

На правах рукописи

Кузьмина Анна Александровна

ОСОБЕННОСТИ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ АПЕЛИН/АРJ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ
ВАРИАНТАХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

14.01.25 – Пульмонология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена на кафедре терапии госпитальной с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М. В. Черноруцкого с клиникой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Минеев Валерий Николаевич

Официальные оппоненты:

Шишкин Александр Николаевич – заведующий кафедрой факультетской терапии СПбГУ медицинского факультета, доктор медицинских наук, профессор

Казанцев Виктор Александрович доктор медицинских наук, профессор 1-й кафедры (терапии усовершенствования врачей) Военно-медицинской академии им.С.М.Кирова МО РФ, главный пульмонолог Комитета по здравоохранению Ленинградской области, профессор

Ведущая организация: государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится “_____” _____ 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д.208.090.02 при Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете имени академика И.П. Павлова (197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена 12, зал заседаний Ученого Совета, 6 этаж).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Первого Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6-8 и на сайте <http://spb-gmu.ru>.

Автореферат разослан “_____” _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор медицинских наук,
профессор

Александров Альберт Леонидович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Бронхиальная астма является одной из важнейших проблем современной пульмонологии с большой социальной значимостью (Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.А., 2011). Отмечается непрерывное увеличение распространенности этого заболевания во многих странах, достигая 10% у взрослого населения (Чучалин А.Г., Илькович М.М., 2009). Основным патогенетическим механизмом в течение бронхиальной астмы является хроническое воспаление в респираторной системе, имеющее многофакторный и полиморфный характер. Предполагается, что одним из механизмов поддержания этого воспаления может быть нарушение цитокиновой и, в частности, адипокиновой сигнальной системы. К наиболее исследованным адипокинам относятся лептин, адипонектин, резистин, участие которых многие авторы считают важным в патогенезе бронхиальной астмы (Лалаева Т.М., 2015). Еще одним перспективным, но малоисследованным адипокином является апелин. Этот белок представлен в организме большим количеством вариантов, различающихся по количеству аминокислот, входящих в состав, и образующихся из единого белка-предшественника. Наименьший по молекулярной массе апелин (из активных форм) – апелин-12, наибольший – апелин-36.

Единственным известным рецептором, способным связываться с различными изоформами апелина, является APJ-рецептор. Этот рецептор относится к группе трансмембранных семидоменных рецепторов, связанных с G-белком. Апелин/APJ – система представлена практически во всех тканях организма и, в частности, в клетках бронхолегочной системы (Piairo P., Moura R.S., Nogueira-Silva C. [et al.], 2011).

Обсуждается возможный бронходилатирующий эффект апелина, опосредованный NO-зависимым механизмом, при различных патологических состояниях, а также гиперреактивности бронхов (Gurzu B., Dumitriu I.L., Petrescu B.C. [et al.], 2007). Предполагается противовоспалительное действие апелина, в том числе и при патологии бронхолегочной системы, влияние его на клетки воспаления и продукцию цитокинов (De Visser Y.P., Walther F.J., Laghmani E.H. [et al.], 2010; Fan X.F., Xue F., Zhang Y.Q. [et al.], 2015; Luo K., Long H., Xu B., Luo Y., 2015; Izgüt-Uysal V.N., Gemici B., Birsen I. [et al.], 2017).

Исследований о влиянии апелина на течение патологических процессов в легких у человека крайне мало. Так, отмечалось снижение апелина-36 плазмы крови у больных хроническими паренхиматозными заболеваниями легких (Goetze J.P., Rehfeld J.F., Carlsen J. [et al.], 2006); получены данные о повышении апелина плазмы у пациентов с обструктивным сонным апноэ и снижение уровня апелина на фоне CPAP-терапии (Henley D.E., Buchanan F., Gibson R. [et al.], 2009), вероятнее всего, в связи с нормализацией уровня гипоксемии, которая является важным фактором, изменяющим уровень экспрессии апелина; наблюдалось повышение уровня апелина-12 в плазме крови у детей, страдающих

аллергическим вариантом бронхиальной астмы в фазе ремиссии (Machura E., Ziora K., Ziora D. [et al.], 2013).

Важным аспектом является также возможное паракринное действие апелина (Barnes G., Jarr A.G., Newby D.E., 2010), оценка которого в легких человека не проводилась.

Основываясь на вышесказанном, можно предположить важную роль апелин/APJ-системы в функционировании и развитии бронхиальной астмы, однако малочисленность данных литературы, их противоречивость и фрагментарность не позволяют на сегодняшний день оценить вклад этой системы в патогенез бронхиальной астмы. В связи с этим изучение апелинергической сигнализации представляет интерес, как с фундаментальной точки зрения, так и с позиции разработки методов воздействия на бронхоконстрикцию и течение хронического воспаления при бронхиальной астме.

Степень разработанности темы.

Как обсуждалось ранее, APJ-рецептор и его лиганд обнаружены в различных клетках легких: бронхиальный и альвеолярный эпителий, альвеолоциты 1 и 2 типов, альвеолярные кровеносные сосуды (эндотелий, гладкомышечные клетки).

Кроме того, было показано вовлечение апелин/APJ системы в эмбриональное развитие лёгких у крыс (Piairo P., Moura R.S., Nogueira-Silva C. [et al.], 2011). В эмбриональной легочной ткани наблюдалась высокая экспрессия апелина и APJ, причем последний был представлен виде мономерных, димерных и олигомерных форм. Обнаружено, что APJ-рецептор имеет несколько локализаций в бронхиальном эпителии: мембранную, ядерную (известна также в ткани головного мозга) и цитоплазматическую.

Экспрессия апелина наиболее выражена в ранние сроки гестации; на поздних сроках гестации экспрессия апелина преобладала в бронхиальном и альвеолярном эпителии, а так же в эндотелии сосудов, у взрослых особей – в альвеолярном эпителии. Авторы предполагают, что апелин способен тормозить эмбриональное развитие легких путем супрессии P38 и JNK сигнальных путей.

Присутствие апелина и его рецептора в тканях центральной нервной системы предполагает и центральные эффекты при активации этой системы, в том числе и в лёгких. Было показано, что микроинъекции апелина-13 в ядро солитарного тракта приводили к апноэ за счет воздействия на работу диафрагмы, а микроинъекции апелина-13 в ростральный вентролатеральный отдел продолговатого мозга, наоборот, стимулировали работу диафрагмы (Seyedabadi M., Goodchild A.K., Pilowsky P.M., 2002).

Эти данные еще раз демонстрируют важность паракринной и аутокринной регуляции в апелин/APJ системе.

При исследовании действий апелина у недоношенных новорожденных крыс с бронхопульмональной дисфункцией, наблюдался положительный эффект от его введения: терапия апелином-13 в течение 9 дней приводила к снижению правожелудочковой гипертензии, улучшению альвеолоризации и ангиогенеза,

снижению количества белка в бронхоальвеолярной жидкости, уменьшению миграции в легкие нейтрофилов и макрофагов и уменьшению толщины альвеолярной перегородки. В целом, отмечалось уменьшение воспалительного процесса в легких (De Visser Y.P., Walther F.J., Laghmani E.H. [et al.], 2010).

При исследовании апелин/APJ системы у крыс с острым респираторным дистресс-синдромом отмечалось повышение уровня апелина в плазме, легких и бронхо-альвеолярном лаваже. Увеличивалась экспрессия APJ в поврежденной легочной ткани. При ингибировании апелин/APJ системы наблюдалось более выраженное повреждение лёгочной ткани, а при терапии апелином-13 снижалась инфильтрация иммунными клетками лёгочной ткани и их содержание в бронхо-альвеолярном лаваже, уменьшалась толщина альвеолярной перегородки, выраженность отёка ткани, снижались признаки оксидативного стресса. Схожее действие апелина отмечалось и при LPS-индуцированном повреждении лёгких (Fan X.F., Xue F., Zhang Y.Q. [et al.], 2015).

Исходя из вышесказанного, можно предположить наличие противовоспалительного, протективного эффектов апелина в лёгких.

Предполагают протективный эффект апелин/APJ системы при лёгочной гипертензии. Отмечалось снижение экспрессии апелина в эндотелии лёгочных артерий у мышей с лёгочной гипертензией и уровня апелина в сыворотке крови людей с повышенным давлением в лёгочной артерии. Предполагается, что снижение апелина уменьшает его вазодилатирующий эффект, усугубляя течение заболевания (Chandra S.M., Razavi H., Kim J. [et al.], 2011).

У собак с острой эмболией легочных артерий введение апелина уменьшало давление в лёгочных артериях (Feng J.H., Li W.M., Wu X.P. [et al.], 2010), подобный эффект наблюдался и у крыс (Fan X.F., Wang Q., Mao S.Z. [et al.], 2010).

Клинических исследований апелин/APJ системы у людей с лёгочной патологией очень мало. Известно о снижении уровня апелина-36 в плазме крови у больных паренхиматозными заболеваниями лёгких, повышение уровня плазматического апелина-12 у больных сонным апноэ и бронхиальной астмой.

В отечественной литературе данные о вовлечении апелин/APJ-системы в развитие бронхолёгочной патологии не представлены.

Всё вышеперечисленное указывает на актуальность исследования апелин/APJ системы при бронхолёгочных заболеваниях, и, в частности, при бронхиальной астме.

Цель работы

Установить особенности изменений в сигнальной системе апелин/APJ в плазме крови и мокроте при различных вариантах бронхиальной астмы.

Задачи исследования

1. Определить уровни адипокинов: апелина-12 и апелина-36 в плазме крови при аллергической и неаллергической бронхиальной астме в сопоставлении с контрольной группой.

2. Определить уровни адипокинов: апелина-12 и апелина-36 в мокроте у больных аллергической и неаллергической бронхиальной астмой.

3. Оценить корреляционные связи апелина-12 и апелина-36 в плазме крови и мокроте с клиническими, лабораторными и функциональными (функция внешнего дыхания (ФВД)) показателями при различных вариантах заболевания.

4. Исследовать уровни APJ-рецептора в лимфоцитах периферической крови при аллергической и неаллергической бронхиальной астме в зависимости от фазы заболевания в сопоставлении с контрольной группой.

Научная новизна

1. Впервые выявлены изменения уровней апелина-12 и апелина-36 в плазме крови у взрослых больных бронхиальной астмой и проведен сравнительный анализ их корреляционных связей с клиническими, лабораторными и функциональными показателями.

2. Впервые у больных бронхиальной астмой выявлен феномен присутствия апелина-12 и апелина-36 в мокроте, показана связь их уровней с показателями ФВД. Выявление данного феномена рассматривается как проявление паракринного действия апелина.

3. Впервые оценен уровень APJ-рецептора в лимфоцитах периферической крови у больных бронхиальной астмой, показано снижение количества рецепторов в фазе ремиссии, что рассматривается как проявление рецепторных изменений у больных бронхиальной астмой, вероятно, на фоне глюкокортикоидной терапии.

Методология и методы исследования

В соответствии с разработанным методологическим подходом, включающим комплексный принцип оценки механизмов апелин/APJ системы на различных уровнях, определялись уровни апелина-12 и апелина-36 на системном уровне (в плазме крови), а также в органе мишени – лёгких, в мокроте больных бронхиальной астмой и рецепторный компонент в виде APJ-рецептора лимфоцитов периферической крови. Определение проводилось иммуноферментным методом по стандартному протоколу с использованием наборов реактивов «Human Apelin 36 ELISA Kit» (Cusabio, Китай), «Human Apelin 12 ELISA Kit» (MyBioSource, США), «Human Apelin Receptor ELISA Kit» (MyBioSource, США), «интерлейкин-4 – ИФА – Бест», «альфа-ФНО – ИФА – Бест», «Интерлейкин - 10 – ИФА – Бест», производства фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Мокроту у больных бронхиальной астмой получали с помощью гипертонического раствора естественным путём без индукции и с дальнейшей обработкой с использованием DPP-IV ингибиторов (Linco, США), Sputolysin (Calbiochem, США) и диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА).

Статистический анализ результатов исследования выполнен с помощью компьютерной программы SPSS для Windows (Statistical Package for the Social Science), русифицированная версия 21.0.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью методов параметрической и непараметрической статистики.

При сравнении групп вычисляли медианы, 25-й и 75-й процентиля.

Нормальность статистического распределения проверяли тестом Колмогорова-Смирнова.

Для оценки межгрупповых различий количественных показателей использовались t-критерий Стьюдента для независимых выборок; ранговый критерий Вилкоксона-Манна-Уитни при использовании методов непараметрической статистики.

Для проверки равенства медиан нескольких выборок (более двух) использовался непараметрический критерий Краскала-Уоллиса для независимых выборок.

Для сравнения парных (зависимых) выборок использовался парный критерий Вилкоксона (непараметрическая статистика).

Также использовались методы линейного корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции по Пирсону (r) и Спирману (ρ), выполнялся факторный анализ с использованием метода главных компонент и метода вращения матрицы Варимакс.

Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Уровни плазменных апелинов при бронхиальной астме изменены в зависимости от их формы: уровень апелина-12 повышается у больных бронхиальной астмой как при аллергическом, так и неаллергическом вариантах заболевания, уровень апелина-36 - снижается у больных с неаллергическим вариантом бронхиальной астмы по сравнению с практически здоровыми лицами. При этом плазменный индекс апелин-12/апелин-36 характеризует бронхиальную астму вне зависимости от её варианта.

2. При бронхиальной астме выявлен феномен присутствия апелина-12 и апелина-36 в мокроте, установлены корреляционные связи их уровней с показателями ФВД и клеточным составом мокроты. Роль данного феномена рассматривается в качестве протективной на уровне паракринной регуляции в легких.

3. Установлена зависимость уровня APJ-рецептора лимфоцитов периферической крови от фазы бронхиальной астмы, который в фазе ремиссии снижается и не зависит от варианта заболевания.

4. Наблюдаемые корреляционные связи уровней апелина-12 и апелина-36 с уровнями цитокинов (про-, противовоспалительных) в плазме крови отражают, по-видимому, протективное влияние этих апелинов при бронхиальной астме.

Апробация работы

Материалы диссертации представлялись на научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики, терапии и реабилитации жителей блокадного Ленинграда и пациентов пожилого возраста» (Санкт-Петербург 2013); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала. Проблемы и пути их решения» (Санкт-Петербург 2014 г); «Булатовских чтениях» (Санкт-Петербург 2014, 2015); LXXV научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2014» (Санкт-Петербург 2014); LXXVIII научно-практической

конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2017» (Санкт-Петербург 2017).

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 6 статей, в том числе 5 в журналах, рекомендованных ВАК.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты проведенного исследования создают научный базис для анализа взаимоотношений системы апелин/APJ и выраженности как функциональных нарушений, так и воспаления в органе-мишени, а также в перспективе - для разработки таргетных лекарственных подходов, регулирующих активность этой системы.

Результаты проведенных исследований внедрены в лечебную практику пульмонологического отделения клиники госпитальной терапии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства Здравоохранения РФ (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 234-54-51, vnmineev@mail.ru, www.spb-gmu.ru), а также межклинического аллергологического отделения ПСПбГМУ им.акад.И.П.Павлова (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 234-24-75, www.spb-gmu.ru) и консультативно-диагностического центра на базе поликлиники № 31 Петроградского района Санкт-Петербурга (197022, СПб, ул.Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 499-71-60, <http://poliklinika-31-spbgmu-im.spb24.net>).

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Высокая степень обоснованности и достоверности результатов исследования определяется репрезентативным объемом выборки обследованных, использованием современных методов исследования и наиболее статистически значимых связей.

Соответствие диссертации Паспорту научной специальности

Приведенные в диссертации научные положения соответствуют области исследования по пунктам 1-5 паспорта специальности 14.01.25 – Пульмонология по номенклатуре паспортов научных специальностей Высшей Аттестационной Комиссии (ВАК).

Структура диссертации

Диссертация представляет собой рукопись объемом 153 страницы машинописного текста и состоит из введения, глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списков литературы и сокращений. Библиографический указатель включает 135 источников, в том числе 14 отечественных и 121 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Состав обследованных лиц

В исследование включено 127 человек. Из них 95 больных бронхиальной астмой и 32 практически здоровых человека.

Из работы исключались больные бронхиальной астмой, у которых был выявлен сахарный диабет, ВИЧ-инфекция, а так же при наличии в анамнезе острого нарушения мозгового кровообращения, острого нарушения коронарного кровообращения и онкологических заболеваний.

Первую группу с преимущественно аллергической бронхиальной астмой составили 53 человека (АБА), страдающие аллергическим вариантом бронхиальной астмы и смешанным вариантом бронхиальной астмы с преобладанием аллергического варианта. Из них 28,3% страдали бронхиальной астмой легкой степени тяжести, 71,7% – средней степени тяжести. Вторую группу составили 42 человека (НАБА), страдающие неаллергическим и аспириновым вариантами бронхиальной астмы и смешанным вариантом бронхиальной астмы с преобладанием неаллергического варианта. Из них 23,8% страдали бронхиальной астмой легкой степени тяжести, 69,1% – средней степени тяжести и у 7,1% пациентов определялось тяжелое течение заболевания.

Общая характеристика обследованных групп представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика обследованных групп

Признак	ПЗЛ (1) n=32	АБА (2) n=53	НАБА (3) n=42	Р-значение по крит. Манна- Уитни
ИМТ кг/м ² Медиана (25 и 75 перцентили)	25,23 (21,5 28,6)	24,5 (21,1 26,7)	26,15 (23,1 29,2)	$P_{1-2}>0,05$ $P_{1-3}>0,05$ $P_{3-2}>0,05$
Возраст, лет Медиана (25 и 75 перцентили)	31 (27,0 44,0)	30 (23,5 40,5)	48,5 (40,7 56,2)	$P_{1-2}>0,05$ $P_{1-3}<0,001$ $P_{3-2}<0,001$
Длительность заболевания, лет Медиана (25 и 75 перцентили)	-	9,0 (3,5 19,0)	6,0 (2,0 13,5)	$P_{3-2}>0,05$
Пол муж/жен	14/18	23/30	14/28	$P_{1-2}>0,05$ $P_{1-3}>0,05$ $P_{3-2}>0,05$
Курение есть/нет	0/32	15/38	11/31	$P_{2-3}>0,05$

Для больных в группе НАБА была характерна более высокая скорость оседания эритроцитов ($p<0,05$). Показатели лейкоцитарной формулы в клиническом анализе крови не выявили межгрупповых различий. При анализе показателей цитологического исследования мокроты достоверных различий так же выявлено не было.

У обследованных пациентов наблюдались различные сопутствующие патологии. Их характеристика представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика сопутствующей патологии у больных бронхиальной астмой

Признак	АБА	n	НАБА	n	p – значимость по крит. Манна-Уитни
Аллергический ринит, нет/есть	9/43	53	19/23	42	P=0,003*
Хронический тонзиллит, нет/есть	34/17	53	35/7	42	P>0,05
Хронический бронхит, нет/есть	27/26	53	10/32	42	P=0,007*
Кардиологическая патология, нет/есть	53/0	53	32/10	42	P<0,001*
Гастроэнтерологическая патология, нет/есть	25/28	53	9/33	42	P=0,01*
Патология щитовидной железы, нет/есть	47/6	53	32/10	42	P>0,05
Нефрологическая патология, нет/есть	47/6	53	36/5	42	P>0,05

При сравнении видно, что у больных неаллергическим вариантом бронхиальной астмы более сильно выражены нарушения показателей функции внешнего дыхания, соответствующие обструктивным изменениям, чем у больных аллергическим вариантом заболевания.

Для отбора практически здоровых лиц использовались следующие критерии: 1) отсутствие признаков любых бронхолегочных заболеваний; 2) отсутствие признаков острых заболеваний в течение последнего месяца; 3) неотягощенный наследственный анамнез по бронхиальной астме и другим аллергическим заболеваниям; 4) отсутствие признаков аллергических заболеваний; 5) отсутствие гипотензивной терапии; 6) отсутствие сахарного диабета, гипертонической болезни 2 и 3 стадии, гепатита В и С, ВИЧ-инфекции, онкологической патологии, аутоиммунной патологии, острого нарушения мозгового или коронарного кровообращения в анамнезе, других хронических заболеваний, сопровождающихся выраженными нарушениями функции органа или находящихся в фазе обострения.

Хронические заболевания в группе практически здоровых лиц были представлены: хроническим гастритом, мочекаменной болезнью, хроническим пиелонефритом, гипертонической болезнью 1 стадии, желчнокаменной болезнью, гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью.

Обследование проводили в фазе обострения и в фазе затихающего обострения заболевания. Комплекс лечебных мероприятий у больных бронхиальной астмой полностью соответствовал варианту заболевания. Больные получали медикаментозную терапию в соответствии со стандартами лечения (GINA, 2016).

Результаты исследования и их обсуждение

Характер обнаруженных изменений апелина-12 и апелина-36 в плазме крови представлен на следующих диаграммах (рисунок 1).

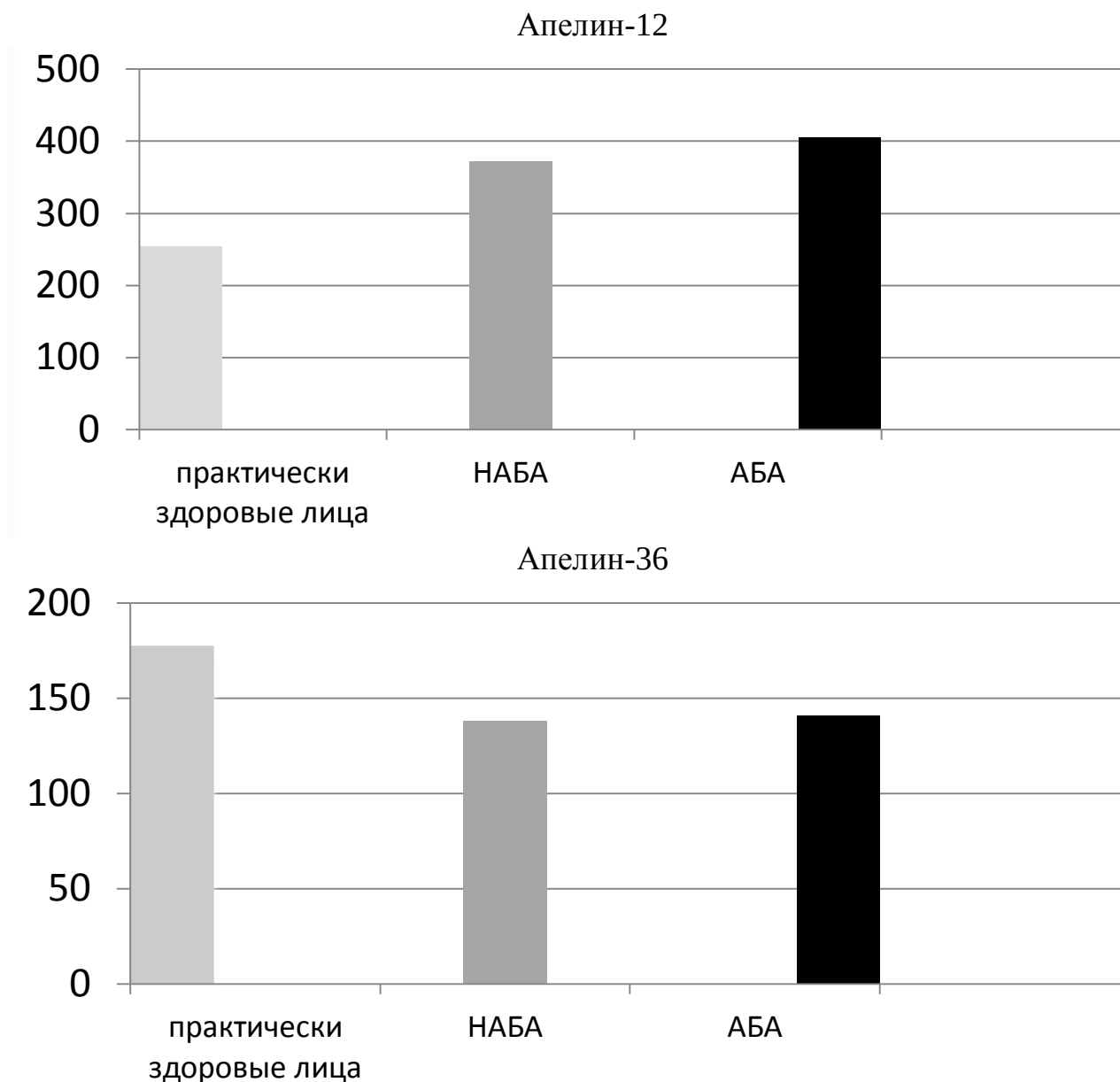


Рисунок 1 – Характер изменений уровней аполинов в плазме крови.

Как видно из рисунка 1, у больных бронхиальной астмой отмечалось повышение уровня апелина-12 вне зависимости от варианта заболевания в сравнении с группой практически здоровых лиц ($p < 0,05$), а также снижение уровня апелина-36, более значимое в группе НАБА ($p < 0,05$). Различий уровней аполинов в плазме крови при аллергической и неаллергической бронхиальной астме не наблюдалось.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы: известно о повышении уровня апелина-12 у детей страдающих бронхиальной

астмой и снижение уровня апелина-36 у лиц с паренхиматозными заболеваниями легких.

Больные бронхиальной астмой были разделены на две группы в зависимости от наличия у них мокроты в фазе обострения заболевания, при этом у группе больных с секрецией мокроты выделялись больные с положительным и отрицательным результатом посева мокроты. Характеристика уровня апелина-36 в плазме крови в этих группах представлена на рисунке 2.

Наибольший уровень апелина-36 наблюдался у больных без секреции мокроты, при этом наименьший в группе больных с положительным результатом бактериологического посева мокроты ($p < 0,05$).

Мы не наблюдали достоверных отличий уровня плазматического апелина-12 у больных с наличием и без наличия мокроты.

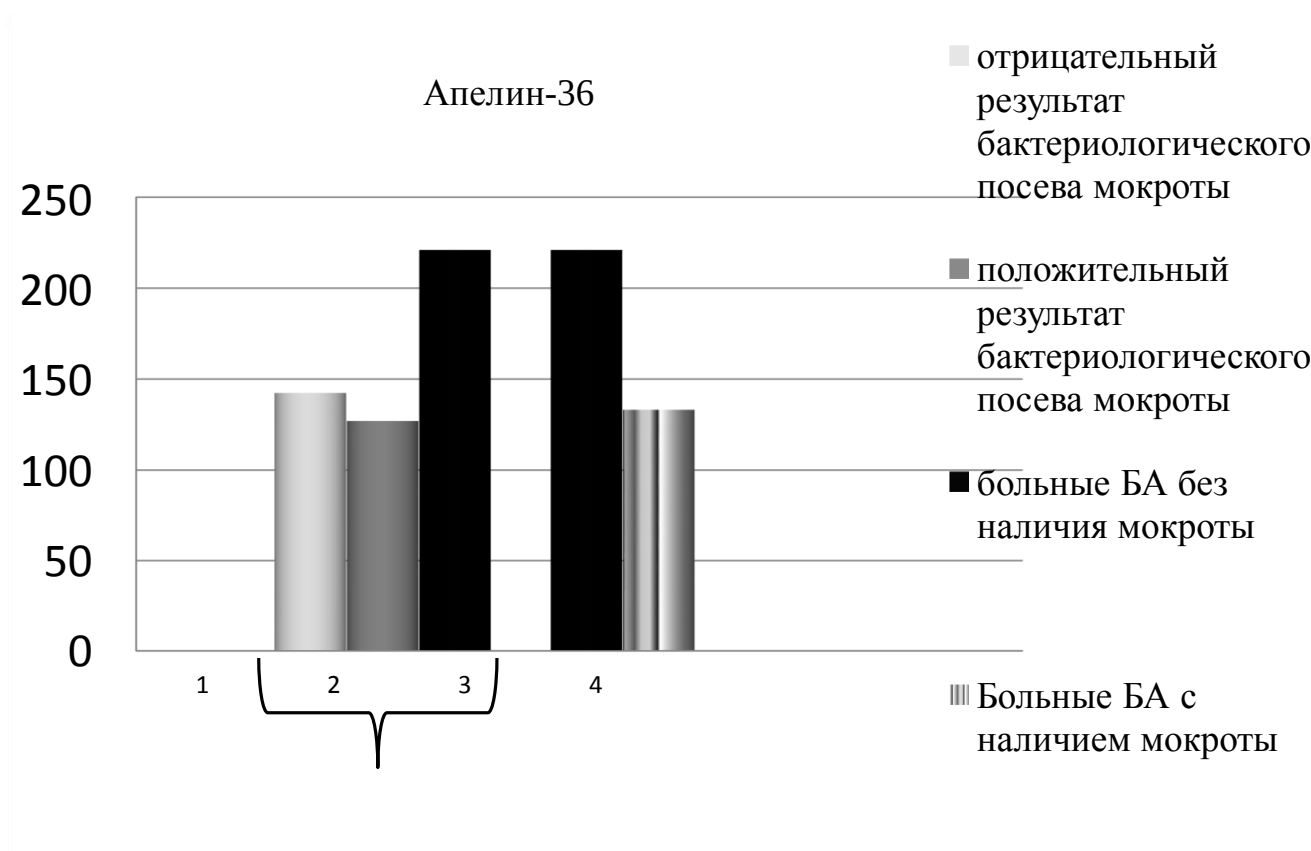


Рисунок 2 – Характеристика уровня плазматического апелина-36 у больных с секрецией мокроты и без секреции мокроты.

При анализе соотношения апелина-12 к апелину-36 наиболее низкое значение наблюдалось в группе практически здоровых лиц, а наиболее высокое у больных бронхиальной астмой с секрецией мокроты ($p < 0,05$).

Нами был проведен анализ уровней апелинов в мокроте больных бронхиальной астмой в фазе обострения. Результаты представлены на рисунке 3.

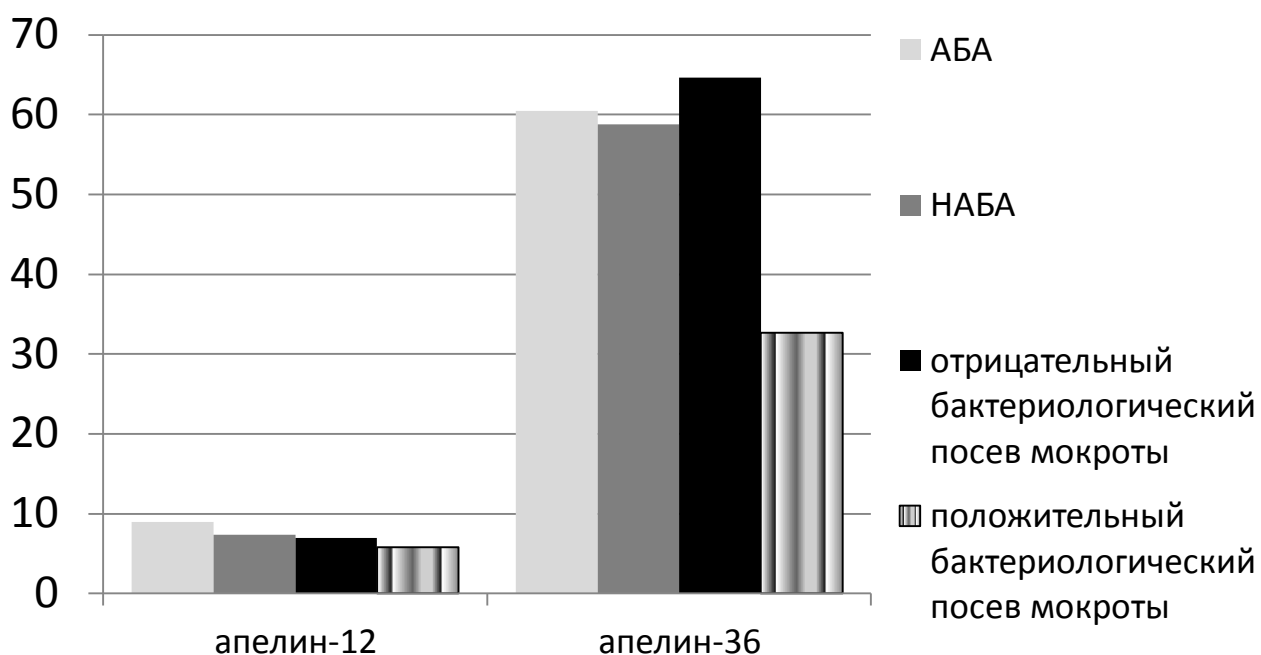


Рисунок 3 – Характеристика уровней апелинов в мокроте у больных бронхиальной астмой.

Мы не обнаружили достоверных отличий по уровню апелина-12 в мокроте в различных группах больных бронхиальной астмой. Уровень апелина-36 в мокроте не отличался при различных вариантах бронхиальной астмы, однако наблюдалось его снижение у больных с положительным результатом посева мокроты ($p > 0,05$).

Кроме того, наблюдалась отрицательная корреляционная связь уровня плазматического апелина-36 в фазе затихающего обострения (после лечения) с проведением антибактериальной терапии ($-0,640$; $n=10$; $P=0,046$).

По данным литературы известно, что при модели сепсиса у крыс уровень апелина-36 в плазме крови и кардиальной ткани снижался (Pan C.S., Teng X., Zhang J. [et al.], 2010), в другом исследовании модели ожогового сепсиса у мышей отмечалось снижение апелина в плазме крови и ткани селезенки (Luo K., Long H., Xu B., Luo Y., 2015). Апелин оказывает ингибирующее влияние на гликолиз в макрофагах и лимфоцитах (Nabata Y., Fujii R., Hosoya M. [et al.], 1999), необходимый для выработки энергии в процессе фагоцитоза и хемотаксиса.

В различных исследованиях авторы отмечали положительный эффект от вводимого апелина на течение воспалительного процесса в легких крыс и мышей.

Можно предположить, что снижение уровня апелина-36 в мокроте и плазме отражает уменьшение его защитной функции на фоне развития обострения бронхиальной астмы и присоединения инфекционного компонента.

Мы исследовали уровни плазматических апелинов у больных бронхиальной астмой в фазе обострения и в фазе затихающего обострения, после

проведенной терапии. Наблюдалась тенденция к повышению уровня апелина-36 и к снижению уровня апелина-12 в фазе затихающего обострения (рисунок 4).

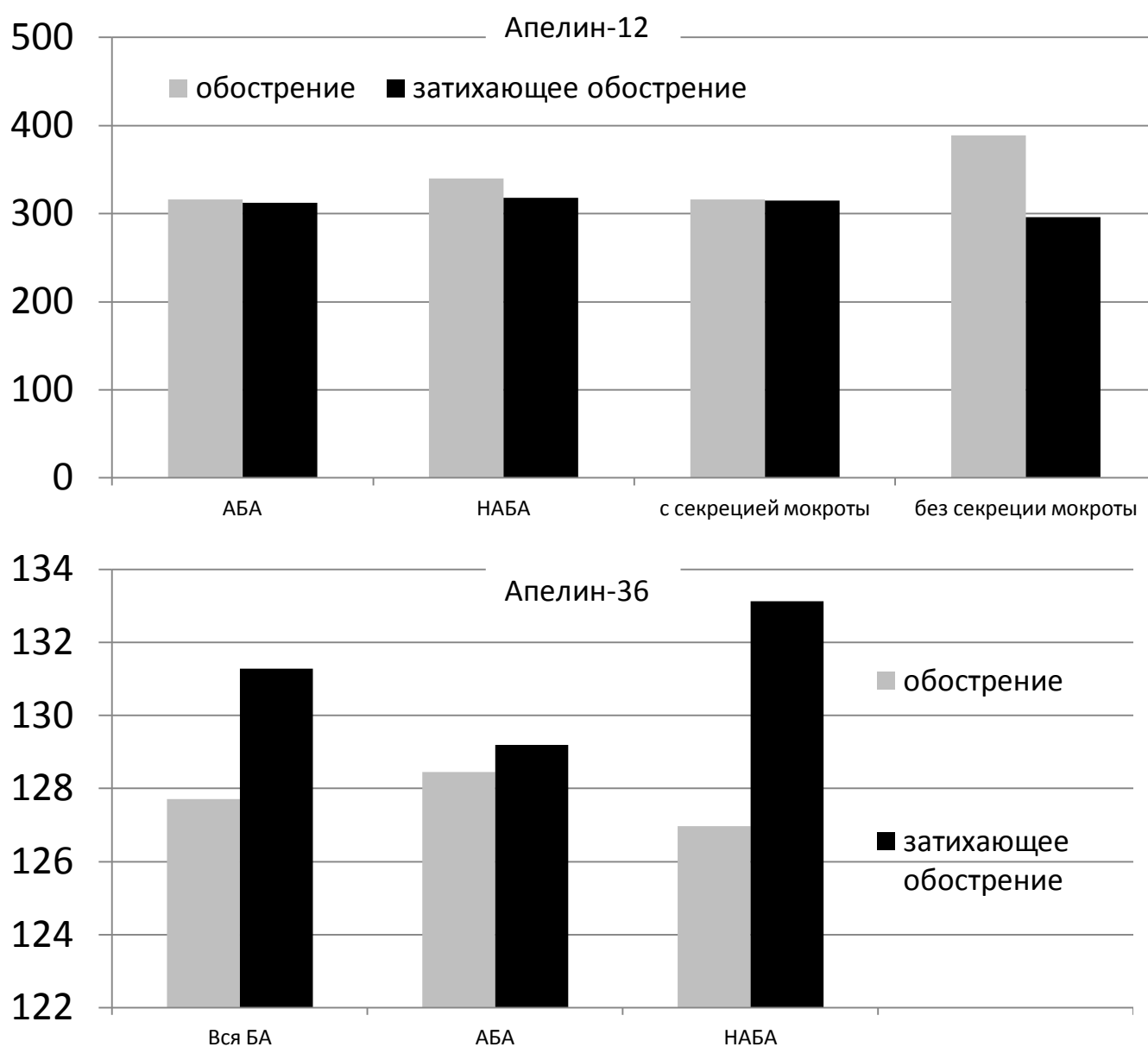


Рисунок 4 – Уровни плазматических апелинов в фазах обострения и затихающего обострения бронхиальной астмы.

Наиболее выраженное повышение апелина-36 в фазе затихающего обострения наблюдается у больных НАБА ($p > 0,05$), в группах больных с секретцией мокроты и без секретиции мокроты тенденция сохранялась, но не достигала уровня достоверности. У больных бронхиальной астмой без секретии мокроты наблюдалось достоверное снижение ($p < 0,05$) апелина-12 в фазе затихающего обострения.

Уровень апелина-12 в фазе ремиссии у больных бронхиальной астмой был выше, чем у практически здоровых лиц и ниже, чем у больных в фазе обострения заболевания ($p < 0,05$).

Наблюдалась отрицательная корреляционная связь уровня плазматического аполипептида-12 в фазе затихающего обострения с суточной дозой ингаляционных глюкокортикостероидов у больных АБА ($-0,646$; $n=12$; $P=0,023$).

При определении уровня АРJ-рецептора лимфоцитов периферической крови мы не обнаружили отличий при различных вариантах бронхиальной астмы и в сравнении с группой практически здоровых лиц.

Однако наблюдалось снижение уровня АРJ-рецептора в фазе ремиссии заболевания ($p<0,05$) в сравнении с фазой обострения и тенденция к снижению уровня рецептора в фазе затихающего обострения ($p>0,05$) (рисунок 5).

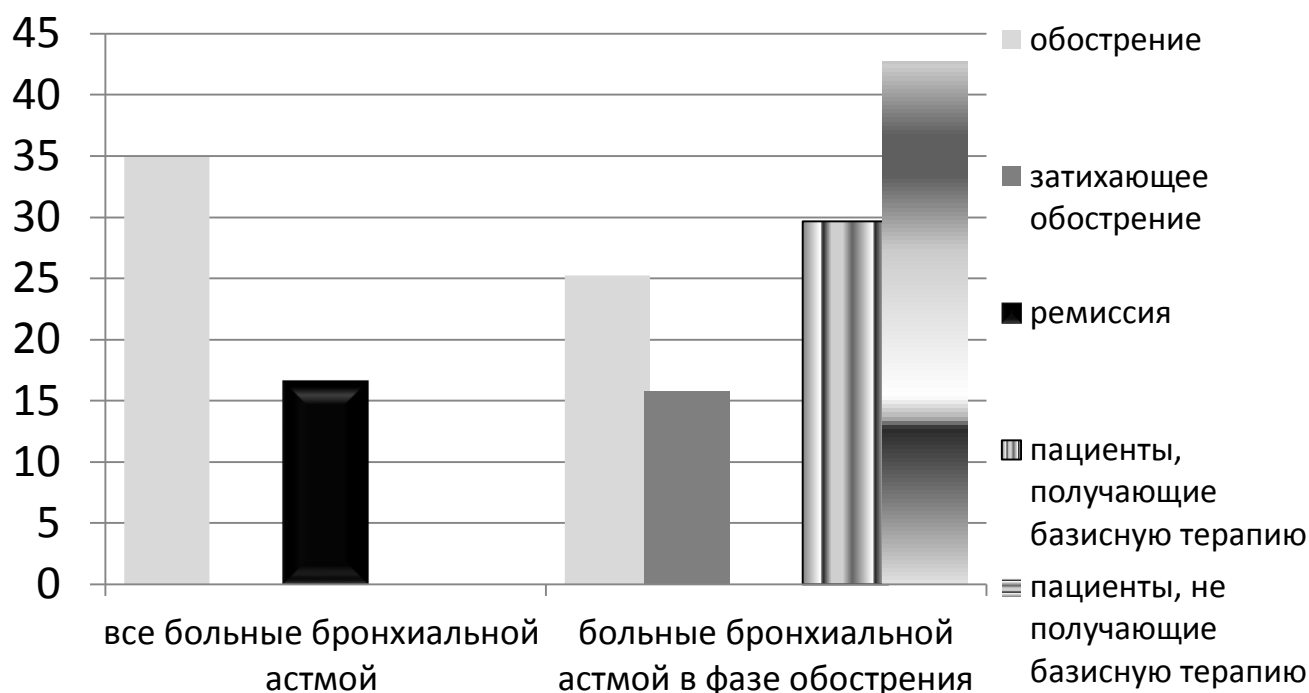


Рисунок 5 –Уровень АРJ-рецептора лимфоцитов периферической крови в различных группах.

У больных бронхиальной астмой в фазе обострения, не получающих базисную ингаляционную глюкокортикостероидную терапию, наблюдалась тенденция к более высоким значениям уровня АРJ-рецептора, чем у больных бронхиальной астмой в фазе обострения на фоне базисной ингаляционной глюкокортикостероидной терапии ($p>0,05$). Также наблюдалась негативная корреляционная связь терапии глюкокортикостероидами: ингаляционными ($-0,815$; $n=7$; $P=0,025$) и парентеральными ($-0,757$; $n=7$; $P=0,049$) с уровнем рецептора в фазе затихающего обострения.

Известно, что глюкокортикостероиды оказывают негативную регуляцию не только на экспрессию аполипептида, но и на экспрессию его рецептора (O'Carroll A.M., Don A.L., Lolait S.J., 2003; Pan C.S., Teng X., Zhang J. [et al.], 2010). Возможно, гормональная терапия больных бронхиальной астмой оказывает подавляющее действие на экспрессию АРJ-рецептора лимфоцитов, однако, усиление воспалительного процесса при обострении бронхиальной астмы

требует более активной работы апеллин/APJ системы в лимфоцитах в рамках подавления воспалительной активности клеток. Однако, наблюдаемые изменения уровня рецептора могут быть связаны и с активностью самого воспалительного процесса.

Кроме того, известно об антиапоптотическом влиянии апеллина на гладкомышечные клетки, кардиомиоциты и остеобласты (Cui R.R., Mao D.A., Yi L. [et al.], 2010; Xie H., Yuan L.Q., Luo X.H. [et al.], 2007; Zeng X.J., Zhang K., Wang H.X. [et al.], 2009). Возможно, что антиапоптотический эффект апеллина распространяется и на лимфоциты. Не исключено, что снижение проапоптотической активности глюкокортикостероидов в лимфоцитах в фазе обострения бронхиальной астмы связано с активацией апеллин/APJ системы (Чубарова С.В., Чернова И.А., Капошина А.Ю. [и др.], 2013).

Нами наблюдался запутанный характер корреляционных связей уровней апеллинов с уровнями цитокинами в плазме крови. В таблице 4 представлены обобщенные сведения корреляционного анализа.

Таблица 4 – Характер корреляционных связей апеллинов с цитокинами в плазме крови

цитокины	Апелин-12		Апелин-36	
	Фаза обострения бронхиальной астмы	Фаза затихающего обострения бронхиальной астмы	Фаза обострения бронхиальной астмы	Фаза затихающего обострения бронхиальной астмы
IL-10	-	+	- (не достигает уровня достоверности)	-
IL-4	+ при АБА - при НАБА	- при НАБА	+	+ (не достигает уровня достоверности)
TNF- α	+	- (не достигает уровня достоверности)	- (не достигает уровня достоверности)	- (не достигает уровня достоверности)

Наиболее доказанной представляется взаимосвязь уровней TNF- α и апеллина. При обострении бронхиальной астмы ожидается повышение уровня TNF- α , которое может оказывать стимулирующее влияние на экспрессию апеллина, а апеллин, в свою очередь, ингибирующее действие по типу обратной связи.

При действии апеллина на клеточную культуру не отмечалось изменений уровня экспрессии IL-10 (Shigeyuki O., Akifusa S., Ariyoshi W. [et al.], 2014), однако, отмечалось повышение IL-10 в сыворотке крови на фоне введения апеллина-13 (Emam N., Abo R.E., 2016).

Как известно, при обострении бронхиальной астмы наблюдается снижение уровня IL-10 (Ахмедов В.А., Шевченко А.А., 2015), что подтверждается и нашими наблюдениями. На фоне терапии наблюдается повышение уровня IL-10 в плазме крови ($p < 0,05$). Можно предположить, что наблюдаемые нами корреляции уровней IL-10 и апелина-12, а также известные данные литературы, по-видимому, являются опосредованными. Кроме этого, нельзя исключить, что повышение уровня апелина-12 в фазе обострения является компенсаторным на фоне снижения IL-10.

Данных о влиянии апелина на экспрессию IL-4 в литературе очень мало, а информации об обратном влиянии нами не было найдено. Так, апелин-36 и апелин-13 негативно влияли на экспрессию IL-4 в клетках селезенки (Nabata Y., Fujii R., Hosoya M. [et al.], 1999). Полученные нами корреляции позволяют предположить сложные взаимодействия между апелином-12, апелином-36 и IL-4.

В таблице 5 представлен обобщенный характер корреляционных связей апелина-12 и апелина-36 с показателями ФВД.

Таблица 5 – Направленность корреляционных связей апелинов в мокроте и плазме крови с показателями ФВД

показатели	плазма	мокрота		
АПЕЛИН-12				
ООЛ	-	+		
Объемные и скоростные показатели спирометрии	+	-		
АПЕЛИН-36				
	(+) посев мокроты	(-) посев мокроты	НАБА	АБА
Объемные и скоростные показатели спирометрии	-	+	+	-
Raw	+	-	-	+
				(не достоверно)

Обструктивный тип ФВД связан с более низким уровнем апелина-12 в плазме крови и с более высоким - в мокроте.

Корреляционные связи уровней апелина-36 с показателями ФВД наблюдались только у больных с секрецией мокроты. При этом повышение уровня апелина-36 в плазме крови (при положительном посеве мокроты) связано с обструктивными изменениями показателей ФВД, а в мокроте уровень апелина-36 положительно коррелировал с показателями проходимости бронхов у больных с неаллергическим вариантом бронхиальной астмы.

И, наоборот, снижение уровня апелина-36 в плазме крови (у больных с отрицательным посевом мокроты) и повышение его в мокроте (у больных с

аллергическим вариантом заболевания) было связано с развитием обструктивных изменений ФВД.

При анализе результатов не было найдено связи уровней апелинов в плазме крови и в мокроте.

Корреляционные связи уровня APJ-рецептора лимфоцитов периферической крови и показателей ФВД, также зависят от варианта бронхиальной астмы: в группе АБА с пиковой скоростью вдоха (0,886; $p=6$; $P=0,019$), в группе НАБА с форсированной жизненной емкостью легких (-0,655; $p=12$; $P=0,021$). В группе пациентов без секреции мокроты наблюдались отрицательные корреляционные связи со скоростными показателями ФВД.

Можно предположить, основываясь на известных положительных эффектах апелина при различных моделях легочного повреждения, а также данных о негативном влиянии апелина-13 на продукцию муцина бокаловидными клетками кишечника (Wang G., Kundu R.K., Han S. [et al.], 2008) и наличии корреляционной связи уровня плазматического апелина-12 с количеством бокаловидных клеток в мокроте (0,335; $p=50$; $P=0,017$), что апелин-12 играет роль в регуляции секреции слизи в бронхах.

По данным литературы апелин проявлял антитромботические свойства (Adam F., Khatib A.M., Lopez J.J. [et al.], 2016). В нашем исследовании мы также наблюдали корреляционные связи плазматических апелинов с показателями коагулограммы. Мы наблюдали положительную корреляционную связь уровня апелина-36 с протромбиновым временем (0,731; $p=8$; $P=0,04$) и обратную с протромбиновым индексом у больных АБА (-0,731; $p=8$; $P=0,04$). Уровень апелина-12, напротив, отрицательно коррелировал с протромбиновым временем (-0,367; $p=38$; $P=0,023$), однако наблюдалась положительная корреляция с активированным парциальным тромбопластиновым временем (0,259; $p=75$; $P=0,025$).

Уровень рецептора APJ в группе НАБА обратно коррелировал с протромбиновым временем (-0,615; $p=15$; $P=0,015$) и прямо - с протромбиновым индексом (0,615; $p=15$; $P=0,015$). Возможно, эти связи косвенно отражают активацию апелин/APJ системы лимфоцитов при развитии воспаления, которое обычно связано с повышением свертываемости крови.

Нами наблюдались различные корреляционные связи с лабораторными и анамнестическими данными. Некоторые из них приведены в таблице 6.

Наблюдаемая связь изменений, характерных для развития респираторного ацидоза с повышением апелинов в плазме крови, вероятно, отражает известное положительное влияние гипоксии на экспрессию апелина.

Известно, что гипоксическое состояние стимулирует синтез апелина, посредством гипоксия-индуцибельного фактора (HIF), в частности HIF-1 α . Предполагают, что повышение апелина вовлечено в адаптивный физиологический или патофизиологический ответ при гипоксии (He L., Xu J., Chen L., Lanfang L., 2015). Авторами отмечалось, что некоторые воздействия апелина наблюдались только при гипоксическом состоянии, и отсутствовали при нормоксии.

Таблица 6 – Корреляционные связи уровней апелина-12 и апелина-36 с некоторыми лабораторными и анамнестическими данными

Коррелируемые показатели	Группа	Коэффициент корреляции Спирмана; n; P-значимость
Лейкоциты периферической крови ($10^9/\text{л}$)/плазматический апелин-12 (пг/мл)	АБА+НАБА	-0,243; n=92; P=0,019
Эозинофилы в мокроте (%) / плазматический апелин-12 (пг/мл)	АБА+НАБА	-0,284; n=50; P=0,046
Обострение аллергического ринита/плазматический апелин-12 (пг/мл)	НАБА	0,642; n=16; P=0,007
Отягощенный аллергологический анамнез/ плазматический апелин-12 (пг/мл)	АБА средней степени тяжести	0,384; n=37; P=0,019
Лимфоциты в мокроте (%) / плазматический апелин-36 (пг/мл)	НАБА	0,698; n=13; P=0,008
Эозинофилы периферической крови ($10^9/\text{л}$)/апелин-12 в мокроте (пг/мл)	АБА	-0,943; n=5; P=0,037
Эозинофилы в мокроте (%) / апелин-12 в мокроте (пг/мл)	АБА+НАБА	-0,762; n=13; P=0,002
Нейтрофилы в мокроте (%) / апелин-36 в мокроте (пг/мл)	НАБА	-0,829; n=6; P=0,042
РаО ₂ капиллярной крови/плазматический апелин-36 (пг/мл)	С положительным бактериологическим посевом мокроты	-0,543; n=15; P=0,036
рН капиллярной крови/плазматический апелин-36 (пг/мл)	С положительным бактериологическим посевом мокроты	-0,537; n=14; P=0,048
рН капиллярной крови/плазматический апелин-12 (пг/мл)	АБА+НАБА	-0,251; n=82; P=0,023

При обобщении полученных нами результатов видно, что апелины плазмы и мокроты находятся в противоположных отношениях со многими показателями. При этом изменения уровней апелина-12 и апелина-36 также противоречивы. Мы предполагаем, что апелин-12, вероятно, более вовлечен в патогенетические процессы при АБА, а апелин-36 - при НАБА.

Нами не найдено зависимости уровней апелинов от индекса массы тела, объема талии и бедер, пола и возраста.

В заключение отметим, что исследованные нами аспекты апелин/APJ системы у больных бронхиальной астмой, касающиеся целого ряда характеристик заболевания, вносят вклад в понимание роли этой системы в патогенезе бронхиальной астмы. Это позволяет создать научную базу для дальнейших исследований, а в перспективе и для разработки таргетных лекарственных подходов, регулирующих активность этой системы.

Выводы

1. Уровень апелина-12 в плазме крови повышается у больных бронхиальной астмой как при аллергическом, так и неаллергическом вариантах заболевания, а уровень апелина-36 в плазме крови снижается у больных с неаллергическим вариантом заболевания по сравнению с практически здоровыми лицами. У больных бронхиальной астмой с выраженным бронхитическим и бактериальным компонентами выявлен наиболее низкий уровень апелина-36 в плазме крови. При этом индекс апелин-12/апелин-36 повышается у больных бронхиальной астмой в сравнении с контрольной группой, отражая разнонаправленный характер их изменений при бронхиальной астме.

2. В мокроте больных бронхиальной астмой выявляется как апелин-12, так и апелин-36, уровень которых не зависит от варианта заболевания. При корреляционном анализе не было найдено связи между плазменными уровнями апелинов и их уровнями в мокроте. Наблюдаются отрицательные корреляционные связи уровня апелина-12 с количеством эозинофилов и уровня апелина-36 с количеством нейтрофилов в мокроте. Эти связи отражают, по-видимому, различное участие апелинов в характере воспалительного процесса при различных вариантах бронхиальной астмы.

3. Анализ корреляционных связей уровней апелинов в плазме крови и мокроте со скоростными показателями ФВД выявил разнонаправленный характер связей: нарастание уровня апелина-12 в плазме крови соответствовало улучшению, а в мокроте – ухудшению бронхиальной проходимости. Корреляционные связи уровней апелина-36 выявлялись только у больных бронхиальной астмой с выраженным бронхитическим компонентом. При этом характер связей зависит от бактериального компонента мокроты и варианта бронхиальной астмы. Указанные корреляционные связи могут отражать вовлеченность апелинов в воспалительный процесс в бронхах на уровне паракринной регуляции в системе апелин/APJ при бронхиальной астме.

4. Обнаружена отрицательная корреляционная связь апелина-12 в плазме крови и положительная связь апелина-36 в плазме крови с показателями свертываемости крови, что может указывать на их участие в гемореологических нарушениях при бронхиальной астме.

5. Уровень APJ-рецептора лимфоцитов периферической крови в фазе обострения бронхиальной астмы существенно не отличается от его уровня в контрольной группе, не зависит от варианта заболевания, однако в фазе

ремиссии снижается в сравнении с его уровнем в фазе обострения заболевания. В фазе обострения бронхиальной астмы при аллергическом варианте отмечаются положительная корреляция уровня APJ-рецептора со скоростным показателем функции внешнего дыхания, а при неаллергическом варианте бронхиальной астмы – отрицательная корреляция. Отмечаются отрицательные корреляционные связи уровня APJ-рецептора в фазе затихающего обострения с дозой глюкокортикостероидов, получаемых пациентами в фазе обострения.

6. Уровень апелина-12 в фазе обострения бронхиальной астмы имеет положительную корреляционную связь с уровнем TNF- α , отрицательную – с IL-10 и положительную при аллергической бронхиальной астме – с IL-4, отрицательную – при неаллергической бронхиальной астме. В фазе затихающего обострения бронхиальной астмы – положительная корреляционная связь с IL-10, отрицательная при неаллергическом варианте бронхиальной астмы с IL-4. Уровень апелина-36 в фазе обострения бронхиальной астмы имел положительную корреляционную связь с IL-4. В фазе затихающего обострения бронхиальной астмы – отрицательную корреляционную связь с IL-10. Выявленные различные корреляционные связи уровней апелина-12 и апелина-36 с уровнями цитокинов в плазме крови, отражающие, вероятно, протективное влияние этих адипокинов.

Практические рекомендации

1. Для анализа системы апелин/APJ при бронхиальной астме рекомендуется одновременная оценка комплекса изоформ апелинов (уровень апелина-12 и апелина-36), учитывая различный характер их изменений у больных бронхиальной астмой.

2. Для анализа системы апелин/APJ при бронхиальной астме рекомендуется использование мокроты для оценки особенностей этой системы на местном уровне (орган-мишень).

3. Выявляемые особенности системы апелин/APJ могут служить в перспективе основанием для разработки таргетных лекарственных подходов, регулирующих активность этой системы при бронхиальной астме.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Минеев В. Н., Кузьмина А. А., Лалаева Т. М. «Апелин – новый адипокин много неясного» // Современная медицинская наука. – 2012. – №3 - С. 142-157.

2. Минеев В. Н., Лалаева Т. М., Васильева Т. С., Кузьмина А. А. Клинико-патогенетическое значение резистина при бронхиальной астме с ожирением // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. – 2013. – Т. XX. - № 1. – С. 31-35.

3. Минеев В.Н., Лалаева Т.М., Кузьмина А.А. Возможная роль апелинергической сигнализации в развитии патологии бронхолегочной системы. // Пульмонология. – 2013. - № 2. – С. 101-104.

4. Минеев В.Н., Кузьмина А.А., Лалаева Т.М. Апелин/АРJ сигнальная система и бронхиальная астма. // «Актуальные проблемы диагностики, терапии и реабилитации жителей блокадного Ленинграда и пациентов пожилого возраста» Материалы научно-практической конференции Санкт-Петербургского гос. Бюд. Учреж. Здрав. «Клиническая городская больница №46 Святой Евгении» – Санкт-Петербург - 2013- с. 21-22

5. Минеев В. Н., Лалаева Т. М., Кузьмина А. А. Апелин-12 плазмы крови при бронхиальной астме. // Казанский медицинский журнал. - 2014. - Т. 95. - № 5. - С. 631-636.

6. Минеев В.Н., Лалаева Т.М., Васильева Т.С., Кузьмина А.А. Мокрота как источник адипокинов при бронхиальной астме. // Ученые записки ПСПбГМУ. – 2014. - № 3. - том 21. - С. 34-40.

7. Кузьмина А.А., Лалаева Т.М. Апелин и бронхиальная астма. // «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2014» Тезисы докладов LXXV научно-практической конференции, Санкт-Петербург. – 2014. - С. 19.

8. Минеев В.Н., Лалаева Т.М., Кузьмина А.А. Ассоциация апелина-12, адипонектина, лептина и резистина при аллергической бронхиальной астме – использование интегральных индексов. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. - № 1. – С. 30-34.

9. Кузьмина А.А. Особенности уровней апелина-12 и апелина-36 при бронхиальной астме. // «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2017» Тезисы докладов LXXVIII научно-практической конференции, Санкт-Петербург. – 2017. - С. 41.

Список сокращений

АБА – аллергический вариант бронхиальной астмы

ИФА – иммуноферментный анализ

НАБА - неаллергический вариант бронхиальной астмы

ООЛ – остаточный объем лёгких

ФВД – функция внешнего дыхания

СРАР – постоянное положительное давление в дыхательных путях

ДТРА – диэтилентриаминпентауксусная кислота

GINA – Global Initiative for Asthma Global Strategy for Asthma Management and Prevention

HIF-1 α - гипоксия-индуцибельный фактор 1 альфа

IL- интерлейкин

LPS - липополисахарид

NO – окись азота

Raw – аэродинамическое сопротивление дыхательных путей

TNF- α - фактор некроза опухоли альфа