

## Активность нейтрофильной эластазы сыворотки крови у больных атопической бронхиальной астмой

Российская медицинская академия последипломного образования: 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2 / 1

*D.S. Fomina, L.A. Goryachkina, N.M. Nenasheva, E.A. Neshkova*

## Serum activity of neutrophil elastase in patients with atopic bronchial asthma

### Summary

A role of neutrophilic inflammation in bronchial asthma has been widely discussed in recent studies but is still uncertain. Particularly, the activity of neutrophil elastase is likely to be the major mechanism providing chronic and acute inflammatory responses by mediating the elastolysis, degradation of collagen, matrix proteins and glycoproteins which are responsible for the protection and adaptation. The aim of this study was to analyze clinical importance and diagnostic and prognostic values of neutrophil elastase activity in patients with moderate to severe atopic bronchial asthma. Activity of neutrophil elastase in the blood was measured in 34 patients with atopic asthma by using spectrophotometry. Enhanced activity of neutrophil elastase in comparison with normal range was found in patients with poor control of asthma and was not associated with the disease severity. Six month after therapy adjustment, significant decrease in neutrophil elastase activity was shown only in patients receiving maintenance therapy with fixed-dose fluticasone / salmeterol plus salbutamol as-needed. In smoking patients, adequate therapy with ICS / LABA led to significant improvement in clinical and functional parameters but did not influence on neutrophil elastase activity.

**Key words:** bronchial asthma, management, control, inflammation, neutrophil elastase.

### Резюме

В настоящее время значение нейтрофильного воспаления при бронхиальной астме (БА) является предметом тщательного изучения. Именно нейтрофильная эластаза (НЭ) наиболее активно участвует в остром и хроническом воспалении, поскольку она способна деградировать эластин, коллаген, другие матричные белки и гликопротеиды, обеспечивающие процессы защиты и адаптации. Исследования активности НЭ и  $\alpha_1$ -антитрипсина у пациентов с БА немногочисленны. Целью настоящей работы явилась оценка диагностической и прогностической значимости определения НЭ у пациентов с атопической БА среднетяжелого и тяжелого течения. Активность эластазы сыворотки крови определялась спектрофотометрическим методом у 34 таких больных. Был выявлен повышенный уровень активности НЭ у пациентов с неконтролируемым течением БА, вне зависимости от тяжести патологии. Коррекция терапии привела к значимому снижению активности НЭ только у пациентов, которым была назначена терапия фиксированными комбинациями ингаляционных глюкокортикостероидов и длительнодействующих  $\beta_2$ -агонистов (иГКС / ДДБА) в режиме стабильного дозирования. У курящих пациентов с БА адекватное лечение с применением иГКС / ДДБА привело к значимому улучшению клинических и функциональных показателей, но не повлияло на активность НЭ.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, терапия, контроль, воспаление, нейтрофильная эластаза.

Согласно современной концепции, бронхиальная астма (БА) рассматривается как гетерогенное хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в развитии которого определенную роль играют многие клеточные элементы, особенно эозинофилы, тучные клетки, Т-лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы и эпителиоциты. Воспаление респираторного тракта является центральным фактором патогенеза и клинических проявлений БА, приводящим к обструкции и гиперреактивности дыхательных путей. За последние 20 лет представления о патогенезе БА значительно изменились, что повлекло за собой необходимость поиска новых диагностических технологий и терапевтических стратегий.

Основными противовоспалительными препаратами являются глюкокортикостероиды (ГКС), в случае лечения БА – ингаляционные (иГКС), которые не уступают по своей клинической эффективности системным ГКС (сГКС), но значительно снижают возможность возникновения побочных эффектов. Однако приблизительно у 5–10 % больных БА нет адекватного ответа даже на сГКС [1, 2]. Многие ис-

следователи сходятся во мнении, что снижение эффективности иГКС, особенно при тяжелом персистирующем течении БА, связано с изменением спектра воспалительных клеток, аккумулирующихся в слизистой оболочке дыхательных путей [3, 4]. В большинстве клинических случаев при исследовании бронхоальвеолярного лаважа, эндобронхиального биоптата или индуцированной мокроты регистрируется высокое содержание эозинофилов – как правило, у пациентов с аллергическим фенотипом заболевания, но в некоторых случаях выявляется и значительное количество нейтрофилов – что очень важно, при тяжелой, рефрактерной к обычной терапии БА [4]. Для этих пациентов характерна низкая эффективность иГКС [5]. Значение нейтрофильного воспаления при БА активно изучается.

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что воспаление различного генеза сопровождается локальным экстравазальным накоплением лейкоцитов кровяного русла и их активацией в местах повреждения, инфицирования или антигенной стимуляции. Несмотря на то, что экстрацел-

люлярная секреция нейтрофилов является важным звеном в регуляции воспаления, на последних этапах развития нейтрофильного ответа лизосомные азурофильные гранулы, подвергаясь дегрануляции, выбрасывают во внеклеточное пространство мощные протеолитические ферменты. Среди протеиназ, вовлеченных в развитие острых и хронических заболеваний, именно нейтрофильной эластазе (НЭ) принадлежит первенство вследствие ее протеолитических свойств, характеризующихся способностью деградировать эластин, коллаген, протеогликаны, другие матричные белки и гликопротеиды, обеспечивающие процессы защиты и адаптации.

НЭ относится к группе сериновых протеаз, локализуется в азурофильных цитоплазматических гранулах полиморфно-ядерных лейкоцитов. Регуляция активности НЭ осуществляется главным образом  $\alpha_1$ -антитрипсином, одним из основных белков острой фазы воспаления. Степень протеолитической активности эластазы отражает тяжесть заболевания, а врожденная или приобретенная недостаточность  $\alpha_1$ -антитрипсина (формирующаяся в результате инактивации химическими, биологическими оксидантами, табачным дымом или бактериальными протеиназами) приводит к неконтролируемому протеолизу и хронизации патологического процесса. Приводимые в современной отечественной и зарубежной литературе данные об уровнях активности НЭ и  $\alpha_1$ -антитрипсина у пациентов с БА немногочисленны. Вместе с тем, выделение различных биологических фенотипов БА [6, 7] и поиск их специфических маркеров являются актуальными задачами, решение которых поможет оптимизировать терапию БА.

Целью настоящего исследования являлась оценка диагностической и прогностической значимости определения НЭ у пациентов с атопической БА среднетяжелого и тяжелого течения.

## Материалы и методы

В исследовании участвовали 25 пациентов (11 мужчин и 14 женщин, средний возраст –  $46,4 \pm 14,2$  года. У всех больных был подтвержден диагноз БА: среднетяжелой – в 13 случаях (52 %), тяжелой – в 12 (48 %). Все пациенты до включения в исследование получали базисную противовоспалительную терапию и ГКС (средняя длительность –  $2,89 \pm 1,7$  года). Диагностические мероприятия проводились согласно критериям Глобальной стратегии лечения и профилактики БА (GINA) [8]. До включения в исследование у пациентов не было зафиксировано эпизодов острых респираторных заболеваний в течение предшествующего месяца и обострений сопутствующих хронических заболеваний. У всех пациентов регистрировались атопическая форма БА и сочетанная сенсibilизация к бытовым, пыльцевым, эпидермальным и грибковым аллергенам. По результатам комплексного обследования, включающего в себя клинические и лабораторные методы, оценку уровня контроля в соответствии с критериями GINA (2006),

течение БА было расценено как неконтролируемое у всех пациентов.

Оценка исходного уровня контроля, а также эффективности назначенного лечения в динамике, включала в себя: клинические параметры, исследование функции внешнего дыхания с тестом на обратимость бронхиальной обструкции, самооценку пациентом с помощью теста контроля астмы (АСТ). Все параметры определялись исходно, через 12 нед. и 24 нед. лечебного периода.

Лечебный период составил 24 нед. и предполагал 3 контрольных визита: до начала лечения, через 3 мес. (промежуточный) и через 6 мес. (заключительный), как показано на рис. 1. В зависимости от режима фармакотерапии были выделены 2 лечебные группы. В 1-ю группу вошли больные, получавшие комбинированную терапию будесонидом / формотеролом (Симбикорт Турбухалер) в дозе 160 / 4,5 мкг и использовавшие один и тот же ингалятор для базисной терапии и для купирования симптомов по методу SMART (1-й режим). Пациенты, страдающие БА средней степени тяжести, получали по 1 ингаляции утром и вечером, с тяжелым течением заболевания – 2 ингаляции будесонида / формотерола дважды в день и тот же ингалятор по потребности. Во 2-ю группу вошли больные, получавшие флутиказон / сальметерол (Серетид Мультидиск) в режиме стабильного дозирования 250 / 50 мкг и 500 / 50 мкг в сутки по 1 ингаляции дважды в день соответственно тяжести состояния и сальбутамол для купирования приступов удушья (2-й режим).

Кроме того, была выделена группа из 8 пациентов, имеющих длительный стаж курения (индекс курения < 10 пачек / лет, в среднем –  $6,5 \pm 0,5$  пачки / лет). Группу сравнения составили 9 больных атопической БА легкого интермиттирующего течения в фазе ремиссии.

У всех пациентов до и после периода лечения оценивали уровень активности НЭ и  $\alpha_1$ -антитрипсина в сыворотке крови. Активность эластазы определялась спектрофотометрическим методом [9],  $\alpha_1$ -антитрипсина – по унифицированному методу В.Ф.Нартиковой и Т.С.Пасхиной [10]. Нормальный уровень активности НЭ у здоровых доноров составляет  $200 \pm 34$  МЕ/мл [9]

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного пакета *Statistica 6.0* (Stat Soft Inc.). В случае ненормального распределения признаков использовали непараметрические методы: для описательной статистики – параметры медианы

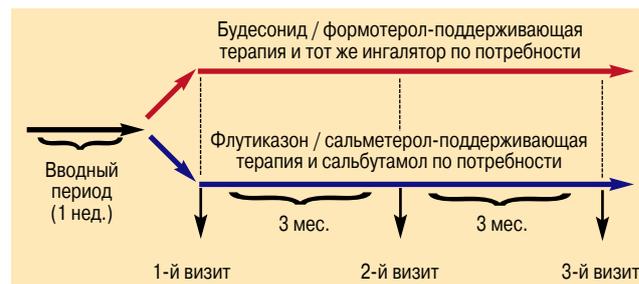


Рис. 1. Дизайн исследования

и верхнего и нижнего квартилей ( $Me$  (Q1; Q3)), для сравнения показателей в независимых группах использовался – тест Манна–Уитни, для сравнения показателей внутри группы – тест Вилкоксона. В случае нормального распределения использовались параметрические методы ( $M \pm m$ ).

## Результаты

Анализ данных проведенного исследования показал, что у всех пациентов с неконтролируемой БА, вне зависимости от режима фармакотерапии фиксированными комбинациями иГКС / ДДБА, наблюдалось достоверное улучшение показателей, используемых для оценки клинической эффективности (табл. 1).

У курящих пациентов была выявлена более медленная положительная динамика показателей спирометрии, по сравнению с больными, которые не курили. Установлено, что у курящих пациентов ОФВ<sub>1</sub> достоверно повышался только к 3-му визиту по сравнению с исходным, тогда как у некурящих пациентов этот показатель достоверно возрастал уже ко 2-му визиту (через 3 мес.). Вместе с тем, по результатам АСТ, достоверная положительная динамика уровня контроля БА отмечалась уже ко 2-му визиту и у курящих, что, вероятно, обусловлено более быстрыми изменениями клинических проявлений БА в ответ на адекватную терапию (табл. 2).

Исходный уровень НЭ у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением БА (463,6 (391,2 ÷ 543,3) МЕ/мл и 496,2 (420,1 ÷ 557,5) МЕ/мл соответственно) был значительно выше, чем в контрольной группе больных интермиттирующей БА (347,7 (327,17 ÷ 420,17) МЕ/мл) и достоверно ( $p < 0,05$ ) превышал границы нормальных значений данного показателя у здоровых доноров (200 ± 34 МЕ/мл), что может косвенно свидетельствовать о наличии персистирующего нейтрофильного воспаления у этой группы пациентов (рис. 2).

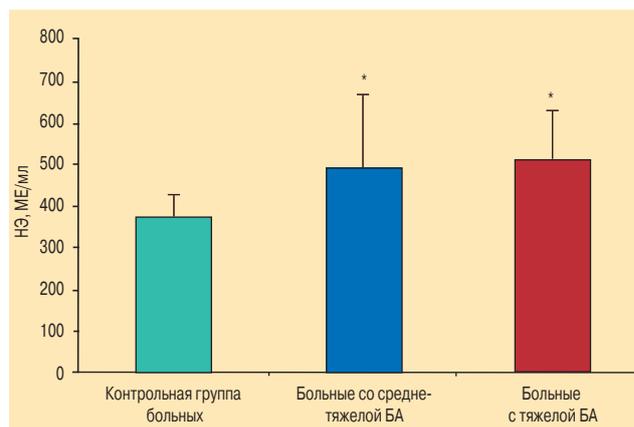


Рис. 2. Активность НЭ (МЕ/мл) у больных БА до коррекции терапии

Примечание: \* – статистически значимое отличие от контрольной группы при  $p < 0,05$ .

В результате анализа полученных данных не было выявлено разницы в активности НЭ у больных с тяжелым и среднетяжелым течением БА. Таким образом, у пациентов с неконтролируемым течением БА уровень активности НЭ был повышен вне зависимости от тяжести течения заболевания. Коррекция терапии привела к значимому снижению активности НЭ только у пациентов, которым была назначена терапия фиксированными комбинациями иГКС / ДДБА (флутиказоном / сальметеролом) во 2-м режиме (до коррекции терапии – 498,8 ± 163,5 МЕ/мл; через 6 мес. лечения – 379,9 ± 56,9 МЕ/мл;  $p < 0,05$ ). У больных, получавших будесонид / формотерол в 1-м режиме, активность НЭ не изменилась (до коррекции терапии – 472,6 ± 119,8 МЕ/мл; через 6 мес. лечения – 462,3 ± 151,4 МЕ/мл) и даже имела некоторую тенденцию к повышению (рис. 3).

Исходный уровень НЭ коррелировал с длительностью предыдущего постоянного применения иГКС терапии у больных БА ( $r = 0,41$ ;  $p < 0,05$ ), что, вероятно, связано с длительностью персистирующе-

Таблица 1  
Изменение ОФВ<sub>1</sub> (%<sub>долж.</sub>), результатов АСТ у больных БА на фоне терапии фиксированными комбинациями иГКС / ДДБА

|                      | ОФВ <sub>1</sub> , % <sub>долж.</sub> |                            | АСТ, баллы                 |                            |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                      | 1-й режим терапии (n = 15)            | 2-й режим терапии (n = 10) | 1-й режим терапии (n = 15) | 2-й режим терапии (n = 10) |
| До коррекции терапии | 76 (67; 87)                           | 73 (59; 76)                | 11 (9,5; 16,5)             | 11 (10; 19)                |
| Через 3 мес.         | 84 (69,5; 106)*                       | 91 (71; 107)*              | 21 (17; 24)*               | 21 (17; 23)*               |
| Через 6 мес.         | 80 (77; 95)                           | 76 (68; 91)                | 22 (21; 23)*               | 22 (19; 24)*               |

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

Таблица 2  
Изменение ОФВ<sub>1</sub> (%<sub>долж.</sub>), результатов АСТ у курящих и некурящих больных на фоне терапии фиксированными комбинациями иГКС / ДДБА

|                      | ОФВ <sub>1</sub> , % <sub>долж.</sub> |                   | АСТ, баллы      |                   |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|                      | курящие больные                       | некурящие больные | курящие больные | некурящие больные |
| До коррекции терапии | 75,5 (73; 94)                         | 73 (55; 81)       | 10,5 (10; 16)   | 11 (9; 18)        |
| Через 3 мес.         | 84 (81; 108)                          | 82 (69; 104)*     | 21,5 (17; 24)*  | 20,59 (17; 23)*   |
| Через 6 мес.         | 91 (90; 106)*                         | 76,5 (69; 100)*   | 21,5 (20; 23)*  | 22 (21; 24)*      |

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

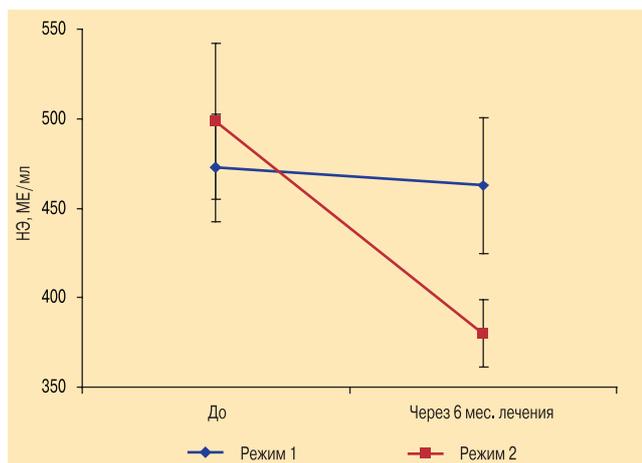


Рис. 3. Динамика уровня активности НЭ (МЕ/мл) у больных БА на фоне применения разных режимов фармакотерапии фиксированными комбинациями иГКС / ДДБА

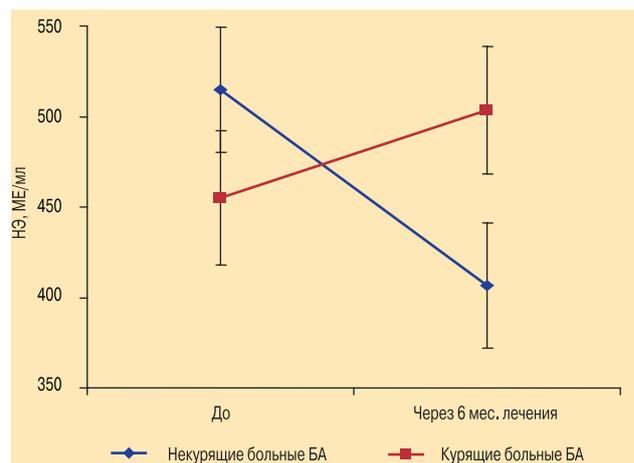


Рис. 4. Изменение уровня активности НЭ (МЕ/мл) на фоне терапии фиксированными комбинациями иГКС / ДДБА у курящих и некурящих больных БА

го воспаления, неадекватным противовоспалительным лечением, а также возможным проактивирующим влиянием иГКС на развитие нейтрофильного воспаления при БА.

Недостаточности  $\alpha_1$ -антитрипсина у всех участвовавших в исследовании пациентов выявлено не было, его уровень составил 38,9 (43,7 ÷ 31,4) МЕ/мл. Значения данного показателя не отличались ни в одной из выделенных подгрупп пациентов, в т. ч. у больных с разным статусом курения. Коррекция терапии не привела к значимым изменениям содержания  $\alpha_1$ -антитрипсина.

Отдельно оценивалось влияние проводимой терапии на уровень НЭ у курящих пациентов. Исходный уровень НЭ в группе курящих составил 456,35 (376,7 ÷ 543,3) МЕ/мл и достоверно не отличался от уровня НЭ у некурящих пациентов 474,5 (398,4 ÷ 557,5) МЕ/мл.

На фоне проводимой терапии уровень активности НЭ статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снизился только в группе некурящих пациентов, хотя и не достиг значений контрольной группы больных. В группе курящих больных БА активность НЭ имела даже некоторую тенденцию к повышению, что отражает особенности ответа на терапию иГКС у курящих пациентов (рис. 4).

## Обсуждение

Основным критерием эффективности терапии БА в обычной практике является динамика проявлений патологии, хотя часто обнаруживается несоответствие клинической картины, функциональных параметров и выраженности воспалительных изменений бронхов [11, 12]. Необходим более тщательный мониторинг состояния БА, дополненный дифференцированной оценкой воспаления с помощью новых патогенетически-ориентированных биомаркеров. На данный момент нет универсальных методов, за исключением инвазивных, которые позволяли бы объективно судить об интенсивности воспалительного процесса в бронхах.

Полученные результаты могут косвенно свидетельствовать о том, что воспаление при БА носит системный характер. В настоящем исследовании это проявлялось повышением активности НЭ сыворотки крови у больных неконтролируемой персистирующей БА среднетяжелого и тяжелого течения. Кроме того, такой рост активности НЭ указывает на наличие нейтрофильного компонента воспаления, особенно у пациентов с длительной неадекватной терапией иГКС. Современный арсенал терапевтических подходов позволяет в большинстве случаев достичь хорошего уровня клиничко-функционального контроля БА при условии правильного подбора лечения. Однако клиничко-функциональное исследование не предполагает анализа воспаления, на подавление которого и направлена терапия. Недооценка воспаления может приводить к преждевременному пересмотру текущей терапии БА в сторону снижения.

По мнению *P.J. Barnes et al.* [13], при многофакторном воспалении, которое наблюдается при персистирующем течении БА, более оправданно назначение комбинированной базисной терапии (иГКС / ДДБА), по сравнению с увеличением дозы иГКС в качестве монотерапии. В результате применения в настоящем исследовании фиксированных комбинаций иГКС / ДДБА, наряду с достижением клиничко-функционального контроля БА, снизилась активность НЭ сыворотки крови – наиболее выраженным ее падение было в случае применения режима стабильного дозирования.

Большинство исследователей, анализируя причины плохого ответа на терапию иГКС, подчеркивают первостепенную роль такого преморбидного фактора, как табакокурение. По данным эпидемиологических исследований, доля курильщиков среди больных БА – такая же, как и в общей популяции [14]. К этому можно добавить, что курение ассоциируется со сниженным ответом на противовоспалительную терапию и, как следствие, приводит к снижению клиничко-функционального контроля БА.

Исследования, в которых оценивались клеточные эффекты, позволили сделать некоторые выводы

о влиянии курения на патофизиологию БА: у курильщиков изменяются спектр воспалительных клеток дыхательных путей и соотношение  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкокортикоидных рецепторов, падает активность деацетилазы гистонов, уменьшается количество рецепторов к ГК, снижается аффинитет лигандов к ГК, и, по последним данным, ослабевает способность ГК связываться с ДНК или повышается экспрессия воспалительных факторов транскрипции, взаимодействующих с комплексом ГК-ДНК [15]. Результаты изучения активности НЭ у курящих пациентов с БА демонстрируют, что даже правильно подобранная комбинированная терапия приводит только к улучшению клинических и функциональных показателей, но не влияет на НЭ.

Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что адекватно подобранный объем терапии, дифференцированный подход к выбору режима терапии и своевременный пересмотр ее объема могут привести не только к достижению клинико-функционального контроля, но и снижению интенсивности воспаления.

## Заключение

1. Таким образом, НЭ является маркером нейтрофильного воспаления, которое, по-видимому, наряду с эозинофильным воспалением может присутствовать у пациентов с атопической БА среднетяжелого и тяжелого персистирующего течения.
2. Уровень активности НЭ сыворотки крови у больных БА может служить дополнительным ориентиром при оценке эффективности проводимой противовоспалительной терапии.
3. Показана необходимость дифференцированного подхода к выбору терапии с учетом клинико-функциональных параметров и оценки воспаления.
4. У курящих пациентов с БА даже правильно подобранная комбинированная терапия иГКС / ДДБА приводит только к улучшению клинических и функциональных показателей, но не влияет на активность НЭ.

Данная статья опубликована при финансовой поддержке компании "ГлаксоСмитКляйн", мнение авторов может отличаться от мнения компании.

## Литература

1. Heaney L.G., Robinson D.S. Severe asthma treatment: need for characterizing patients. *Lancet* 2005; 365 (9463): 974–976.

2. Wenzel S. Severe asthma in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172 (2): 149–160.
3. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма: Клинические рекомендации. М.: Атмосфера; 2008.
4. Jatakanon A., Uasuf C., Mazziak W. et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160 (5, pt. 1): 1532–1539.
5. Gaga M., Zervas E., Loukides S. The usefulness of inflammatory markers in monitoring treatment responses in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33 (7): 873–881.
6. Wenzel S. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; 368 (9537): 804–813.
7. Wenzel S. Phenotypes in asthma useful guides for therapy, distinct biological processes, or both? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 170 (6): 601–605.
8. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы: Пересмотр 2006 г.: Пер. с англ. М.: Атмосфера; 2007.
9. Щербакова И.В. Особенности врожденного и приобретенного иммунитета при высоком риске возникновения шизофрении и в процессе ее развития (клинико-иммунологические аспекты): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2006.
10. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности  $\alpha_1$ -антитрипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. *Вопр. мед. химии* 1979; 25 (4): 494–499.
11. Sorkness C., McGill K., Busse W.W. Evaluation of serum ECP as a predictive marker for asthma exacerbation in patients with persistent disease. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32 (9): 1355–1359.
12. Matsumoto K., Taki F., Miura M. et al. Serum levels of soluble IL-2R, IL-4, and soluble Fc epsilon RII in adult bronchial asthma. *Chest* 1994; 105 (3): 681–686.
13. Barnes P.J. et al. How do corticosteroids work in asthma? *Ann. Intern. Med.* 2003; 139 (5, pt. 1): 359–370.
14. Wakefield M., Ruffin R., Capbell D. et al. Smoking-related beliefs and behaviour among adults with asthma in a representative population sample. *Aust. N. Z. J. Med.* 1995; 25 (1): 12–17.
15. Chaudhuri R., Livingston E., McMahon A.D. et al. Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174 (2): 127–133.

## Информация об авторах

Горячкина Людмила Александровна – к. м. н., проф., зав. кафедрой клинической аллергологии РМАПО; тел: (499) 196-17-86; e-mail: clinallergy@yandex.ru

Ненашева Наталья Михайловна – д. м. н., проф. кафедры клинической аллергологии РМАПО; тел: (499) 196-19-54; e-mail: clinallergy@yandex.ru

Нешкова Елена Андреевна – к. б. н., доцент кафедры биохимии РМАПО; тел.: (499) 945-24-15; e-mail: acadbio@mail.ru

Фомина Дарья Сергеевна – аспирант кафедры клинической аллергологии РМАПО; тел: (499) 196-19-54; e-mail: clinallergy@yandex.ru

Поступила 22.03.10

© Коллектив авторов, 2010

УДК 616.248-07:616.155.34-008.831-074

