на фоне терапии – легкой персистирующей;
 - объём терапии соответствует среднетяжелой астме, симптомы на фоне терапии – среднетяжелой;
 - объём терапии соответствует среднетяжелой астме, симптомы на фоне терапии – тяжелой;
 - постоянное применение системных кортикостероидов.

Критерии включения в контрольную группу

Возраст пациентов от 6 до 17 лет; отрицательные результаты кожных аллергопроб; IgE < 100 МЕ/мл; отсутствие аллергических заболеваний на момент включения и в анамнезе, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение четырёх недель до момента включения в исследование.

Дизайн исследования

Проспективное исследование в параллельных группах с рандомизацией для больных тяжёлой БА, продолжительностью 28 недель (Рис. 1).

Клинико-анамнестический метод

При включении в исследование у всех детей был детально изучен анамнез заболевания, проведено обследование соответственно медицинским стандартам как относительно БА, так и в отношении сопутствующей патологии. На протяжении всего периода исследования осуществлялся мониторинг количества и тяжести симптомов БА.

Исследование функции легких

Оценка функциональных тестов проведена у всех пациентов, включённых в исследование на оборудование MasterScope фирмы Erich Jaeger GmbH (условия проведения теста ATS Standardization of Spirometry, 1995). Пиковая скорость выдоха измерялась пикфлоуметрами Mini-Wright в утренние и вечерние часы до приёма любых лекарственных препаратов. Для оценки уровня неспецифической бронхиальной гиперреактивности всем пациентам (при условии ОФВ₁ более 75% от должного) был проведён метахолиновый тест (PC20) на оборудовании MasterScope фирмы Erich Jaeger GmbH с использованием APS-pro дозатора (условия проведения теста ATS Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing, 2000).

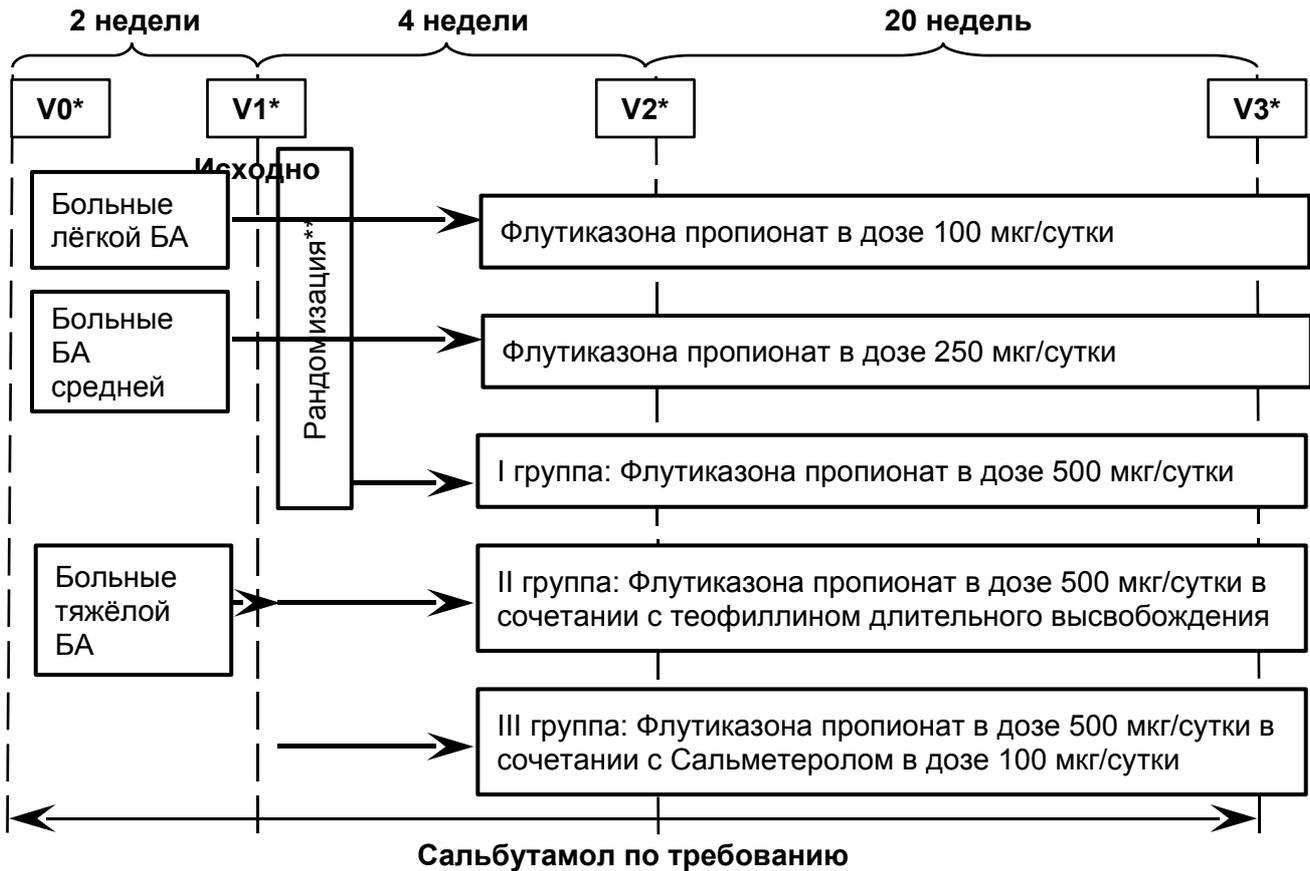


Рис. 1. Схема исследования

Примечание:

* визит 0 (V0) – применение критериев включения, мониторинг ПСВ пациента в течение 2х недель;

визит 1 (V1) – рандомизация пациента, назначение терапии согласно рандомизационной группе, определение ФВД, БГР, уровня общего IgE в сыворотке крови, определение экспрессии мРНК антиапоптотических (ИЛ-5, bcl-2, bcl-xl) и проапоптотических (bax, bcl-xs, p53) эффекторов;

визит 2 (V2) - через 4 недели от V1 – определение ФВД, БГР, экспрессии мРНК антиапоптотических (ИЛ-5, bcl-2, bcl-xl) и проапоптотических (bax, bcl-xs, p53) эффекторов;

визит 3 (V3) - через 20 недель от V2 определение ФВД, БГР, экспрессии мРНК антиапоптотических (ИЛ-5, bcl-2, bcl-xl) и проапоптотических (bax, bcl-xs, p53) эффекторов.

**Принцип случайного распределения пациентов в фармакотерапевтические группы был реализован путём конвертной рандомизации.

Получение периферической крови

Периферическую (венозную) кровь забирали из *venaе ulnaris* утром, натощак в стерильную пробирку, содержащую 2,5 мл 3% раствора ЭДТА, в объеме 10 мл.

Определение абсолютного и относительного содержания эозинофилов в периферической крови

Относительное и абсолютное содержание эозинофилов определяли общепринятыми методами (Новицкий В.В., 1999).

Определение общего IgE в сыворотке крови

Определение общего IgE в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью стандартного набора реагентов «Вектор БЕСТ IgE – ИФА – БЕСТ – стрип» согласно приложенной инструкции.

Получение обогащенной суспензии ядросодержащих клеток из периферической крови

Полученную кровь смешивали с 3% ЭДТА (4:1), инкубировали 60 мин при температуре 37°C. Образовавшийся над эритроцитами слой плазмы осторожно собирали пастеровской пипеткой и переносили в стерильную пробирку. Добавляли 0,9% NaCl (1:1) и центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Затем удаляли супернатант и повторяли процедуру. Супернатант сливали, осадок использовали для дальнейшего исследования.

Выделение эозинофилов из периферической крови

Выделение эозинофилов проводили на трех градиентах плотности фиколла (молекулярная масса 400000) и 35% раствора урографина : 1,082, 1,092 и 1,115 г/см³. Клетки над выбранными градиентами плотности (1,115 - эозинофилы нормальной плотности; 1,092 - эозинофилы высокой плотности) собирали пипеткой в центрифужную пробирку и дважды отмывали раствором Хенкса (Берестецкий А. Б., 1997).

Цитоморфологический анализ апоптоза эозинофилов

Морфологический анализ апоптотической гибели клеток проводили на препаратах, приготовленных из культуральной клеточной суспензии по общепринятой методике. Мазки окрашивали по Нохта-Максимову (азур II-эозин). Анализ препаратов проводился на микроскопе «REICHERT» (Австрия) при увеличении об. 90 х ок. 10. При анализе использовали критерии, характеризующие кариопатологические и цитопатологические изменения в клетках (Allen R.T., 1997). Подсчитывали не менее 200 клеток.

Выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК)

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора для выделения ДНК и РНК на колонках «QIAGEN RNA/DNA» (QIAGEN, Германия). Принцип метода основан на связывании РНК с сорбентом с последующей ее элиминацией специальным буфером. Выделение проводили согласно приложенной инструкции.

Анализ экспрессии мРНК

Из тотальной РНК получали полиА-РНК (мРНК). Выделение проводили на колонках с олиго-dT целлюлозой (ICN, США). РТ-ПЦР выполняли с помощью набора «Titan One Tube RT-PCR System» (Roche Diagnostics, Германия) согласно приложенной инструкции. Амплификацию ДНК проводили с использованием специфических праймеров для bax, bcl-2, bcl-x1, bcl-xs, ИЛ-5, p53. Все праймеры синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе («Биосет», Новосибирск).

Экспрессию мРНК оценивали полуколичественно в сравнении с экспрессией мРНК глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФД). Ген этого фермента относится к постоянно экспрессирующим (house keeping) генам, и его экспрессия является стабильной и постоянной во всех клетках организма. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 2% агарозном геле. Изображения электрофореграмм получали с использованием стационарной видеосистемы и обрабатывали при помощи

компьютерной программы «Biotest D» с целью получения количественной информации по каждой пробе. Для каждой пробы результат оценки экспрессии мРНК ГАФД принимали в качестве эталонной пробы, а количественное значение – за 100% (Рис. 2).

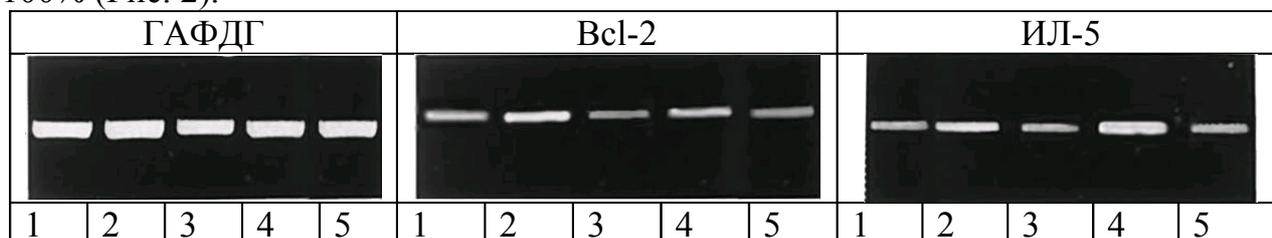


Рис. 2. Экспрессия мРНК ГАФД, мРНК vcl-2 и мРНК ИЛ-5 у больных БА

Примечание: 1 – группа здоровых доноров; 2 – больные легкой БА; 3 - больные легкой БА после лечения; 4 - больные тяжелой БА; 5 - больные тяжелой БА после лечения.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных 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 не связанных выборках применяли U-критерий Манна-Уитни, в связанных – критерий Вилкоксона. Для сравнения показателей в трех несвязанных группах проводили дисперсионный анализ ANOVA Крускала-Уоллиса, в трёх связанных анализ Фридмана. Степень взаимосвязи между признаками оценивали, вычисляя коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$. Для сравнения частот качественных признаков использовался критерий χ^2 . Данные группировались в соответствии с задачами исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-функциональная характеристика больных бронхиальной астмой

При включении в исследование все больные (лёгкой, среднетяжёлой и тяжёлой БА) имели выраженные симптомы заболевания, потребность в β_2 -агонистах короткого действия, низкие значения ОФВ1 и ПСВ, высокий уровень бронхиальной гиперреактивности (Табл. 1).

Назначение базисной противовоспалительной терапии приводило к нормализации клинико-функциональных параметров заболевания, изучаемые показатели по окончании лечебного периода (24 недели терапии) достоверно отличались от исходных значений во всех исследуемых группах (Табл. 1).

При этом полное восстановление функциональных показателей, отсутствие дневных и ночных симптомов после лечения зарегистрировано только у больных лёгкой и среднетяжёлой БА. В среднем, в группе детей с тяжёлой БА по окончании лечения не достигнута нормализация клинико-функциональных параметров БА (дневные и ночные симптомы, потребность в β_2 -агонистах короткого действия, уровень бронхиальной гиперреактивности). В этой связи дети, страдающие тяжёлой БА, по итогам лечебного периода были разделены на контролируемых (достигших в результате лечения критериев хорошего или полного контроля по GOAL) и неконтролируемых пациентов.

Таблица 1

Динамика клинико-функциональных показателей у детей с БА на фоне фармакотерапии

Исследуемые Параметры	Больные БА					
	Лёгкая (n=20)		Среднетяжёлая (n=20)		Тяжёлая (n=60)	
	Исходно	После лечения	Исходно	После лечения	Исходно	После лечения
Дневные симптомы в течение последних 7 дней, среднее количество	2,42± 0,31	0,30± 0,01 *,**	5,23± 0,39	0,20± 0,00 *,**	7,24± 0,81	1,01± 0,22*
Ночные симптомы в течение последних 7 дней, среднее количество	0,08± 0,02	0*,**	1,66± 0,60	0,10± 0,00*	4,27± 0,87	0,23± 0,05*
Использование средств скорой помощи (короткодействующие β ₂ -агонисты) в течение последних 7 дней, среднее количество	1,51± 0,39	0*,**	6,21± 1,98	0,25± 0,01*	8,64± 0,70	0,83± 0,21*
Объём форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1) % от должного	97,12± 3,98	112,21±7 ,75*,**	88,71± 3,71	102,74±7 ,24*,**	77,48± 4,46	89,22± 5,48*
Пиковая скорость выд. (ПСВ) % от должного	98,24± 2,81	123,12±7 ,21*,**	91,45± 2,27	119,62±7 ,32*,**	82,35± 3,52	91,42± 6,23*
БГР (РС 20) в тесте с метахолином (мг/мл)	7,0±0,64	9,6±0,89 *,**	6,8±0,7	8,5±0,92 *,**	0,96± 0,21	3,01± 0,45*

*p<0,05 по сравнению с исходными значениями для данной группы;

**p<0,05 при сравнении значений лёгкой, среднетяжёлой БА (V3) со значениями тяжёлой БА (V3)

Распределение контролируемых и неконтролируемых пациентов в зависимости от фармакотерапевтического режима представлено в табл. 2.

Таблица 2

Достижение контроля при различных фармакотерапевтических режимах у детей с тяжёлой БА

Фармакотерапевтические режимы											
ФП				ФП+Тео				ФП+Сальметерол			
Контролируемые пациенты		Неконтролируемые пациенты		Контролируемые пациенты		Неконтролируемые пациенты		Контролируемые пациенты		Неконтролируемые пациенты	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
14	70	6	30	15	75	5	25	19	95	1	5

Наибольшее количество пациентов, достигших контроля по GOAL к моменту окончания лечебного периода было отмечено при использовании комбинации ФП + Сальметерол. (табл. 2). На фоне терапии ФП и β_2 -агонистов длительного действия у пациентов с тяжёлой БА к окончанию лечебного периода отмечено достоверно меньшее количество дневных и ночных симптомов, эпизодов использования препаратов скорой помощи по сравнению с детьми, получавшими другие фармакотерапевтические схемы.

Содержание эозинофилов в периферической крови у детей, больных БА

Эозинофилы при БА обнаруживают в мокроте, бронхоальвеолярном лаваже, в стенке бронхов при биопсии и аутопсии. Многие исследователи описывают прямые взаимосвязи между относительным количеством эозинофилов периферической крови и бронхиальной гиперреактивностью, степенью тяжести заболевания, тяжестью обострений БА [Kroegel C., 1990; Woolley K.L., 1996; Vignola A.M., 1999].

Результаты, полученные в рамках данной работы, не противоречат данным литературы. При включении в исследование у всех детей (с лёгкой, среднетяжёлой и тяжёлой БА) зарегистрировано наличие эозинофилии в ОАК от $6,8 \pm 0,47\%$ до

$8,2 \pm 0,65\%$, что достоверно отличалось ($p=0,004$) от значений группы контроля ($2,1 \pm 0,23$) – Рис. 3.

Проведённый сравнительный анализ не показал достоверных различий данного показателя у больных с разной тяжестью БА, что может свидетельствовать о наличии сопоставимой активности эозинофильного воспаления у детей при БА разной степени. Однако проведённый сравнительный анализ в группе больных тяжёлой БА показал значимые отличия ($p=0,021$) относительного количества эози-

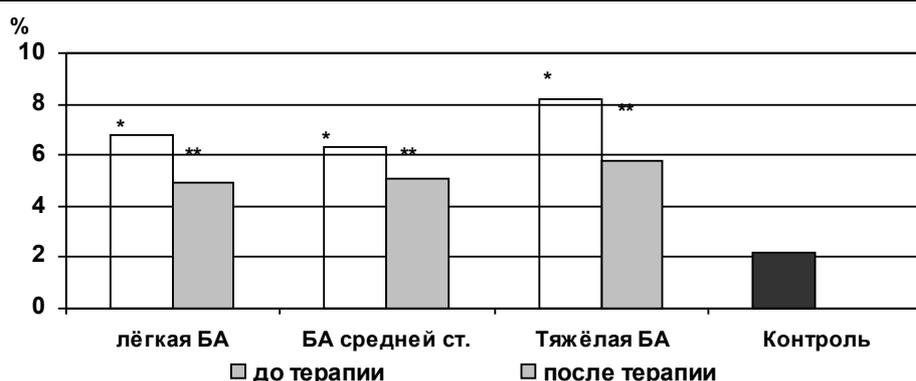


Рис. 3. Количество эозинофилов периферической крови у больных бронхиальной астмой до и после лечения

* $p < 0,02$ при сравнении с группой контроля до терапии

** $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля после терапии

*** $p < 0,05$ при сравнении показателей до и после терапии внутри каждой группы

нофилов в периферической крови у детей, страдающих БА в сочетании с аллергическим ринитом и/или атопическим дерматитом ($10,1 \pm 0,76$), в сравнении с больными БА без сопутствующей атопии ($6,3 \pm 0,44$). Аналогичных различий по изучаемому показателю в зависимости от пола, возраста и валентности сенсибилизации выявлено не было. Такие данные, по-видимому, можно объяснить суммарно большей продукцией цитокинов в очагах атопического воспаления у детей с сочетанной атопией, что обеспечивает активную пролиферацию эозинофилов в костном мозге, увеличивает продолжительность жизни этих клеток.

По окончании лечебного периода (24 недели терапии ИКС) зарегистрировано достоверное снижение (от $4,9 \pm 0,73\%$ до $5,8 \pm 0,74\%$, $p < 0,05$) относительного количества эозинофилов периферической крови по сравнению с исходными значениями у всех пациентов (лёгкая, среднетяжёлая, тяжёлая БА), однако ни в одной из исследуемых групп данный показатель не достиг значений контроля. Возможно, такие результаты объясняются использованием в терапии астмы ИКС, которые характеризуются низкой биодоступностью (флутиказона пропионат) и незначительным системным эффектом. Снижение относительного количества эозинофилов периферической крови у пациентов с БА на фоне приёма ИКС, вероятно, может быть обусловлено опосредованным действием дистантных медиаторов, способных влиять на рост, дифференцировку, селективную адгезию и миграцию эозинофилов (ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-6). Использование в качестве терапии ИКС сопровождается снижением активности указанных цитокинов в очаге воспаления, что, по-видимому, обуславливает снижение уровня данных факторов в крови и приводит к уменьшению относительного количества эозинофилов.

Одним из ключевых факторов, регулирующих количество эозинофилов как в периферической крови, так и в ткани бронхов при БА, является ИЛ-5. Этот цитокин, вырабатываемый в очаге воспаления, обладает выраженным апоптозингибирующим действием на эозинофилы посредством активации экспрессии мРНК внутриклеточных антиапоптотических факторов (bcl-2, bcl-xl) [Kroegel C., 1990; Woolley K.L., 1996; Vignola A.M., 1999]. Активность мРНК ИЛ-5 у пациентов с БА значительно превышает

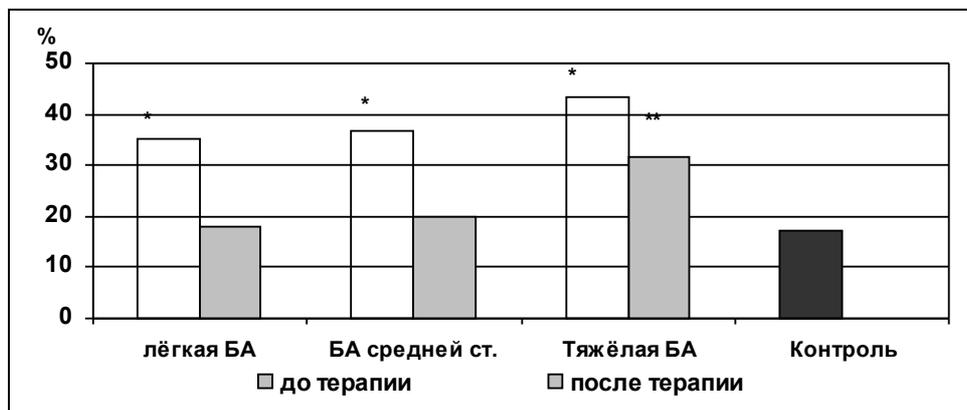


Рис. 4. Экспрессия мРНК ИЛ-5 у детей, больных БА до и после лечения

* $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля

** $p < 0,05$ по сравнению с лёгкой, среднетяжёлой БА и группой контроля

контрольные значения, это обуславливает дифференцировку эозинофилов, способствует высвобождению их из костного мозга и усиливает таксис данных эффекторных клеток в очаг воспаления при БА [Сазонов А.Э., 2003].

контрольные значения, это обуславливает дифференцировку эозинофилов, способствует высвобождению их из костного мозга и усиливает таксис данных эффекторных клеток в очаг воспаления при БА [Сазонов А.Э., 2003].

Результаты, полученные в рамках данной работы, показали высокую активность мРНК ИЛ-5 (до лечения) у всех детей, включённых в исследование, по сравнению с контрольными значениями (рис. 4).

В случае тяжёлой БА зарегистрирована значимо большая активность мРНК ИЛ-5 в сравнении с лёгкой и среднетяжёлой БА. Достоверных отличий экспрессии мРНК ИЛ-5 в зависимости от пола, возраста, валентности сенсibilизации, уровня IgE в сыворотке крови зарегистрировано не было. При этом наибольшая активность мРНК данного эффектора зарегистрирована у больных тяжёлой БА с сочетанной атопической патологией в сравнении с пациентами, страдающими лёгкой и среднетяжёлой БА. Использование базисной противовоспалительной терапии приводило к снижению активности гена ИЛ-5 во всех исследуемых группах. При этом сравнимые с контрольными ($17,2 \pm 1,86$) значения были зарегистрированы только у детей, страдающих лёгкой ($18,0 \pm 4,44$) и среднетяжёлой ($19,8 \pm 3,37$) БА. Больные тяжёлой БА достоверно отличались после лечения по изучаемому показателю как от группы контроля, так и от детей, страдающих лёгкой и среднетяжёлой БА. Проведённый корреляционный анализ показал наличие положительной взаимосвязи между активностью мРНК ИЛ-5 и количеством дневных ($r=0,42$, $p=0,025$), ночных симптомов ($r=0,47$, $p=0,040$), и относительным количеством эозинофилов в ОАК ($r=0,52$, $p=0,002$). Выявлена отрицательная корреляция активности мРНК ИЛ-5 и количества апоптотически изменённых эозинофилов периферической крови ($r= -0,43$, $p=0,001$).

Суммируя данные литературы и результаты, полученные в рамках проведённого исследования, можно заключить, что содержание эозинофилов в периферической крови больных БА как при симптоматической БА, так и в ремиссии не зависит от степени тяжести заболевания, несмотря на существенные различия клинических проявлений. Активность мРНК ИЛ-5 у симптоматических пациентов превышает значения контроля вне зависимости от тяжести БА.

Апоптоз эозинофилов периферической крови у детей, больных бронхиальной астмой

Формирование и хроническое течение воспаления респираторного тракта ассоциировано с гистотоксическим эффектом провоспалительных медиаторов, выделяемых активированными эозинофилами [Fine A., 2000; Jang A.S., 2000]. Наиболее важную роль в активации этих клеток играет ИЛ-5, менее специфичным активатором является ИЛ-3 [Sehmi R. Wood L.J., 1997]. Зарегистрированная в рамках данного исследования высокая активность мРНК ИЛ-5 может обуславливать усиление пролиферации и дифференцировки эозинофилов, стимулировать инфильтрацию респираторного тракта и обеспечивать тканевую активацию эозинофилов у детей с БА. При этом стоит отметить апоптозингибирующее действие ИЛ-5, что обеспечивает увеличение продолжительности жизни эозинофилов (усиление инфильтрации ткани бронхов) и их гибель по некротическому пути (с последующей секрецией медиаторов воспаления, их гистотоксическим эффектом, что приводит к развитию воспаления дыхательных путей, появлению симптомов заболевания и снижению параметров лёгочной функции) [Kroegel C., 1990].

Согласно данным литературы, количество апоптотически изменённых эозинофилов и макрофагов в бронхиальных биоптатах больных БА связано (отрицательная корреляция) с тяжестью симптомов астмы [Vignola A.M., 1999]. Изучение

апоптоза эозинофилов в мокроте и бронхо-альвеолярном лаваже пациентов, страдающих БА, показывает наличие взаимосвязи между снижением апоптотической активности этих клеток и высоким уровнем ИЛ-5, а также ГМКСФ [Lotem J., 1999; Zangrilli J., 2000]. Отмечено, что в случае высокого содержания эозинофилов в слизистой бронхов у пациентов с тяжелой астмой наиболее выражен процесс ремоделирования (по сравнению с легкой персистирующей и среднетяжелой БА), что, вероятно, связано с увеличением продолжительности жизни этих клеток, элиминацией их по некротическому пути вследствие выраженной супрессии апоптоза [Gleich G.L., 1996]. Исследование биоптатов бронхов больных БА продемонстрировало наличие положительной корреляционной взаимосвязи количества bcl-2 позитивных клеток с тяжестью заболевания и отрицательной - с объемом форсированного выдоха за первую секунду [Jang A.S., 2000]. Все эти данные свидетельствуют о нарушении механизмов реализации апоптотической гибели эозинофилов при БА в очаге воспаления.

Учитывая факт воздействия ИЛ-5 на эозинофилы в костном мозге (пролиферация и дифференцировка), в крови (подавление апоптотической активности, увеличение продолжительности циркуляции - один из возможных механизмов эозинофилии) и в очаге воспаления (активация гистотоксических эффектов и увеличение продолжительности жизни), можно предположить, что данные, полученные при исследовании периферической крови (количество эозинофилов с признаками апоптотической гибели, активность мРНК антиапоптотических и проапоптотических эффекторов эозинофилов), могут быть применены для оценки активности воспаления у детей с БА [Dzidziczko A., 2004].

В рамках данного исследования был проведён анализ мРНК антиапоптотических эффекторов (bcl-2, bcl-xl), экспрессии генов проапоптотических факторов (bax, bcl-xs, p53), количества эозинофилов с признаками апоптотической гибели в периферической крови детей, больных БА.

Установлено, что количество эозинофилов периферической крови с признаками апоптотической гибели у всех пациентов с БА на момент включения в исследование (до начала терапии) было меньшим ($p < 0,05$), чем у детей группы контроля, при этом достоверных различий в зависимости от тяжести зарегистрировано не было (). Выявлены отрицательные корреляционные связи данного показателя с количеством дневных ($r = -0,46$, $p = 0,043$) и ночных симптомов астмы ($r = -0,48$, $p = 0,027$). Низкое количество эозинофилов с признаками апоптотической гибели в периферической крови больных БА ассоциировано с высокой активностью мРНК ИЛ-5 ($r = -0,43$, $p = 0,001$) и экспрессией мРНК антиапоптотического эффектора bcl-2 ($r = 0,68$, $p = 0,001$). При этом у всех больных БА, включённых в исследование, была зарегистрирована высокая, относительно группы контроля, активность мРНК этого цитокина. В случае наличия у детей сочетанной атопии изучаемый показатель был несколько выше аналогичного в группе больных, страдающих только БА, однако, статистически значимых различий зарегистрировано не было.

Развитие апоптотической гибели клетки зависит от внутриклеточного баланса проапоптотических (bax, bcl-xs, p53) и антиапоптотических (ИЛ-5, bcl-2, bcl-xl) эффекторов. К ключевым внутриклеточным системам регуляции апоптоза относят семейство протоонкогенов bcl-2. В клетках человека, по данным литературы, идентифицировано около пятнадцати членов этого семейства [Ochiai K., 1997].

Ингибиторы апоптоза локализованы в цитоплазме клетки, а индукторы интегрированы в мембрану митохондрий, эндоплазматический ретикулум или мембрану ядра. Белки семейства bcl-2 находятся в постоянном динамическом равновесии, образуя гомо и гетеродимеры, что, в конечном счете, влияет на развитие апоптоза клеток.

Описано возможное влияние на апоптоз отдельных эфффекторов (ИЛ-5, bcl-2, bax, p53), однако до сих пор не проведена комплексная оценка взаимосвязей про- и антиапоптотических факторов с клиническими параметрами заболевания. Таким образом, на сегодняшний день, нет данных, демонстрирующих участие такого механизма как апоптоз, в манифестации и прогрессировании БА. В этой связи в рамках данной работы проведено изучение активности мРНК антиапоптотических эфффекторов и проапоптотических факторов у детей с различной степенью тяжести БА в динамике на фоне базисной противовоспалительной терапии.

Установлена высокая, по сравнению с группой контроля, экспрессия антиапоптотического эфффектора мРНК bcl-2, при этом уровень мРНК bcl-2 у пациентов с тяжёлой БА был значительно выше, чем при лёгкой и среднетяжёлой БА. Подобные отличия активности мРНК bcl-2 можно объяснить выраженной продукцией цитокинов в очаге воспаления при тяжёлой БА, например, ИЛ-5, который, как известно, является важнейшим апоптозингибирующим фактором эозинофилов (табл. 3).

При этом значимых различий в зависимости от пола, возраста, наличия сопутствующей патологии зарегистрировано не было. Проведённый корреляционный анализ показал наличие положительной корреляционной связи экспрессии мРНК bcl-2 с количеством дневных симптомов БА ($r=0,39$, $p=0,025$) и отрицательной корреляции с количеством апоптотически изменённых эозинофилов периферической крови ($r=-0,34$, $p=0,001$) и ОФВ1% ($r=-0,39$, $p=0,046$). Анализируя эти данные, можно предположить, что высокая активность мРНК ИЛ-5 при БА, зарегистрированная в рамках данного исследования, приводит к увеличению экспрессии мРНК bcl-2 (активность мРНК ИЛ-5 и мРНК bcl-2 - $r=0,68$, $p=0,001$), что в свою очередь обеспечивает снижение апоптотической активности эозинофилов периферической крови (увеличение продолжительности жизни и гибель по некротическому пути).

Некроз эозинофилов сопровождается выделением большого количества гистотоксических медиаторов, это приводит к усилению воспалительного ответа в респираторном тракте, проявлением которого является увеличение количества симптомов БА и снижение параметров функции дыхания (в частности ОФВ1). Изучение экспрессии другого внутриклеточного антиапоптотического эфффектора (bcl-x1) показало, что при включении в исследование (до назначения терапии) этот показатель был значительно выше контроля и не имел достоверных отличий у пациентов с разной степенью тяжести БА.

Таблица 3.

Динамика экспрессии мРНК анти- и проапоптотических эфффекторов на фоне терапии у детей, больных БА

Показатель/ степень тяжести БА		До лечения	После лечения	Группа контро- ля (n=20)
bcl-2	Лёгкая	10,2±0,67*	2,7±0,71 ^{*,**}	1,10±0,07
	Среднетяжёлая	9,8±0,69*	2,3±0,32 ^{*,**}	
	Тяжёлая	11,4±0,91*	5,5±0,65 ^{*,**}	
bcl-XL	Лёгкая	146,63±9,57	135,1±12,50	136,50±9,21
	Среднетяжёлая	151,18±12,90	137,82±10,62	
	Тяжёлая	177,02±10,01*	158,36±10,27*	
Baх	Лёгкая	82,63±3,73	126,58±7,28 ^{*,**}	83,41±4,18
	Среднетяжёлая	79,82±2,25	130,59±8,25 ^{*,**}	
	Тяжёлая	85,08±3,51	107,76±8,44 ^{*,**}	
bcl-XS	Лёгкая	15,3±0,97*	25,21±3,02 ^{*,**}	27,21±1,63
	Среднетяжёлая	13,9±0,83*	26,53±3,18 ^{**}	
	Тяжёлая	12,1±0,95*	20,40±3,44 ^{*,**}	

Примечание:

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями

** $p < 0,05$ по сравнению с исходными значениями внутри каждой группы

На фоне базисной противовоспалительной терапии отмечена нормализация клинико-функциональных параметров заболевания (снижение количества симптомов, эпизодов использования средств скорой помощи, увеличение функции внешнего дыхания). При этом после лечения зарегистрировано и восстановление апоптотической активности эозинофилов периферической крови у больных лёгкой и среднетяжёлой БА. Что касается тяжёлой БА, то активность мРНК антиапоптотических эффекторов также снижалась относительно исходных значений, однако была выше чем при лёгкой, среднетяжёлой БА и в контроле.

При симптоматической астме (до лечения) активность мРНК внутриклеточного проапоптотического эффектора (baх) у всех детей (лёгкая, среднетяжёлая и тяжёлая БА) была сопоставима с контрольными значениями, что может быть связано с особенностью регуляции активности мРНК данного эффектора при БА (табл. 3.). Данные литературы свидетельствуют о стабильной экспрессии (конституциональная активность мРНК) некоторых проапоптотических факторов, в частности мРНК baх, клетками человеческого организма независимо от наличия или отсутствия воспаления в бронхиальном дереве [Dewson G., 1999]. Экспрессия мРНК проапоптотического эффектора bcl-xs (исходно) не зависела от степени тяжести БА и была ниже контроля.

Активность мРНК транскрипционного фактора p53 у детей с БА изначально зарегистрирована как низкая относительно контрольных значений, при этом у пациентов с тяжёлой БА данный показатель был достоверно меньше по сравнению с аналогичным в группах больных лёгкой и среднетяжёлой БА (табл. 3.). Установлено наличие положительной корреляции экспрессии мРНК p53 с активностью мРНК агониста апоптоза baх ($r=0,45$, $p=0,021$) и отрицательных корреляционных связей между экспрессией мРНК p53 и активностью мРНК антиапоптотического эффектора bcl-2 ($r=0,23$, $p<0,001$) и тяжестью БА ($r=0,36$, $p=0,044$). Назначение базисной противовоспалительной терапии продолжительностью 24 недели лишь в

случае лёгкой и среднетяжёлой БА приводило к увеличению экспрессии мРНК проапоптотических эффекторов. При тяжёлой БА к моменту окончания лечебного периода аналогичных изменений зарегистрировано не было. Низкий уровень мРНК p53 у детей с тяжёлой астмой, возможно, связана с высокой активностью цистеиновых лейкотриенов, вырабатываемых в большом количестве эффекторными клетками воспаления при тяжёлой БА, которые оказывают выраженное супрессивное действие на активность мРНК этого транскрипционного фактора [Laitinen L.A., 1991, Fridman J.S., 2003]. Анализируя приведённые результаты, стоит отметить, что низкая активность экспрессии гена мРНК p53 сопровождается отсутствием стимулирующего влияния на экспрессию проапоптотических эффекторов, при этом, как показало данное исследование, сохраняется высокая экспрессия мРНК антиапоптотического эффектора bcl-2. Описанное взаимоотношение обеспечивает снижение апоптотической активности эозинофилов при БА, что сопровождается увеличением продолжительности жизни, а в последующем гибелью этих клеток преимущественно по некротическому пути с высвобождением гистотоксических медиаторов, которые обеспечивают увеличение активности воспаления в дыхательных путях.

Полученные данные свидетельствуют о низком апоптотическом статусе эозинофилов периферической крови у пациентов с БА. У всех больных, включённых в исследование, выявлено низкое количество эозинофилов с признаками апоптотической гибели, высокая активность мРНК антиапоптотических эффекторов (ИЛ-5, bcl-2, bcl-xl). Назначение базисной противовоспалительной терапии приводило к увеличению количества апоптотически изменённых эозинофилов во всех исследуемых группах, также было зарегистрировано и снижение экспрессии антиапоптотических эффекторов у детей с лёгкой, среднетяжёлой и тяжёлой БА. Сопоставимых значений с группой контроля по количеству эозинофилов с признаками апоптоза и активности мРНК антиапоптотических эффекторов после терапии достигали только дети с лёгкой и среднетяжёлой БА, у пациентов с тяжёлой БА эти показатели и после лечения оставались достоверно выше контрольных значений.

Анализ экспрессии проапоптотических эффекторов (bax, bcl-xs, p53) показал, что исходно (до назначения терапии) у всех детей активность мРНК этих модуляторов либо снижена относительно контрольных значений (bcl-xs, p53), либо находится на уровне, сопоставимом с контрольными значениями. При этом низкая активность мРНК проапоптотических эффекторов у детей не зависит от пола, возраста, наличия сопутствующей патологии. После 24 недель лечения у пациентов с лёгкой и среднетяжёлой БА происходит некоторое увеличение экспрессии мРНК проапоптотических факторов, в случае наличия у детей тяжёлой БА повышения активности мРНК не происходит или даже регистрируется снижение (мРНК p53).

Корреляционный анализ продемонстрировал взаимосвязь клинических параметров БА и экспрессии мРНК изучаемых модуляторов апоптоза. Установлено апоптозингибирующее действие ИЛ-5 и сопряжённое с активностью мРНК этого цитокина увеличение количества дневных и ночных симптомов астмы. Выявлено отрицательное влияние активности мРНК антиапоптотического эффектора bcl-2 на ОФВ1 и количество апоптотически изменённых эозинофилов периферической крови. Установлена отрицательная взаимосвязь экспрессии мРНК p53 с тяжестью

БА. Такие результаты демонстрируют, что зарегистрированные изменения активности мРНК анти- и проапоптотических модуляторов апоптоза сопряжены с клиническими проявлениями заболевания, а значит симптомы болезни, изменение параметров лёгочной функции у больных астмой могут быть следствием выявленных нарушений регуляции системы апоптоза эозинофилов - ключевых эффекторных клеток воспаления при БА.

Таким образом, при БА у детей имеет место нарушение апоптоза эозинофилов периферической крови, которое связано с низкой экспрессией мРНК проапоптотических и высокой активностью мРНК антиапоптотических эффекторов. Использование адекватной базисной терапии позволяет восстановить апоптотическую активность эозинофилов периферической крови за счёт снижения экспрессии мРНК супрессоров апоптоза и увеличения активности мРНК апоптоз стимулирующих эффекторов у больных лёгкой и среднетяжёлой БА. Что касается тяжёлой БА, то экспрессия тормозящих апоптоз факторов остается высокой на фоне проводимого лечения, активность мРНК проапоптотических эффекторов после терапии либо остаётся на прежнем уровне, либо снижается.

В целом низкая апоптотическая активность эозинофилов периферической крови ассоциирована с клиническими проявлениями БА. Приведённые результаты, полученные при исследовании экспрессии мРНК анти- и проапоптотических факторов у больных БА до и после лечения, а также взаимосвязи, зарегистрированные при проведении корреляционного анализа, свидетельствуют, что апоптоз эозинофилов является важным механизмом формирования и поддержания хронического воспаления дыхательных путей при БА.

Особенности регуляции системы апоптоза у детей, больных тяжёлой бронхиальной астмой

Результаты, полученные в рамках данного исследования, свидетельствуют,

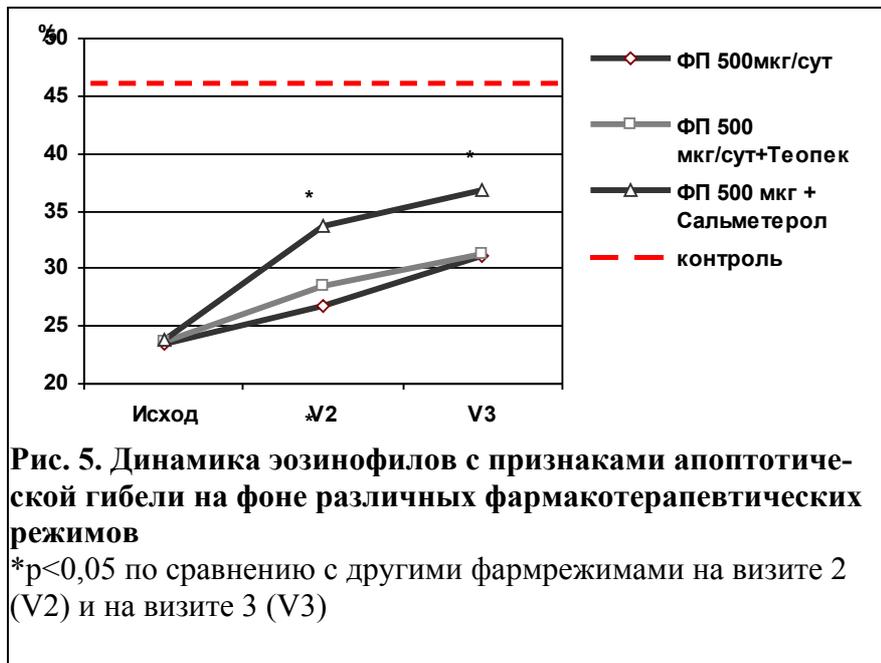


Рис. 5. Динамика эозинофилов с признаками апоптотической гибели на фоне различных фармакотерапевтических режимов

* $p < 0,05$ по сравнению с другими фармрежимами на визите 2 (V2) и на визите 3 (V3)

что апоптоз эозинофилов является важным механизмом в формировании и поддержании хронического воспаления при БА. Наиболее низкая апоптотическая активность зарегистрирована у больных тяжёлой БА. В этой связи важным, с позиции клинической практики, представляется выбор максимально эффективной схемы терапии тяжёлой БА. Такое утверждение требует

ответа на следующие вопросы: возможно ли восстановление механизмов регуляции апоптотической гибели и какой фармакотерапевтический режим является оптимальным с позиции нормализации апоптоза эозинофилов у больных тяжёлой

БА? Динамика клинико-функциональных показателей у детей, больных тяжёлой БА в зависимости от получаемого фармакотерапевтического режима представлена в таблице 4.

Согласно протоколу исследования, в рамках данной работы, всем пациентам с тяжёлой БА была назначена терапия продолжительностью 24 недели в зависимости от группы рандомизации (монотерапия ФП 500 мкг/сут, комбинация ФП 500 мкг/сут + Тео, сочетание ФП 500 мкг/сут + Сальметерол). Проведённый статистический анализ показал различное влияние используемых фармакотерапевтических режимов на восстановление механизмов регуляции апоптоза эозинофилов.

Наиболее эффективное воздействие на апоптоз эозинофилов периферической крови у детей с тяжёлой БА в течение 24 недель терапии отмечено при использовании комбинации ИКС и β_2 -агониста длительного действия. Количество апоптотически изменённых эозинофилов периферической крови увеличивалось и достигало контрольных значений уже к концу 4 недели терапии на фоне применения этого фармакотерапевтического режима (рис. 5).

Использование комбинации ИКС + β_2 -агонист длительного действия приводило к снижению активности мРНК апоптоз ингибирующего фактора ИЛ-5 и антиапоптотического эффектора bcl-x1.

К окончанию лечебного периода (24 недели терапии) экспрессия мРНК данных показателей была сравнима с контрольными значениями.

Активность мРНК bcl-2 в группе детей, получавших комбинацию ФП 500 мкг/сут + Сальметерол, по окончании курса лечения не достигала контрольных значений, но была достоверно ниже экспрессии мРНК данного антиапоптотического эффектора при других фармакотерапевтических режимах (Рис. 6).

Активность мРНК проапоптотических эффекторов (bax, bcl-xs, p53) при использовании фармакотерапевтического режима ФП 500 мкг/сут + Сальметерол увеличивалась и достоверно отличалась от исходных значений через 4 недели лечения. По окончании лечебного периода на фоне терапии комбинацией ИКС + β_2 -агонист длительного действия экспрессия мРНК bcl-xs была сравнима с контрольными значениями и достоверно отличалась от аналогичного показателя при использовании других фармакотерапевтических режимов (ФП 500 мкг/сут, ФП 500 мкг/сут + Тео).

Полученные при проведении статистического анализа результаты можно объяснить апоптоз индуцирующим эффектом β_2 -агонистов длительного действия. Возможно, использование ИКС в сочетании с пролонгированными бронхолитиками приводит к потенцированию проапоптотического эффекта.

Таким образом, использование в качестве терапии комбинации ФП + Сальметерол является оптимальным с позиции нормализации апоптоза эозинофилов у больных тяжёлой БА. При этом использование данной комбинации демонстрирует и большую клиническую эффективность в сравнении с другими фармакотерапевтическими режимами при тяжёлой БА у детей. Приведённые данные свидетельствуют, что нормализация клинических параметров БА, возможно, является следствием восстановления механизмов регуляции апоптотической активности эозинофилов.

Таблица 4

Динамика клинико-функциональных показателей у детей, больных тяжёлой БА в зависимости от получаемого фармакотерапевтического режима

Показатель	Фармакотерапевтические режимы					
	ФП		ФП+Тео		ФП+Сальметерол	
	Визит 1	Визит 3	Визит 1	Визит 3	Визит 1	Визит 3
Дети						
Дневные симптомы, количество в неделю	1,05±0,11	0,17±0,04	1,09±0,95	0,20±0,08	1,10±0,12	0,06±0,03*,**
Ночные симптомы, количество в неделю	0,93±0,09	0,05±0,02	0,92±0,07	0,04±0,01	0,95±0,09	0,01±0,00*,**
Потребность в β ₂ -агонистах (количество ингаляций/сутки)	1,21±0,19	0,24±0,03	1,24±0,20	0,28±0,10	1,25±0,18	0,12±0,05*,**
ОФВ ₁ , % от должного	77,47±4,36	87,24±4,35	78,38±3,96	96,84±5,15*	76,89±5,93	98,12±5,42*
ПСВ, % от должного	82,27±3,52	90,24±7,97	83,18±3,89	89,61±8,14	82,34±4,52	94,41±8,93
БГР (PC20), мг/мл	0,93±0,18	2,43±0,38	0,91±0,12	2,37±0,34	0,97±0,09	4,23±0,62*,**

Примечание:

* - $p < 0,05$ по сравнению с показателем группы ФП;

** - $p < 0,005$ по сравнению с показателем группы ФП+Тео

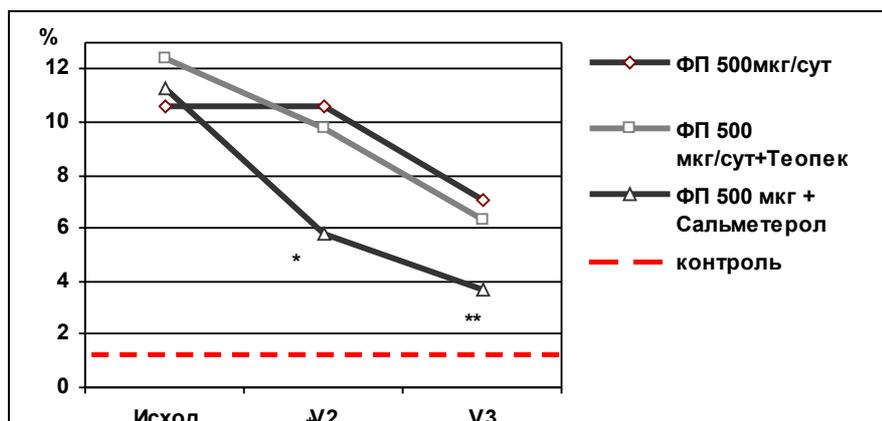


Рис. 6. Динамика экспрессии мРНК bcl-2 на фоне различных фармакотерапевтических режимов

* $p < 0,05$ по сравнению с другими фармрежимами на визите 2 (V2)

** $p < 0,05$ по сравнению с другими фармрежимами и контролем на визите 3 (V3)

Рассматривая нарушения в системе апоптоза эозинофилов периферической крови у больных тяжёлой БА, стоит отметить, что не все пациенты даже на фоне адекватного лечения имели полную клинико-функциональную ремиссию. У ряда пациентов с тяжёлой БА использование базисной противовоспалительной

терапии не приводило к полному восстановлению механизмов регуляции апоптоза эозинофилов.

В этой связи дети, страдающие тяжёлой БА по итогам лечебного периода, были разделены на контролируемых (достигших в результате лечения критериев хорошего или полного контроля по GOAL) и неконтролируемых пациентов. В случае неконтролируемой БА по окончании лечебного периода в отличие от средних значений больных тяжёлой БА, получавших в качестве базисной терапии комбинацию ФП + Сальметерол значимого увеличения количества эозинофилов периферической крови с признаками апоптоза, снижения активности мРНК антиапоптотических эффекторов и повышения экспрессии мРНК агонистов апоптоза зарегистрировано не было. Такие данные, по-видимому, могут быть связаны с более выраженным воспалительным процессом в дыхательных путях при тяжёлой неконтролируемой БА.

Суммируя изложенные результаты, можно отметить, что нарушение апоптоза эозинофилов периферической крови у детей, связанное с низкой экспрессией мРНК проапоптотических и высокой активностью мРНК антиапоптотических эффекторов, имеет важное значение в механизмах развития БА у детей.

ВЫВОДЫ

1. Уровень мРНК антиапоптотических (ИЛ-5, bcl-2, bcl-x1) эффекторов повышен в эозинофилах периферической крови при симптоматической бронхиальной астме. На фоне базисной противовоспалительной терапии экспрессия мРНК антиапоптотических эффекторов снижается у пациентов с лёгкой и среднетяжёлой БА.
2. Экспрессия мРНК антиапоптотических эффекторов (ИЛ-5, bcl-2, bcl-x1) при тяжёлой бронхиальной астме у детей достоверно выше значений, регистрируемых при легкой и среднетяжелой астме, при этом экспрессия мРНК p53 снижена относительно показателей контроля и не изменяется на фоне базисной противовоспалительной терапии.
3. Экспрессия гена ИЛ-5 ассоциирована с активностью генов антиапоптотических эффекторов, а также с апоптотической активностью эозинофилов вне зависимости от степени тяжести заболевания (обострение и ремиссия).
4. Количество эозинофилов периферической крови с морфологическими признаками апоптоза при бронхиальной астме у детей снижено, независимо от степени тяжести, и ассоциировано с уровнем экспрессии мРНК ИЛ-5. На фоне базисной противовоспалительной терапии количество эозинофилов с признаками апоптоза повышается, достигая значений контроля при легкой и среднетяжелой астме и оставаясь достоверно ниже контроля и при тяжёлой бронхиальной астме.
5. Проапоптотический эффект кортикостероидов у больных бронхиальной астмой реализуется путем снижения экспрессии генов антиапоптотических факторов. Наибольшей эффективностью при тяжёлой БА, с позиции восстановления механизмов регуляции апоптоза, обладает комбинация ФП 500 мкг/сутки + Серевент 100 мкг/сутки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Изучение активности мРНК антиапоптотических (bcl-2, bcl-x1, ИЛ-5) и проапоптотических (bax, bcl-xs, p53) эффекторов в динамике на фоне базисной проти-

вовоспалительной терапии может быть использовано в качестве дополнительного критерия оценки эффективности лечения бронхиальной астмы у детей.

2. Учитывая максимальную клиническую эффективность и восстановление апоптотической активности эозинофилов периферической крови на фоне лечения комбинацией флутиказона пропионат 500 мкг/сутки + сальметерол у детей с тяжёлой бронхиальной астмой, рекомендовано использование в качестве базисной противовоспалительной терапии этого фармакотерапевтического режима.
3. Восстановление клинко-функциональных параметров заболевания и механизмов регуляции апоптоза эозинофилов у больных с тяжёлой БА зарегистрировано только по окончании лечебного периода, в этой связи оптимальная продолжительность лечения, позволяющая достигать контроля воспаления и симптомов заболевания, должна составлять не менее 24 недель.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Эпидемиология бронхиальной астмы у детей города Томска // Актуальные вопросы медицины. - 2000. - С.47-49. (Соавт. Е. М. Камалтынова, Е. М. Еременкова, В. Ю. Тихонов)
2. Эпидемиология аллергических заболеваний у детей города Томска // Вестник СГМУ: ежеквартальное периодическое издание СМУ . - 2000. - N2 (Спец. вып.). - С.53-54. (Соавт. Тихонов В.Ю.)
3. Эпидемиология и клинко-аллергологическая характеристика бронхиальной астмы у детей города Томска // Сборник статей по результатам 60-й юбилейной студенческой научной конференции имени Н. И. Пирогова (23-25 апреля 2001 г.). - 2001. - с.51-53.
4. The epidemiology of bronhial asthma in Tomsk according to ISAAC Program data // European Respiratory Society. Annual Congress. – 2001. - P. 122 (Coathor. Ogorodova L.M., Kamaltynova E.M., Eryomenkova L.S.)
1. The peculiarities respiration of children with asthma – similar symptoms // European Respiratory Society. Annual Congress. – 2001. - P. 121 (Coathor. Ogorodova L.M., Kamaltynova E.M., Eryomenkova L.S., Kochetkova E.V.)
2. Клинико – функциональная и аллергологическая характеристика бронхиальной астмы у детей города Томска // Сборник по итогам II межрегиональной научно – практической конференции педиатров «Здоровье детей – наше будущее!». – Томск. – 2002. – Томиинформ. - С. 19 – 22 (Соавт. Козырицкая Д.В., Логинова Н.А.)
3. Эпидемиология и клинко-функциональная характеристика бронхиальной астмы у детей города Томска // Сборник статей по материалам 3 конгресса молодых учёных и специалистов «Науки о человеке». - 2002. - С. 50-51. (Соавт. Евдокимова Т.А.)
4. Специфическая иммунотерапия как метод первичной профилактики бронхиальной астмы у детей, страдающих атопическим дерматитом // Сборник по итогам II межрегиональной научно – практической конференции педиатров «Здоровье детей - наше будущее!». - 2002. - С. 43-46. (Соавт. Кочеткова Е.В., Петровская Ю.А.)
5. Особенности клинического течения бронхиальной астмы сочетанной с описторхозом, у детей // Сборник статей по материалам 3 конгресса молодых учё-

- ных и специалистов «Науки о человеке». - 2002. - С. 52-53. (Соавт. Евдокимова Т.А.)
6. Комбинированная терапия тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмы // Врач. - 2002. - №3. - С. 31–35 (Соавт. Огородова Л.М., Петровский Ф.И., Смоленов И.В., Ребров А.П., Пунин А.А., Скалозуб Е.А., Иванова У. В., Кароли Н.А., Кобякова О.С., Молотков А.О., Иванова Т.В., Стреж Ю.А.)
 7. Многоцентровое исследование сравнительной эффективности режимов комбинированной терапии у пациентов с тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой // Качественная клиническая практика. – 2002. - №2. - С. 26 – 33 (Соавт. Огородова Л.М., Кобякова О. С., Петровский Ф.И., Смоленов И. В., Ребров А.П., Пунин А.А., Скалозуб Е.А., Сметаненко Т. В., Короли Н.А., Иванова Т. В., Молотков А.О., Сосонная НА., Ханова Ф.М.)
 8. Средства ингаляционной доставки препаратов: взгляд врача и взгляд пациента // Атмосфера. - 2002 . - №1 (4). -С. 62 – 65 (Соавт. Огородова Л.М., Петровский Ф.И.)
 9. Бронхообструктивный синдром у детей младшего возраста как маркёр развития бронхиальной астмы // Материалы 3-ей межрегиональной научно – практической конференции молодых учёных-педиатров «Здоровье детей - наше будущее!». - Томинформ. – 2003. - С. 25 – 30 (Соавт. Козырицкая Д.В., Фёдорова О.С.)
 10. Влияние описторхозной инвазии на показатели бронхиальной гиперреактивности у детей, страдающих атопической бронхиальной астмой // Материалы X Национального конгресса «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО». – Москва. – 2003. - С. 127 (Соавт. Огородова Л.М., Евдокимова Т.А.)
 11. Влияние специфической иммунотерапии на формирование бронхиальной астмы у детей, больных атопическим дерматитом // Сборник статей по материалам 4 конгресса молодых учёных и специалистов «Науки о человеке». - 2003. - С. 73-74. (Соавт. Кочеткова Е.В., Федорова О.С.)
 12. Гиперреактивность дыхательных путей: основы патогенеза // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. - №4. - С. 65 – 73 (Соавт. Огородова Л.М., Петровский Ф.И., Петрова И.В., Кармалита Е.Г.)
 13. Особенности функции внешнего дыхания и бронхиальной гиперреактивности у детей с астма – подобными симптомами // Материалы X Национального конгресса «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО». – Москва. – 2003. - С. 271 (Соавт. Огородова Л.М., Евдокимова Т.А.)
 14. Особенности функциональных показателей у детей, имеющих астма – подобные симптомы // Сборник статей по материалам 4 конгресса молодых учёных и специалистов «Науки о человеке». – 2003. - С. 64 - 65 (Соавт. Евдокимова Т.А., Козырицкая Д.В., Федорова О.С.)
 15. Результаты национального фармако-эпидемиологического исследования бронхиальной астмы тяжёлого течения // Аллергология. – 2003. - №3. - С. 12 - 19 (Соавт. Огородова Л.М., Петровский Ф.И., Смоленов И.В., Реутова Л.Ю., Петровская Ю.А.)
 16. Роль бронхообструктивного синдрома у детей младшего возраста в развитии бронхиальной астмы // Сборник статей по материалам 4 конгресса молодых

- учёных и специалистов «Науки о человеке». - 2003. - С. 71-72. (Соавт. Козырицкая Д.В., О.С. Фёдорова)
17. Сравнительная оценка риска развития бронхиальной астмы у детей, больных атопическим дерматитом, в различные возрастные периоды // Материалы 3-ей межрегиональной научно – практической конференции молодых учёных-педиатров «Здоровье детей - наше будущее!». - Томинформ. – 2003. - С. 71 – 74 (Соавт. Фёдорова О.С., Петровская Ю.А.)
 18. Факторы риска развития бронхиальной астмы (по Martinez F., Silverman M.) у детей с атопическим дерматитом в разные возрастные периоды // Науки о человеке. - 2003. - С. 81-82. (Соавт. Фёдорова О.С., Козырицкая Д.В.)
 19. Хронический описторхоз и его влияние на клиническое течение бронхиальной астмы у детей // Сборник статей по материалам 4 конгресса молодых учёных и специалистов «Науки о человеке». – 2003. - С. 66 - 68 (Соавт. Евдокимова Т.А.)
 20. Эффективность и безопасность использования различных режимов комбинированной терапии у пациентов с тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой // Пульмонология. – 2003. - №1. - С. 74 – 78 (Соавт. Огородова Л.М., Кобякова О.С., Петровский Ф.И., Иванова У.В., Ханова Ф.М., Краюшкина Н.П., Петровская Ю.А., Сметаненко Т.В., Реутова Л.Ю.)
 21. Многоцентровое исследование сравнительной эффективности комбинированной терапии у пациентов с тяжёлой неконтролируемой астмой, BRILLIANT-II // Качественная клиническая практика. – 2004. –№2. – С.22-31. (Соавт. Огородова Л.М., Кобякова О.С., Петровский Ф.И., Ребров А.П., Пунин А.А., Сметаненко Т. В., Кароли Н.А., Сосонная Н.А., Молотков А.О.)
 22. Бронхообструктивный синдром у детей младшего возраста, как маркер развития бронхиальной астмы // Сборник научных трудов по итогам IV межрегиональной научно - практической конференции "Здоровье детей - наше будущее!". - 2004. - С. 23-28. (Соавт. Фёдорова О.С., Козырицкая Д.В.)
 23. Особенности регуляции апоптоза эозинофилов при бронхиальной астме у детей // Сборник научных трудов по итогам IV межрегиональной научно - практической конференции "Здоровье детей - наше будущее!". – Томск. - 2004. - С. 82-96 (Соавт. Сазонов А.Э., Никитина Л.Ю., Агеева И.П.).
 24. Тяжёлая и терапевтически резистентная астма у детей // Аллергология. – 2004. - №2. - С. 21-24 (Соавт. Огородова Л.М. Петровский Ф.И. Петровская Ю.А.)
 25. Тяжелая бронхиальная астма у детей: результаты многоцентрового национального исследования "НАБАТ" // Аллергология. - 2004. - N2. - С. 3-9. (Соавт. Огородова Л.М., Петровский Ф.И., Коростовцев Д.С.)
 26. Linkage between NO synthases polymorphisms and asthma // European Respiratory Society. Annual Congress. – Glasgow. - 2004. - P. 136 (Coathor. Petrova I. V., A Sazonov., Deyev I.A., Ogorodova L.M.).
 27. Ассоциация показателей бронхиальной гиперреактивности с однонуклеотидной заменой в первом трансмембранном домене гена бета2-адренорецептора при бронхиальной астме среднетяжелого типа течения // Науки о человеке. - 2004. - С. 205-206. (Соавт. Васьковский Н.В., Кармалита Е.Г.)
 28. Факторы риска развития бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом // Сборник научных трудов по итогам IV межрегиональной научно - прак-

- тической конференции "Здоровье детей - наше будущее!". - 2004. - С. 126-129. (Соавт. Фёдорова О.С., Федотова М.М., Козырицкая Д.В.)
29. Экспрессия мРНК мембраносвязанной и растворимой изоформ альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-5 в индуцированной мокроте и периферической крови больных бронхиальной астмой // Бюллетень Сибирской медицины. - 2005. - Том4. N1. - С. 40-44. (Соавт. Сазонов А.Э., Иванчук И.И., Попова И.С.)
30. Взаимосвязь бронхиальной гиперреактивности и количества эозинофилов слизистой носа у детей с БА, АД, АР // Сборник по итогам V межрегиональной научно – практической конференции педиатров «Здоровье детей – наше будущее!». – Томск. – 2005. - С. 42 – 44 (Петровская Ю.А., Козырицкая Д.В.)
31. Биологические маркеры атопического воспаления у детей с атопией // Сборник статей по материалам 6 конгресса молодых учёных и специалистов «Науки о человеке». – 2005. - С. 78 -79 (Соавт. Петровская Ю.А., Козырицкая Д.В., Федорова О.С.)

Условные сокращения

БА	бронхиальная астма
БГР	бронхиальная гиперреактивность
ИКС	ингаляционные кортикостероиды
ИЛ	интерлейкин
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
ОАК	общий анализ крови
ОФВ1	объём форсированного выдоха за первую секунду
ПСВ	пиковая скорость выдоха
Тео	теофиллин длительного высвобождения
ФВД	функция внешнего дыхания
ФП	флутиказона пропионат
GINA	Global Initiative for asthma (регламентирующий документ «Глобальная инициатива по астме»)
GOAL	Gaining Optimal Asthma Control (международное исследование «Достижение оптимального контроля над астмой»)
IgE	иммуноглобулин класса E
PC20	мера бронхиальной гиперреактивности (предельная концентрация метахолина, вызывающая падение ОФВ1 на 20%)