

На правах рукописи

СЕЛИВАНОВА

Полина Александровна

**КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТЯЖЕЛОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ
РЕЗИСТЕНТНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

14.00.43 - пульмонология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск - 2009

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ,
член-корреспондент РАМН

Огородова Людмила Михайловна

Научный консультант:

Кандидат биологических наук

Фрейдин Максим Борисович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Бодрова Тамара Николаевна

Кандидат медицинских наук, доцент

Агеева Татьяна Сергеевна

Ведущая организация:

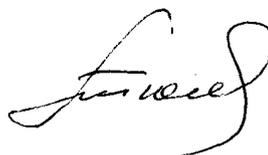
ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет
Росздрава

Защита состоится «____» _____ 2009 г. в ____⁰⁰ 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

Автореферат разослан «____» _____ 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Тюкалова Л.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения количество больных, страдающих бронхиальной астмой (БА), оценивается в 300 миллионов человек, распространенность астмы среди взрослого населения составляет от 1 до 18% в различных регионах (Burney P., 2008; Masoli M., 2004). В России этот показатель колеблется от 4 до 6% (Балаганская М.А., 2008; Федосеев Г.Б., 2003; Чучалин А.Г., 1999). Несмотря на значительные достижения в диагностике и лечении астмы, внедрение в практику согласительных документов по БА (GINA, 2006 и др.), заболеваемость и смертность продолжают сохраняться на высоком уровне, особенно в случае тяжелой астмы.

Тяжелая БА является значимой медико-социальной проблемой, составляя в общей структуре заболевания 15-20% (Holgate S.T., 2003; Чучалин А.Г., Огородова Л.М. 2004). Тяжелая БА ассоциирована с высоким риском смерти, частыми жизнеугрожающими обострениями болезни, высоким уровнем инвалидизации, резким снижением качества жизни таких пациентов. Именно на долю тяжелой астмы приходится 80% всех затрат, связанных с БА, сюда входят как прямые затраты на медикаментозное обеспечение, оказание дорогостоящей экстренной помощи, так и непрямые затраты в связи с длительными периодами нетрудоспособности пациентов (Чучалин А.Г., 1997; Ленская Л.Г., 2000; Медников Б.Л., 1998).

По результатам проведенных в последние годы эпидемиологических исследований (AIRE, AIRCEE, AIA, НАБАТ) контроль над заболеванием регистрируется лишь у 5-20% больных, что связано в первую очередь с неадекватным степени тяжести лечением. Однако у части больных формируется терапевтически резистентная астма, характеризующаяся сохранением симптомов болезни, несмотря на применение высоких доз базисных препаратов (Holgate S.T., 2006; Chung K.F., 1999; Barnes P.J., 1998). В литературе активно обсуждаются возможные причины, приводящие к терапевтической резистентности (персистенция эозинофильного воспаления, ремоделирование бронхов, формирование вторичной кортикостероидной резистентности, наследственная предрасположенность) (Wenzel S.E., 2006; Vignola A.M., 1999; Chetta A., 1997), но часто не принимается во внимание клиническая и патогенетическая гетерогенность терапевтически резистентной астмы. Так, на сегодняшний день выделяют три клинических фенотипа тяжелой неконтролируемой астмы (фатальная астма, фенотип «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией») (Holgate S., 1999), продемонстрированы и патогенетические различия этих клинических фенотипов (Кобякова О.С., 2005). Однако отсутствуют данные о морфологических и молекулярных особенностях, лежащих в основе клинической гетерогенности тяжелой астмы.

Таким образом, изучение патоморфологических и молекулярных характеристик тяжелой неконтролируемой астмы представляет значительный научный и практический интерес с точки зрения их вклада в формирование

терапевтической резистентности и разработки оптимальных патогенетически обоснованных терапевтических стратегий.

Цель: установить клинико-функциональные, патоморфологические и молекулярные особенности тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмы (фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией») для разработки мероприятий патогенетически обоснованной терапии.

Задачи:

1. Оценить особенности формирования, поло-возрастные, клинические и функциональные характеристики у больных тяжелой терапевтически резистентной астмой фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» в различные периоды болезни. Дать сравнительный анализ параметров функции внешнего дыхания и бронхиальной гиперреактивности у пациентов с изучаемыми фенотипами тяжелой БА.
2. Представить характеристику цитологического состава бронхиальных смывов, морфометрических и цитологических параметров бронхиальных биоптатов у больных тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» в сравнении со среднетяжелой БА. Оценить вклад эффекторных клеток воспаления и явлений ремоделирования в формирование клинических фенотипов тяжелой терапевтически резистентной астмы.
3. Оценить экспрессию генов воспаления и бронхоконстрикции (*CHRM3*, *H1R*, *ADRB2*) в бронхиальных биоптатах пациентов с изучаемыми фенотипами тяжелой БА в сравнении со среднетяжелой астмой и проанализировать их вклад в клинико-функциональные и патоморфологические особенности фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» тяжелой терапевтически резистентной БА.
4. Исследовать динамику клинико-функциональных, патоморфологических и молекулярных показателей на фоне использования базисной ингаляционной терапии в дозах, соответствующих степени тяжести заболевания (у пациентов с тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» и среднетяжелой БА).

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка патоморфологических (цитологический состав бронхиальных смывов, морфометрия и плотность клеточного инфильтрата в слизистой оболочке бронхов) и молекулярных (уровень экспрессии генов рецепторов воспаления и бронхоконстрикции - M3-холинорецептора, β 2-адренорецептора, H1-рецептора гистамина в бронхиальных биоптатах, полученных при фибробронхоскопии) показателей у пациентов с фенотипами «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» тяжелой терапевтически резистентной астмы. Доказано, что в основе клинико-функциональных различий изучаемых фенотипов лежат выявленные патоморфологические и молекулярные особенности.

Приоритетными являются результаты, полученные методом дискриминантного анализа, показавшие, что наибольший вклад в формирование

различий между обследованными группами вносят плотность нейтрофилов и высота эпителиального пласта в бронхиальных биоптатах, а также уровень экспрессии генов М3-холинорецептора и $\beta 2$ -адренорецептора.

Установлены взаимосвязи между основными показателями ремоделирования тканей (толщина базальной мембраны, высота эпителиального пласта и относительный объем соединительной ткани) и такими клинико-функциональными характеристиками, как тяжесть, стаж БА, ОФВ1. Приоритетными являются данные о наличии положительных корреляций между плотностью в слизистой оболочке бронхов таких эффекторных клеток, как макрофаги и эозинофилы и показателем суточной лабильности бронхов.

Впервые выявлено, что плотность гистио-макрофагальных элементов в слизистой оболочке бронхов ассоциирована с уровнем экспрессии гена М3-холинорецептора, а плотность эозинофилов – с экспрессией H1-рецептора гистамина. Это служит подтверждением тесной взаимосвязи между морфологическими и молекулярными особенностями фенотипов БА и основными клинико-функциональными характеристиками заболевания.

Получены приоритетные данные с использованием цитологических, морфометрических и молекулярных методов об отсутствии динамики патоморфологических и молекулярных показателей у больных с тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» на фоне применения адекватных степени тяжести доз базисной ингаляционной терапии. Это реализуется в невозможность достижения критериев полного контроля и подтверждает базисный вклад выявленных патоморфологических и молекулярных изменений в формирование болезни и феномена терапевтической резистентности. Установлено, что на фоне использования базисной противовоспалительной терапии в группе среднетяжелых больных отмечается положительная динамика патоморфологических и молекулярных параметров, что приводит к достижению контроля над заболеванием.

Практическая значимость. Проведенное комплексное изучение клинико-функциональных, патоморфологических и молекулярных особенностей тяжелой терапевтически резистентной астмы позволяет обосновать наличие разных клинико-патогенетических фенотипов тяжелой терапевтически резистентной БА. Установлено, что «brittle» фенотип тяжелой астмы характеризуется преобладанием гистио-макрофагальных элементов и эозинофилов в составе инфильтрата слизистой оболочки бронхов, тогда как фенотип «астма с фиксированной обструкцией» отличается нейтрофильным паттерном воспаления и выраженными явлениями ремоделирования бронхов, что позволяет рассматривать изученные патоморфологические характеристики в качестве дополнительных критериев диагностики фенотипов заболевания.

Патогенетически важные для фенотипов тяжелой терапевтически резистентной БА патоморфологические и молекулярные особенности, выявленные в исследовании, представляют большой практический интерес в

качестве потенциальных молекулярных мишеней для разработки индивидуальных режимов противовоспалительной терапии бронхиальной астмы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клинические фенотипы «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмы характеризуются значительными различиями по клинико-функциональным параметрам болезни, в основе которых лежат патоморфологические особенности каждого фенотипа. Фенотип «brittle» тяжелой астмы ассоциирован с гистио-макрофагальной инфильтрацией и эозинофильным типом воспаления. Фенотип «астма с фиксированной обструкцией» характеризуется преобладанием нейтрофилов и выраженными явлениями ремоделирования.
2. Тяжелая терапевтически резистентная астма ассоциирована с увеличением экспрессии в бронхиальных биоптатах генов М3-холинорецептора и β 2-адренорецептора, в сравнении со среднетяжелыми больными. Отличительной особенностью «brittle» фенотипа тяжелой БА на молекулярном уровне является существенное увеличение уровня экспрессии генов М3-холинорецептора и Н1-рецептора гистамина, в сравнении как со среднетяжелой астмой, так и с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией» и меньшая экспрессия гена β 2-адренорецептора в сравнении с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией». Фенотип тяжелой терапевтически резистентной БА «астма с фиксированной обструкцией» характеризуется максимальным уровнем экспрессии гена β 2-адренорецептора и статистически значимо меньшим уровнем экспрессии М3-холинорецептора в сравнении с «brittle» фенотипом.
3. У больных тяжелой терапевтически резистентной астмой фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» на фоне проводимой терапии отсутствует динамика патоморфологических параметров и уровня экспрессии изучаемых генов, не удается достичь критериев контроля астмы. При среднетяжелой астме положительная динамика патоморфологических и молекулярных параметров на фоне использования базисной ингаляционной противовоспалительной терапии приводит к достижению контроля над заболеванием.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на VII международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2006), VIII международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007), XII Национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2007), VIII международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке; концепции болезней цивилизации» (Москва, 2007), XVIII национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Екатеринбург, 2008), заседании областного научно-практического общества аллергологов-иммунологов (Томск, 2005), совещании кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (Томск, 2008).

Внедрение результатов исследований. Полученные результаты используются в работе отделения пульмонологии ОГУЗ «Томская областная клиническая больница». Материалы проведенных исследований используются в учебном процессе на кафедре госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава для студентов лечебного факультета, учебном процессе кафедры госпитальной терапии БУ ВПО «Ханты-Мансийского государственного медицинского института», учебном процессе кафедры аллергологии и пульмонологии ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей» Росздрава.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 12 работ, в том числе 2 полнотекстовые журнальные статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 169 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, глав собственных наблюдений (главы 3-5), обсуждения и выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 19 таблицами. Список источников цитируемой литературы включает в себя 229 работ, из которых 25 отечественных и 204 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические группы

Согласно поставленным целям было обследовано 56 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет, 29 из которых имели диагноз тяжелой персистирующей БА (10 пациентов с «brittle» фенотипом тяжелой БА, 19 – с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией»), 27 - персистирующей астмы средней степени тяжести (группа сравнения). Работа выполнена на базе кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (зав. каф.- д-р мед. наук, профессор Г.Э. Черногорюк), отделения пульмонологии ОГУЗ «Томская областная клиническая больница» (гл. врач – Б.Т. Серых), отделения пульмонологии МЛПУ «Городская больница №3» (гл. врач – М.А. Лукашов), кафедры внутренних болезней педиатрического факультета ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (зав. каф.- д-р мед. наук, профессор Л.И. Волкова). Молекулярные методы исследования проводились на базе ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН (директор – д-р мед. наук, профессор, академик РАМН В.П. Пузырев). Функциональные методы исследования выполнены в лаборатории функциональной диагностики кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (зав. каф. - д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАМН Л.М. Огородова). Исследование выполнено на базе протокола, одобренного локальным комитетом по этике ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава г. Томска (заключение №383 от 31.01.2006).

Критерии включения пациентов с бронхиальной астмой

1. Ранее подтвержденный диагноз БА (не менее 1 года).
2. Возраст от 18 до 65 лет.
3. Для тяжелой БА:

- а) Наличие у больного «brittle» фенотипа БА, подтвержденного медицинскими документами (диагноз лабильной астмы должен быть подтвержден не ранее чем за 1 год до включения больного в исследование): наличие суточной вариабельности уровня ПСВ с амплитудой >40% в течение более 50% времени за 5-ти месячный период, на фоне максимально интенсивного лечения с применением высоких доз ингаляционных стероидов (прием беклометазона в суточной дозе $\geq 1,5$ мг/сут или будесонида $\geq 1,0$ мг/сут или флутиказона пропионата (ФП) $\geq 0,75$ мг/сут), частых ингаляций бронхолитиков;
- б) Наличие у больного фенотипа «астма с фиксированной обструкцией»: постоянная персистенция симптомов БА, низкие показатели функции внешнего дыхания (ФВД) (ОФВ1 < 60% от должного, ПСВ < 60% от должного), с или без эпизодов внезапного ухудшения, требующие системной терапии ГКС (в дозах 5-20 мг/сут по преднизолону, в течение не менее 1 года), которая приводит к неполному ответу;
4. Для среднетяжелой неконтролируемой астмы: на фоне базисной терапии в дозах 500-750 мкг/сут по бекламетазону (ступень 3 по GINA 2006) симптомы соответствуют легкой персистирующей БА.
5. Отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних 4-х недель перед исследованием.
6. Умение правильно пользоваться ингалятором, пикфлоуметром, способность адекватно оценивать своё состояние.

Методы исследования

Клинико-anamnestические методы. Диагностика БА, оценка степени тяжести, уровень контроля над БА, а также оценка клинической эффективности противовоспалительной терапии определялись согласно критериям документа GINA, 2006 г. (табл. 1) путем объективного осмотра, ежедневного мониторингования симптомов, потребности в бронхолитиках.

Исследование вентиляционной функции легких. Оценка функциональных тестов, уровня бронхиальной гиперреактивности к гистамину проведена у всех пациентов, включённых в исследование на оборудовании 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.

Цитоморфологические методы. С целью получения бронхиальных смывов (БС) и биоптатов всем пациентам проводилась БФС по стандартной методике (Robinson D.S., 1998) гибким фиброскопом (BF1T20, Olympus Corporation) в условиях эндоскопического кабинета. Процедура БС осуществлялась через тубус бронхоскопа путем введения 30-40 мл стерильного изотонического раствора NaCl, подогретого до 37°C, с немедленной аспирацией в специальный силиконизированный контейнер (Полосухин В.В., 1995). Биоптаты получали со

слизистой оболочки среднедолевого бронха методом щипковой биопсии, в количестве двух фрагментов.

Таблица 1

Уровни контроля астмы (GINA, 2006)

Характеристики	Контролируемая БА (все критерии из нижеприведенных)	Частично контролируемая БА (какая-либо из характеристик, присутствующая в любую неделю)	Неконтролируемая БА
Дневные симптомы	Нет (дважды или менее в неделю)	Более 2-х в неделю	Три и более признака частично контролируемой астмы, присутствующие в любую неделю
Ограничение активности	Нет	Любые	
Ночные симптомы/про- буждения	Нет	Любые	
Потребность в использовании β 2-агонистов короткого действия в качестве средства скорой помощи	Нет (дважды или менее в неделю)	Более 2-х в неделю	
Функция легких (ПСВ или ОФВ1)	Норма	<80% от должного или персонального лучшего значения	
Обострения	Нет	Одно и более в год	
			Одно в какую-либо из недель

Обработка БС включала центрифугирование и приготовление мазков из полученного осадка. Цитологическое исследование окрашенных препаратов проводилось при увеличении 1500 на светооптическом микроскопе, подсчитывалось не менее 300 клеток и определялось процентное содержание каждого типа клеток с последующим пересчетом на абсолютное значение.

Материал бронхобиоптатов фиксировался в 10% забуференном формалине. После стандартной проводки и заливки готовились срезы толщиной 5-7 мкм с последующей окраской гематоксилином и эозином (Лили Р., 1969). Под малым увеличением (x 200) проводилась обзорная микроскопия слизистой оболочки бронхов. При морфометрическом исследовании методом точечного счета сеткой Автандилова оценивалась объемная плотность покровного эпителия и отдельных клеток ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$), относительный объем соединительной ткани и желез (%). С помощью окуляр-микрометра измерялась высота покровного эпителия, толщина базальной мембраны (мкм). Подсчет плотности различных клеточных популяций в 1 мм^2 собственной пластинки слизистой оболочки проводился в графическом редакторе Adobe PhotoShop 7.0.

Молекулярные методы (выполнены на базе ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН). Образцы ткани бронха для молекулярного исследования сразу

после забора помещались в эппендорфы и замораживались в жидком азоте при температуре -196°C , где они хранились вплоть до момента выделения РНК. Выделение РНК производилось методом кислото-фенольной экстракции с помощью реактива Три-реагент (Molecular Research Center Inc., США). Далее выполнялась постановка реакции обратной транскрипции с целью накопления кДНК (комплект для обратной транскрипции РНК «Реверта», ООО «Амплисенс» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Синтезированную кДНК в дальнейшем использовали для постановки полимеразной цепной реакции. Генотипирование генов *ADRB2*, *H1R*, *CHRM3*, *GAPDH* осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени, используя коммерческие наборы, разработанные и произведенные в ООО «Биосан», г. Новосибирск. Определение уровня экспрессии проводили путем сравнения пороговых уровней флюоресценции маркерного гена и гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*), уровень экспрессии которого принимался за 100%.

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. Степень взаимосвязи между признаками оценивали, вычисляя коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Проводился многофакторный дисперсионный анализ изучаемых параметров. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$. Данные группировались в соответствии с задачами исследования (Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Клинико-функциональная характеристика больных, включенных в исследование.

Средний возраст обследованных пациентов составил $46,77 \pm 1,76$ лет, статистически значимые различия по возрасту обнаружены только между группами пациентов со среднетяжелой и тяжелой БА фенотипа “астма с фиксированной обструкцией» ($p < 0,05$). Стаж заболевания также различался у этих двух групп пациентов. Средний возраст манифестации болезни составил $34,86 \pm 1,99$ лет, статистически значимых различий между группами не обнаружено, однако, среди пациентов с «brittle» астмой чаще встречались лица с так называемой early-onset БА (возникшей в возрасте до 12 лет), фенотип «brittle» сформировался к 18-20 годам. Исходная клинико-функциональная характеристика пациентов представлена в таблице 2.

Пациенты с тяжелой терапевтически резистентной астмой имели исходно статистически значимо более частые и выраженные дневные и ночные симптомы астмы. Основные показатели ФВД (ОФВ1, ПСВ, СЛБ) также статистически значимо отличались в группах среднетяжелых и тяжелых больных. Пациенты с тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипа «brittle» характеризовались

исключительно атопической формой заболевания, высокой среднесуточной лабильностью бронхов. Больные тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» отличались низким индексом атопии, монотонностью показателей функции легких.

Таблица 2
Сравнительная клинико-функциональная характеристика обследованных групп пациентов с диагнозом БА ($X \pm x$)

Показатели	Больные БА		
	Среднетяжелые (n=27)	Тяжелые, фенотип «brittle» (n=10)	Тяжелые, фенотип «астма с фиксированной обструкцией» (n=19)
Средний возраст, лет	42,67±2,47	43,40±5,22	54,37±1,88*
Стаж заболевания, лет	8,15±1,34	15,50±3,57	13,89±2,35*
Средний возраст манифестации болезни, лет	34,51±2,85	27,10±5,99	39,42±2,57
Дневные симптомы, баллы [#]	1,53±0,15	3,72±0,40*	3,69±0,11*
Ночные симптомы, баллы [#]	0,12±0,01	2,06±0,25*	2,61±0,20*
Потребность в бронхолитиках, доз/сут	0,96±0,12	5,88±1,12*	8,28±0,94***
Обострения, число случаев в год	2,28±0,35	3,60±0,46*	6,50±1,33***
Утренние значения ПСВ, %	77,75±1,76	64,83±6,41*	54,61±2,07*
ОФВ1, %	74,54±1,82	55,06±4,33*	60,34±2,79*
СЛБ, %	20,12±1,12	45,82±1,22*	8,28±0,94***
ПК 20 мг/мл ^{##}	3,34±0,73	0,24±0,19*	- ^{##}
IgE МЕ/мл	272,68±53,00	309,60±34,90	107,34±24,68***

Примечание: [#] – оценка по шкале симптомов;

^{##} – тест выполнялся только пациентам с исходным уровнем ОФВ1 $\geq 70\%$ от должного;

* – $p < 0,05$ по сравнению с показателями группы среднетяжелых пациентов;

** – $p < 0,05$ по сравнению с показателями группы тяжелой БА фенотипа «brittle».

Таким образом, установлено, что клинические фенотипы тяжелой терапевтически резистентной БА различаются по клинико-функциональным параметрам, при этом максимальный вклад в различия между группами вносят показатели бронхиальной реактивности.

2. Патоморфологическая характеристика фенотипов тяжелой терапевтически резистентной БА.

Обзор исследований БА с использованием бронхоскопических методик (бронхоальвеолярный лаваж, биопсия) продемонстрировал ряд различий в морфологической картине воспаления бронхов в случае разнородности клинических фенотипов заболевания. S.E. Wenzel и соавт. (1997) обнаружили, что в случае тяжелого персистирующего течения астмы преобладает нейтрофильная инфильтрация воздухоносных путей. У пациентов с преобладанием ночных симптомов было установлено значительное увеличение количества эозинофилов в тканях, полученных при трансбронхиальной биопсии в 4 часа утра (Martin R. J., 1996; Kraft M., 1998). Вероятно, в основе фенотипов БА лежат различные воспалительные реакции с преобладанием тех или иных

эффекторных клеток, однако комплексные исследования патоморфологических характеристик терапевтически резистентной астмы с учетом ее клинической гетерогенности отсутствуют.

С целью определения морфологических особенностей клинических фенотипов тяжелой БА в данной работе проведена оценка клеточного состава БС, морфометрических и цитологических параметров биоптатов слизистой оболочки бронха больных тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» в сравнении со среднетяжелой астмой.

При анализе полученных морфометрических данных установлено, что структурные изменения слизистой оболочки бронхов у больных тяжелой БА, независимо от фенотипа, носят преимущественно атрофический характер и выражаются в уменьшении толщины эпителиального пласта, снижении объемной плотности покровного эпителия, уменьшении относительного объема желез. Одновременно выявлен фиброз собственной пластинки, что проявлялось в увеличении относительного объема соединительной ткани, а также в утолщении базальной мембраны (табл. 3). Для больных «brittle» БА характерна гиперплазия гладкомышечных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки.

Статистически значимые различия между фенотипами тяжелой БА выявлены по высоте эпителиального пласта и толщине базальной мембраны.

Таблица 3

Показатели морфометрии у больных среднетяжелой и тяжелой БА ($X \pm x$)

Исследуемые параметры	Тяжесть БА		
	Среднетяжелая (n=22)	Тяжелая, фенотип «brittle» (n=9)	Тяжелая, фенотип «астма с фиксированной обструкцией» (n=14)
Объемная плотность всего покровного эпителия, мм ³ /мм ³	0,26±0,01	0,12±0,01*	0,16±0,02*
Объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,12±0,01	0,05±0,002*	0,07±0,01*
Объемная плотность бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,08±0,004	0,02±0,002*	0,04±0,01*
Объемная плотность базальных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,06±0,005	0,05±0,01	0,05±0,01
Относительный объем желез, %	66,30±2,48	32,16±2,63*	26,76±5,56*
Относительный объем соед. ткани, %	34,58±2,25	68,12±2,67*	60,18±5,03*
Высота эпителиального пласта, мкм	63,30±2,80	56,31±4,23	24,31±3,46* **
Толщина базальной мембраны, мкм	8,47±0,64	18,77±2,74*	25,69±5,37* **

Примечание: * – $p \leq 0,01$ по сравнению с показателями группы среднетяжелой БА;

** – $p < 0,05$ по сравнению с группой тяжелой БА, фенотип «brittle».

Известно, что уменьшение толщины покровного эпителия в бронхиальных путях существенно снижает его защитные свойства, облегчая проникновение аллергенов (Абросимов В.Н., 1994; Vrugt В., 1993). Морфологическим подтверждением такой антигенной стимуляции является высокий уровень лимфоцитов и гистио-макрофагальных элементов в слизистой оболочке бронхов, имеющий место у больных с «brittle» БА. Значимость снижения толщины

эпителиального пласта слизистой оболочки бронхов в патогенезе персистенции симптомов у тяжелых больных подтверждают выявленные в ходе работы корреляционные связи. Отрицательная корреляция обнаружена между тяжестью заболевания, частотой дневных и ночных симптомов и высотой эпителиального пласта ($r=-0,57$; $p=0,001$), и положительная – между объемной плотностью покровного ($r=0,67$; $p=0,0002$), реснитчатого ($r=0,67$; $p=0,0002$) и бокаловидного эпителия ($r=0,57$; $p=0,002$) и уровнем ПК20 в тесте с гистамином.

При сравнении клеточного состава инфильтрата слизистой оболочки бронхов обнаружено преобладание эозинофилов и нейтрофилов при БА средней степени тяжести, тогда как в случае «brittle» БА преобладали гистио-макрофагальные элементы, а при тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» выявлено значительное число нейтрофилов (рис. 1).

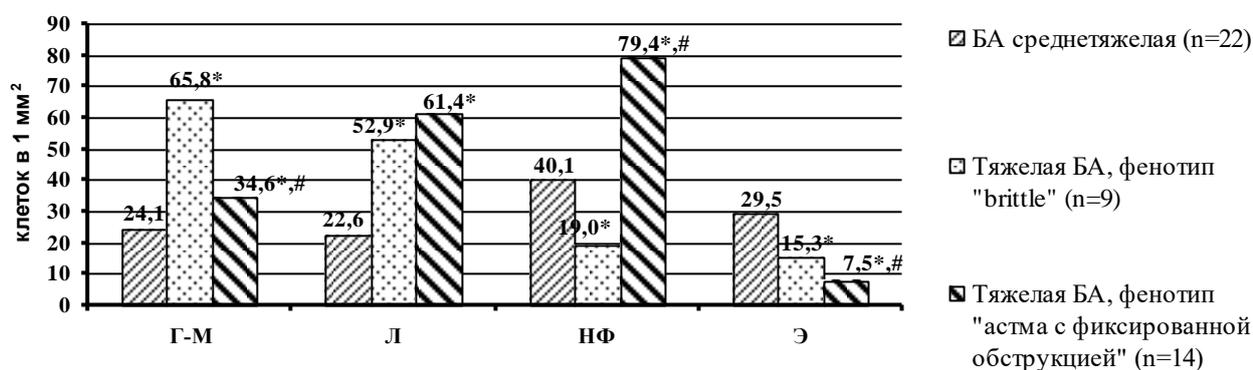


Рис. 1. Характеристика клеточного состава инфильтрата в слизистой оболочке бронхов у больных среднетяжелой и тяжелой (фенотипы «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией») БА.

Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой среднетяжелой БА;

- $p<0,05$ по сравнению с группой тяжелой БА, фенотип «brittle»;

Г-М - гистио-макрофагальные элементы;

Л – лимфоциты;

НФ – нейтрофилы;

Э – эозинофилы.

На сегодняшний день нет единого мнения о преобладании какого-либо типа эффекторных клеток в воспалительном инфильтрате, особенно в случае тяжелой БА. В проведенном исследовании наибольшее количество нейтрофилов ($79,42 \pm 9,26$ в 1 мм^2), инфильтрирующих слизистую оболочку бронха, выявлено у пациентов с тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией», именно в этом случае можно говорить о нейтрофильном паттерне воспаления. Необходимо отметить, что все эти пациенты получали в качестве базисной терапии БА системные кортикостероиды, для которых показан эффект подавления апоптотической гибели нейтрофилов у больных с БА (Cox G., 1995; Nguyen L.T., 2005).

В случае «brittle» БА отмечена относительно высокая плотность эозинофилов в слизистой бронхов ($15,35 \pm 2,13$ в 1 мм^2) в сравнении с БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» ($p=0,003$), что позволяет характеризовать данное воспаление как эозинофильное. Полученные данные соответствуют результатам S.E. Wenzel с соавт. (1999 г.), которые в группе

больных с тяжелой БА, не разделяя их на клинические фенотипы, выделили два морфологических подтипа, характеризующихся различным паттерном воспаления в слизистой бронха: при эозинофильном фенотипе количество эозинофилов, инфильтрирующих стенку бронха, составляет от 16 до 31 клетки в 1 мм^2 (медиана = 20), при нейтрофильном – количество нейтрофилов – 39-273 клетки в 1 мм^2 (медиана = 65), число эозинофилов – 0-2 клетки в 1 мм^2 .

Результаты дискриминантного анализа свидетельствуют о достоверном различии патоморфологических характеристик для отдельных фенотипов тяжелой БА и среднетяжелых больных, что подтверждает их значимый вклад в формирование фенотипической гетерогенности пациентов (табл. 4, рис. 2).

Таблица 4

Результаты дискриминантного анализа патоморфологических характеристик при сравнении групп больных среднетяжелой и тяжелой терапевтически резистентной астмой

Показатели	Среднетяжелая БА	Тяжелая БА, фенотип «brittle»	Тяжелая БА, фенотип «астма с фиксированной обструкцией»
Число больных	22	9	14
Правильная классификация, %	100	100	93
Включенные в уравнение ЛДФ характеристики ФВД, λ Уилкса и уровень значимости	Плотность нейтрофилов, кл. в 1 мм^2 ; $\lambda=0,04$; $p<0,001$		
	Высота эпителиального пласта, мкм; $\lambda=0,05$; $p<0,0001$		
Характеристики уравнения ЛДФ	$\lambda=0,29$; $F=12,63$; $p<0,0001$		

Примечание: ЛДФ – линейная дискриминантная функция.

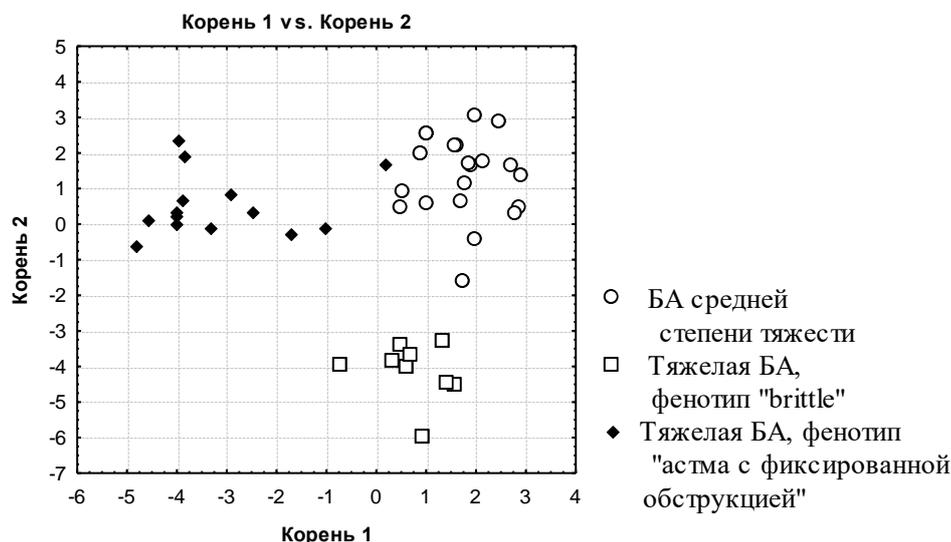


Рис. 2. Рассеяние значений дискриминантной функции при сравнении групп больных с тяжелой БА фенотипа «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» и среднетяжелой астмой по изучаемым патоморфологическим характеристикам.

Изменение клеточного состава БС у обследованных групп больных в целом отражает клеточный паттерн воспаления в слизистой оболочке бронхов. Так, у пациентов с тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» преобладающими клетками БС являются нейтрофилы ($0,73 \pm 0,05 \times 10^6$ в 1 мл), в

группе среднетяжелых больных – наряду с клетками бронхиального эпителия, одинаково часто встречались эозинофилы ($0,47 \pm 0,06 \times 10^6$ в 1мл) и нейтрофилы ($0,46 \pm 0,11 \times 10^6$ в 1мл). Для пациентов с «brittle» фенотипом тяжелой астмы характерно меньшее абсолютное количество клеток ($1,73 \pm 0,10 \times 10^6$ в 1 мл) в связи с более низким содержанием лимфоцитов, эозинофилов и эпителиальных клеток.

Таким образом, основной патоморфологической характеристикой «brittle» фенотипа БА является персистирующее воспаление в ответ на постоянную стимуляцию аллергенами, проявляющееся в высокой плотности гистиомакрофагальных элементов, лимфоцитов и эозинофилов, что подтверждает важный вклад активно персистирующего воспаления в манифестное течение заболевания у этой группы больных.

У пациентов с тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» воспаление носит качественно иной характер, что отражается в клинико-функциональных параметрах болезни. Так, преобладание нейтрофилов ассоциировано с выделением ферментов, обладающих деструктивным и ремоделирующим действием на ткани (Cundall M., 2003; Simpson J.L., 2005; Pepe S., 2005), что приводит к необратимым структурным изменениям ткани бронхов, имеющим крайнюю степень выраженности у этой группы больных, и может быть реализовано в наблюдаемый у них феномен фиксированной обструкции.

3. Особенности экспрессии генов воспаления и бронхоконстрикции у больных тяжелой терапевтически резистентной БА.

Изучаемые клинические фенотипы тяжелой астмы значительно различаются по показателям гиперреактивности бронхов. Одним из факторов, принимающих участие в формировании феномена БГР, является нарушение нейрогенного контроля тонуса гладких мышц бронхов больных БА (Barnes P.J., 1999; Smith H., 2002). В рамках настоящей работы проведен анализ экспрессии генов, задействованных в воспалении и механизмах бронхоконстрикции (ген МЗ-холинорецептора, ген $\beta 2$ -адренорецептора, ген Н1-рецептора гистамина), в образцах ткани бронхов больных со среднетяжелой БА и тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией».

Исходная характеристика уровня мРНК исследуемых генов представлена в табл. 5.

Таблица 5

Исходные показатели экспрессии генов в бронхиальных биоптатах у больных среднетяжелой и тяжелой БА

Исследуемые параметры	Тяжесть БА		
	Среднетяжелая (n=16)	Тяжелая, фенотип «brittle» (n=10)	Тяжелая, фенотип «астма с фиксированной обструкцией» (n=14)
мРНК <i>CHRM3</i> , %	45,76±1,76	57,17±0,94*	50,54±1,61***
мРНК <i>ADRB2</i> , %	28,92±1,31	51,70±0,56*	71,41±2,43***
мРНК <i>H1R</i> , %	34,36±0,59	38,82±1,26*	34,65±0,98**

Примечание: *— $p \leq 0,05$ по сравнению с показателями группы среднетяжелой БА;

** – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой тяжелой БА, фенотип «brittle».

Максимальное повышение уровня экспрессии гена МЗ-холинорецептора наблюдалось в группе пациентов тяжелой БА с «brittle» фенотипом как в сравнении со среднетяжелыми больными ($p=0,0002$), так и с группой тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» ($p=0,008$). Уровень мРНК H1-рецептора гистамина статистически значимо повышен в группе больных БА с «brittle» фенотипом, как в сравнении со среднетяжелыми пациентами ($p=0,005$), так с пациентами с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией» ($p=0,03$). Установлена положительная корреляционная связь между уровнем экспрессии *H1R* и *CHRM3* и СЛБ ($r=0,67$; $p=0,002$ и $r=0,86$; $p=0,0006$, соответственно).

Известно, что рецепторы гистамина активно экспрессируют клетки воспаления (лимфоциты, эозинофилы), поэтому повышение уровня экспрессии *H1R* у больных с «brittle» БА может быть следствием активно протекающего аллергического воспаления в слизистой оболочке бронхов. Это отражается в положительной корреляционной взаимосвязи между уровнем мРНК *H1R* и плотностью эозинофилов в слизистой оболочке бронхов в группе пациентов с «brittle» БА ($r=0,92$; $p=0,002$).

В ряде работ установлено, что МЗ-холинорецептор активно экспрессируется макрофагами, опосредуя их хемотаксис (Mita Y., 1996; Sato E., 1998). По результатам проведенного исследования, количество макрофагов, инфильтрирующих слизистую оболочку бронхов, максимально у больных «brittle» БА; у пациентов с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией» инфильтрация гистио-макрофагальными элементами слизистой оболочки выше по сравнению со среднетяжелой астмой, но ниже этого показателя у больных «brittle» БА. Это согласуется с установленным уровнем экспрессии МЗ-холинорецептора и подтверждено корреляцией между количеством макрофагов и уровнем экспрессии *CHRM3* ($r=0,41$; $p=0,043$).

Активность гена *ADRB2* достоверно различалась во всех трех группах, наибольший уровень отмечен в группе больных тяжелой БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» ($p<0,0001$, в сравнении со среднетяжелой БА), у пациентов с «brittle» БА показатель уровня мРНК гена $\beta 2$ -адренорецептора был достоверно выше, чем в группе среднетяжелой БА ($p=0,00002$), однако ниже уровня пациентов с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией» ($p=0,00003$). Это может быть объяснено с позиции влияния проводимой терапии. Так, по данным литературы, ГКС способны повышать экспрессию гена *ADRB2* через инактивацию транскрипционного NF- κ B (Szeffler S. J., 1997; Nelson H. S., 2003), возможно, именно это оказывает влияние на полученные результаты, так как пациенты группы БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» исходно получали в качестве базисной терапии системные стероиды.

При оценке значимости вклада уровня экспрессии изучаемых генов в формирование различий между группами больных со среднетяжелой и фенотипами тяжелой БА установлено, что наибольший вклад вносят активность гена $\beta 2$ -адренорецептора и МЗ-холинорецептора (рис. 3, табл. 6).

Результаты дискриминантного анализа уровня мРНК генов воспаления и бронхоконстрикции при сравнении групп больных среднетяжелой и тяжелой терапевтически резистентной астмой

Показатели	Среднетяжелая БА	Тяжелая БА, фенотип «brittle»	Тяжелая БА, фенотип «астма с фиксированной обструкцией»
Число больных	16	10	14
Правильная классификация, %	100	100	85
Включенные в уравнение ЛДФ показатели экспрессии генов бронхоконстрикции, λ Уилкса и уровень значимости	мРНК <i>ADRB2</i> , %; λ 0,43; $p < 0,0001$		
	мРНК <i>CHRM3</i> , %; $\lambda = 0,06$; $p = 0,03$		
Характеристики уравнения ЛДФ	$\lambda = 0,039$; $F = 22,82$; $p < 0,0001$		

Примечание: ЛДФ – линейная дискриминантная функция.

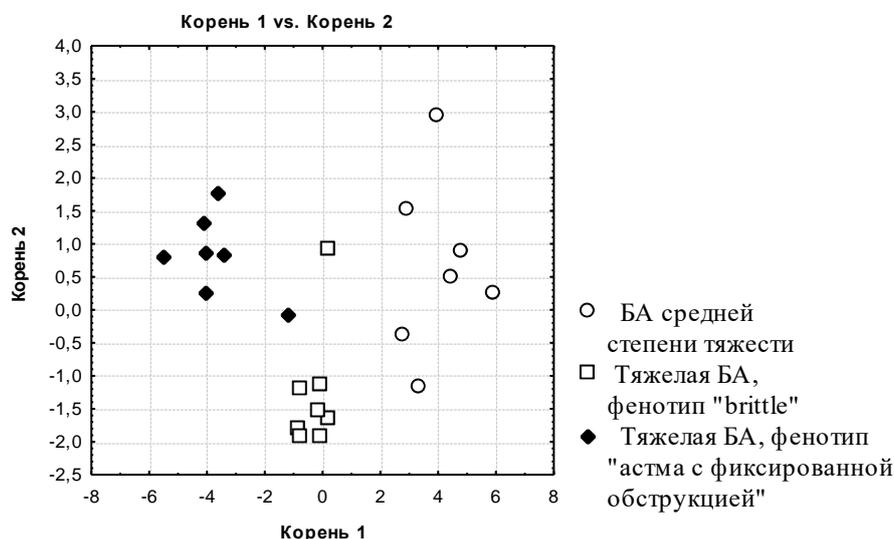


Рис. 3. Рассеяние значений дискриминантной функции при сравнении групп больных с тяжелой БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» и среднетяжелой астмой по показателям уровня экспрессии генов рецепторов воспаления и бронхоконстрикции.

Таким образом, у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной астмой с фенотипами «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» выявлены различия в уровне экспрессии генов, вовлеченных в воспалительный и бронхоконстрикторный ответ (*CHRM3*, *H1R*, *ADRB2*).

4. Динамика клинико-функциональных, патоморфологических и молекулярных показателей на фоне использования базисной противовоспалительной терапии у пациентов с различной степенью тяжести БА.

В ходе проведенной работы всем пациентам назначена базисная ингаляционная терапия в дозах, соответствующих степени тяжести заболевания (рис. 4).

Эффективность назначаемой базисной терапии оценивали на основании клинико-функциональных и патоморфологических критериев. Клиническую оценку эффективности выполняли с учетом соответствия пациента критериям контроля GINA, 2006 (табл. 1).

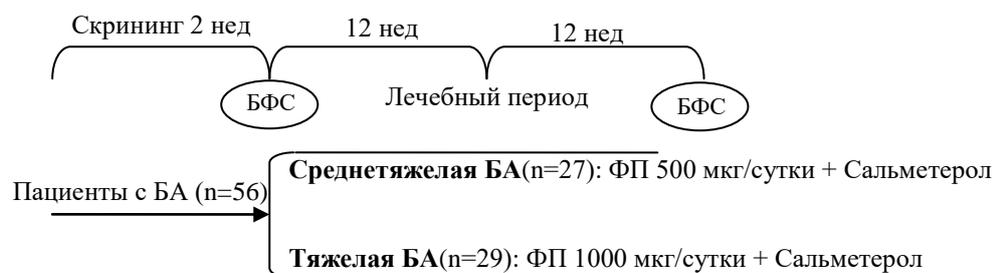


Рис. 4. Дизайн исследования пациентов с БА различной степени тяжести.

На фоне проводимой противовоспалительной терапии отмечена положительная динамика клиничко-функциональных показателей во всех группах обследуемых пациентов (табл. 7).

Таблица 7

Клиничко-функциональная характеристика больных с различной степенью тяжести БА при использовании адекватной базисной терапии

Показатель	Больные БА (n=56)					
	Средней степени тяжести (n=27)		Тяжелой БА, фенотип «brittle» (n=10)		Тяжелой БА, фенотип «астма с фиксированной обструкцией» (n=19)	
	Исходно	После лечения	Исходно	После лечения	Исходно	После лечения
Дневные симптомы, баллы	1,53±0,15	0,72±0,12*	3,72±0,40	1,11±0,44*	3,69±0,11	1,78±0,25*
Ночные симптомы, баллы	0,12±0,01	0,04±0,00*	2,06±0,25	0,25±0,14*	2,61±0,20	0,57±0,14*
Потребность в β2-агонистах (количество ингаляций/сутки)	0,96±0,12	0,02±0,01*	5,88±1,12	2,43±0,90*	8,28±0,94	2,34±0,78*
ОФВ1, % от должного	74,54±1,82	80,12±1,66*	55,06±4,33	74,50±3,18*	60,39±2,79	73,55±2,28*
ПСВ, % от должного	77,75±1,76	84,36±1,95*	64,83±6,41	77,49±4,00*	54,61±2,07	73,22±2,28*
СЛБ, %	20,12±1,12	10,48±0,72*	45,82±1,22	41,16±1,06*	8,28±0,94	8,34±0,59
ПК20 в тесте с гистамином (мг/мл)#	3,34±0,73	6,66±1,33*	0,24±0,19	1,18±0,46*	#	2,66±0,42

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с исходными показателями;

- тест выполнялся только пациентам с исходным уровнем ОФВ1 $\geq 70\%$ от должного.

В группе больных БА средней степени тяжести по окончании лечебного периода критериев полного и частичного контроля по GINA 2006 достигли все обследованные пациенты. Параллельно с восстановлением клиничко-функциональных показателей наблюдали достоверные изменения морфологической картины воспаления в слизистой оболочке бронхов (табл. 8, рис. 5).

Таблица 8

Динамика морфометрических показателей больных среднетяжелой БА на фоне базисной терапии, соответствующей степени тяжести

Исследуемые параметры	Больные БА средней степени тяжести (n=12)	
	Исходно	На фоне адекватной базисной терапии
Объемная плотность всего покровного эпителия, мм ³ /мм ³	0,26±0,01	0,34±0,03*
Объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,12±0,01	0,17±0,01*
Объемная плотность бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,08±0,004	0,07±0,01
Объемная плотность базальных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,06±0,005	0,09±0,01*
Относительный объем желез, %	66,30±2,48	64,17±3,35
Относительный объем соед. ткани, %	34,58±2,25	33,79±2,79
Высота эпителиального пласта, мкм	63,30±2,80	53,00±3,65*
Толщина базальной мембраны, мкм	8,47±0,64	10,25±0,58

Примечание: * - p<0,05 по сравнению с исходными показателями.

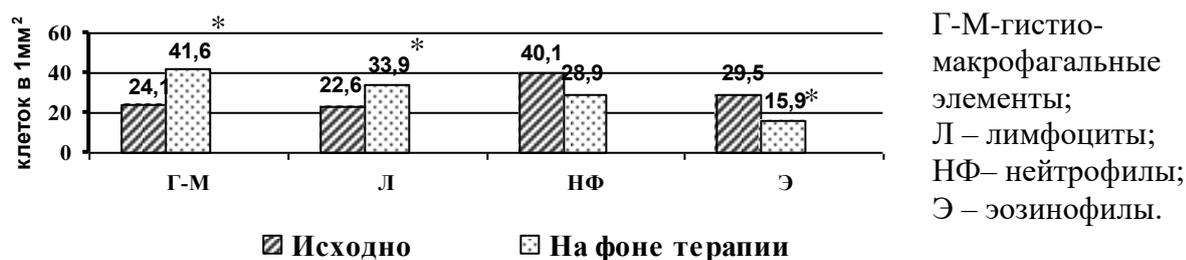


Рис. 5. Динамика клеточного состава инфильтрата в слизистой оболочке бронхов у больных БА средней степени тяжести на фоне адекватной базисной терапии.

Примечание: * - p<0,05 по сравнению с исходными значениями.

Восстановление клинико-функциональных и патоморфологических параметров сочеталось со снижением уровня экспрессии генов М3-холинорецептора и Н1-рецептора гистамина и повышением уровня экспрессии гена β2-адренорецептора (табл. 9), что может быть отражением эффективного подавления воспаления в тканях бронхов у этих пациентов.

Таблица 9

Динамика экспрессии генов в бронхиальных биоптатах у больных среднетяжелой и тяжелой БА на фоне адекватной степени тяжести ингаляционной терапии (X±x)

Исследуемые параметры	Больные БА			
	Среднетяжелые (n=10)		Тяжелые, фенотип «астма с фиксированной обструкцией» (n=14)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
мРНК <i>CHRM3</i> , %	46,58±3,19	41,77±2,62*	50,54±1,61	49,72±1,20
мРНК <i>ADRB2</i> , %	24,91±0,90	30,29±1,47*	71,41±2,43	59,21±6,41
мРНК <i>H1R</i> , %	33,06±0,97	29,75±1,75*	34,65±0,98	34,37±0,96

Примечание: * - p<0,05 по сравнению с исходными показателями.

Указанные на рисунке 6 и изученные в данной работе рецепторы задействованы в воспалительном и бронхоконстрикторном ответе, что отражает тесную взаимосвязь между клинико-функциональными, морфологическими и молекулярными особенностями фенотипов тяжелой терапевтически резистентной астмы.

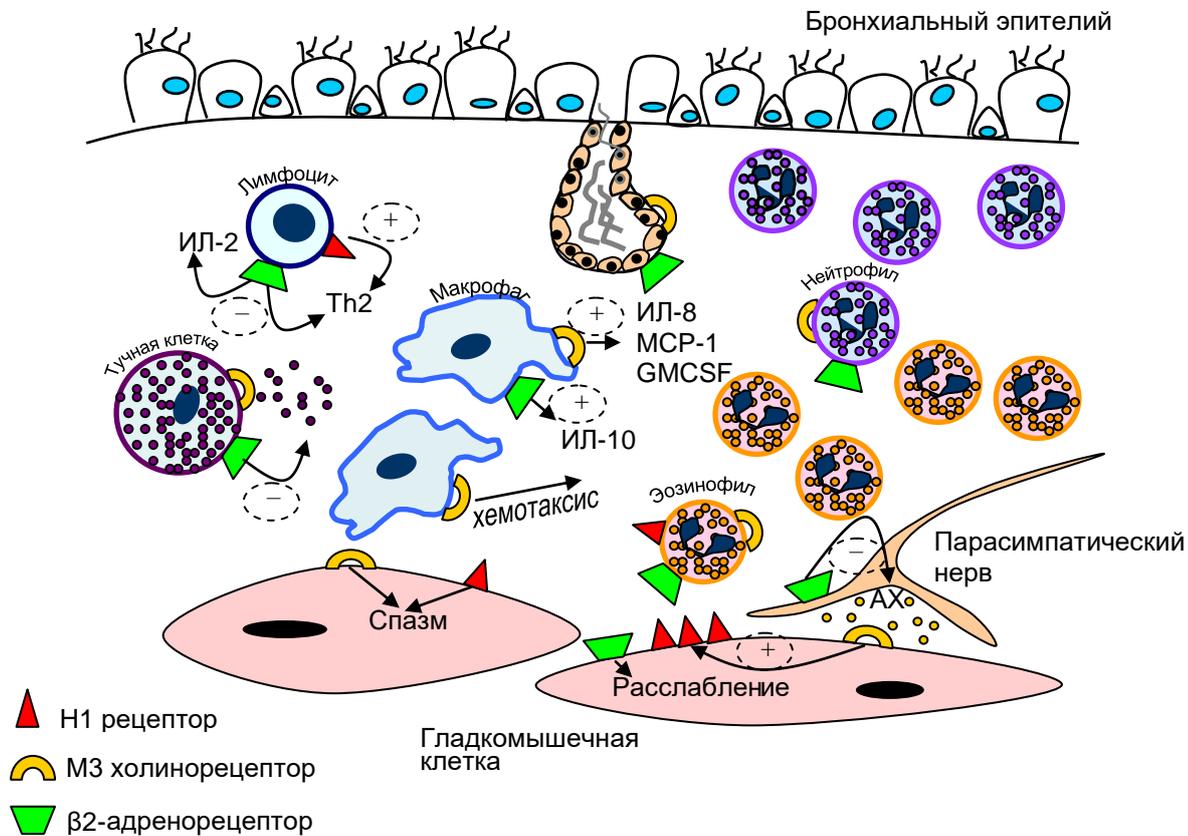


Рис. 6. Локализация и биологические эффекты изучаемых рецепторов.

Известно, что H1-рецепторы гистамина локализованы, помимо гладких миоцитов бронхов, на лимфоцитах, участвуя в их дифференцировке по Th2 пути, и эозинофилах, опосредуя их хемотаксис в очаг воспаления. M3-холинорецептор экспрессируется тучными клетками, макрофагами, стимулирует секрецию ими медиаторов воспаления, провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантов. M3-холинорецептор представлен также на эффекторных клетках – эозинофилах и нейтрофилах, обеспечивая хемотаксис и накопление их в очаге воспаления. Локализованный на эпителиальных клетках подслизистых желез бронха, M3-холинорецептор способствует усилению продукции слизи.

β2-адренорецептор, не только участвует в расслаблении гладких мышц бронхов, но и экспрессируется провоспалительными клетками – лимфоцитами, тучными, макрофагами, эозинофилами, нейтрофилами, оказывая при стимуляции противовоспалительное действие – блокирует выброс медиаторов, выработку провоспалительных цитокинов и приводит к синтезу противовоспалительных цитокинов.

Концепция работы

В процессе выполнения исследования показан дифференцированный вклад экспрессии генов в развитие фенотипов терапевтически резистентной БА, как

доказательство биологически закрепленных механизмов клинического полиморфизма тяжелой неконтролируемой БА.

Персистенция аллергического воспаления - базисный механизм «brittle» фенотипа тяжелой терапевтически резистентной астмы, что обосновано высокой активностью экспрессии генов М3-холинорецептора, Н1-рецептора гистамина, β 2-адренорецептора в слизистой бронхиальной стенке больных «brittle» БА. Уровень мРНК М3-холинорецептора, Н1-рецептора гистамина был значительно выше у пациентов с «brittle» астмой, в сравнении с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией», что характеризовалось высокой суточной лабильностью бронхов и патоморфологическими особенностями – высокой плотностью лимфоцитов, макрофагов и эозинофилов, выявленных у данной группы больных.

Тяжелая БА фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» отличается нейтрофильным паттерном воспаления, значительными явлениями ремоделирования бронхов, что приводит к необратимым структурным изменениям у этой группы больных и реализуется в феномен фиксированной бронхообструкции. Установленная статистически значимо более высокая экспрессия гена β 2-адренорецептора в этой группе больных, вероятно, обусловлена влиянием терапии системными стероидами.

Предположительно, высокий уровень экспрессии β 2-адренорецептора, выявленный в группе пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА и не приводящий к ожидаемым противовоспалительным и бронходилатационным эффектам, может быть следствием синтеза функционально неполноценной формы рецептора (Audet M., 2008; McGraw D.W., 2005), однако это требует дальнейшего изучения.

Терапевтическая резистентность пациентов доказана отсутствием контроля над заболеванием в ответ на назначение высоких доз базисной противовоспалительной ингаляционной терапии, а также отсутствием динамики патоморфологических и молекулярных параметров у пациентов с тяжелой астмой фенотипа «астма с фиксированной обструкцией», что подтверждает базисный вклад этих изменений в формирование терапевтической резистентности.

Таким образом, клинический полиморфизм тяжелой терапевтически резистентной астмы подтвержден новыми фундаментальными данными, раскрывающими дифференцированный вклад морфологических и молекулярных механизмов воспаления и бронхоконстрикции.

ВЫВОДЫ

1. Тяжелая терапевтически резистентная бронхиальная астма фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» характеризуется значительными различиями по клинико-функциональным, патогенетическим, морфологическим и молекулярным параметрам болезни: «brittle» фенотип характеризуется обязательным наличием атопии, ранним началом заболевания (у 30% пациентов астма развивалась в возрасте до 12 лет), высокой среднесуточной лабильностью бронхов; фенотип «астма с фиксированной обструкцией» отличается низким индексом атопии

(большой удельный вес эндогенной астмы, существенно более низкие значения сывороточного IgE), монотонностью показателей функции легких (пониженные показатели среднесуточной лабильности бронхов).

2. В бронхиальных смывах пациентов с «brittle» фенотипом БА снижен общий цитоз за счет более низкого содержания лимфоцитов, эозинофилов и эпителиальных клеток по сравнению со среднетяжелой астмой. В бронхиальных смывах больных с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией» преобладают нейтрофилы.
3. У больных «brittle» фенотипом тяжелой БА в составе клеточного инфильтрата слизистой оболочки бронхов преобладают гистиомакрофагальные элементы, лимфоциты и эозинофилы, в случае фенотипа «астма с фиксированной обструкцией» – нейтрофилы.
4. В слизистой оболочке бронхов пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА в сравнении со среднетяжелыми больными выражены явления ремоделирования (уменьшение объемной плотности и высоты покровного эпителия, реснитчатых и бокаловидных эпителиоцитов, снижение относительного объема желез, значительное увеличение толщины базальной мембраны и относительного объема соединительной ткани). Фенотип «астма с фиксированной обструкцией» отличается от «brittle» БА более выраженным утолщением базальной мембраны и снижением высоты эпителиального пласта.
5. Повышена экспрессия ряда генов воспаления и бронхоконстрикции (*CHRM3* и *ADRB2*) у пациентов с тяжелой БА по сравнению с группой среднетяжелых больных; «brittle» фенотип тяжелой БА характеризуется увеличением активности генов *CHRM3* и *H1R* в сравнении со среднетяжелой БА и фенотипом тяжелой БА «астма с фиксированной обструкцией», и меньшей активностью гена *ADRB2* по сравнению с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией».
6. Плотность гистио-макрофагальных элементов статистически значимо взаимосвязана с экспрессией *CHRM3*, плотность эозинофилов в слизистой бронхиальной стенке – с экспрессией гена *H1R*.
7. Пациенты среднетяжелой БА на фоне применения базисной терапии, в дозах соответствующих степени тяжести, достигли критериев контроля, что ассоциировано с достоверными изменениями морфологической картины воспаления в слизистой оболочке бронхов, а также снижением экспрессии генов *CHRM3* и *H1R*, и увеличением уровня экспрессии *ADRB2* в бронхиальных биоптатах.
8. Установлено улучшение клинико-функциональных показателей у больных с тяжелой БА на фоне применения адекватных степени тяжести доз базисной терапии, но критерии полного контроля достигнуты не были: у пациентов с «brittle» фенотипом частичный контроль достигнут у 30% пациентов, при этом сохранялся высокий уровень гиперреактивности бронхов по показателям ПК20 в тесте с гистамином и СЛБ; назначение адекватной степени тяжести базисной терапии у пациентов с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией» не сопровождалось динамикой

патоморфологических показателей и статистически значимыми изменениями экспрессии изучаемых генов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для индивидуализации режимов базисной противовоспалительной терапии у пациентов с терапевтически резистентной бронхиальной астмой принципиально важным является тщательная диагностика фенотипов терапевтически резистентной бронхиальной астмы.
2. Пациентам с терапевтически резистентной бронхиальной астмой фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной обструкцией» с целью контроля воспаления в дыхательных путях и снижения его вклада в терапевтическую резистентность, рекомендовано использовать долговременную базисную терапию в стабильно высоких дозах в течение как минимум 6 месяцев. Конечной целью лечения должно быть достижение максимально возможного контроля тяжелой астмы.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности течения тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмы в сочетании с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью / О.С. Кобякова, У.В. Рудык, Г.Э. Черногорюк, П.А. Селиванова // Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии. – 2005. – №19. – С. 40-43.
2. Костная прочность у больных бронхиальной астмой по данным ультразвуковой остеометрии / О.П. Зоркальцева, В.Д. Завадовская, О.С. Кобякова, О.Ю. Килина, П.А. Селиванова и др. // Материалы IV региональной конференции, посвященной 50-летию кафедры лучевой диагностики и Лучевой терапии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава. – Томск. – 2006. – С. 301-306.
3. Изменение биологических маркеров атопического воспаления на фоне базисной терапии бронхиальной астмы у детей / Д.В. Козырицкая, Е.В. Деева, Е.А. Старовойтова, П.А. Селиванова // Материалы Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва. – 2007. – С. 703.
4. Геренг, Е.А. Морфологическая характеристика бронхобиоптатов у больных различными фенотипами тяжелой бронхиальной астмы / Е.А. Геренг, П.А. Селиванова // Научные труды VIII международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке; концепции болезней цивилизации». – Москва. – 2007. – С. 195-196.
5. Геренг, Е.А. Морфофункциональная характеристика слизистой оболочки бронхов у больных различными формами тяжелой бронхиальной астмой / Е.А. Геренг, П.А. Селиванова // Сибирский консилиум. – 2007. – №7(62). – С. 30-31.
6. Селиванова, П.А. Особенности морфологической картины различных фенотипов тяжелой бронхиальной астмы / П.А. Селиванова, Е.А. Геренг, Е.С. Куликов // Материалы VIII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о Человеке». – Томск. – 2007. – С. 22-24.
7. Оценка влияния вентиляционных нарушений на костную прочность при бронхиальной астме по данным ультразвуковой остеометрии / О.П. Зоркальцева, В.Д. Завадовская, О.С. Кобякова, В.М. Шевелев, О.Ю. Килина, П.А. Селиванова и др. // Материалы Невского радиологического форума «Новые горизонты». – Санкт-Петербург. – 2007. – С.139-140.

8. Показатели костной прочности у больных бронхиальной астмой с наличием и различным стажем базисной терапии / О.П. Зоркальцева, О.С. Кобякова, В.Д. Завадовская, Д.В. Капитанова, П.А. Селиванова // Сборник трудов Томской областной клинической больницы. – Томск. – 2007. – выпуск 14. – С. 60-64.
9. Огородова, Л.М. GINA 2006: контроль астмы как основная цель лечения и критерий эффективности терапии / Л.М. Огородова, И.А. Деев, П.А. Селиванова // Пульмонология. – 2007. – №6. – С. 98-103.
10. Клеточный состав бронхиальных смывов у больных тяжелой бронхиальной астмой / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, П.А. Селиванова // Морфология (Материалы докладов IX конгресса МАМ). – 2008. – №2. – С. 31.
11. Патоморфологическая характеристика нестабильной бронхиальной астмы (фенотип brittle) / Л.М. Огородова, П.А. Селиванова, Е.А. Геренг и др. // Терапевтический архив. – 2008. – №3. – С. 39-43.
12. Геренг, Е.А. Тканевые изменения слизистой оболочки бронхов при лечении больных тяжелой бронхиальной астмой / Е.А. Геренг, Е.В. Константинова, П.А. Селиванова // Материалы XI межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины». – Абакан. – 2008. – С. 41-43.

Условные сокращения

БА – бронхиальная астма

БГР – бронхиальная гиперреактивность

БС – бронхиальный смыв

БФС – бронхофиброскопия

ГКС – глюкокортикостероиды

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОФВ1 - объем форсированного выдоха за 1 секунду

ПК20 - предельная концентрация гистамина, вызывающая падение ОФВ1 на 20%

ПСВ – пиковая скорость выдоха

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЛБ – среднесуточная лабильность бронхов

ФВД – функция внешнего дыхания

ФП – флутиказона пропионат

ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

ADRB2 – ген β 2-адренорецептора

CHRM3 – ген М3-холинорецептора

GINA – Global Initiative for Asthma

H1R – ген H1-рецептора гистамина

IgE – иммуноглобулин класса E