

Хабаровский филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» -
Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства

На правах рукописи

СУПРУН ЕВГЕНИЙ НИКОЛАЕВИЧ

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
НЕКОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ
У ДЕТЕЙ

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

3.1.29. Пульмонология (медицинские науки)

Диссертация на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

Член-корреспондент РАН, доктор
медицинских наук, профессор
Владимир Кириллович Козлов

Доктор медицинских наук
Ольга Антоновна Лебедько

Благовещенск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ НЕКОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ И ИХ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ (литературный обзор)	16
1.1. Распространённость бронхиальной астмы по обращаемости и результатам применения стандартизированного опросника ISAAC	17
1.2. Имуногенетические характеристики бронхиальной астмы у детей,	22
1.3. Некоторые неспецифические факторы, оказывающие влияние на контроль заболевания при бронхиальной астме.....	39
1.4. Нейросети в медицинском прогнозировании	48
1.5. Клинико-иммунологические эффекты бурых водорослей	52
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
2.1. Характеристика обследованных пациентов, концептуальные направления и этапы исследования	55
2.2. Социологические методы исследования (анкетирование)	60
2.3. Клинические методы исследования	64
2.4. Инструментальные методы исследования.....	64
2.5. Лабораторные методы исследования.....	65
2.6. Климатологические методы исследования	68
2.7. Стандартные статистические методы обработки данных	69
2.8. Обучающиеся нейросети в прогнозировании бронхиальной астмы	72
2.9. Этические аспекты исследования.....	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ОПРОСА С ПОМОЩЬЮ СТАНДАРТИЗИРОВАННОГО ОПРОСНИКА ISAAC СРЕДИ ДЕТЕЙ ХАБАРОВСКОГО КРАЯ	75
3.1. Частота встречаемости астмоподобных симптомов по результатам стандартизированного опросника ISAAC	75
3.2. Частота встречаемости неастмоподобных симптомов атопии по результатам	

стандартизированного опросника ISAAC	79
ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ СВОЕОБРАЗИЕ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ КОНТРОЛИРУЕМОМ И НЕКОНТРОЛИРУЕМОМ ТЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ.....	90
4.1. Клинико-иммунологические проявления полиморфизмов генов Toll- подобных рецепторов при контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астме	93
4.2. Клинико-иммунологические проявления полиморфизмов генов цитокинов при контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астме	112
4.3. Оценка взаимодействия полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы.....	123
ГЛАВА 5. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ ПРИ КОНТРОЛИРУЕМОЙ И НЕКОНТРОЛИРУЕМОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ	128
5.1. Характеристика цитокиновой сети у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой	128
5.2. Сравнительный анализ субпопуляций лимфоцитов у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой.....	131
5.3. Характеристика показателей нейтрофильного фагоцитоза у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой	135
5.4. Оценка мембранного потенциала митохондрий иммунокомпетентных клеток крови как маркера их функционального состояния у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой	137
ГЛАВА 6. ФАКТОРЫ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ ТЕЧЕНИЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ.....	144
6.1. Полиморфизмы генов детоксикации, как фактор контролируемости течения бронхиальной астмы и эффективности ее терапии	144
6.2. Климатический температурный режим как экзогенный триггерный фактор бронхиальной астмы.....	147
6.3. Оценка уровня витамина Д в крови у детей как фактора контролируемости	

бронхиальной астмы.....	151
6.4. Взаимосвязь уровня микроэлементов в сыворотке, форменных элементах крови и показателей иммунного статуса при бронхиальной астме.....	154
6.5. Трансформация эритроцитов, как модель состояния мембран при контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астме.....	157
6.6. Влияние активации ВЭБ и вируса герпеса человека 6 типа на течение бронхиальной астмы у детей.....	167
6.7. Частота сенсibilизации респираторными аллергенами у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой	171
ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ УРОВНЕЙ КОНТРОЛЯ ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ ПРИАМУРЬЯ.....	176
ГЛАВА 8. ПРИМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРОДУКТА ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ..	182
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	195
ВЫВОДЫ	212
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	216
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	218
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	219

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) – одно из распространенных хронических заболеваний дыхательной системы как у взрослых, так и у детей. В последние десятилетия отмечается рост БА, и к настоящему времени ее частота встречаемости достигла 15-18% среди детской популяции населения Земли [130]. Россия в целом [26] и Хабаровский край [38], в частности, не составляют исключения из этой тенденции. Отмечен двукратный рост распространенности БА среди детей Хабаровского края в период с 2005 по 2020 годы (подростки – с 12‰ до 25‰, дети до 14 лет - с 11‰ до 20‰). При этом относительно более низкие официальные показатели распространенности заболевания (около 2% в России и 7-15% в индустриально развитых странах) обусловлены методом учета по обращаемости. При исследованиях методом сплошного опроса International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) в различных регионах нашей страны астмоподобные симптомы выявляются у 4-15% детей, что соответствует показателям других индустриально развитых стран [7]. Такое распространение БА обусловлено, в первую очередь, изменением совокупного генотипа населения этих стран, вызванным кардинальной сменой образа жизни в последнем столетии, которое приводит к все более широкому распространению атопии вообще, и БА, в частности, в связи с чем оно практически не поддается коррекции. Исходя из этого, усилия медицинского сообщества направлены на повышение эффективности терапии БА, а не на её первичную профилактику. Тем не менее, доля больных, у которых достигнут контроль БА, не превышает 30%, полный контроль достигается лишь у 5%. Даже когда базисная терапия осуществляется под непосредственным наблюдением специалиста, согласно принятых схем терапии, с бесплатным предоставлением препаратов, в группе больных БА без значимой сопутствующей патологии полного контроля удаётся добиться лишь у 34% пациентов, хорошего - у 38% и 28% больных остаётся с неконтролируемым течением патологического процесса [89, 188]. В России имеют место сходные соотношения степеней контроля заболевания [3, 39, 59].

Степень разработки темы

Бронхиальная астма - мультифакториальное заболевание, поэтому причины неконтролируемого течения весьма разнообразны, однако в ее основе у детей практически всегда лежит атопическое воспаление. В свою очередь, атопия является нарушением с полигенным наследованием, поэтому полиморфизмы генов, обуславливающих ее реализацию, представляют особый интерес, как базис различной реакции на провоцирующие и терапевтические воздействия в разных группах пациентов, страдающих БА [18, 52]. Фенотипические проявления атопии зависят не от одной конкретной нуклеотидной замены или делеции, а от комплекса полиморфизмов генов-предикторов. Поскольку в основе атопии, в т. ч. при БА, лежит нарушение распознавания типа антигена, то большой интерес для исследования представляют полиморфизмы генов, кодирующих белки распознавания (Toll-подобные рецепторы - TLR) и коммуникативные молекулы иммунитета (интерлейкины - IL) [17, 94, 120, 230, 275]. Еще более важно выделение конкретных генов-предикторов, полиморфизм которых достоверно различается у пациентов с БА разной степени тяжести и в группах контролируемого и неконтролируемого течения заболевания, а также их ассоциаций. Фенотипическая реализация генетически обусловленной атопии происходит посредством изменения соотношений в интерлейкиновой сети. Для БА вообще и неконтролируемой, в частности, характерны определённые изменения сывороточных уровней сигнальных молекул этой системы, причем не только непосредственно воздействующих на Th₂-опосредованное воспаление, которыми являются IL 4 и IL 5, но и другие интерлейкины, реципрокно угнетающие или усиливающие его. В свою очередь, изменения в интерлейкиновой сети ведут к нарушениям абсолютных и относительных показателей субпопуляций лимфоцитов, непосредственно определяющих течение воспаления, в том числе атопического, а также иных эффекторных механизмов иммунитета: выработка Ig класса E и других, нейтрофильный фагоцитоз, что непосредственно проявляется в изменении клинического течения заболевания.

Наряду с врожденной атопией значимую роль в формировании и развитии заболевания играет гиперреактивность бронхов как врожденная, так и

приобретенная, которая во многом связана с состоянием клеточных мембран, его изучение могло бы позволить оценить вероятность развития БА и характер ее течения [41]. Однако получение клеток бронхиального эпителия подразумевает проведение диагностической бронхоскопии с биопсией, которая является сложной инвазивной процедурой и требует квалифицированного персонала. В то же время существует метод интегральной оценки клеточных мембран организма посредством анализа трансформации мембран эритроцитов. Эта клетка не имеет собственного ядра и ряда органелл, в связи с чем является показательной моделью состояния клеточных мембран организма в целом [57], также показана ее применимость при БА [13]. Как и для любого atopического заболевания важнейшим фактором в патогенезе БА является ксенобиотическая нагрузка, особенно важно для БА, поскольку ксенобиотиками являются не только причинные аллергены, но и постоянно получаемые препараты базисной терапии. Гены системы детоксикации контролируют взаимодействие организма с ксенобиотиками, поэтому их полиморфизмы модифицируют как течение atopического воспаления, так и реакцию на базисную терапию [5, 63]. Достаточно выраженное влияние на atopическое воспаление имеют пневмотропные персистирующие возбудители и индивидуальный спектр сенсibilизации для каждого пациента.

Таким образом, мультифакториальность патогенеза БА требует комплексного исследования факторов, влияющих на ее течение, степень контроля и патогенетические механизмы их реализации.

Цель исследования: Комплексный анализ иммуногенетических особенностей и патогенетических механизмов atopического воспаления, выявление влияющих на него факторов и их взаимодействий; разработка нейросетевых моделей прогнозирования неконтролируемого течения бронхиальной астмы и оптимизация методов коррекции у детей.

Задачи:

1. Оценить частоту встречаемости астмоподобных симптомов и неастмоподобных признаков atopии с использованием опросника международной программы ISAAC, а также заболеваемость БА по обращаемости у детей Хабаровского

края.

2. Выявить генетические паттерны, характерные для детей, страдающих БА, и их взаимосвязь со степенью контроля и тяжестью заболевания.

3. Изучить патогенетические механизмы реализации выявленных врожденных особенностей в сигнальных сетях, регуляторном и эффекторном звеньях иммунитета у детей с БА в зависимости от степени контроля заболевания.

4. Определить неспецифические факторы и клеточно-молекулярные особенности (баланс эссенциальных и условно токсических элементов, состояние клеточных мембран, уровень содержания витамина Д), их влияние на течение атопического воспаления у детей, страдающих БА, и воздействие на контролируемость заболевания.

5. Выявить модифицирующее воздействие региональных экзогенных факторов: экологических, спектра сенсibilизации и активизации персистирующих вирусов группы герпеса (ВЭБ и герпес человека 6 типа) на механизмы атопического воспаления и его клиническую манифестацию у детей с БА.

6. Научно обосновать дополнительное применение у детей с БА, получающих стандартную базисную терапию, функционального продукта питания на основе дальневосточных бурых водорослей.

7. Разработать комплексную методику прогнозирования уровней контроля течения БА у детей.

Научная новизна

Впервые, с использованием опросника международной программы ISAAC, оценена частота встречаемости астмоподобных симптомов и неастмоподобных признаков атопии у подростков Хабаровского края, которая кратно превышает заболеваемость БА по обращаемости и является одной из самых высоких среди регионов России, где проводилось исследование данным методом.

Выявлены генетические паттерны и впервые определены их особенности у детей с неконтролируемым течением заболевания: сочетания некоторых полиморфизмов генов TLR (2, 4, 9), IL (6, 10, TNF α), системы детоксикации (GSTT, GSTM, GSTP).

Изучена и впервые предложена патогенетическая концепция реализации выявленных полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов 2, 4, 9 и интерлейкинов 4, 6, 10, 12b, TNF α в сети сигнальных молекул иммунной системы (уровень IL 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 18, TNF α), регуляторном и эффекторном звеньях иммунитета (субпопуляции лимфоцитов CD3+, CD8+, CD4+, CD16+, CD19+, показатели фагоцитоза, Ig A, M, G, E), а также показана их манифестация в клинических проявлениях заболевания (степень тяжести) и достижении контроля над ним (степень контроля).

Впервые продемонстрировано влияние некоторых полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов (2, 4), TNF α и системы детоксикации (GSTP) на объём топических глюкокортикостероидов (ТГКС), необходимый для достижения контроля над БА.

Впервые показаны особенности изменений энергообеспеченности (мембранного потенциала митохондрий) различных популяций иммунокомпетентных клеток крови (моно-, лимфо-, гранулоцитов) у детей, страдающих БА, в том числе при неконтролируемом течении.

Продемонстрированы изменения клеточных мембран на модели трансформации эритроцитов при БА и впервые показана их зависимость от степени тяжести и контролируемости БА у детей.

Определены некоторые новые механизмы влияния дефицита витамина D на неконтролируемое течение БА и дозы ТГКС, за счет повышения уровня одного из индукторов атопического воспаления - IL5 и снижения абсолютного числа и доли В-лимфоцитов.

Впервые выявлен региональный фактор неконтролируемости БА в детском возрасте: влияние сенсибилизации к пыльце сорных трав и спорам грибов, а именно *Aspergillus niger* (при повышении влажности в следствии наводнения) в условиях Приамурья.

Впервые показано воздействие активизации ВЭБ, герпеса человека 6 типа на объём терапии, необходимый для достижения контроля над БА у детей.

Обосновано дополнительное применение у детей с БА, получающих стандартную базисную терапию, функционального продукта питания для детей на основе

ламинарии дальневосточной гомогенизированной и впервые продемонстрирован его иммуномодулирующий эффект при БА.

С учетом исследованных взаимодействий генетических и неспецифических факторов в сигнальных сетях, регуляторном и эффекторном звеньях иммунитета впервые разработана нейросетевая модель прогнозирования риска неконтролируемого течения БА у детей на различных этапах развития заболевания, включая до-нозологический. На её основе разработаны три программы ЭВМ.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе получены новые данные о закономерностях воспаления при неконтролируемой БА у детей, которые обобщены в концептуальную модель иммунопатогенеза заболевания, что расширяет и дополняет понимание изменений при данной патологии на фундаментальном уровне; выявлены особенности генетических паттернов предрасположенности к заболеванию и его неконтролируемому течению; определены патогенетические механизмы реализации некоторых полиморфизмов генов TLR и сигнальных молекул иммунной системы в регуляторном и эффекторном звеньях иммунитета, их манифестации в клинических проявлениях и курабельности БА; показана модификация атопического воспаления под влиянием климата и активизации вирусов группы герпеса (вирус Эпштейна-Барр и вирус герпеса человека 6 типа) в слизистой оболочке верхних дыхательных путей.

Разработанные на основе полученных данных нейросетевые модели поэтапного прогнозирования уровней контроля течения БА у детей позволяют персонализировать подходы к диагностике и терапии заболевания. Предложено дополнительное применение функционального продукта питания на основе бурых водорослей у детей с БА.

Результаты проведенных исследований предоставляют возможность сфокусировать внимание практикующих специалистов на патогенетических основах данной нозологии и необходимости индивидуализации ведения каждого больного с диагнозом БА.

Материалы диссертации используются в работе клиники ХФ ДНЦ ФПД - НИИ ОМиД г. Хабаровска и включены в рабочие программы дисциплин Факультетская

педиатрия, Госпитальная педиатрия на кафедре госпитальной и факультетской педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней ДВГМУ для специальности Педиатрия, в рабочие программы дисциплины Клиническая аллергология специальности Медицинская биохимия, а также института непрерывного профессионального образования и аккредитации.

Внедрение результатов исследования

Результаты завершеного исследования посвященного комплексному изучению распространенности, клинико-иммунологических особенностей и выявлению патогенетических механизмов атопического воспаления при бронхиальной астме и причин неконтролируемого течения заболевания, внедрены в работу стационарного и амбулаторно-консультативного отделений клиники ХФ ДНЦ ФПД - НИИ охраны материнства и детства и включены в рабочие программы дисциплин Факультетская педиатрия, Госпитальная педиатрия на кафедре госпитальной и факультетской педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней ДВГМУ для специальности Педиатрия, в рабочие программы дисциплины Клиническая аллергология специальности Медицинская биохимия, а также института непрерывного профессионального образования и аккредитации.

Положения, выносимые на защиту

1. Общая частота встречаемости астмоподобных симптомов у подростков Хабаровского края, выявленная с использованием стандартизированного опросника ISAAC кратно превышает заболеваемость БА по обращаемости и является одной из самых высоких среди регионов России. При этом в сельской местности показатели выше, чем в городе, и сами симптомы (длительность, частота, тяжесть, циркадное распределение приступов и др.) более выражены.

2. Некоторые генетические паттерны, включающие полиморфизмы генов TLR (2, 4, 9), IL (6, 10, TNF α), GSTM, GSTT, GSTP, характерны для неконтролируемого течения БА у детей, их реализация осуществляется через прямые и опосредованные изменения в иммунном статусе: в сигнальных сетях (уровни интерлейкинов 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 18, TNF α), регуляторном (соотношение субпопуляций лимфоцитов) и эффекторном (уровень IgA, M, G, E, показатели фагоцитоза) звеньях

иммунитета и манифестируют в клинических проявлениях (тяжесть и степень контроля БА, объем терапии, необходимый для его достижения). Нарушению функциональной активности иммунокомпетентных клеток крови (ИКК) способствует выявленное снижение энергообеспеченности моно-, лимфо- и гранулоцитов по данным показателей мембранного потенциала митохондрий.

3. Установлены неспецифические эндогенные факторы и клеточно-молекулярные особенности, влияющие на течение атопического воспаления и контроль БА у детей: дисбаланс микроэлементного статуса крови Cu, Se, Zn, Mn, Li, Pb; изменения трансформации эритроцитов, как модели состояния клеточных мембран в организме, показывающие их нестабильность, что выражается нарушением соотношения дискоцитов, дегенеративных и переходных форм, повышенной чувствительностью к токсикантам (Pb); дефицит витамина D, способствующий повышению IL 5.

4. Выявлен ряд экзогенных факторов, оказывающих влияние на течение и контролируемость БА: климатические факторы, связанные со среднесуточным колебанием температур, повышающие число обострений; спектр сенсibilизации – пыльца сорных трав и споры *Aspergillus niger*, влияющие на степень контроля БА у детей Приамурья; активизация вирусов группы герпеса – ВЭБ, герпес человека 6 типа, значимо модифицирующая атопическое воспаление, усиливая тяжесть течения и увеличивая объем терапии, необходимой для достижения контроля.

5. Прогнозирование уровня контроля течения БА на различных этапах развития заболевания возможно на основе учета генетических полиморфизмов Toll-подобных рецепторов, цитокинов и стандартной иммунограммы (субпопуляции лимфоцитов, уровень иммуноглобулинов и показатели нейтрофильного фагоцитоза) с использованием статистического метода обучающихся нейронных сетей и архитектуры многослойного перцептрона MLP с алгоритмом обучения BFGS.

6. Дополнительное использование функционального продукта питания на основе ламинарии дальневосточной гомогенизированной у пациентов с БА в сочетании с базисной терапией позволяет добиться положительной динамики клинических показателей контроля над течением заболевания за счет изменения

интерлейкинового профиля (снижение интенсивности воспалительных процессов - IL-6, IL-10, IL-18), улучшения энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови - гранулоцитов и моноцитов, уменьшения доли пациентов с активной репликацией ВЭБ и вируса герпеса человека 6 типа.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов и выводов проведенного исследования определяется комплексной проработкой проблемы в соответствии с поставленными задачами, объемом фактической выборки, достаточным для получения статистически достоверных результатов, использованием отвечающих современным требованиям и поставленной цели работы лабораторных и инструментальных методов исследования, в том числе высокотехнологичных, и адекватных систем статистической обработки полученных данных.

Результаты исследования представлены на следующих площадках: XV Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге», 1-8 июня 2015; XVI Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге», 5-8 июня 2017; VII Съезд врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (с международным участием), Благовещенск, 30-31 мая 2017; XVI Российский конгресс «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» с международным участием, Москва, 24-26 октября 2017; Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы педиатрии и перинатологии», Хабаровск, 19 сентября 2017; Региональная научно-практическая конференция «Трудные вопросы практической пульмонологии», Хабаровск, 24 ноября 2017; Международная конференция Workshop AASSAA – FEB RAS International Workshop on «Climate change adaptation and mitigation: sustainable agriculture and health security», Биробиджан, 1-5 октября 2018; VIII съезд врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока с международным участием, Благовещенск, 29-30 мая 2019; Научно-практическая конференция «Клиническая педиатрия практическому здравоохранению. Инновационные подходы в диагностике и лечении», Хабаровск, 26 апреля 2019; Международный конгресс ATS 2020, 6-10 августа 2020,

Филадельфия; IX съезд врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока с международным участием, Благовещенск, 27-28 мая 2021; Международный конгресс ATS 2021, Сан-Диего, 14-19 мая 2021.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 46 научных работ, из них 18 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 19 в журналах, индексируемых в Scopus и WoS, получено 4 свидетельства о государственной регистрации электронных баз данных, 2 патента РФ на изобретения, 3 программы для ЭВМ.

Методология и методы исследования

Данное исследование представляет собой самостоятельный фрагмент научно-исследовательской работы ХФ ДНЦ ФПД – НИИ ОмиД (Медико-социальные и молекулярно-генетические основы оптимизации персонализированного подхода к диагностическим, терапевтическим и профилактическим стратегиям при бронхолегочных заболеваниях у детей. Рег. №АААА-А20-120122990075-4).

В основу методологии диссертационного исследования положены принципы доказательной медицины. Работа выполнена в дизайне обсервационного, проспективного, рандомизированного, контролируемого исследования в параллельных группах в соответствии с методологическими принципами комплексности, целостности, достоверности, валидности, объективности. Её методологической базой явились методы общенаучного познания с приемами формальной логики, а также применение актуальных клинических, современных лабораторных технологий исследования, результаты которых обрабатывались обоснованными статистическими программами.

Объект исследования – дети с БА разной степени тяжести и контроля (538 пациентов обоего пола, 4431 случай наблюдения). Диагноз верифицировался согласно стандартам GINA (Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2017-2021), национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика», 2017-2020, Клинических рекомендаций, 2017-2021. В части исследования встречаемости астмоподобных симптомов опрошены дети 13-14

лет, обучающиеся в школах г. Хабаровска и Хабаровского сельского района (696 школьников).

Предмет исследования – клиничко-патогенетические особенности неконтролируемой БА во взаимодействии с генетическими и неспецифическими факторами.

В работе проведено комплексное общеклиническое и аллергологическое обследование с применением молекулярных и генетических, иммунологических, функциональных, биохимических, спектрометрических, климатологических методов исследований, анкетирование, полученные данные обрабатывались обоснованными и современными методами статистического анализа. Для лабораторных исследований использовались цельная кровь, сыворотка и форменные элементы крови, мазки из зева.

Исследования проводились в соответствии с принципами текущего пересмотра Хельсинской декларации (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October, 2013). Все данные были собраны с персонального согласия исследуемых и/или их законных представителей, во всех таблицах статистической обработки, кроме первичной, обследуемые представлены под порядковыми номерами. Электронная таблица Excel с первичными данными хранилась под защитой пароля и была доступна только участникам исследования. Дизайн исследования утвержден этическим комитетом ХФ ДНЦ ФПД – НИИ ОМид, протокол №5 от 14.05.2013.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 247 страницах и состоит из введения, обзора литературы, характеристики методов исследования, 8 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы, включающего 275 источников, из них 65 работ отечественных и 210 зарубежных авторов; иллюстрирована 59 таблицами и 67 рисунками.

**ГЛАВА 1. МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ
НЕКОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У
ДЕТЕЙ И ИХ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ
(литературный обзор)**

Бронхиальная астма (БА), заболевание давно известное в медицине, в конце XX века стало серьезной проблемой здравоохранения почти во всех странах мира. Бронхиальная астма дебютирует в раннем возрасте, не поддается полному излечению на современном уровне медицины, но при надлежащем лечении почти не сокращает продолжительность жизни, в настоящее время такое снижение составляет лишь 6,6 лет у мужчин и 13,5 лет у женщин [46]. При этом качество жизни пациентов может колебаться в широких пределах и зависит от множества как экзогенных, так и эндогенных факторов. Именно такое уникальное сочетание свойств заболевания привлекает особое внимание медиков.

Широкое распространение БА обусловлено, в первую очередь, изменением совокупного генотипа населения индустриально развитых стран, где она наиболее часто встречается. Оно вызвано кардинальной сменой образа жизни в последнем столетии, которое приводит к все более широкому распространению атопии вообще и БА, в частности, в связи с чем практически не поддается коррекции. Это подтверждается тем, что интенсивный рост распространения астмы в Западной Европе и Северной Америке начался с 60-х годов 20 века, а через 20 лет эта тенденция отмечена и в странах Восточной Европы [115]. В настоящее время наибольшая скорость роста распространённости БА отмечается в развивающихся странах, переходящих к индустриальному типу производства [185].

Исходя из этого, усилия медицинского сообщества в последние десятилетия направлены на повышение эффективности терапии БА, а не на её первичную профилактику. В этой области были достигнуты выдающиеся успехи, так, в период с 1990 по 2010 гг. смертность от астмы в мире снизилась почти в 2 раза (с 25 случаев на 100 000 населения в год до 13 у мужчин и с 17 до 9 у женщин) [129]. Такая же тенденция отмечается и в России, в настоящее время в период с 2010 по 2017 годы общая смертность

по причине БА снизилась на 43,8% с 1,6 до 0,9 случаев на 100 000 населения [58].

Тем не менее, в популяции доля больных, у которых достигнут контроль БА, не превышает 30%, а полный контроль достигается лишь у 5% [130]. В России, по результатам некоторых авторов, существенно больше больных (23,0%) имели полностью контролируемую БА по критериям GINA-2009, у 35,0 % участников исследования была диагностирована частично контролируемая БА, но 45,0% не контролировали заболевание, несмотря на то, что исследование, в отличие от выше приведенных, проводилось среди пациентов, находящихся под диспансерным наблюдением [3].

Большую роль в неконтролируемом течении БА играют приверженность пациентов базисной терапии, социальные факторы, в частности, доступность лекарственных средств, образовательный уровень больных или их родителей, квалификация и доступность медицинского персонала, осуществляющего диспансерное наблюдение и контролирующую терапию, наличие и степень выраженности сопутствующих заболеваний. Однако даже при исключении этих факторов, когда базисная терапия осуществляется под непосредственным наблюдением специалиста согласно принятых схем терапии, с бесплатным предоставлением препаратов и в группе больных БА без значимой сопутствующей патологии, полного контроля удаётся добиться лишь у 34% пациентов, частичного – у 38,0%, и 28,0% больных остаётся с неконтролируемым течением патологического процесса [188]. Можно предположить, что это обусловлено, в том числе, некоторыми эндогенными факторами, поиск которых становится особенно актуален.

1.1. Распространённость бронхиальной астмы по обращаемости и результатам применения стандартизированного опросника ISAAC

Распространенность БА в текущем столетии неуклонно возрастала, и к настоящему времени ее регистрация достигла 15% среди детской популяции населения Земли [130]. За последние годы наблюдается неуклонный рост распространенности БА среди детей и подростков и в Хабаровском крае: так, среди детей до 14 лет за 15 лет отмечается рост от 1,2% до 2,0%, у подростков с 1,2% до 2,5%, то есть в два раза [35] (Рисунок 1).

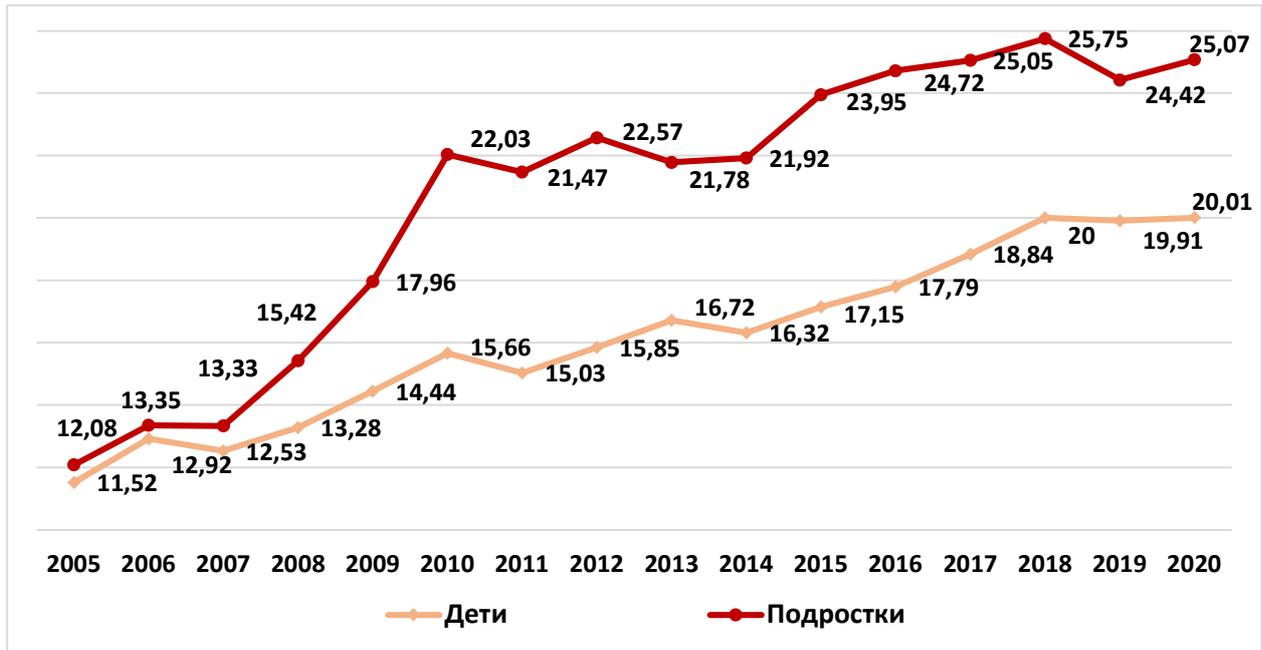


Рисунок 1 – Распространенность БА среди детей и подростков Хабаровского края (на 1000 детей) [38]

При этом в Хабаровском крае и в России в целом отмечаются значительно меньшие абсолютные показатели распространенности БА по сравнению с другими индустриально развитыми странами (около 2% в России и 7-15% в индустриально развитых странах) [3, 26, 35, 103, 107, 130, 188, 245] (Рисунок 2).

Однако это видимое благополучие иллюзорно, оно лишь результат расхождения методик. В большинстве стран мира принят учет астмоподобных симптомов методом сплошного популяционного опроса, в то время как в России и некоторых других странах, например, в Китае, учет заболевания ведется по обращаемости.

Для популяционных опросов, как правило, используется стандартизированный опросник исследований распространенности симптомов БА в популяциях (ISAAC), что позволяет получить сравнимые данные. Эта программа была разработана в 1990-х гг. по инициативе М. Asher, получила международное признание и названа International Study of Asthma and Allergies in Childhood – ISAAC («Международное исследование астмы и аллергии у детей») [159].

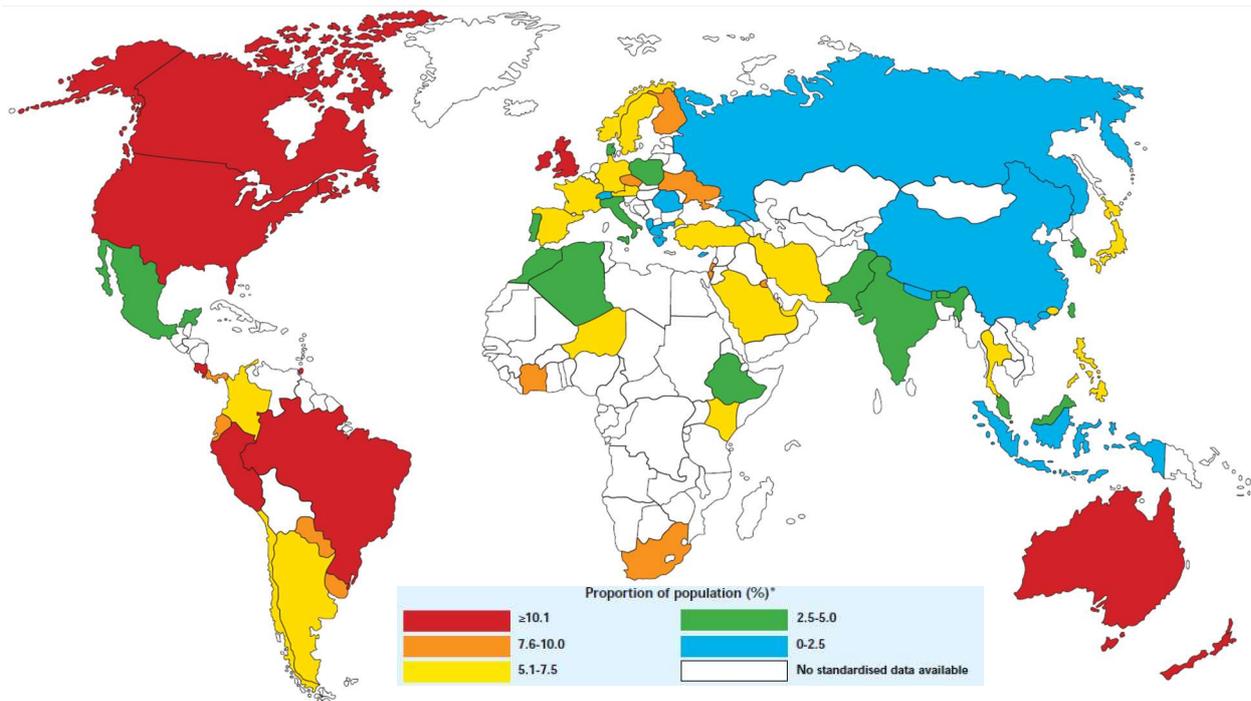


Рисунок 2 – Распространенность БА в мире

http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINABurdenReport_1.pdf

В основу положено многоцентровое поперечное эпидемиологическое исследование путем сплошного стандартизованного анкетирования детей двух возрастных групп: 6-8 лет (первоклассники) и 13-14 лет (восьмиклассники) для выявления у них астмоподобных симптомов (I фаза) с последующей верификацией потенциального диагноза после углубленного клинико-функционального и лабораторного обследования лиц с положительными ответами на вопросы анкеты (II фаза). Повторение в этих же центрах обследования через 5-10 лет (III фаза) позволяет установить тренд распространенности симптомов и самого заболевания (группа 3А). Центры, позднее присоединившиеся к исследованию ISAAC, не участвовавшие ранее в I фазе и принявшие участие сразу в III фазе, составили группу 3В [191, 243, 244]. Масштабное исследование по программе ISAAC было выполнено в 1990–2000 гг. более чем в полусотне стран мира и охватывало огромные контингенты детей [271]. Результаты исследования дали возможность руководящему комитету этой всемирной программы проанализировать ее итоги в различных странах на разных континентах, составить представление о вариабельности и динамике распространенности астмоподобных симптомов в различных возрастных группах, определить ведущие факторы риска.

Однако и после окончания исследования ISAAC как такового, сплошные популяционные опросы проводятся именно на основе стандартизированного опросника ISAAC, который был переведён на большинство мировых языков [237]. Полученные результаты показали кратное расхождение с выявлением БА по обращаемости. Так, согласно опросу, проведенному по методике ISAAC, в Амазонском регионе Бразилии распространённость астмоподобных симптомов в возрастной группе 6-7 лет составила 25,2%, 13-14 лет 15,9% [203]. В Курдистане, западной провинции Ирана, распространённость астмоподобных симптомов выявлена в 24,2% случаев в возрастной группе 6-7 лет и 25,1% – в 13-14 лет, причем распространённость БА в этом регионе по обращаемости составляет 3,9% [248].

Кроме вопросов, характеризующих астмоподобные симптомы, опросник ISAAC содержит и пункты, позволяющие получить информацию о частоте встречаемости неастмоподобных симптомов атопии – признаков аллергического ринита, атопического дерматита. Эти заболевания наряду с БА входят в «атопический марш» и предшествуют астме в его развитии [95]. Количественная оценка риска показала, что школьники с атопической экземой имели 3-кратный риск развития аллергического ринита (ОШ: 3,33; 95% ДИ: 2,45-4,54), 4-кратный риск развития астмы (ОШ: 3,85; 95% ДИ: 2,74-5,42) и 5-кратный риск развития аллергической астмы (ОШ: 4,91; 95% ДИ: 3,17-7,59) по сравнению со школьниками без атопической экземы. Тяжесть экземы также была напрямую связана с астмой и ринитом [181]. Поэтому учет неастмоподобных симптомов атопии, выявляемых путем популяционного опроса, крайне важен в оценке риска развития БА, во многих странах на всех континентах проводился анализ неастмоподобных симптомов атопии, выявленных методом ISAAC [88, 90, 163, 198, 199, 200, 201, 202, 204, 205, 206, 207, 210, 211, 231, 270].

В России общенационального исследования по данной методике не проводилось. Так и для Хабаровского края в настоящее время доступна статистика распространенности БА только по обращаемости. В ряде других российских регионов такие исследования были проведены в рамках программы ISAAC (Новосибирск, Москва), либо после ее окончания, но по стандартизированной методике (Благовещенск, Владивосток, Саха-Якутия, Наро-Фоминск, Чебоксары, Нальчик, Улан-Удэ, Иркутск,

Новокузнецк, Томск и т.д. – всего 17 регионов) (Рисунок 3).

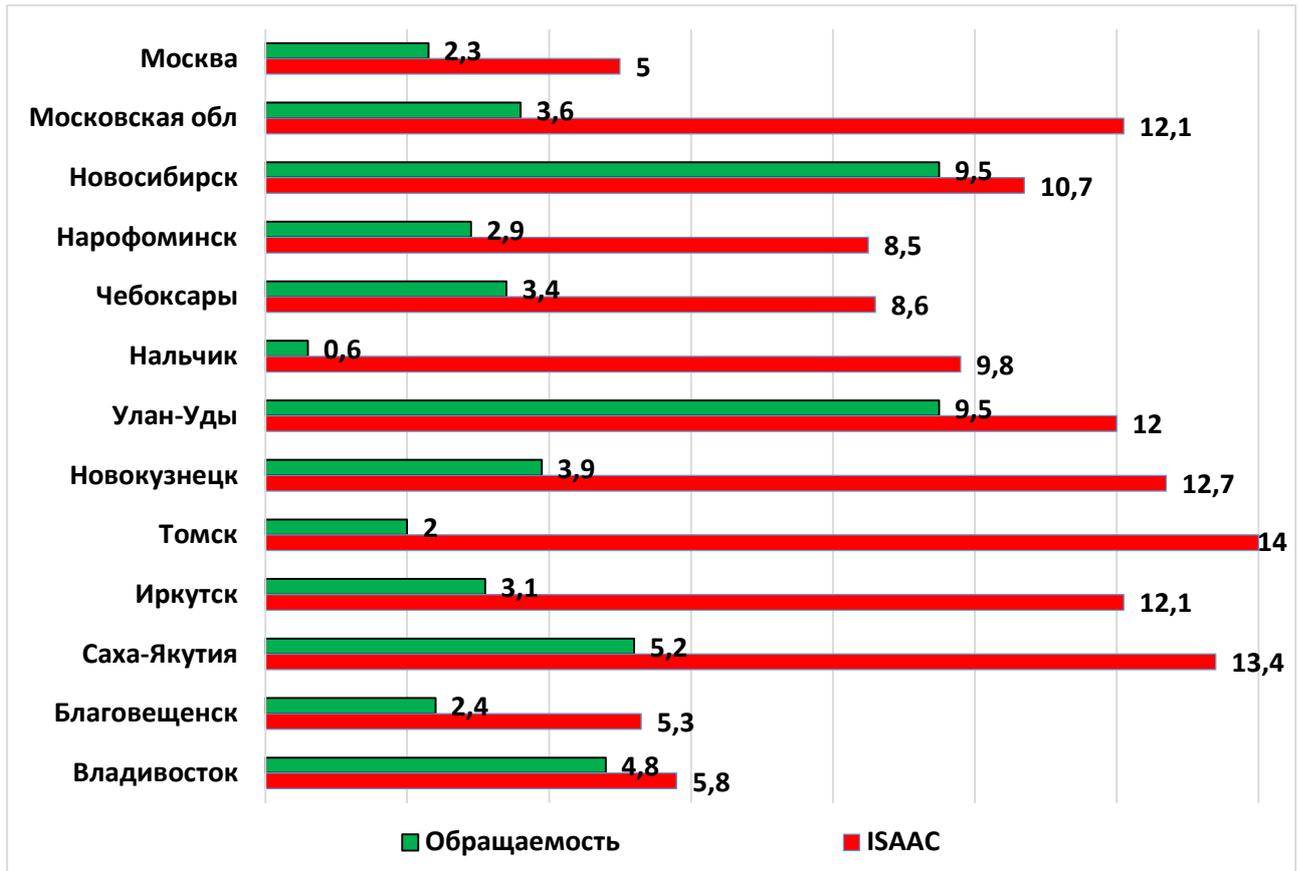


Рисунок 3 – Распространенность (%) астмоподобных симптомов у восьмиклассников по ISAAC и обращаемости соответственно [24, 131, 188]

Во всех случаях отмечается превышение распространённости по опросу над распространённостью по обращаемости минимум вдвое, и она достигает характерных для индустриально развитых стран величин (Москва – 2,3% по обращаемости и 5,0% по ISAAC, Благовещенск – 2,4% и 5,3%, Новосибирск – 3,5% и 10,7%, Иркутск – 3,1% и 12,1%, Якутия – 5,2% и 13,4%, Томск – 2,0% и 14,0%, Санкт-Петербург – 1,5% и 7,4%) [24, 131, 188]. При этом полученные по единой методике показатели распространённости различаются в различных регионах России в два и более раза, что подчеркивает необходимость проведения таких исследований в каждом регионе. Изучение БА по обращаемости не только даёт неточные количественные сведения, но и искажает наблюдаемую структуру тяжести БА. При такой оценке по обращаемости наиболее часто, до 70,0%, встречается БА средней тяжести [29], при исследовании по методике ISAAC у 80,0% детей и подростков с выявленными астмоподобными симптомами они

соответствуют легкой БА [24, 131, 188]. Это коррелирует с известными данными, согласно которым с появления первых симптомов БА до постановки диагноза проходит в среднем более двух лет [131], таким образом, патологический процесс успевает в полной мере развиваться, легкие же формы часто так и остаются не диагностированными. В связи с вышеизложенным, проведение стандартизированного опроса в тех регионах России, где он не осуществлялся ранее, представляется необходимым для понимания истинной ситуации с распространённостью БА.

1.2. Имуногенетические характеристики бронхиальной астмы у детей, их клинические проявления

БА у детей – мультифакториальное заболевание, поэтому причины неконтролируемого течения весьма разнообразны, однако в ее основе у детей, как правило, лежит атопическое воспаление. Атопия является нарушением с полигенным наследованием, поэтому полиморфизмы системы генов, обуславливающих ее реализацию, представляют особый интерес в качестве базиса различной реакции на провоцирующие и терапевтические воздействия в разных группах пациентов, страдающих БА [18, 19, 40]. Фенотипические проявления атопии зависят не от одного конкретного полиморфизма, а от их комплекса в генах-предикторах.

В последние годы общепринятой считается теория, согласно которой аллергические заболевания обусловлены нарушениями регуляции в иммунной системе, связанными с повышенной несбалансированной активацией аллерген-специфических клонов Th_2 . В целом аллергический вариант реагирования иммунной системы сейчас называют иммунным ответом 2-го типа, который в норме обеспечивает развитие гуморального иммунитета и защиту от гельминтов и ряда других патогенов, а при патологии приводит к развитию аллергии. Иммунологические механизмы формирования иммунного ответа 2-го типа связаны с активацией Th_2 и синтезом В-лимфоцитами IgE, накоплением и активацией эозинофилов, базофилов и тучных клеток [51].

Поскольку в основе атопии вообще и БА, в частности, лежит нарушение распознавания типа антигена, то большой интерес для исследования представляют

полиморфизмы генов, кодирующих белки распознавания (Toll-подобные рецепторы) [17, 120, 197, 275]. Именно Toll-подобные рецепторы (TLR) распознают чужеродные компоненты, поступающие из внешней среды, и собственные клетки организма, утратившие принадлежность к нему, и вызывают всё разнообразие реакции специфического иммунитета. На настоящий момент у людей обнаружено в общей сложности 10 генов TLR (TLR1-TLR10), их можно разделить на две группы. Первая группа включает в себя TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10, в основном они экспрессируются на клеточной поверхности [184], а вторая – TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, которые экспрессируются внутриклеточно в везикулах (например, в лизосомах, эндосомах и эндоплазматическом ретикулуме) [192].

TLR, располагающиеся на поверхности клеток, реагируют на компоненты клеточной стенки микроорганизмов (например, липополисахариды и липопротеины), а внутриклеточные TLR распознают нуклеиновые кислоты вирусов и другие компоненты внутриклеточных патогенов, инициируя защитную реакцию организма. Стимуляция TLR молекулами, содержащими паттерны патогенности (PAMP), или паттерны, ассоциированные с повреждениями (DAMP), активирует антигенпрезентирующие клетки, несущие эти рецепторы, которые запускают, контролируют дифференцировку Т-хелперов (Th1, Th2 и Th17 типов) и дальнейшую продукцию цитокинов тучными клетками, активацию эозинофилов. Очевидно, что TLR участвуют в патофизиологии аллергических заболеваний, в том числе БА. Дендритные, антигенпрезентирующие клетки, несущие максимальное количество TLR, которые играют ключевую роль в индукции аллергического воспаления дыхательных путей, являются основными мишенями для молекулярных паттернов, связанных с патогенами. Во время аллергических реакций взаимодействие комплекса TLRs антигенпрезентирующей клетки определяет Th₂-поляризацию дифференцировки Т-хелперов. Сигнализация TLR, имеющихся в некотором количестве в тучных клетках, увеличивает высвобождение IL 5, а активация TLR эпителиальных клеток дыхательных путей вызывает выработку проаллергических цитокинов Th₂-типа. Хотя эти реакции эволюционно направлены на защиту организма, они также могут привести к воспалительному повреждению тканей в дыхательных путях. При определенных условиях стимуляция TLR в другой их комбинации, напротив,

может уменьшить Th₂-зависимое аллергическое воспаление путем усиления Th₁-ответа. Поэтому понимание сложной регуляторной роли TLR в патогенезе аллергического воспаления дыхательных путей необходимо для выявления их роли в контролируемости БА [235].

Наиболее важными для патогенеза воспаления при БА в настоящее время считаются TLR2 и TLR4. TLR4 обнаруживает грамотрицательные бактерии, реагируя на их липополисахариды, в то время как TLR2 играет большую роль в распознавании грамположительных бактерий. Как описано ранее, Th₂-клетки, тучные клетки и эозинофилы обычно связаны с врожденными и адаптивными иммунными реакциями при астме. Распознавание аллергенов, например, таких как клещи домашней пыли, может активировать TLR4, а затем аллергенспецифичные Th₂-клетки. Активация TLR2 в определенных условиях способствует Th₂-зависимым иммунным реакциям, которые могут быть связаны с дисбалансом Th₁/Th₂ при астме. Существует два различных пути передачи сигналов TLR, миелоидный фактор дифференцировки 88: MyD88-зависимый и MyD88-независимый. Оба пути играют важную роль во врожденном иммунном ответе. MyD88 и домен рецептора Toll/IL1, содержащий индуцирующий адаптер интерферон-β (TRIF), независимо связываются с TLR, что приводит к высвобождению таких цитокинов как TNF-α, IL1β, CXCL10, IL6 и IFN-γ [192]. Во время обострений БА продукты расщепления протеиназ связываются с TLR4, которые присутствуют как в эпителии дыхательных путей, так и в макрофагах, связывание этих продуктов приводит к усилению аллергического воспаления [106].

Помимо TLR, экспрессируемых на клеточной мембране, большое значение в развитии атопического воспаления имеет группа эндосомальных агонистов TLR. TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, они распознают нуклеиновые кислоты, их стимуляция приводит к выработке ИФН 1-го типа. TLR3 распознает двухцепочечную РНК (dsRNA), TLR7 и TLR8 распознают одноцепочечную РНК, а TLR9 распознает ДНК [173]. Об их роли в течении БА имеется недостаточно информации, существуют лишь отдельные исследования. Например, в одном из исследований при тяжелой астме, индуцированной у мышей с использованием таких аллергенов, как яйцеклетки, экстракты тараканов и клещ домашней пыли, эффекты эндосомальных агонистов TLRs сравнивали с

дексаметазоном. В этой модели лечение дексаметазоном было неэффективным, в то время как агонисты TLR7 и TLR9 показали эффективность в снижении аллерген-специфического IgE, эозинофилов и Th₂-ассоциированных цитокинов [112]. Другими авторами было проведено двойное слепое рандомизированное пробное исследование для изучения эффективности нового агониста TLR9, известного как QbG10 (вирусоподобная частица, полученная из бактериофага Qbeta), показано, что такая стимуляция позволяет достичь контроля над заболеванием [247].

В целом данные, полученные в исследованиях на людях и животных, показывают, что влияние агонистов TLR на течение atopического воспаления при БА может зависеть от типа активируемых клеток, природы аллергена и способа его введения. В зависимости от этих условий TLR могут подавлять, усугублять или способствовать развитию воспаления в патогенезе астмы [275].

Генетические полиморфизмы смысловой части кодонов генов TLR могут влиять на чувствительность и специфичность этих рецепторов, однонуклеотидные замены в промоторной части влияют на экспрессию этих генов в ответ на эндо- и экзогенные стимулы, соответственно они могут сдвигать спектр реакции кодируемых рецепторов на различные раздражители. Показано, в частности, что варианты гена TLR4 либо повышают, либо снижают чувствительность рецептора как к патогенам [195], так и к аллергенам [116]. В ходе этих исследований было изучено несколько типов полиморфизмов в попытке обнаружить конкретную комбинацию генов, ответственных за восприимчивость и тяжесть астмы. Аллель гомозиготы TT гена TLR rs1927914 оказывает пагубное влияние на объем форсированного выдоха 1 (ОФВ₁). Его снижение свидетельствует об снижении проходимости бронхов и повышении сопротивления дыхательных путей. Кроме того, аллель C rs1927914 и аллель A как rs10983755, так и rs1927907 уменьшают тяжесть астмы. Проводились достаточно широкие исследования встречаемости полиморфизма TLR4-Asp299Gly у больных с БА в сравнении с условно здоровыми лицами как в России, так и за рубежом, большая часть зарубежных исследований данного полиморфизма объединены метаанализом, проведенным Жао и соавторами в 2017 году (Таблица 1).

Таблица 1 – Частота встречаемости (%) полиморфизма TLR4-Asp299Gly при БА и в группе сравнения (по литературным данным) [80]

Страна	БА	Группа сравнения
США [66]	12,9	16,4
Иран [171]	14,1	13,3
Индия [217]	18,9	21,1
Турция [239]	6,9	5,6
Польша [240]	11,3	10,7
Египет [259]	13,2	11,2
Португалия [196]	14,3	12,5
Тунис [262]	0,5	0,4
Дания [92]	9,0	10,3
Китай [74]	18,3	17,69
Британия [261]	12,5	11,2
Россия [42, 100]	10,7-11,9	13,4-23,1

Не меньшее внимание уделялось однонуклеотидной замене TLR4-Thr399Ile, это второй по частоте значимый для атопии вообще и БА, в частности, полиморфизм данного гена. Его встречаемость у пациентов с БА в сравнении с условно здоровыми также освещена в упомянутом метаанализе и в отечественных исследованиях (Таблица 2).

Таблица 2 – Частота встречаемости (%) полиморфизма TLR4-Thr399Ile при БА и в группе сравнения (по литературным данным) [80]

Страна	БА	Группа сравнения
США [66]	11,2	13,1
Индия [217]	15,2	20,5
Турция [239]	8,4	5,3
Франция [101]	11,6	13,4
Тунис [262]	0,5	1,3
Дания [92]	7,0	11,5
Китай [74]	3,0	3,8
Россия [42]	21,4	18,5

Полиморфизмы в гене TLR2 также связаны с риском развития БА и нарушений функций легких [82]. Международные исследования мононуклеотидной замены TLR2 - Arg753Glu немногочисленны. Российских работ по этой теме в доступной литературе не было обнаружено (Таблица 3).

Показано, что генотип варианта ТТ гомозиготного полиморфизма rs7656411 в

TLR2 может снизить частоту развития заболевания.

Таблица 3 – Частота встречаемости (%) полиморфизма TLR2-Arg753Glu при БА и в группе сравнения (по литературным данным)

Страна	БА	Группа сравнения
Иран [171]	7,1	5,8
Украина [238]	11,1	2,2
Египет [259]	3,2	2,8
Португалия [196]	14,3	6,3
Тунис [262]	0,9	0,4
Дания [92]	3,0	8,0

Еще более редко исследовалась встречаемость полиморфизмов TLR9 при БА, причем одно из таких исследований проводилось в России в рамках комплексного исследования полиморфизмов генов TLR при БА, также проводилось исследование одной из нуклеотидных замен в этом гене в Китае (Таблица 4), достоверных различий для их встречаемости не обнаружено.

Таблица 4 – Частота встречаемости (%) полиморфизмов TLR9 при БА и в группе сравнения (по литературным данным)

SNP	Страна	БА	Группа сравнения
TLR9 - A2848G	Россия [42]	72	73,9
TLR9 - T1237C	Китай [119]	2,0	0,0

Кроме того, было показано, что аллель Т однонуклеотидного полиморфизма rs2381289 (SNP) в TLR6 способствует развитию аллергического ринита и астмы, в то время как аллель А rs11466651 SNP в TLR10 отрицательно связан с развитием астмы [194].

Следующим уровнем регуляции любого, в том числе атопического, воспаления является цитокиновая сеть. В случае атопического воспаления основные изменения в ней состоят в повышении синтеза клетками проаллергических цитокинов, или так называемых цитокинов 2-го типа иммунного ответа: IL4, IL5, IL9, IL13. В норме стимуляция развития Th₂ ведет к активации гуморального звена иммунитета, без которого невозможно представить нормальное течение защитных реакций против целого ряда патогенов, однако при аллергии такая активация приобретает черты патологического

воспаления [51]. Первым среди этих цитокинов является ИЛ4, именно его выработка антигенпрезентирующими и некоторыми другими пулами клеток в ответ на аллерген служит главным индуктором дифференцировки наивных Th_0 в направлении Th_2 . Несмотря на то, что изначально, локально в лимфоузлах этот интерлейкин вырабатывается антигенпрезентирующей клеткой и определяет пути дифференцировки Т-хелперов, в дальнейшем основными продуцентами ИЛ4 являются активированные Th_2 лимфоциты, базофилы и тучные клетки, в меньшей степени – цитотоксические Т-лимфоциты, гамма- и дельта-Т-лимфоциты, эозинофилы и некоторые другие клетки. Сигналом для экспрессии гена ИЛ4 в Т-лимфоцитах служит их активация через Т-клеточный антигенный рецептор при наличии поляризующих сигналов дифференцировки в Th_2 , которые обеспечивают, в том числе, и сам ИЛ4. Одним из главных биологических свойств ИЛ4 является его способность активировать пролиферацию и функциональную активность Т-лимфоцитов после их активации специфическим антигеном (аллергеном). ИЛ4 стимулирует продукцию активированными В-лимфоцитами человека определенных типов антител: IgE и IgG4. Механизм действия ИЛ4 связан с переключением синтеза тяжелых цепей молекул иммуноглобулинов от IgM в направлении IgE либо IgG4. Биологическая активность ИЛ4 в ряде случаев может рассматриваться в свете взаиморегулирующих отношений Т-хелперных клонов. Кроме стимулятора гуморального звена иммунитета и аллергии, ИЛ4 играет роль одного из основных негативных регуляторов развития реакций клеточного иммунитета, осуществляя это действие путем подавления иммунологических реакций, вызываемых цитокинами Th_1 , в частности, блокируя активацию Т-лимфоцитов и натуральных киллеров под действием ИЛ2. Но это проявляется только в аспекте изменения баланса активации Т-хелперных клонов. Сам по себе ИЛ4 является типичным плейотропным провоспалительным и проаллергическим цитокином с широким спектром биологической активности, охватывающей многие типы клеток, участвующих в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. ИЛ13 оказывает сходное с ИЛ4 воздействие на функции В-лимфоцитов и макрофагов, но у человека абсолютно не влияет на дифференцировку Т-хелперов, т. к. Т-клетки человека не имеют рецепторов к нему [51].

Следующим этапом в развитии atopического воспаления является синтез ИЛ5

активированными Th₂, как правило параллельно с IL4, но экспрессия этих генов регулируется независимо. IL5 является главным ростовым и дифференцированным фактором эозинофилов. При развитии БА он обеспечивает мобилизацию эозинофилов из костного мозга и привлекает эти клетки в ткань легких [51].

В развитии астматического статуса участвует также IL9, вызывающий увеличение числа тучных клеток в легочной ткани и активацию гиперсекреции слизи эпителием дыхательных путей. IL9 является ростовым фактором, синтезируемым Т-хелперами после встречи с антигеном и усиливающим размножение тучных клеток, всех типов Т-лимфоцитов. IL9 долгое время считался продуктом Th₂, но затем были получены клоны CD4⁺ Th, являющиеся основными продуцентами этого цитокина и названные Th₉. Они дифференцируются из Th₀ под влиянием трансформирующего ростового фактора β, IL4 или из клонов Th₂ с утратой последними функции синтеза цитокинов IL4, IL5, IL13. У больных аллергической БА повышен уровень IL9 в лаважах и увеличено соотношение Th₉/Th₁ [233].

Если оценивать не только сам факт развития БА, но и более подробно рассматривать ее течение и контроль над заболеванием, то большое влияние приобретают цитокины не только атопического воспаления, но и местного воспаления вообще. Известно, что уровень IL6, который является одним из основных медиаторов острого воспаления вне зависимости от его генеза, у пациентов с БА, даже вне приступа, значительно превосходит таковой в группе контроля [104104] и еще больше увеличивается на фоне обострения БА [105].

IL7 также является неспецифическим цитокином, стимулирующим созревание и пролиферацию практически всех типов лимфоцитов, однако существуют подтверждения его роли именно при БА [146]. Кроме того, подтверждена зависимость времени жизни Th₂ клеток памяти от уровня IL7, что прямо влияет на вероятность хронизации аллергического воспаления [144].

IL8 является основным хемокином всех гранулоцитов, включая базофилы и эозинофилы, поэтому его роль в развитии местного воспаления, являющегося непосредственным патогенетическим субстратом при БА, несомненна. Этот интерлейкин непосредственно секретируется в ответ на сигналинг IL4 и IL13 различными пулами клеток,

в том числе клетками бронхиального эпителия, именно поэтому даже при исключительно атопическом генезе астмы в инфильтрации эпителия бронхов присутствует и нейтрофильный компонент. IL8 – мощный хемотаксический цитокин, который активирует воспаления путем рекрутирования тучных клеток, мононуклеарных фагоцитов, Т-лимфоцитов и нейтрофилов в очаг воспаления, запуская порочный круг возрастающей аллергенной нагрузки. Показано большее содержание IL8 у пациентов с БА в сравнении с условно здоровыми, при этом достоверной разницы между уровнем этого интерлейкина в ремиссию и в обострении у пациентов с БА не выявлено. Однако выявлен достоверно более высокий уровень IL8 у больных с признаками ремоделирования бронхов [212], которое является одной из причин утраты контроля над БА.

В организме существуют несколько уровней контроля за избыточной активацией воспаления как при ответе на патогены, так и при развитии аллергических реакций, для предотвращения повреждения собственных тканей. В системе цитокиновой регуляции за это отвечают иммунорегуляторные и иммуносупрессорные цитокины, включая в частности IL10, 12, 18 и некоторые другие, которые синтезируются в основном Т-регуляторными лимфоцитами и в меньшей степени Th₂ [96].

После открытия IL10 в 1991 году было обнаружено, что он подавляет синтез почти всех других цитокинов, презентацию антигенов и активацию Т-хелперов всех типов путем ограничения экспрессии CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) класса II на антигенпрезентирующих клетках. Таким образом, он ослабляет любую сенсibilизацию, в том числе ведущую к атопическому воспалению. В клинических исследованиях показано, что у пациентов с БА уровень IL10 значительно ниже, чем у условно здоровых людей [268].

Одним из основных Th₁-поляризующих цитокинов является IL12, продуцируемый в основном дендритными и Th₁-клетками, который обладает иммунной активностью, индуцируя Th₁-тип иммунного ответа, подавляя Th₂-реакции. Показано, что недостаточная выработка IL12 является одним из механизмов поляризации иммунного ответа по Th₂. Однако современные исследования демонстрируют неоднозначную роль IL12. С одной стороны, он противодействует сенсibilизации Th₂ и развитию аллергии, с другой – способствует развитию полномасштабного аллергического заболевания

дыхательных путей при воздействии аллергена в дыхательных путях после сенсibilизации, в фазе постчувствительности, с усилением хемотаксиса Т-хелперов, эозинофилов и повышением регуляции цитокинов Th₂ типа [143].

IL18 выполняет регуляторные функции в отношении продукции цитокинов Th₁ и Th₂, сдвигая поляризацию иммунного ответа к первому типу, IL18 напрямую ингибирует IL4, который является первым и основным индуктором Th₂ ответа [273]. В клинических исследованиях показано, что уровень IL18 у пациентов с БА значительно ниже, чем в группе контроля, а при обострении БА ниже, чем в ремиссии, таким образом его влияние на течение БА можно считать доказанным [221].

TNF α является наиболее широко изученным плеiotропным цитокином надсемейства TNF. Это важный цитокин врожденного иммунного ответа, который играет ключевую роль в непосредственной защите организма от вторгающихся микроорганизмов до активации адаптивной иммунной системы. Он в основном вырабатывается макрофагами в ответ на активацию мембранных TLR. TNF α также вырабатывается и другими клетками, включая В-лимфоциты, Т-хелперы, нейтрофилы, базофилы и эозинофилы [97].

TNF α – хемоаттрактант для нейтрофилов и эозинофилов – усиливает цитотоксическое действие эозинофилов на эндотелиальные клетки, увеличивает эпителиальную экспрессию молекул адгезии, таких как молекула межклеточной адгезии 1 и адгезии сосудистых клеток 1, усиливает пролиферацию миоцитов, стимулирует рост и созревание фибробластов в миофибробласты путем стимулирования экспрессии TGF- β , то есть способствует ремоделированию бронхов [97]. Кроме того, показано, что он напрямую усиливает гиперреактивность дыхательных путей, введение ингаляционного рекомбинантного TNF α условно здоровым людям приводило к развитию гиперреактивности и нейтрофильной инфильтрации дыхательных путей [251]. Клинические исследования показали повышение уровня TNF α у пациентов с БА в сравнении с условно здоровыми [155].

Генетические полиморфизмы смысловой части кодонов генов цитокинов могут влиять на их активность и специфичность связывания с различными рецепторами, мутации нуклеотидные замены в промоторной части влияют на экспрессию этих генов в ответ

на эндо- и экзогенные стимулы, соответственно, различные мононуклеотидные замены могут сдвигать спектр воздействия кодируемых медиаторов в цитокиновых сетях.

Показаны достоверные различия в распространённости полиморфизма IL4 у детей с БА и без этого заболевания [45]. В гене IL4 выявлено несколько точечных полиморфизмов промоторной области (С-1098Т, С-590Т, С-285Т, А-81G, С-33Т), имеющих значение для течения БА. Точечная замена С-589Т обуславливает повышенную активность промотора по сравнению с аллельным вариантом С-589С и, как результат, увеличенную экспрессию и продукцию IL4. При изучении частот распределения генотипов в группах условно здоровых и больных БА индивидов выявлено, что генотипы в полиморфных участках С-589Т, С-33Т ассоциированы с БА. Имеются данные о связи генотипа С-589Т с более высокой степенью бронхиальной гиперреактивности, уровнем системной эозинофилии и продукцией специфических IgE при БА у детей монголоидной расы. Аллель Т-589 гена IL4 является кандидатным в развитии тяжелых форм БА среди иранской популяции. [52]. Метаанализ влияния данной мононуклеотидной замены показал, что она повышает риск астмы во всех генетических моделях, в том числе и доминирующей модели (Ош = 1.22), рецессивной модели (Ош = 1.17), аллельные модели (Ош = 1.21), ТТ и СС модель (или = 1.34). Анализ подгрупп по возрасту показал роль данной мононуклеотидной замены IL4 одинаково значимой как у детей, так и у взрослых, а по этнической принадлежности выявил ее значительное влияние у азиатов, американцев и европейцев [152]. В ряде экспериментов показан протективный эффект полиморфизма С-1098Т в формировании тяжелых форм БА при исследовании жителей Македонии [52].

Для IL5 показано, что вариант полиморфизма IL5 С-703Т-ТТ чаще встречается у детей с БА, чем условно здоровых. У носителей этого генотипа более высок уровень IL5 в сыворотке крови и абсолютное количество эозинофилов. Гетерозиготный вариант – IL5 С-703Т-СТ связан с более высоким уровнем общего IgE в сыворотке крови [138].

Встречаемость полиморфизма IL6 С174G у пациентов с БА и в группе сравнения из относительно здоровых людей отражена в ряде зарубежных и отечественных источников, в том числе данные метаанализа, охватывающего ряд таких исследований [118] (Таблица 5).

Таблица 5 – Частота встречаемости (%) полиморфизма IL6 C174G при БА и в группе сравнения (по литературным данным)

Страна	БА	Группа сравнения
Бразилия [156]	98,9	95,1
Иран [108]	92,6	92,7
Иран [209]	98,2	97,1
Египет [126]	91,3	93,9
Македония [77]	95,9	91,7
Китай [157]	100,0	80,6
Болгария [78]	62,1	80
Россия [11]	78,3	76,5

Для этого полиморфизма установлена достоверная и значимая связь с БА (отношение шансов OR=3,4 при доверительном интервале (ДИ) 95%: 2,045–5,638 $P < 8 \times 10^{-5}$), еще более выраженная у пациентов с подтвержденной атопией (OR=4,1, 95% ДИ: 2,308–7,280, $P < 8 \times 10^{-5}$) [78].

Для полиморфизмов IL7 было проведено большое исследование, включавшее 8 однонуклеотидных замен, но влияние на вероятность развития БА была выявлена только для одной из них. Миссенс SNP rs766736182 гена IL7 достоверно (OR = 2,185, 95%, ДИ = 1,561-2,252, P -значение = $8,69468 \times 10^{-19}$) связан с риском развития астмы у детей [158].

При изучении полиморфизмов IL8 было доказано, что наличие полиморфизмов IL8 - 251 A/T (rs4073) и + 781C/T (rs2227306) достоверно повышает риск развития астмы ($p = 0,002$, $p = 0,036$ соответственно). Для rs2227306 SNP был выявлен самый высокий медианный уровень IgE при наличии генотипа TT ($865 \pm 99,74$ МЕ/мл), при более подробном изучении этой нуклеотидной замены выявлено, что она связана и с более тяжелым течением БА [193]. Полиморфизм rs4073 указывал на более высокий риск развития тяжелого течения БА (например, $p = 0,008$ у тунисских детей). Поэтому аллели rs4073 T и rs2227306 C рассматриваются как факторы риска развития БА [145].

Для полиморфизмов IL9 была показана более высокая частота генотипа GG в локусе rs1859430 у пациентов с БА ($p=0,005$), частота генотипа CC в rs2066758 напротив, значительно ниже ($p=0,044$) [86]. В других исследованиях для полиморфизма промотора IL9 (SNP) (rs2069882) не было обнаружено значимых различий между пациентами с БА и условно здоровыми [179].

Для гена IL10 установлен ряд аллельных вариантов промоторного региона (-1061G, T-798C, C-627A, G-1082A, C-819T, C-592A, C-571A) [48]. Так, у европеоидов аллель G в позиции -1082 коррелирует с высокой продукцией IL10, а аллель A – с его низкой продукцией. Присутствие аллельного варианта -592A ассоциировано с уменьшением продукции IL10. Аллель C в позиции -571 связан с повышением синтеза IL10, а также с гиперпродукцией IgE и, как правило, с усилением тяжести течения БА. Частота генотипа IL10 CA-592 была достоверно выше у больных иранцев с БА по сравнению с группой контроля. При исследовании трех полиморфизмов промоторного региона гена IL10 G-1082A, C-819T, C-592A выявлено, что A-1082G полиморфизм и АТА гаплотип в промоторе гена IL10 связан с усилением бронхиальной гиперреактивности, а T-819C и A-592C полиморфизмы, и АТА и АСС гаплотипы ассоциированы с повышением уровня катионного эозинофильного белка в сыворотке крови [52].

При изучении полиморфизма гена IL10 -1082 G/A другими авторами было достоверно доказано его влияние на вероятность возникновения БА у детей. Генотип AA был представлен (66,0%) в группе с БА и только у (6,0%) в контрольной группе, генотип AG был выявлен у 20,0% больных и 4,0% у условно здоровых детей. Напротив, генотип GG был обнаружен у 14,0% страдающих БА и в 90,0% случаев в контрольной группе [151]. В результатах метаанализа представлена ассоциация полиморфизмов гена IL10 -1082A/G и -592A/C с атопической БА, тогда как для полиморфизма -819T/C такой взаимосвязи не показано [154].

Представляем частоту встречаемости полиморфизма IL10 - C592A у больных детей с БА в сравнении с условно здоровыми (Таблица 6).

Таблица 6 – Частота встречаемости (%) полиморфизма IL10 - C592A при БА и в группе сравнения (по литературным данным)

Страна	БА	Группа сравнения
Россия [11]	99,9	83,6
Тайвань [153]	81,7	44,9
Мексика [142]	61,46	71,55

Стало известно, что для IL12A распределение генотипических и аллельных частот IL12A rs568408 продемонстрировало существенные различия между больными с

БА и контрольной группой. В частности, процентное содержание генотипа AA IL12A rs568408 было значительно выше среди пациентов с астмой на Тайване, чем у здоровых лиц, по сравнению с генотипом GG. Не наблюдалось существенных различий между генотипами IL12A rs2243115 и IL12B rs3212227 в основной (пациенты с БА) и контрольной группах. Кроме того, аллель A в IL12A rs568408 был связан с более тяжелыми симптомами ($p = 0,0085$) при астме [79].

Для полиморфизмов IL12B проводился метаанализ, в результате которого выяснилось, что для мононуклеотидной замены IL12B -1188A/C в Восточной Азии был заметно снижен риск развития астмы (CC + AC по сравнению с AA: OR = 0,64, 95% ДИ = 0,50–0,81), для промотора IL12B анализ по этнической принадлежности показал, что в Восточной Азии был заметно повышен риск (MM по сравнению с WM + WW: OR = 1,57, 95% ДИ = 1,18–2,10, $P = 0,002$), то есть аллель IL12B -1188 C может снижать вероятность БА. Кроме того, промоторный генотип MM, напротив, может быть фактором риска развития астмы [174]. В другом исследовании показано, что у пациентов с аллергией на клещ домашней пыли, самой распространённой среди больных БА, наблюдалось значительное увеличение вариантов генотипов IL12B (+1188 A/C) по сравнению с условно здоровыми людьми. Наблюдалось значительное увеличение общего уровня IgE, количества эозинофилов и уровня IL4, в то время как IL12B был значительно ниже по сравнению с контрольной группой [216].

Для полиморфизмов IL18 показано, что гетерозиготный вариант CT ($p=0,047$) в локусе rs360715 гена и рецессивный вариант GA+AA ($p=0,021$), а также гетерозиготный вариант GA ($p=0,031$) в локусе rs1859430 гена IL18 и гаплотипа AC в локусе rs189667 ($p=0,048$) у пациентов с БА встречаются достоверно реже, чем у условно здоровых людей [86]. Кроме того, в метаанализе показано, что некоторые полиморфизмы гена IL18 в 1,5 раза увеличивают вероятность развития аллергического ринита – заболевания, предиктора БА [148].

Ген TNF расположен на шестой хромосоме (6p21.3). Расположение в средней части генома определяет его большую вариабельность, промоторная зона гена TNF включает восемь полиморфных участков с единичными нуклеотидными заменами: T-1031C, C-863A, C-857T, G-575A, G-376A, G-308A, G-244A, G-238A. Однако наиболее

значимыми полиморфизмами в формировании патологических состояний являются два. Это единичные нуклеотидные замены гуанина на аденин в положениях: G-308A и G-238A, которые вызывают изменения уровня продукции TNF α , т. е. являются функциональными. Это объясняется тем, что позиции -308 и -238 локализованы в промоторном регионе гена, что сказывается на возможности транскрипционных факторов связываться с этой частью гена и таким образом влиять на скорость транскрипции [52]. Эти мононуклеотидные замены достаточно распространены, и в исследованиях для западной Сибири показано, что около 27-33% европеоидов в своем генотипе содержат полиморфный (более редкий) аллель -308A и около 7-10% – редкий аллель -238A [61]. Известно предиктивное значение полиморфизма G-308A гена TNF α для заболеваний, в основе патогенеза которых лежит хроническое воспаление, в том числе для БА. Риск развития такого воспаления в легких и бронхах при этой мононуклеотидной замене возрастает более чем в 1,5-2,4 раза, и при БА она встречается значительно чаще [25, 276]. При чем уровень этого риска зависит от степени загрязнения воздушной среды [4], считается, что это связано с его антиоксидантным действием [70]. Полиморфизм G-238A снижает риск развития атопической БА [113, 127]. Частота встречаемости полиморфизма G-308A представлена в таблице 7, в том числе, по данным метанализа, охватывающего ряд таких исследований [76].

Таблица 7 – Частота встречаемости (%) полиморфизма TNF α - G308A при БА и в группе сравнения (по литературным данным)

Страна	БА	Группа сравнения
Россия [11]	38,3	21,1
Египет [186, 225]	41,2-60,0	26,0-30,0
Корея [84, 259]	9,8-14,7	9,2-23,0
Пакистан [83]	73,0	73,0
Китай [128]	33,0	17,3
Бельгия [169]	32,6	29,6
Чехия [170]	32,5	25,2
Италия [172]	23,9	20,0
Британия [267]	53,7	30,2
Франция [147]	34,9	27,4
Индия [266]	30,1	18,0
США [93]	22,0	26,3

Общеизвестно, что многочисленные гены взаимодействуют между собой при БА и атопии, повышая или уменьшая риск развития болезни. При наличии сочетания полиморфизмов генов, кодирующих IL13 и IL4RA (обе ключевые молекулы в Th₂ сигнализации), выявлен в 2,5 раза больший риск развития БА, чем у индивидуумов с наличием изменений в одном гене. Исследование четырех генов показало, что комбинация определенного однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) в IL13, IL4, IL4RA и STAT6 сопровождается увеличением риска БА в 16,8 раз. Эти сведения указывают на значение изучения взаимодействия генов при сложных болезнях и объясняют их роль в развитии и прогрессировании патологии [21]. Поэтому необходимо не только выявить конкретные гены, влияющие на степень контроля над БА, еще более важно выделение их ассоциаций, генетических паттернов, определяющих вероятность развития того или иного варианта течения заболевания.

Вышеописанные изменения в сети сигнальных молекул иммунной системы с неизбежностью находят свое выражение в основных показателях стандартной иммунограммы, которые могут быть использованы как более легко отслеживаемые маркеры этих изменений. Для детей, страдающих БА вообще, характерны достаточно типичные изменения основных показателей иммунограммы.

Абсолютное количество лимфоцитов периферической крови не отличается от показателей условно здоровых детей. Количественное содержание (относительное и абсолютное) Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток, как правило, существенно ниже нормальных величин [187]. По данным других авторов уровень CD8+ лимфоцитов именно при тяжелой БА может повышаться за счет части из субпопуляций, которые невозможно отдефинировать от общего пула в рамках стандартной иммунограммы [140, 176, 232]. Данные о содержании натуральных киллеров у детей с БА в сравнении с условно здоровыми противоречивы, что связано с его колебаниями в зависимости от фазы воспаления и конкретного фенотипа заболевания [166].

Известно, что количество В-лимфоцитов достоверно повышено при atopических заболеваниях дыхательной системы, это повышение может быть кратным, например, при аллергическом рините – заболевании-предикторе БА – они увеличиваются по сравнению с условно здоровыми до пяти раз [71]. Подобные изменения происходят и при

БА [122].

Естественным продуктом активации В-клеток является выработка иммуноглобулинов различных классов, и если роль IgE в аллергическом воспалении очевидна и интерпретация его показателей не требует специального рассмотрения, то остальные иммуноглобулины, оказывающие в большей степени опосредованное воздействие, представляют определенный интерес. Известно о более низком уровне IgA у детей с БА [180], его уровень прямо связан с выраженностью сенсibilизации, в том числе к самым частым при БА аллергенам – клещу домашней пыли [214]. Более того, селективный дефицит IgA является значимым фактором риска по БА, более чем у половины пациентов с этой патологией развивается астма [220]. Доказан и более высокий уровень IgM у пациентов с БА, для IgG значимой разницы не обнаружено [222].

Конечным эффекторным звеном работы гуморального иммунитета является активация различных популяций гранулоцитов. При БА естественным образом основное внимание уделяется базофилам и эозинофилам, но и показатели нейтрофильного фагоцитоза могут представлять интерес, особенно в плане дальнейшего прогноза заболевания. Некоторые авторы указывают на снижение этих показателей в сравнении со здоровой популяцией [32]. Другие авторы отмечают, что при некоторых условиях они могут повышаться [241]. В связи с этим, их изменения в зависимости от тяжести и контроля представляют особый интерес.

Большой интерес представляет не только количественное содержание и соотношение иммунокомпетентных клеток при БА, но и их функциональное состояние, одним из методов определения такого состояния является оценка мембранного потенциала митохондрий [53, 114]. Изучению этого показателя применительно к БА посвящены лишь единичные работы, в частности, в одной из работ выявлено снижение мембранного потенциала митохондрий у больных с БА в сравнении со здоровыми [149]. Подобные данные подтверждаются и в отечественных исследованиях [34, 41]. Однако в этих работах нет деления иммунокомпетентных клеток по популяциям и не рассматривались вопросы изменения мембранного потенциала митохондрий в зависимости от тяжести и контролируемости БА.

1.3. Некоторые неспецифические факторы, оказывающие влияние на контроль заболевания при бронхиальной астме

Атопическое воспаление, которое, как правило, лежит в основе патогенеза БА у детей, в первую очередь обусловлено врождёнными факторами, однако вероятность и срок их реализации, а также течение заболевания после его начала могут значительно модифицироваться под воздействием разнообразных экзогенных факторов [67, 121, 168].

Одним из основных барьеров, защищающих организм от негативных воздействий окружающей среды, является система генов детоксикации. Установлено, что на проявление БА, экодетерминированной патологии, влияют отдельные типы метаболической активности генов детоксикации ксенобиотиков тремя фазами. Например, для первой фазы доказано, что пациенты с неконтролируемой астмой значительно чаще имеют генотипы CC и GG гена mEPHX1. Снижение функционального состояния гена mEPHX1, соответствующее гомо- и гетерозиготам по полиморфным аллелям: CC-AA и TC-AA, также является частым явлением у таких больных [178].

Иракскими исследователями показано, что при мононуклеотидной замене GSTP1 Ile105Val как гетерозиготный вариант Ile/Val, так и гомозиготный вариант Val/Val чаще встречается у детей с БА, чем гомозиготный генотип Ile/Ile [109]. В португальском исследовании было выявлено, что в сравнении со здоровыми значительная связь с астмой наблюдалась для генотипа GSTP1 rs1695 AA (отношение шансов (OR) - 1,96; 95% ДИ - 1,18-3,25; $p = 0,010$) [87]. Финские исследователи представили данные по зависимости между полиморфизмами генов детоксикации и нарастанием гиперреактивности бронхов при БА у детей, особенно при сенсibilизации к химическим загрязнителям. Была продемонстрирована ассоциация между нарастанием гиперреактивности бронхов и снижением активности фермента GSTP1 при генотипе Val105/Val105. Более того, у пациентов с этим вариантом гена чаще проявлялись характеристики иммунного ответа типа Th₂ по сравнению с пациентами с неизменным геном GSTP1. Интересно, что у всех пациентов данный полиморфизм GSTP1 сочетался с мононуклеотидной заменой, снижающей активность GSTM3 и неизменной активностью

GSTT1 [85]. Подтверждают это и исследователи из Кореи для БА с сенсibilизацией к бисфенолу А. По сравнению с генотипом GG гена GSTP1, у детей с генотипом AA концентрация бисфенола А в моче была выше ($12,72 \pm 4,16$ нг/мл против $11,42 \pm 2,82$ нг/мл; $p=0,036$), и это показало более высокие шансы развития астмы, чем у носителей генотипа GG (OR=4,84; 95% ДИ, 1,0223,06) [175]. Однако в метанализах, проведенных в отношении этих мононуклеотидных замен, обнаруживаются противоречивые данные. В многочисленных исследованиях изучалось влияние полиморфизмов GSTP1 на риск развития астмы и снижения функции внешнего дыхания. Например, некодирующие полиморфизмы rs1871042 (C>T) и rs947895 (C>A) были связаны с более низкими шансами развития астмы. Гаплотип, соответствующий GSTP1 rs6591256, rs17593068, rs1695, rs1871042, rs947895, ассоциировался с почти пятикратным увеличением вероятности развития БА (OR = 4,8, $p = 0,007$). Полиморфизм GSTP1 Ile105Val изменяет сродство соответствующего фермента к субстрату и снижает активность GST в отношении топических глюкокортикостероидов. Примечательно, что индивидуумы, гомозиготные по генотипу GSTP1 105val, имеют измененную каталитическую активность в зависимости от субстратов по сравнению с индивидуумами, гомозиготными по аллелю GSTP1 105ile. Дети с астмой, гомозиготные по аллелю GSTP1 105Val, демонстрируют более медленное улучшение функции легких на фоне лечения. Однако немецкие исследователи не смогли установить связь между полиморфизмами Ile105Val, а также Ala114Val (A114V; rs1138272) и БА у детей [133].

Полученные разнонаправленные результаты могут быть объяснены различиями в этнической принадлежности, возрасте и урбанизации. Однако, когда был проведен метаанализ 28 различных исследований, включая эти независимые генетические ассоциации, не было обнаружено существенной связи с восприимчивостью к астме для полиморфизмов GSTP1 Ile105Val, хотя стоит отметить, что была выявлена высокая гетерогенность между исследованиями [132].

Для полиморфизмов GSTM1 в метаанализе было показано, что они связаны с повышенным риском развития БА у детей и взрослых. Нулевой генотип GSTM1 был ассоциирован с более частой встречаемостью воспалительных заболеваний легких, включая астму и атопию, предрасположенность к развитию определенных аллергических

реакций гиперчувствительности, особенно в сочетании с воздействием окружающей среды. Пациенты с БА демонстрируют более высокую распространенность нулевого генотипа GSTM1 по сравнению с условно здоровыми людьми (63,4% против 40,8%; OR = 2,34; 95% ДИ 1,31–4,20), хотя эта распространенность варьируется в зависимости от этнической принадлежности [133]. Наблюдалась крайняя вариабельность между исследованиями и связь между GSTM1 и астмой иногда исчезала, когда метаанализ ограничивался более крупными исследованиями [134]. В недавнем обновленном метаанализе, включающем 26 исследований "случай-контроль", была обнаружена значительная связь нулевого полиморфизма GSTM1 (OR = 1,452; 95% доверительный интервал (ДИ): 1,192–1,770) и риска развития БА как у детей (OR = 1,368; 95% ДИ: 1,051–1,781), так и у взрослых (OR = 1,859; 95% ДИ: 1,183–2,921). Основываясь на анализе подгрупп по этнической принадлежности, значительная связь между GSTM1 и риском развития астмы была обнаружена у европейцев (OR = 1,303; 95% ДИ: 1,018–1,667), африканцев (OR = 2,175; 95% ДИ: 1,560–3,031) и латиноамериканцев (OR = 2,265; 95% ДИ: 1,375–3,729). В одном исследовании также сообщалось о связи между полиморфизмом rs412543 GSTM1 (G>C) и астмой. Эти данные об уровнях транскриптов контрастируют с результатами метаанализа, которые предполагают, что субъекты с нулевым полиморфизмом GSTM1 могут демонстрировать ухудшение функции легких и могут иметь повышенный риск развития БА [133].

Для GSTT1, как и для GSTM1, у больных с БА наблюдалась более высокая распространенность нулевого генотипа, а нулевые генотипы GSTT1 были связаны с астмой и астмоподобными симптомами (свистящее дыхание, кашель, приступы одышки). Но метаанализ также показал противоречивые результаты. «Обновленное» исследование метаанализа, "случай-контроль", выявило значительную связь между полиморфизмами GSTT1 и риском развития астмы у взрослых (OR = 2,312; 95% ДИ: 1,204–4,439). Основываясь на анализе подгрупп по этнической принадлежности, повышенный риск обнаружили только у азиатов (OR = 2,105; 95% ДИ: 1,101–4,025) и русских (OR = 2,747; 95% ДИ: 1,071–7,046). В том же году был опубликован еще один метаанализ [113], который включал независимые генетические исследования с использованием моделей фиксированных и случайных эффектов, обнаружена достоверная связь между

восприимчивостью к астме и нулевым фенотипом GSTT1 (объединенный OR = 1,33, 95% CI = 1,10-1,60).

Таким образом, влияние полиморфизмов генов детоксикации на течение БА разнопланово и сильно зависит от условий окружающей среды и этнических особенностей популяции, поэтому столь важно и интересно изучение этой проблемы в конкретном регионе.

Наиболее общим фактором, воздействующим на организм человека, в том числе и при БА, является климат, при чем наиболее его очевидным проявлением – перепад температур, сезонный и суточный. Изучение влияния температур на БА имеет длительную историю, в том числе проводились многочисленные метаанализы по этой проблеме. В одном из них, например, изучалось более 2000 статей, связанных с данной тематикой. Из 2633 статей авторы сочли только 23, соответствующие критериям включения и исключения. В четырнадцати исследованиях сообщалось об обратных зависимостях, которые показали, что по мере снижения температуры у детей увеличивалось количество приступов БА. В девяти работах наблюдалась связь между жаркой погодой и приступами астмы. В 3 исследованиях сообщалось о связи между перепадами температур и приступами астмы, а два исследования не выявили никакой связи. Некоторые исследования показали, что увеличение заболеваемости БА в возрастной группе 5-14 лет было связано с началом учебного года и, вероятно, связано с распространением вирусных заболеваний, а не с изменениями температуры. На основании чего авторы делают достаточно очевидный вывод – экстремальные температуры и их перепады, скорее всего, вызовут обострение астмы у ребенка [249]. В другом метаанализе исследовалось 19 источников, подошедших под критерии включения, 13 работ дали количественную оценку влиянию абсолютной температуры на астму у детей, а в шести работах изучалось влияние внутрисуточных или межсуточных колебаний температуры. Все исследования проводились в городских районах. Существовало расхождение в значимости взаимосвязи между абсолютной температурой и астмой, а также в форме этой взаимосвязи (т.е. линейной или нелинейной) и в том, были ли запаздывающие температурные эффекты. Все больше доказательств свидетельствует о нелинейной взаимосвязи между абсолютной температурой и астмой у детей [236]. Несмотря на это, исследования в

данной области продолжают. Так, в работах последних лет иранских ученых показано, что изменения погодных условий, высокая относительная влажность и холодная погода могут спровоцировать приступы астмы, особенно у детей младшего возраста, в то время как уровень запыления и грозы не оказали заметного влияния на частоту обострений БА у детей [164]. В Польше исследования проводились на основе оценки взаимосвязи между частотой обострения астмы и условиями окружающей среды в соответствии с биометеорологическим индексом UTCI (Универсальный индекс теплового климата). При значениях UTCI в интервале 5-го класса, описывающих термонейтральные условия, обострения астмы наблюдались со средней частотой. Снижение значения UTCI приводило к уменьшению числа обострений астмы, в то время как рост увеличивал их количество [213].

То, что подобные исследования продолжают, несмотря на обилие информации, полученной в рамках ранее проведенных работ, связано, в первую очередь, с уникальностью климата в каждом районе проживания. Южная часть Дальнего Востока России расположена в зоне с муссонным климатом умеренных широт, характеризующимся суровой холодной сибирской зимой и жарким влажным, тропически знойным летом. Выраженные суточные изменения температуры и давления воздуха, характерные для переходных сезонов, приводят к изменению содержания кислорода в воздухе, оказывая негативное влияние на людей с бронхолегочными заболеваниями, особенно детей [135]. В последние годы отмечается рост как сезонных [47], так межсуточных перепадов температур [14]. В связи с этим для жителей Прибайкалья особый интерес представляет связь частоты обострений БА с резкими изменениями температуры окружающего воздуха.

Еще одной региональной особенностью является уровень инсоляции и возможность воспринимать ее человеком в связи с другими климатическими особенностями. Приамурье является одним из лидеров среди регионов России по формальным показателям инсоляции, число солнечных дней для нашего региона превышает 300 в год. Однако достаточно суровый климат с большими перепадами температур, вплоть до экстремальных, не позволяет в полной мере воспользоваться этим преимуществом, поэтому уровень витамина Д в популяции достаточно низок. По данным проведенных в

2020 году исследований, дефицит витамина D выявлен практически у половины детского населения нашего региона [2, 36]. Между тем, роль этого витамина в патогенезе БА известна. В недавних иранских исследованиях было показано, что у пациентов с БА уровень витамина D ниже, чем в контрольной группе, и падает с нарастанием тяжести заболевания [227]. Сходные результаты в том же году были получены индийскими исследователями [219]. Несколько более ранних эпидемиологических и *in vivo* исследований также обнаружили связь между низким уровнем витамина D в сыворотке крови и усилением воспаления, снижением функции легких, увеличением обострений и общим ухудшением состояния у пациентов с БА [73, 137, 224]. Позже в рамках метаанализа подтверждено достоверное снижение объективных показателей обструкции, таких как ОФВ₁, при низком уровне витамина D у детей и у взрослых, больных БА [182]. Ряд научных работ с использованием методов метаанализа показывает эффективность витамина D в комплексной терапии БА. Так, в одном из них изучалось 483 уникальных исследования, восемь из которых были рандомизированными и контролируруемыми (всего 1078 участников). Выявлено, что прием витамина D снизил частоту обострений БА у всех участников, требующих лечения системными кортикостероидами (скорректированное соотношение заболеваемости [aIRR] 0,74, 95% ДИ 0,56-0,97; $p=0,03$; 955 участников в семи исследованиях; высококачественные доказательства). Анализ частоты обострений у пациентов, получавших системные кортикостероиды, показал, что защитные эффекты терапии наблюдались у пациентов с исходным уровнем 25(ОН)D менее 25 нмоль/л (aIRR 0,33, 0,11-0,98; $p=0,046$; 92 участника в трех исследованиях; данные среднего качества), но не обнаружены у пациентов с более высоким исходным содержанием 25(ОН)D (aIRR 0,77, 0,58-1,03; $p=0,08$; 764 участника в шести исследованиях; доказательства среднего качества; $p=0,25$). Двухэтапный метаанализ не выявил признаков неоднородности эффекта ($I^2=0,0$, $p=0,56$) [269]. В одном из отечественных исследований показаны некоторые элементы терапевтического воздействия витамина D при его включении в комплексную терапию БА. Витамин D способствует положительным изменениям в цитокиновой сети в процессе лечения, что связано с его способностью регулировать функции Th₂ и, как результат, снижать синтез IL13 и 17, которые участвуют в патогенезе аллергии [1]. Таким образом, выявление уровня витамина D у

детей, страдающих БА, в нашем регионе и подтверждение его влияния на течение БА вызывает большой научный интерес и может иметь высокую клиническую значимость.

Соотношение и количество микроэлементов в организме человека также имеет региональные особенности и во многом зависит от биогеохимических характеристик региона. Влияние ряда микроэлементов на течение БА известно [274], но разные исследования приводят к неоднозначным результатам при попытке выяснить степень и направленность изменений. По данным иранских авторов средние уровни Zn и Se в сыворотке крови у пациентов с БА были ниже, чем у условно здоровых людей, составивших контрольную группу, а концентрация Cu в сыворотках крови пациентов была несколько выше, чем в контрольной группе [265]. Турецкие исследователи в последней работе отмечают снижение уровня Zn в крови у детей с БА в сравнении со здоровыми [272], а в более ранних исследованиях выявлено достоверное снижение уровня Cr, Se, Zn в сыворотке крови у детей с БА в сравнении со здоровыми, а уровень Cu в сыворотке крови у них был достоверно выше, чем в контроле [223]. Исследования индийских ученых также подтвердили достоверно более низкое содержание Zn и более высокое – Cu у пациентов с БА в сравнении со здоровыми [75]. В работе египетских исследователей, опубликованной в 2022 году, подтверждается достоверное ($p < 0,008$) снижение содержания Zn и Mg в сыворотке крови у пациентов с БА, в то время как уровни Fe и Cu в сыворотке крови у них были достоверно ($p < 0,016$) выше, чем у лиц, не страдающих этим заболеванием. При этом не было достоверных различий в содержании этих микроэлементов в сыворотке крови при различных степенях тяжести БА или контроля над ней [264]. С другой стороны, по данным одного из исследований с использованием методов метаанализа, включавшего 34 источника, не обнаружено достоверных различий в уровне Zn и Se между астмой и контрольной группой, но обнаружены в уровне Cu, при чем степень этих различий не одинакова для человечества в целом и для монголоидов, в частности, при этом выявлена достоверная разница в уровне Mg, которая не имеет этнических различий [229]. Более поздний метаанализ с включением 66 источников выявил, что пациенты с БА имеют достоверно более низкое содержание Zn (SMD = $-0,32$; 95 % CI $-0,48, -0,17$; I² = 90,9 %) и Se (SMD = $-0,32$; 95 % CI $-0,48, -0,17$; I² = 90,9 %) в сыворотке крови по сравнению со здоровыми лицами [102]. Таким

образом, очевидно, что характер воздействия микроэлементов на патогенез БА тесно связан с биогеохимическими характеристиками района проживания пациентов, поэтому особый интерес представляют исследования, характеризующие эту проблему в конкретном регионе.

Важную роль в развитии БА играет состояние клеточных мембран, в первую очередь мембран эпителиальных клеток бронхов [98]. Их непосредственная оценка в клинической практике весьма затруднена, так как требует проведения бронхоскопии с биопсией, инвазивной процедуры, особенно опасной для больных с гиперреактивностью бронхов, и поэтому применяющейся только при прямой угрозе жизни. В то же время существует способ оценки состояния клеточных мембран организма при исследовании трансформации эритроцитов – безъядерных клеток, мембрана которых является релевантной моделью состояния клеточных мембран организма в целом [27]. Эта модель успешно использовалась и при БА [13]. Представляется интересным оценить ее возможности в выявлении групп риска неконтролируемой БА.

Роль вирусной инфекции при БА давно известна, отражена в международных согласительных документах, в том числе, GINA последних редакций. Периодически появляются новые обобщающие работы по этой проблеме [218]. Однако особый интерес представляет влияние на развитие и течение БА пневмотропных персистирующих вирусов группы герпеса, таких как вирус Эбштейна-Барра и герпес вирус человека 6 типа. Они длительное время, часто пожизненно, персистируют в слизистой бронхов и неизбежно принимают участие в патоморфозе БА [31]. Выявлена достоверная разница в интерлейкиновом профиле у детей, страдающих БА, инфицированных вирусами типа герпес и без них, в частности, более высокое содержания TNF α , IL1, 2, 4, 10 и более низкое – IL6 и 8 [60]. В исследованиях показана большая встречаемость ВЭБ у детей с БА [167], подтверждена частота выделения ДНК вируса именно в бронхиальном эпителии у больных с БА в сравнении с контингентом, не имеющим этого заболевания, что свидетельствует о его активном размножении в органе мишени – бронхах [148]. Установлена положительная взаимозависимость между активацией ВЭБ и уровнем IgE у детей с БА [123]. Роль вируса герпеса человека 6 типа в патогенезе БА в доступной литературе отражена намного слабее, встречаются лишь единичные статьи, касающиеся этой

темы, где выдвигается тезис о протективной роли персистенции этого вируса. В эксперименте на мышах показано, что воздействие герпеса 6 типа значительно ингибировало выработку IL4, 5 и 3 в лаважной жидкости и в легочной ткани, подвергшейся воздействию вируса при БА [124].

БА у детей – в первую очередь атопическое заболевание, поэтому сенсibilизация к конкретным аллергенам лежит в основе ее патогенеза. Большой интерес представляет влияние спектра сенсibilизации на течение БА и ее контролируемость. Наиболее частым аллергеном при БА является клещ домашней пыли, это общеизвестный факт, подтвержденный согласительными документами, в том числе всеми редакциями GINA. У детей с БА он зарегистрирован с частотой около 90%, именно поэтому факт сенсibilизации к нему не может оказывать значимого воздействия на характер течения БА. Клещ домашней пыли является облигатным сапрофитом человека, поэтому сам факт его наличия во вдыхаемом воздухе не может выступать релевантным предиктором для вероятности развития БА. В связи с этим, больше внимания уделяют изучению частоты встречаемости и значимости в развитии БА других респираторных аллергенов. Так для спор грибов показано, что их содержание во внешней среде увеличивает вероятность развития БА как для детей, так и для взрослых [125, 139, 162, 189]. Достаточно давно известно, что сенсibilизация к спорам грибов вызывает более тяжелое течение БА в сравнении с другими аллергенами [246]. Более поздние исследования показали, что не только сенсibilизация к плесени, но и к шерсти домашних животных, тараканам и сорным травам, в частности к амброзии, вызывает более тяжелое течение БА, чем к другим аллергенам, в первую очередь к клещу домашней пыли [161]. Выявлена четкая связь концентрации спор грибов в окружающей среде с нарастанием клинических астмоподобных симптомов у детей [91]. В недавних исследованиях подтверждено, что концентрация спор грибов в домашней пыли влияет не только на степень тяжести, но и на контролируемость БА [183]. В патогенетических моделях на животных продемонстрирован тот факт, что именно грибковая сенсibilизация вызывает наиболее выраженную эозинофильную инфильтрацию слизистой бронхов [252].

Очевидно, что вдыхание пыльцы приводит к обострению астмы у сенсibilизированных ею пациентов, в том числе детей [117]. Это подтверждается и недавними

метаанализами, где показано влияние концентрации пыльцы на частоту и тяжесть обострений БА [228]. При исследовании влияния сенсibilизации к пыльце сорных трав было установлено, что у пациентов с чувствительностью к этому аллергену стенка бронхов несколько тоньше, чем у пациентов, чувствительных к клещу домашней пыли, что видимо связано с меньшим суммарным временем воздействия в течение года [68].

Таким образом, мы видим, что различия в течении тяжести и патогенезе БА вызвано сенсibilизацией к тем аллергенам, которые зависят от места проживания пациента и, в некоторой мере, его социально-экономических условий, именно поэтому большой интерес представляют локальные исследования этих факторов в конкретных регионах. Территория вблизи реки Амур регулярно затопляется, в результате чего формируются условия, благоприятные для неконтролируемого распространения грибковых аллергенов снаружи и внутри, во влажных и плохо проветриваемых домах. Катастрофическое наводнение в августе-сентябре 2013 года было беспрецедентно мощным и затяжным, с огромным экономическим ущербом, оценка его последствий, с точки зрения изменения спектра сенсibilизации у больных с БА, представляется важной для детской аллергологии и педиатрии в целом. Кроме того, Приамурье отличается большим разнообразием растительности, в том числе ветроопыляемой, в последние годы еще более увеличивающимся в связи с инвазией не свойственных местности видов, таких как амброзия, поэтому оценка воздействия спектра сенсibilизации на течения БА у детей Приамурья необходима и интересна.

Из вышеизложенного очевидно, что на патогенез, течение, и соответственно, тяжесть и восприимчивость к терапии оказывает влияние множество разнонаправленных эндо- и экзогенных факторов, что сводится к контролю над БА. Они складываются в уникальную мозаику для каждого пациента. Достаточно глубокое их изучение открывает перспективы к персонализации диагностики, профилактики и терапии БА.

1.4. Нейросети в медицинском прогнозировании

Прогнозирование течения того или иного заболевания является неотъемлемой частью работы любого врача и становится особенно актуальными, когда речь

идет о хронических, рецидивирующих заболеваниях, характеризующихся определенной стадийностью. Методы математической статистики пытались использовать для ускорения и объективизации этого процесса с момента их возникновения. Однако, как правило, на развитие патологических изменений влияют не столько отдельные факторы и вызываемые ими нарушения в конкретных цепочках реализации патологии, сколько их сочетания, приводящие к интерференции сигналов в регуляторных сетях организма. Большую роль играют индивидуальные особенности больного, возраст, динамика развития заболевания и другие ситуативные показатели. Необходимо также учитывать объем статистического материала (малая выборка, большое число параметров), потерю информации, пропуски данных и т. д. В связи с этим методы классической статистики при поиске конкретных факторов риска и оценки их влияния на патологический процесс оказываются недостаточно эффективными. В итоге результат прогноза, проводимого этими методами может быть недостоверен [37]. В таких ситуациях, с нечеткими и взаимодействующими параметрами, с нелинейным характером их влияния и взаимодействия, заведомой неполнотой анализируемых данных и неочевидным алгоритмом получения результата, наиболее оптимальным статистическим инструментом прогноза являются обучающиеся нейронные сети.

Задача нейронной сети состоит в том, чтобы построить наиболее адекватную зависимость между входами и выходом, путем подгонки и композиции различных функций по имеющимся примерам исходных данных (наблюдениям).

Нейронные сети позволяют решать основные прикладные задачи, включая регрессию и классификацию. Регрессионные задачи рассматривают взаимосвязи между рядом входных переменных X и непрерывными выходными переменными T (целевые переменные). В задачах классификации для заданного множества входных значений ставится в соответствии метка класса из категориальной целевой переменной. Прогнозирование развития большинства заболеваний относится именно к задачам классификации, поскольку целевые переменные прогноза являются по своей природе категориальными – степень тяжести, наличие осложнений и их конкретный тип, степень контроля над заболеванием.

Для задачи классификации используют многослойный персептрон (МП) (Рисунок 4). Элемент сети строит взвешенную сумму своих входов с поправкой в виде слагаемого и затем пропускает эту величину активации через передаточную функцию, и таким образом получается выходное значение этого элемента. У каждого нейронного слоя сети МП имеется своя поправка к входному сигналу. Она представляется в виде дополнительного нейрона (пороговый элемент) с функцией активации тождественно равной 1. Сигнал порогового элемента, как и сигнал других нейронов, прибавляется к входному сигналу со своим весом – порогом. Элементы организованы в послонную топологию с прямой передачей сигнала. Такую сеть легко можно интерпретировать как модель вход-выход, в которой веса и пороговые значения (смещения) являются свободными параметрами модели. Такая сеть может моделировать функцию практически любой степени сложности, причем число слоев и число элементов в каждом слое определяют сложность функции. Определение числа промежуточных слоев и числа элементов в них является важным вопросом при конструировании МП. Сложность нейронной сети в принципе и измеряется числом нейронов на скрытом слое. Чем больше нейронов в нейронной сети, тем более гибкой и сложной представляется система. Гибкие нейронные сети могут быть использованы для аппроксимации функции любой сложности, описывающей связь между входными и выходными переменными. Поэтому, чтобы моделировать различные зависимости, важно иметь подходящую гибкость нейронной сети с достаточным числом нейронов на скрытом слое.

Помимо заданной сетевой архитектуры, нейроны обладают функциями активации, которые преобразуют сигналы, входящие в нейрон с предыдущего слоя, используя математические функции. Тип функции активации оказывает достаточное влияние на производительность нейронной сети. Входные нейроны обычно не имеют функции активации, они используют тождественную функцию. Для МП с двумя слоями (МП2) рекомендуется использовать гиперболическую функцию, хотя в некоторых случаях применяют другие её типы (логистическую, экспоненту и др.). Например, для задач классификации используется функция софтмакс – экспоненциальные функции, выходы которых нормируются так, чтобы сумма всех

активаций слоя равнялась 1.0. Используются в выходных слоях нейронных сетей, сконструированных преимущественно для задач классификации, но не только, таким образом, чтобы выходы можно было интерпретировать как вероятности принадлежности к классу.

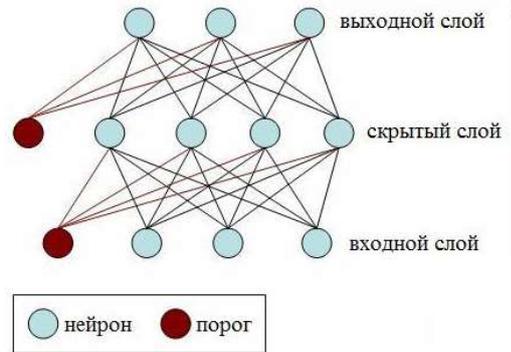


Рисунок 4 – Схематическое изображение полносвязной двухслойной нейронной сети МП2, в которой имеется три входные переменные, четыре скрытых элемента (нейрона) и три выходные переменные. Скрытый и выходной слои содержат дополнительный элемент – порог. Пороговый элемент – это нейрон, излучающий сигнал силой 1.

После того как выбрана архитектура нейронной сети (тип, функции активации и т. д.), в качестве настраиваемых параметров модели выступают веса, связывающие нейроны входные, скрытого слоя и выходные. Процесс настройки этих параметров, при котором нейронная сеть может подгонять лежащую в основе функциональную зависимость между входными переменными X и целевыми переменными T , называется обучением. По сути, этот процесс представляет собой подгонку модели, которая реализуется с помощью обучающих данных. Так как для обучения нейронных сетей необходим итерационный алгоритм, в котором на каждой итерации происходит настройка весов, то вначале для весов необходимо задать некоторые приемлемые начальные значения. Начальные значения могут иногда влиять не только на качество решения, но также и на время работы алгоритма обучения. Важно инициализировать веса малыми значениями, чтобы в начале обучения сеть вела себя как линейная модель, а затем постепенно увеличивала значения весов и

достаточно точно подгоняла модель к данным.

До тех пор, пока нейронная сеть не будет обучена на примерах, составляющих обучающую выборку, сеть бессмысленно использовать для предсказания. Обучающая выборка, как правило, состоит из пар входных и целевых значений, по которым сеть настраивает модель в процессе обучения. Можно интерпретировать входные значения как «вопросы» и целевые значения как «ответы». Таким образом, для каждой входной пары нейронная сеть учится давать правильные ответы на заданные вопросы. Однако для каждого входного значения в таком представлении нейронной сети необходимо попытаться угадать целевое значение, используя текущее состояние (значение) весов, и затем оценивать ее производительность, используя функцию ошибок выходных значений сети от целевых. Если производительность недостаточно приемлема, то веса нейронной сети перенастраиваются, чтобы давать правильные (или более корректные) ответы по сравнению с предыдущей попыткой

Чаще всего процесс обучения является в несколько зашумленным (т. е. некоторые ответы нейронной сети могут на предыдущей итерации алгоритма иметь значение более близкое к истинному нежели на текущей итерации), но в среднем величина ошибки уменьшается по мере обучения сети. Способ перенастройки весов определяется алгоритмом обучения, который, подобно учителю, обучает нейронную сеть изменять свои веса для получения лучших прогнозов при любом множестве обучающих примеров [6, 12, 23, 37, 43, 65].

1.5. Клинико-иммунологические эффекты бурых водорослей

Морские водоросли с древних времен широко применялись человеком в его повседневной жизни, они включались в рацион питания, использовались как удобрения, лекарство и как косметическое средство. Установлено, что активные элементы морских водорослей всасываются практически полностью, поскольку их состав близок к плазме человека. Набор и соотношение элементов в составе водорослей близок к таковому в морской воде, и в теле человека, вследствие этого

водоросли способны возмещать нехватку элементов и содействовать нормализации обмена веществ. Также антиоксидантная активность, которой обладают полиненасыщенные жирные кислоты бурых водорослей, превышает активность витамина Е в несколько раз. Эти растения содержат необходимые человеку моно- и дийодтирозин, Токсичные продукты метаболизма, радионуклиды и соли тяжелых металлов могут быть удалены из организма человека при участии полисахаридов водорослей [50].

Основной химический состав бурых водорослей может быть представлен следующими группами компонентов: минеральные вещества, в том числе микроэлементы; органические вещества: липидно-пигментный комплекс (жирные кислоты, пигменты), полифенольные вещества, азотсодержащие вещества (белки и свободные аминокислоты), структурные углеводы (альгиновые кислоты, фукоидан, целлюлоза), запасные углеводы (маннит, ламинаран) [30].

Водоросли обладают избирательной кумулятивной способностью, в результате чего в их слоевищах накапливается разнообразный комплекс микроэлементов, концентрация некоторых из них в тканях в десятки (кальций), сотни (бром, хром) и тысячи (йод, цинк, барий) раз превышает их содержание в морской воде [33], причем минеральные вещества в биомассе находятся в виде солей и органических комплексов что облегчает их усвоение человеческим организмом (Рисунок 5).

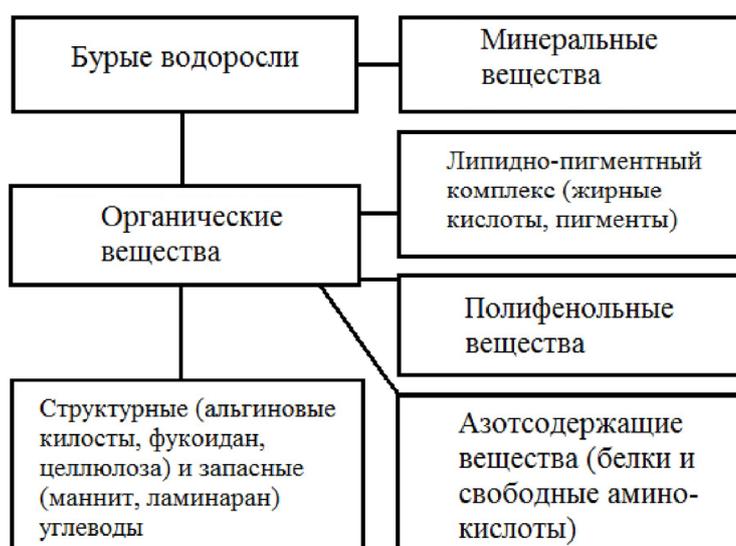


Рисунок 5 – Основной химический состав бурых водорослей

Содержащиеся в бурых водорослях полисахариды не только обладают способностью к сорбции радионуклидов, тяжелых металлов и бактерий, нормализации липидного обмена, активации секреторной и моторной функций кишечника [72, 165], но и могут модулировать различные свойства иммунной системы [8, 20]. Однако конкретные механизмы реализации их иммуномодулирующего действия на различных уровнях регуляции иммунного ответа требуют дальнейшего уточнения.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на базе клиники (педиатрическое и консультативно диагностическое отделение) и лаборатории комплексных методов исследований бронхолегочной и перинатальной патологии Хабаровского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» - Научно-исследовательского института охраны материнства и детства (директор, д-р. Мед. Наук Лебедько Ольга Антоновна) в период с 2013 по 2021 год.

2.1. Характеристика обследованных пациентов, концептуальные направления и этапы исследования

Основой для данного исследования послужило обобщение, анализ и оценка данных, полученных при обследовании, курации (в том числе в условиях стационара) и диспансерном наблюдении детей с БА, обращавшихся за помощью в клинику НИИ ОмиД в период с 2013 по 2021 год. За это время было 4431 обращений (первично и в динамике) 538 пациентов по поводу БА с подтверждением этого диагноза, принятых в последующем под клиническое наблюдение, проживающих в Дальневосточном федеральном округе (Хабаровский край, Еврейская автономная область, Амурская область). Чуть более половины из них (54,1%) горожане, остальные (45,9%) проживают в сельской местности. Средний возраст детей составил $7,3 \pm 1,6$ года, 55,4% – мальчики, 44,6% – девочки. У 40,3% из них была легкая степень БА, у 47,5% средней тяжести и у 12,2% – тяжелое течение заболевания. Средний астматический стаж на момент поступления по данным анамнеза составил $42 \pm 7,1$ месяцев. У подавляющего большинства пациентов (85,1%) отмечается сенсibilизация к клещу домашней пыли, второе место по частоте сенсibilизации занимает полынь (20,6%), при этом почти в 2/3 случаев (61,3%) отмечается сенсibilизация к трём и более аллергенам. В 71,1% случаев БА протекала на фоне иных аллергических заболеваний, из которых наиболее часто (46,5% случаев) встречался

аллергический ринит. В 56,3% случаев имела место наследственная отягощенность по атопии, а почти у 1/3 больных (29,8%) среди родственников были больные с БА. У большинства из детей (84,9%) имеется сопутствующая соматическая патология, чаще всего (51,9%) она представлена нейроциркуляторной дистонией, а именно функциональной кардиопатией. Все пациенты получали консультацию Автора как врача аллерголога-иммунолога в стационарных условиях или в ходе амбулаторного осмотра. На основе многолетней научной и практической деятельности была создана концепция оценки формирования неконтролируемого течения БА (Рисунок 6) у детей, ставшая базой для проведения данной работы.



Рисунок 6 – Концептуальная схема оценки формирования неконтролируемого течения БА у детей

Исходя из данной концепции был разработан, утвержден и принят к исполнению план исследования, которое носит наблюдательный, проспективный характер и включает в себя следующие основные этапы (Таблица 8).

Таблица 8 – Объем основных этапов исследования

		n
	Общее число обследованных детей по всем этапам	1234
I этап	Динамическое наблюдение больных с БА, обратившихся в клинику НИИ ОмиД за период 2013-2021 гг., обследование по стандартам ОМС: число пациентов, число случаев	538 4431
	Исследование взаимосвязи частоты обострений БА и температурных характеристик климата в 2013-2014 гг. число пациентов число случаев, число обострений	136 1112 310
	Опрошено по международной методике ISAAC 5,9% школьников Хабаровского края данной возрастной группы в 2018-2019 гг.	696
II этап	Углубленное обследование с целью выявления факторов и маркеров неконтролируемого течения БА в период 2017-2021 гг., исходя из предложенной концептуальной модели	167
	Основные группы: контролируемая БА,	70
	частично контролируемая и неконтролируемая БА	97
	Группа сравнения (условно здоровые дети, сопоставимые по полу и возрасту)	40
III этап	Исходя из выявленных факторов риска неконтролируемого течения БА, было проведено пилотное исследование (2020-2021 гг.) по использованию функционального продукта питания на основе дальневосточных бурых водорослей у детей с БА.	56
	Основная группа	20
	Группа сравнения	36

I этап:

1.1. Для формирования групп дальнейшего исследований использованы данные, полученные при обследовании детей с БА, наблюдавшихся в клинике НИИ ОмиД в рамках стандартов ОМС (клинико-anamnestическое, определение функции внешнего дыхания (ФВД), определение уровня IgE общего и специфических).

1.2. Исследование взаимосвязи частоты обострений БА и температурных характеристик климата в 2013-2014 гг.

1.3. Для уточнения реальной частоты встречаемости астмоподобных симптомов в Хабаровском крае был проведен стандартизированный опрос по методике ISAAC для учащихся 13-14 лет.

II этап:

С целью выявления факторов и маркеров неконтролируемого течения БА, исходя из предложенной концептуальной модели, в период 2017-2021 гг. проводилось дополнительное комплексное обследование детей: генотипирование TLR, цитокинов, системы детоксикации; уровень сывороточных цитокинов; иммунограмма; определение мембранного потенциала митохондрий иммунокомпетентных клеток крови; содержание витамина D в сыворотке крови; микроэлементов в сыворотке и форменных элементах крови; показатели трансформации эритроцитов, спонтанные, стимулированные Pb, Se; ДНК ВЭБ, вируса герпеса человека 6 типа в мазках из зева; расширенный, стандартизированный спектр специфических IgE.

В результате сформированы две основные группы: контролируемое течение БА, частично контролируемое и неконтролируемое течение БА согласно критериям Клинических рекомендаций [26].

Критерии включения в эти группы: подтверждение диагноза БА, наличие доказательств ее атопического генеза – сенсibilизация к респираторным аллергенам.

Критерии исключения: наличие других бронхолегочных патологий, наличие острых инфекционных заболеваний на момент обследования.

Группу сравнения по некоторым показателям составили условно здоровые дети, обследование которых включало определение полиморфизмов гена IL4 – C589T и TNF α – G308A, субпопуляций лимфоцитов, уровня микроэлементов в сыворотке и форменных элементах крови, показателей трансформации эритроцитов.

III этап:

На третьем этапе, исходя из выявленных факторов риска неконтролируемого течения БА, было проведено пилотное исследование (2020-2021 гг.) по использованию функционального продукта питания на основе дальневосточных бурых водорослей у детей с БА.

Проведение исследований и отбор групп проводился в период с 21.01.2021 по 18.06.2021 гг. Обследованы дети с БА, поступившие на лечение в педиатрическое отделение клиники НИИ ОмиД и обратившиеся на амбулаторный прием в клинико-

диагностическое отделение, в возрасте от 5 до 17 лет. Диагностика проводилась в соответствии с классификацией основных клинических форм заболеваний у детей в соответствии с МКБ-10.

Средний возраст детей составил $12,17 \pm 0,83$ года. Родители всех пациентов были проинформированы о цели исследования, получено их добровольное информированное согласие на проведение диагностических и корригирующих мероприятий. Верификация диагноза осуществлялась на основании клинико-анамнестических данных, современных лабораторно-инструментальных исследований.

Пациенты были разделены на 2 группы;

1 группа, основная – дети с БА, получавшие дополнительно к стандартной терапии функциональный продукт питания;

2 группа, сравнения – дети с БА, получавшие только стандартную терапию.

Дополнительная коррекция включала продукт функционального питания для детей – напиток безалкогольный «ДороМарин» на основе бурых водорослей – ламинарии дальневосточной гомогенизированной с добавлением яблочного или брусничного сока (Разрешительные документы: Сертификат соответствия № РОСС RU.НВ61.Н11693 от 11.08.2020 г.; Свидетельство о государственной регистрации № KZ.16.01.98.007.E.000627.07.18 от 31.07.2018 г., выданного на основе Экспертного заключения Экспертного совета по регистрации биологически активных добавок к пище, детского питания, пищевых добавок и других продуктов № 12/ЭК-0999-18 от 27.05.2018 г.).

Функциональный продукт питания «ДороМарин» использовался по следующей схеме в течение 2-х месяцев:

- детям с массой тела 20-50 кг – 10 мл х 2 раза в день утром за 20-30 мин. До еды и вечером через 1,5-2 часа после еды;
- более 50 кг – 15 мл х 2 раза в день утром за 20-30 мин. До еды и вечером через 1,5-2 часа после еды.

Для регистрации каких-либо побочных явлений прием продукта был начат в условиях круглосуточного или дневного стационара клиники с последующим продолжением употребления в домашних условиях под контролем родителей. Для

оценки эффективности коррекции обменных и других нарушений метаболического и иммунного плана было проведено обследование детей в динамике по тем же клинико-лабораторным параметрам.

Через 2 месяца получения продукта проведено повторное обследование (общий анализ крови, определение сывороточного уровня цитокинов, иммунограмма, определение мембранного потенциала митохондрий иммунокомпетентных клеток крови, выявление ДНК ВЭБ и вируса герпеса человека 6 типа в мазках из зева).

2.2. Социологические методы исследования (анкетирование)

Проведение стандартизированного опроса осуществлялась по методике Международного исследования астмы и аллергии у детей – International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) с использованием стандартного опросника в русском авторизованном переводе. Исследование по опроснику ISAAC проводилось в период с апреля 2018 года по июнь 2019 года после получения разрешения от департаментов образования г. Хабаровска и Хабаровского сельского района. Родители каждого из участников опроса дали письменное персональное согласие на участие ребенка в нём. Опрос производился в школах этих муниципалитетов под непосредственным наблюдением исследователя, в связи с чем на вопросы ответили все ученики, получившие анкеты. В исследование было включено 696 школьников в возрасте 13-14 лет, из которых 556 проживали в городе Хабаровске, и 140 человек – в Хабаровском сельском районе, что примерно соответствует соотношению численности этих муниципалитетов. Случайным образом было выбрано две крупные школы в городе Хабаровске и 5 школ в Хабаровском сельском районе, после чего проведен сплошной опрос всех учащихся этих школ в возрасте 13-14 лет, это позволило рандомизировать исследуемую группу. Из опрошенных школьников 345 составили мальчики, 351 – девочки. Опрос проводился по стандартизированной методике ISAAC для возрастной группы 13-14 лет. Он подходит для проведения глобальных сравнений в различных географических районах с различными языками, существует стандартизованная адаптация опросника ISAAC для русского

языка [54].

В исследуемых группах заполнялась анкета, состоящая из четырех блоков. Первый блок - паспортная часть – фамилия, имя, отчество, возраст, пол, национальность, № школы, класс и дата проведения опроса, второй блок – 8 вопросов, отражавших наличие и интенсивность астмоподобных симптомов, третий – 7 вопросов о симптомах, характерных для аллергического ринита (назальных – ринорея, заложенность и зуд носа, вненазальных – конъюнктивит, системных – влияние на ежедневную активность), четвертый – 5 вопросов о симптомах атопического дерматита (характер и локализация сыпи, зуда).

Анкетирование проводилось непосредственно автором и другими научными сотрудниками НИИ ОмиД, имеющими медицинское образование, в случае возникновения у опрашиваемых каких-либо вопросов давались разъяснения.

Далее приводим полный текст примененного опросника [54]:

УВАЖАЕМЫЙ ШКОЛЬНИК!

Просим Вас внимательно прочитать все вопросы и подчеркнуть правильный ответ. Если Вы не знаете ответа – не подчеркивайте ничего.

БЛАГОДАРИМ ЗА УЧАСТИЕ В ОБСЛЕДОВАНИИ.

1. Школа № Класс

Фамилия, имя, отчество _____

2. Дата заполнения день, месяц, год ____ ____ ____

Дата рождения день, месяц, год ____ ____ ____

3. Пол: мужской женский

4. Национальность _____

5. У Вас когда-нибудь были затрудненное шумное хрипящее дыхание, свисты в грудной клетке?

ЕСЛИ ВЫ ОТВЕТИЛИ «НЕТ», пожалуйста, перейдите к вопросу 10

да нет

2.5.5 За последние 12 месяцев у Вас были затрудненное хрипящее дыхание,

свисты в грудной клетке? ЕСЛИ ВЫ ОТВЕТИЛИ «НЕТ», пожалуйста, перейдите к вопросу 10

да нет

2.5.6 Сколько приступов затрудненного шумного хрипящего дыхания у Вас было за последние 12 месяцев?

ни одного от 1 до 3 от 4 до 12 более 12

2.5.7 За последние 12 месяцев как часто, в среднем, Ваш сон был нарушен из-за затрудненного шумного хрипящего дыхания?

Никогда не просыпался от этого Менее, чем одну ночь в неделю

Одну и более ночей в неделю

2.5.8 За последние 12 месяцев было ли затрудненное хрипящее шумное дыхание достаточно тяжелым, чтобы ограничить Вашу речь до одного или двух слов между вдохами?

да нет

10. У Вас когда-нибудь были приступы бронхиальной астмы?

да нет

11. За последние 12 месяцев в Вашей грудной клетке были слышны хрипы во время или после физических упражнений, занятий физкультурой?

да нет

12. За последние 12 месяцев у Вас был сухой кашель по ночам, кроме кашля, связанного с простудой или инфекцией дыхательных путей?

да нет

ВОПРОСЫ ЭТОЙ СТРАНИЦЫ КАСАЮТСЯ ПРОБЛЕМ, ВОЗНИКАВШИХ, КОГДА У ВАС НЕ БЫЛО ПРОСТУДЫ ИЛИ ГРИППА

13. У Вас когда-нибудь были чихание, насморк или заложенный нос, когда у Вас НЕ БЫЛО простуды или гриппа?

ЕСЛИ ВЫ ОТВЕТИЛИ «НЕТ», пожалуйста, перейдите к вопросу 18

да нет

14. За последние 12 месяцев у Вас были чихание, насморк или заложенный нос, когда у Вас НЕ БЫЛО простуды или гриппа?

ЕСЛИ ВЫ ОТВЕТИЛИ «НЕТ», пожалуйста, перейдите к вопросу 18

да нет

15. За последние 12 месяцев сопровождалось ли заболевание носа зудом глаз и слезотечением?

да нет

16. В какой из прошедших 12-й месяцев возникало это заболевание носа?

Январь, Февраль, Март, Апрель, Май, Июнь, Июль Август,

Сентябрь, Октябрь, Ноябрь, Декабрь

17. За прошедшие 12 месяцев как сильно это заболевание носа мешало Вашей ежедневной активности ?

Никогда Немного Умеренно Сильно

18. У Вас когда-нибудь были сенная лихорадка, поллиноз, сезонный ринит?

да нет

19. У Вас когда-нибудь была зудящая сыпь, которая появлялась и исчезала по крайней мере в течение 6 месяцев?

ЕСЛИ ВЫ ОТВЕТИЛИ «НЕТ», пожалуйста, перейдите к вопросу 25

да нет

20. Отмечалась ли эта зудящая сыпь за последние 12 месяцев?

ЕСЛИ ВЫ ОТВЕТИЛИ «НЕТ», пожалуйста, перейдите к вопросу 25

да нет

21. Эта зудящая сыпь поражала ли какие-нибудь из следующих мест: локтевые сгибы, позади колен, впереди лодыжек, под ягодицами, вокруг шеи, глаз, ушей?

да нет

22. За последние 12 месяцев исчезала ли эта сыпь полностью?

да нет

23. За последние 12 месяцев как часто, в среднем, Вы просыпались ночью от этой зудящей сыпи?

Никогда за последние 12 месяцев Менее, чем одну ночь в неделю

Одну и более ночей в неделю

24. У Вас когда-нибудь были экзема, нейродермит, atopический дерматит?

да нет

2.3. Клинические методы исследования

Пациентам проводилось стандартное клиническое обследование, включающее сбор анамнеза, осмотр, физикальные методы, диагноз «Бронхиальная астма», степень тяжести и степень контроля над заболеванием устанавливались согласно критериям текущих редакций GINA [110], Национальной программы «Бронхиальная астма у детей: Стратегия лечения и профилактики» [35] и «Клинических рекомендаций по диагностике и лечению БА» [26].

При установлении тяжести заболевания использовались критерии для первичной диагностики и для детей, получающих базисную терапию [26]. В целях дальнейшей статистической обработки в данной работе тяжесть заболевания оценивалась в баллах, где легкой интермиттирующей астме соответствовал 1 балл, легкой персистирующей – 2 балла, астме средней тяжести – 3 балла, астме тяжелого течения – 4 балла.

Для определения уровня контроля применялись опросник АСТ (Asthma Control Test) и критерии, приведенные в «Клинических рекомендациях по диагностике и лечению БА» [26]. В целях дальнейшей статистической обработки степень контроля кодировалась следующим образом: полный контроль – 1, частичный контроль – 2, отсутствие контроля – 3.

Оценка требуемой дозы топического глюкокортикостероида (ТГКС) для обеспечения контроля БА проводилась по флутиказону с пересчетом иных препаратов по уровню биоэквивалентности (GINA 2021).

2.4. Инструментальные методы исследования

Всем пациентам старше 5 лет на момент обращения или поступления в

клинику НИИ ОмиД проводилось определение функции внешнего дыхания. Вентиляционную функцию легких оценивали методом спирографии на аппарате MasterScreen (Германия) с соблюдением требованием стандартов Европейского респираторного общества и Американского торакального общества. Измеряли следующие параметры кривой «поток-объем» форсированного выдоха: жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха в первую секунду (ОФВ₁), пиковая объемная скорость выдоха (ПОС), максимальная объемная скорость на уровне 25, 50 и 75% выдоха (МОС_{25, 50, 75}). С целью определения обратимости бронхиальной обструкции проводили бронходилатационные пробы с ингаляцией β₂-агониста – сальбутамола. Параметры кривой поток-объем форсированного выдоха регистрировали до и после ингаляции соответствующего препарата. Пробу считали положительной при величине прироста ОФВ₁ равной или превышающей 12% от исходной [130].

2.5. Лабораторные методы исследования

Забор крови для всех проводимых исследований II-III этапа осуществлялся в процедурном кабинете клиники НИИ ОмиД из локтевой вены, утром натощак.

2.5.1 Общеклинические методы исследования

- гематологические исследования периферической крови (ОАК) на автоматическом анализаторе «МЕК – 7300 К» (Япония), микроскопия мазка с подсчетом процентного содержания лейкоцитов различных генераций осуществлялась на тринокуляре «Leica DM – 1000» (Германия) с объективом 40x20 и окуляром 10x20.

2.5.2 Генетические методы исследования

Изучение полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы и генов системы детоксикации.

Выявлялись следующие мононуклеотидные замены в генах, кодирующих распознающие молекулы иммунной системы (Toll-подобные рецепторы): TLR2-Arg753Glu (rs5743708), TLR4-Asp299Gly (rs4986790), TLR4-Thr399Ile (rs4986791), TLR9-T1237C (rs5743836), TLR9-A2848G (rs352140); генах интерлейкинов: IL4-

C589T (rs2243250), IL6-C174G (rs1800795), IL10-G1082A (rs1800896), IL10-C592A (rs1800872), IL10-C819T (rs1800871), IL12B-A1188C (rs3212227), TNF α -G308A (rs1800629), моноклеотидные замены и делеции генов системы детоксикации: GSTM, GSTT, GSTM/GSTT, GSTP1 Ile105Val (rs1695), GSTP1 Ala114Val (rs1138272). Определение полиморфизмов проводилось методом ПЦР с использованием для выделения ДНК и амплификации наборов НПФ Литех (г.Москва), учет продуктов амплификации проводился методом электрофореза в агарозном геле.

2.5.3 Иммунологические

- Исследование лимфоидных популяций осуществляли на цитометре FACSCalibur «Becton Dickinson». Панель моноклональных антител («BD») состояла из 7 параметров: CD3+/CD45+ (зрелые Т-лимфоциты), CD19+/CD45+ (зрелые В-лимфоциты), CD3+/CD4+/CD45+ (Т-хелперы/ индукторы), CD3+/CD8+/CD45+ (Т-киллеры/цитотоксические), CD3+/CD25+ (маркер лимфоцитарной активации), CD(16+56)/CD45+ (натуральные киллеры).

- Показатели активности нейтрофилов изучали в спонтанном и стимулированном тестах фагоцитарной активности с частицами латекса и в тестах восстановления нистросиний тетразолий тест (НСТ) в формазан («ФАН-тест», «НСТ-тест», «Реа-комплекс», г. Чита).

- Для определения уровней IgA, M, G, E общего и специфических, IL4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 18 и TNF α в сыворотке крови применяли иммуноферментный метод с использованием тест-систем «Вектор-Бест», определение проводилось посредством автоматического спектрофотометра Lazurite «Вектор-Бест».

- Оценка функционально-энергетического статуса иммунокомпетентных клеток (ИКК) периферической крови проводилась методом иммунофенотипирования с определением мембранного потенциала митохондрий (МПМ) на основе регистрации локальных изменений трансмембранного электрохимического потенциала и визуализации митохондрий с низким и высоким потенциалом мембраны. Процентное содержание клеток со сниженным потенциалом митохондриальной мембраны в общей популяции лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов периферической крови определялось на цитометре BD FACS Calibur (США) в программе Cell

Quest Pro в гепаринизированной крови с использованием красителя JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимида-золкарбоцанин иодид/хлорид) (Vector Dikcenson, США). JC-1 является катионным красителем, поглощение которого митохондриями напрямую связано с величиной МПМ. Единица измерения энергообеспеченности ИКК – это процент клеток со сниженным МПМ каждого пула (лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов).

2.5.4 Биохимические методы исследования

Для количественного определения общего 25-ОН витамина D (Витамин D₂/D₃) методом ИФА в сыворотке крови (с ЭДТА) использовался набор реагентов DRG (Техсистемс, ЕИА-5396, Россия).

2.5.9 Спектрометрические методы исследования

Микроэлементный состав определялся отдельно в сыворотке и форменных элементах крови методом пламенной спектрометрии. Такой подход обоснован недостаточной и малоинформативной оценкой содержания микроэлементов только в биологических жидкостях. Форменные элементы крови, представляя тканевой уровень, являются более диагностически значимыми. Атомно-эмиссионный анализ до сих пор занимает ведущее место в ряде самых эффективных и массовых методов химического анализа. Широта областей применения атомно-эмиссионной спектрометрии объясняется ее исключительными аналитическими характеристиками: позволяет одновременно определять большое число элементов (до 70), обладает низкими пределами обнаружения (10^{-10} г/л), высокой воспроизводимостью. Подготовку проб проводили мокрым озолением. Полученный раствор анализировался на атомно-эмиссионном спектрофотометре «Hitachi – 900» (Япония). Результаты получены в мг/л и мг/кг с последующим переводом по системе СИ (мкмоль/л). Исследовались содержания ряда микроэлементов (Ni, Co, Cu, Li, Mn, Se, Pb, Zn, Fe).

2.5.10 Методы визуализации

Для оценки состояния клеточных мембран в организме использовалась модель мембраны эритроцита, исследуемая количественным методом определения трансформации эритроцитов в нативном мазке под световым микроскопом. Способ позволил при минимуме применяемых реактивов получить максимум информации

морфологического спектра. Положительным является использование малого количества крови для постановки реакции. Визуализация цитологических изменений морфологии клеток регистрировалась в виде показателей трансформации (спонтанной и при воздействии солей металлов Pb и Se *in vitro*), вычислении их индексов (ИТ – индекс трансформации и ПКТ – показатель компенсации трансформации). Усовершенствование данного метода подтверждено патентом на изобретение (№ 2332668 РФ от 27.08.2008 «Способ определения чувствительности мембран эритроцитов к воздействию тяжелых металлов») с вычислением коэффициента чувствительности (Кчм) и показателя стабильности (Псм) мембран эритроцитов.

Свинец выбран в качестве типового токсиканта, а селен – как эссенциальный элемент, стабилизирующий клеточные мембраны, недостаточность которого имеет место в нашем регионе.

2.5.11 Вирусологические методы исследования

Мазок из ротоглотки осуществлялся утром, натощак, зондом. ДНК возбудителей вирусных инфекций в мазках из ротоглотки определяли методом ПЦР с применением тест-системы ООО «ИнтерЛабСервис» (г. Москва) «Амплиценс®EBN/CMV/HHV6 – скрин-F1. Детекцию проводили в режиме реального времени с использованием термоциклера С 1000 Touch CFX96 (BIO-RAD США). Выявляли ДНК Human herpes virus 4 type (EBN) – вирус Эпштейна Бара, Human herpes virus 6 type (HHV6) – герпеса человека 6 типа.

2.6. Климатологические методы исследования

Параллельно исследовалось влияние климата, а именно температурного режима окружающего воздуха на частоту обострений БА. Используются погодные данные о среднесуточной температуре воздуха на метеостанции в Хабаровске (индекс ВМО 31735) за период с 01 января 2013 года по 31 декабря 2014 года, полученные из Российского научно-исследовательского института гидрометеорологической информации-Всемирного центра данных, расположенного в г. Обнинске, Россия (<http://meteo.ru/data>). Среднесуточную температуру воздуха рассчитывали с

использованием температурных интервалов в 3 часа. Рассчитывались суточные изменения среднесуточных температур dT_{mean} ; оценивалась частота дней в каждом месяце со средними изменениями температуры более 95-го перцентиля (F_{mean}). Оценка метеорологических показателей осуществлялась при содействии ведущего научного сотрудника лаборатории региональных-экономических систем ИКАРП ДВО РАН Елены Анатольевны Григорьевой.

В этот же период отслеживалась частота обострений БА среди пациентов, наблюдавшихся в клинике НИИ Омид. Учитывались обострения заболевания, различной степени тяжести у детей (4-14 лет) и подростков (15-17 лет) по стандартным критериям. Общее количество обострений за этот период времени составило 310 случаев, из них 153 случая – в 2013 году и 157 – в 2014 году. Эти ежедневные данные были усреднены для каждого месяца двух лет отдельно и сведены в Индекс сезонности (IS) для обострений, который был получен как: $IS = (M_i / M_m) 100$, где M_i – среднее количество обострений за данный месяц, а M_m – среднее количество посещений за месяц в текущем году [94]. Чтобы оценить влияние погоды на частоту обострений БА, был определен коэффициент корреляции (r) между dT_{mean} и F_{mean} с одной стороны и частотой обострений заболевания с другой.

2.7. Стандартные статистические методы обработки данных

2.7.1 Определение валидности выборки

Для определения валидности выборки учитывались показатели распространенности БА в Хабаровском крае – 2,5% [38].

Расчет объема выборки производился по формуле:

$$n = t^2 * p * q / \Delta^2,$$

где n – объем выборки,

t – критическое значение критерия Стьюдента (при уровне значимости 0,05 $t = 1,96$),

p – доля признака в изучаемой совокупности,

q – доля случаев, в которых не встречается изучаемый признак ($100-p$),

Δ – предельно допустимая ошибка (5%).

Таким образом, минимально необходимый объем выборки составил

$$n = 1,96^2 * 2,5 * 97,5 / 5^2 = 38 \text{ детей}$$

Объем минимальной выборки пациентов с частично контролируемой и неконтролируемой БА (доля пациентов с такой БА среди детского населения согласно данным – 95% [188]) составил:

$$n = 1,96^2 * 95 * 5 / 5^2 = 73 \text{ ребенка.}$$

Результаты исследования были введены в ранее созданную и утвержденную электронную базу Excel-2013.

Распределение генов в популяции оценивалось исходя из распределений генотипов, ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга.

2.7.2 Проверка на нормальность распределения статистических показателей

Существует множество статистических тестов, которые можно использовать для проверки выборочных значений на нормальность. Каждый тест использует разные предположения и рассматривает разные аспекты данных. Задача состоит в том, чтобы на основании определенного критерия отвергнуть или принять основную нулевую гипотезу, где выборка подчиняется нормальному закону распределения при выбранном уровне значимости (наиболее часто используемым $p=0,05$) К наиболее известным критериям, которые используются в нашей работе, относятся Критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка.

Одновыборочный критерий нормальности Колмогорова-Смирнова основан на максимуме разности между кумулятивным распределением выборки и предполагаемым кумулятивным распределением. Если D статистика Колмогорова-Смирнова значима, то гипотеза о том, что соответствующее распределение нормально, должна быть отвергнута. В строгом случае использование данного критерия допустимо, если среднее и стандартное отклонение нормального распределения известны априори и не оцениваются из данных. Однако чаще эти параметры вычисляются непосредственно из данных. В этом случае критерий нормальности включает сложную гипотезу ("насколько вероятно получить D статистику данной или большей значимости, зависящей от среднего и стандартного отклонения,

вычисленных из данных"), и поэтому критерий нормальности Колмогорова-Смирнова дополняется поправкой вероятности Лиллиефорса. Данный критерий исторически наиболее часто используется в отечественной статистике для проверки нормальности данных.

Критерий Шапиро-Уилка основан на отношении оптимальной линейной несмещенной оценки дисперсии к ее обычной оценке методом максимального правдоподобия. Критерий Шапиро-Уилка - это W-критерий, который также позволяет оценить нормальность. Если $W=1$, то выборка точно нормально распределена. Так, нулевая гипотеза = выборка принадлежит нормальному распределению. Если Шапиро-Уилка дает маленький p-value, то значит есть выбросы. Все, что выше 0,75, можно считать нормальным распределением. Если размер выборки достаточно велик, этот тест может обнаружить даже незначительные отклонения от нулевой гипотезы. Таким образом, если значение p меньше выбранного альфа-уровня, то нулевая гипотеза отклоняется, и есть доказательства того, что проверенные данные распределены не так, как обычно. С другой стороны, если значение p больше выбранного альфа-уровня, то нулевая гипотеза (что данные получены из нормально распределенной совокупности) не может быть отклонена. Например, для альфа-уровня 0,05 набор данных со значением p меньше 0,05 отклоняет нулевое значение гипотезы о том, что данные взяты из нормально распределенной совокупности, следовательно, набор данных со значением p, превышающим 0,05 альфа-значения, не может отклонить нулевую гипотезу о том, что данные взяты из нормально распределенной совокупности. Данный критерий сейчас наиболее часто используется в международных исследованиях.

В нашей работе для проверки нормальности распределения данных используются оба критерия.

2.7.3. Оценка достоверности различий

При статистическом анализе результатов исследования использовались стандартные методы вариантной статистики с применением пакета статистических программ: «STATISTICA» для «Windows» (версия 10.0). В настоящей работе значения рядов с нормальным распределением данных представлены в виде – $M \pm m$ –

средней \pm «стандартная ошибка средней» ($SD/\sqrt{n} = SEM$ (Standard Error Means), где n – объем выборки. Для рядов данных с ненормальным распределением приводятся верхний и нижний квартили (LQ и HQ) и медиана (Me).

Исследование взаимосвязей изучаемых параметров определялось методом парных корреляций.

Проверку статистической гипотезы равенства групповых средних для рядов данных с нормальным распределением проводили по t-критерию Стьюдента (двух-выборочный t-критерий), для рядов данных с ненормальным распределением – по U-критерию Манна-Уитни-Уилкоксона, для сравнения частот встречаемости категоризированного признака - по Z-критерию.

2.8. Обучающиеся нейросети в прогнозировании бронхиальной астмы

С учетом характера взаимодействий в сигнальных сетях иммунитета, в том числе множественных разнонаправленных интерференций регуляторных цепей, классические методы прогнозирования клинической реализации изменений в них мало применимы в данной области, в связи с чем для прогнозирования развития неконтролируемого течения БА использовался метод обучающихся нейросетей.

Основная характеристика нейросетевой архитектуры – способы, которыми нейроны соединяются друг с другом. Для большинства приложений сети с полной системой связей (полносвязные сети) предпочтительнее, и именно такой тип сетей реализован в пакете STATISTICA Автоматизированные нейронные сети, которые были использованы для моделирования нейронных сетей в данной работе [6, 12, 23, 48, 65].

Алгоритмически обучение производится в следующей последовательности шагов:

1. Представить нейронной сети пару - входное и целевое значение.
2. Вычислить прогнозы нейронной сети для целевых значений.
3. Использовать функцию ошибок для вычисления различия между прогнозами (выходами) сети и целевыми значениями. Продолжить выполнение шагов 1 и

2, пока все пары такого вида не будут представлены нейронной сети.

4. Использовать алгоритм обучения для настройки весов сети, чтобы сеть давала более точные прогнозы для каждой входной пары, шаги 1-5 образуют один обучающий цикл или итерацию. Число циклов априорно неизвестно, но может быть определено как часть процесса обучения.

5. Повторять шаги 1-5 заданное число циклов обучения или итераций, пока нейронная сеть не начнет выдавать подходящие выходные значения (т. е., значения, достаточно близкие к целевым значениям для всех входов). Как правило, процесс обучения нейронной сети состоит из 100 циклов.

В данной работе использована частная реализация данного общего алгоритма – алгоритм BFGS (разработали Бройден, Флетчер, Гольдфарб и Шанно), т.к. он работает значительно лучше, чем большинство традиционных алгоритмов, таких как градиентный спуск, но для его выполнения требуется больше памяти и времени. Тем не менее, позволяет обучать нейронную сеть за меньшее число итераций, что обеспечивает быструю скорость сходимости и более осмысленный критерий поиска.

Функция ошибок используется для оценки производительности нейронной сети в процессе обучения. Функция потерь показывает, насколько близки прогнозы нейронной сети и известные целевые значения, а также величины приращений весов на каждой итерации алгоритма обучения. Одним из общих подходов является использование функции суммы квадратов ошибок. Ошибка полагается равной сумме квадратов разностей между целевыми и фактическими выходными значениями сети по всему обучающему множеству. Именно с этим типом функции ошибок, а также вместе с функцией активации софтмакс, мы интерпретируем выходы нейронной сети как вероятности принадлежности наблюдений к конкретному классу.

Обучающая выборка использовалась исключительно для целей обучения модели. А проверка качества модели выполнялась с использованием контрольной выборки. Полностью обученная нейронная сеть может быть использована для создания прогнозов любых новых наблюдений с теми же переменными, поскольку эти

переменные сгенерированы/измерены с той же зависимостью, что и исходное множество, используемое при обучении сети.

Работа с нейросетью и создание программ прогноза для ЭВМ осуществлялись при содействии научного сотрудника ХФ ДНЦ ФПД - НИИ ОМид, специалиста по информационным технологиям, Алексея Владимировича Королева.

2.9. Этические аспекты исследования

Исследования проводились в соответствии с принципами текущего пересмотра Хельсинской декларации (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October, 2013). Все данные были собраны с персонального согласия исследуемых и/или их законных представителей, во всех таблицах статистической обработки, кроме первичной, обследуемые представлены под порядковыми номерами. Электронная таблица Excel с первичными данными хранилась под защитой пароля и была доступна только участникам исследования. Дизайн исследования утвержден этическим комитетом ХФ ДНЦ ФПД – НИИ ОМид протокол №5 от 14.05.2013.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ОПРОСА С ПОМОЩЬЮ СТАНДАРТИЗИРОВАННОГО ОПРОСНИКА ISAAC СРЕДИ ДЕТЕЙ ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

В последние десятилетия отмечается рост распространенности БА у детей во всем мире, при этом имеет место значимая разница распространённости астмоподобных симптомов, выявляемых сплошным опросом, и БА по обращаемости. В данной работе впервые изучалась частота встречаемости астмо- и неастмоподобных симптомов у детей Хабаровского края посредством стандартизированной методики ISAAC в школах города и села с непосредственным контролем опрашиваемых сотрудниками НИИ Омид.

3.1. Частота встречаемости астмоподобных симптомов по результатам стандартизированного опросника ISAAC

В исследовании приняли участие 5,3% детей, проживающих в городе Хабаровске, и 7,3%, проживающих в Хабаровском сельском районе.

При анализе полученных результатов обнаружено, что встречаемость астмоподобных симптомов в Хабаровском крае самая высокая из российских регионов, в которых проводилось исследование по этой методике (17,9%), и превышает показатели заболеваемости БА у детей Хабаровского края по обращаемости (2,4%) в 7,5 раз, наиболее близкие результаты демонстрируют некоторые дальневосточные и сибирские регионы – Томск (14%), Якутия (13,4%), Новокузнецк (12,7%), Иркутск (12,1%), Ула-Уды (12%), а так же Московская область (12,1%), однако наиболее географически близкие регионы, Благовещенск (5,3%), Владивосток (5,8%) демонстрируют в 3 раза более низкие показатели (Рисунок 7).

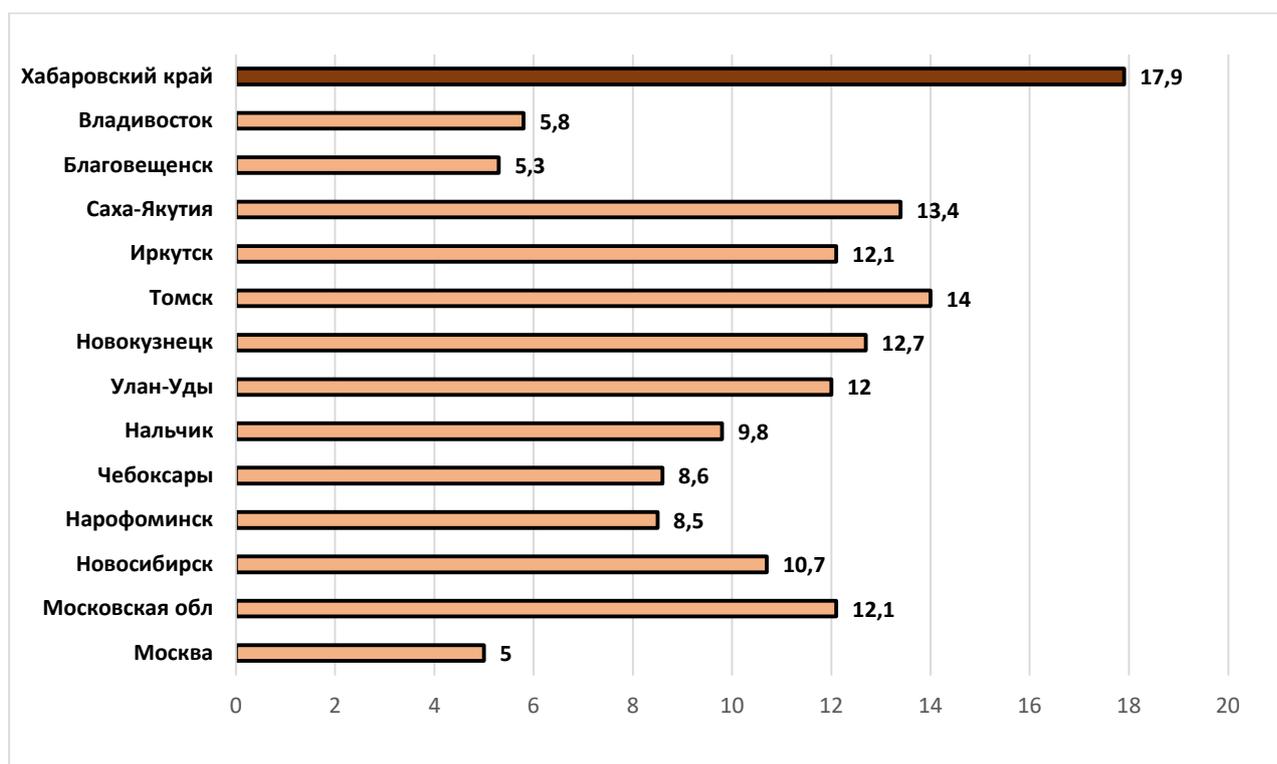


Рисунок 7 – Распространённость астмоподобных симптомов (%) по результатам ISAAC в регионах России

(Хабаровский край - собственные данные, иные регионы - по данным литературы [24, 131, 188])

При анализе структуры этих симптомов использовались показатели частоты астмоподобных проявлений: частота ночных эпизодов обструкции, характеризующая более тяжелое течение процесса, влияние астмоподобных симптомов на качество жизни – переносимость физических нагрузок, нарушение речи (Рисунок 8).

При интегральной оценке этих показателей выявлено, что у детей, имевших астмоподобные симптомы, в 73,0% случаях они соответствуют легкой степени тяжести БА, около 20% – средней и около 8% тяжелой, что совпадает с общемировыми показателями по результатам стандартизированного опроса [159]. Однако они резко отличаются от структуры заболеваемости по обращаемости (по данным нашей клиники: 41,5% – легкая степень БА, у 46,5% – средняя и у 12,0% имело место тяжелое течение).

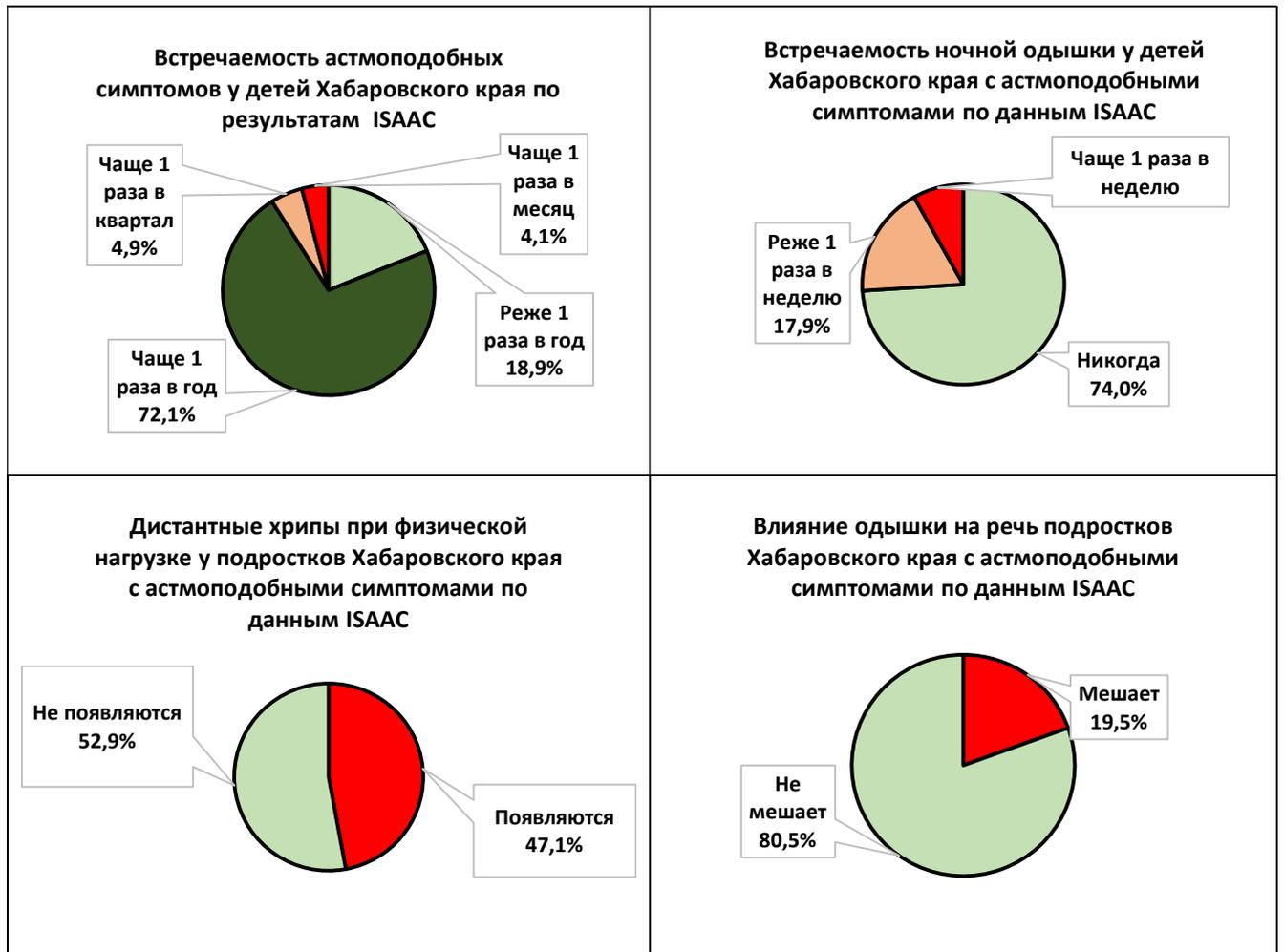


Рисунок 8 – Частота, структура и тяжесть астмоподобных симптомов у детей Хабаровского края

Большой интерес представляет разница встречаемости астмоподобных симптомов в городской и сельской местности. Из рисунка 3.1 следует, что в большинстве случаев в России опрос проводился в городах, исключение составляют лишь Московская область и Республика Саха-Якутия. Только для Московской области есть географически близкий город – Москва, дающий информацию для сравнения, и вопреки общераспространённому мнению об отрицательном влиянии урбанистической среды, в этой области астмоподобные симптомы встречаются более чем в 2 раза чаще относительно прилегающего города.

При сопоставлении распространённости, тяжести и структуры астмоподобных симптомов у городских и сельских подростков нами получены следующие данные (Рисунок 9).

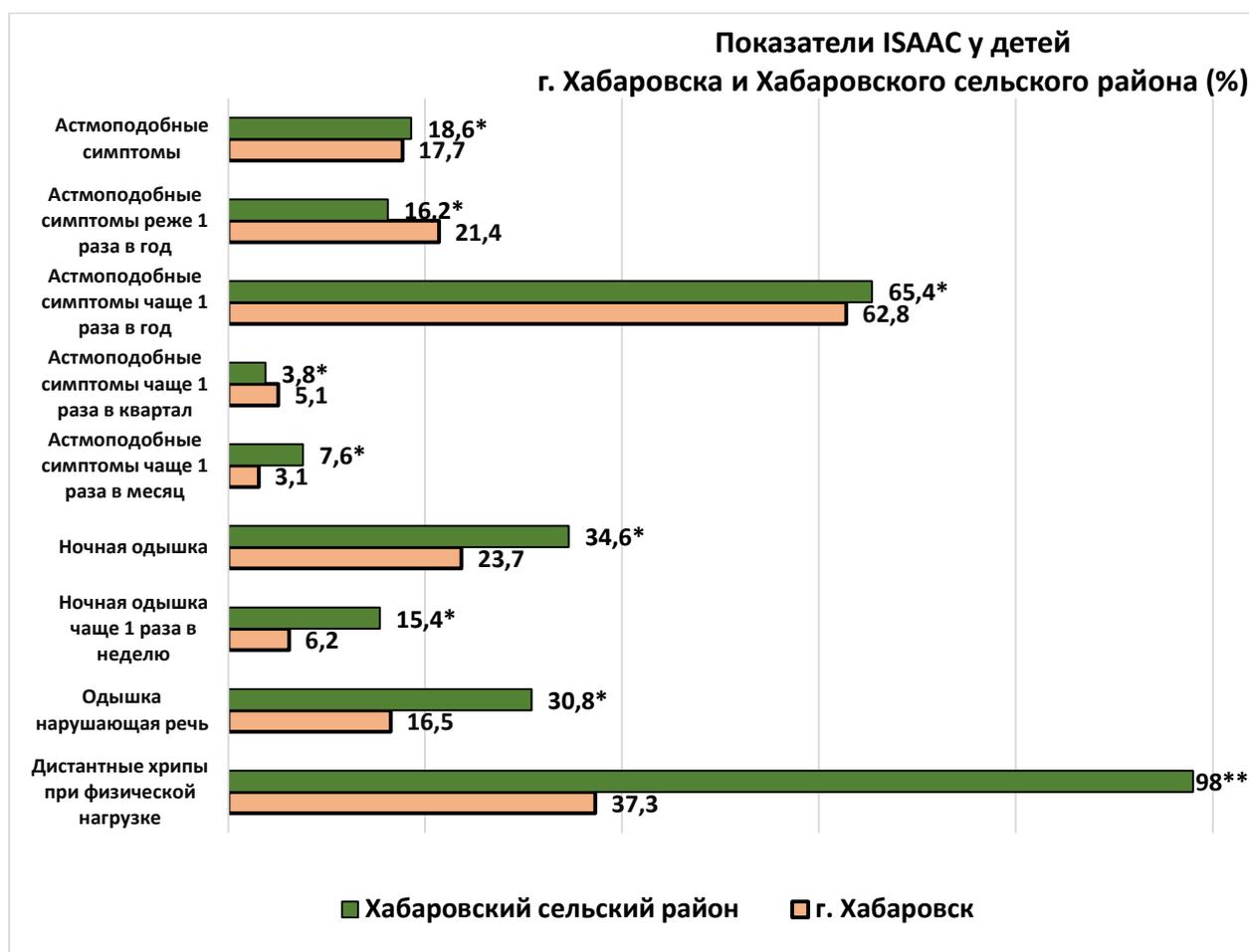


Рисунок 9 – Астмоподобные симптомы у детей г. Хабаровска и Хабаровского сельского района

Обращает на себя внимание тот факт, что показатели частоты встречаемости астмоподобных симптомов выше у детей, проживающих в Хабаровском сельском районе. Например, достоверная ($p=0,02$) разница (в 2,5 раза выше) отмечена у детей, которые страдали астмоподобными симптомами чаще 1 раза в месяц. Соответственно выявлена тенденция к снижению процента сельских жителей с более редкими (менее 1 раза в год) астмоподобными симптомами практически на четверть.

Для сельского района характерно и более тяжелое их течение, на треть чаще встречается ночная одышка ($p=0,03$) и в 2,5 раза чаще – ночная еженедельная одышка ($p=0,02$), являющаяся признаком тяжёлого течения заболевания. Почти в два раза чаще у жителей сельского района отмечена одышка, затрудняющая речь ($p=0,03$), и в 2,6 раза чаще – дистантные хрипы при физической нагрузке ($p=0,009$). Итак, астмоподобные симптомы чаще встречаются у жителей Хабаровского

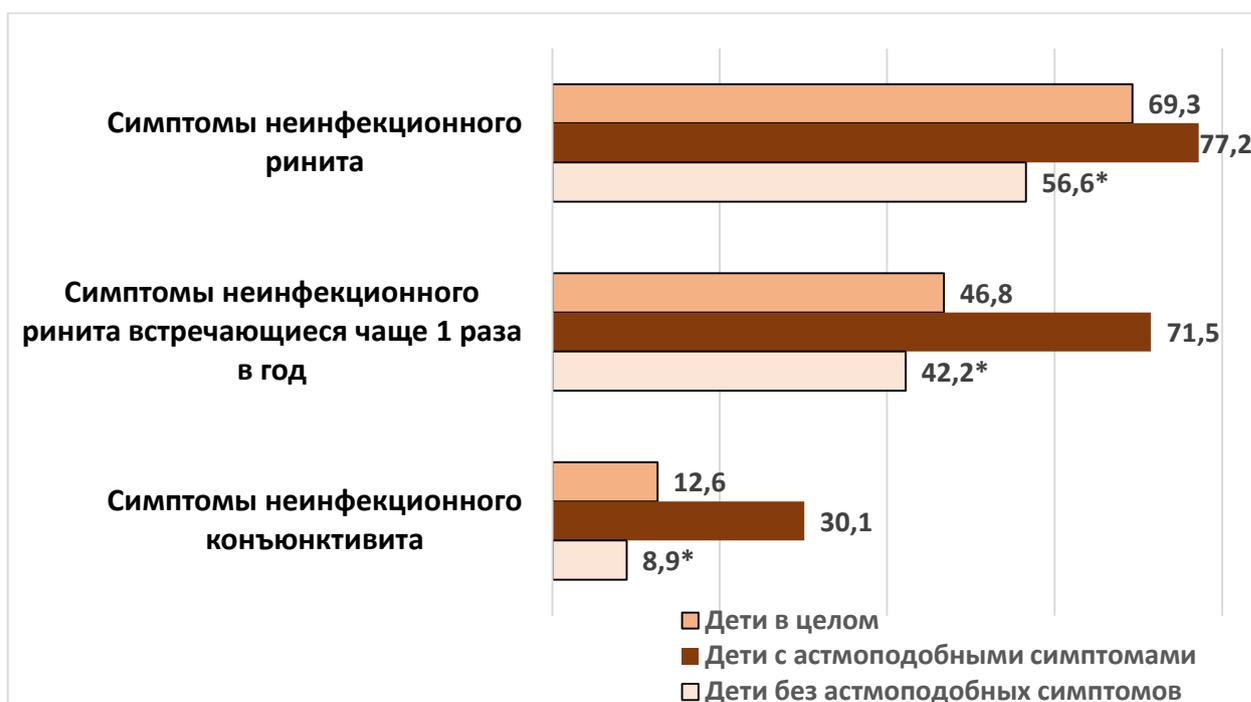
сельского района, протекают более тяжело и оказывают большее влияние на их повседневную жизнь. Несмотря на то, что при сравнении частоты астмоподобных симптомов в Хабаровске и Хабаровском сельском районе отмечается более частая их встречаемость в селе, разница значительно меньше, чем между Москвой и Московской областью.

Полученные нами данные, также, как и данные по Москве и Московской области, вступают в противоречие с «гигиенической» теорией атопического воспаления и с распространённым мнением о значимости ксенобиотиков и антропогенных поллютантов в развитии БА, концентрация которых в городе заведомо выше. Не отрицая их значение в развитии атопического процесса в бронхах, мы можем предположить, что социально-экономические факторы, доступность медицинской помощи, особенно специализированной, кардинально различающиеся в городе и деревне, оказывают большее влияние на частоту встречаемости астмоподобных симптомов.

3.2. Частота встречаемости неастмоподобных симптомов атопии по результатам стандартизированного опросника ISAAC

В ходе стандартизированного опроса ISAAC выявляются не только астмоподобные, но и иные симптомы атопии, распространённость которых в их взаимосвязи с астмоподобными представляет большой интерес для определения вероятности развития БА. В данной работе впервые изучалась частота их встречаемости у детей Хабаровского края.

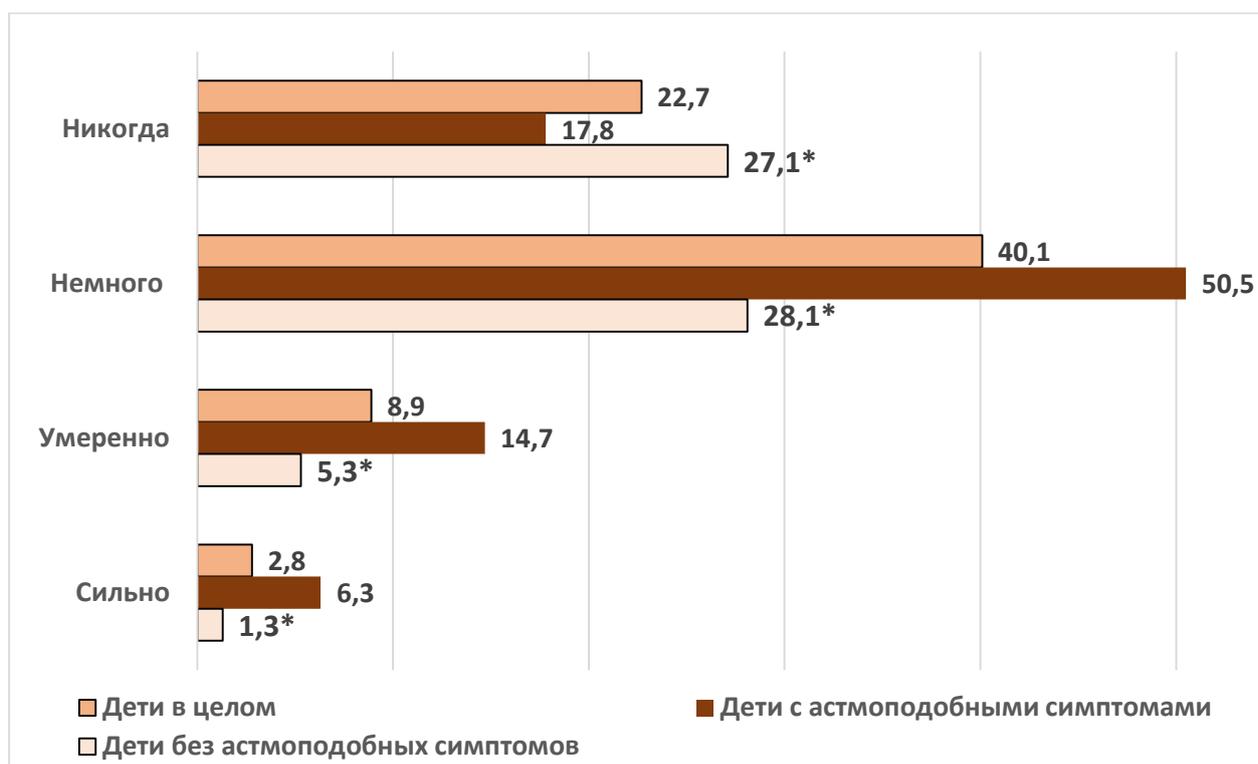
Выявлено, что распространённость симптомов аллергического ринита у детей Хабаровского края составила 69,3% опрошенных (Рисунок 10).



Примечание - *- $p < 0,05$ - достоверная разница между детьми с астмоподобными симптомами и без них

Рисунок 10 – Распространённость симптомов неинфекционного ринита у детей по результатам ISAAC (%) в Хабаровском крае

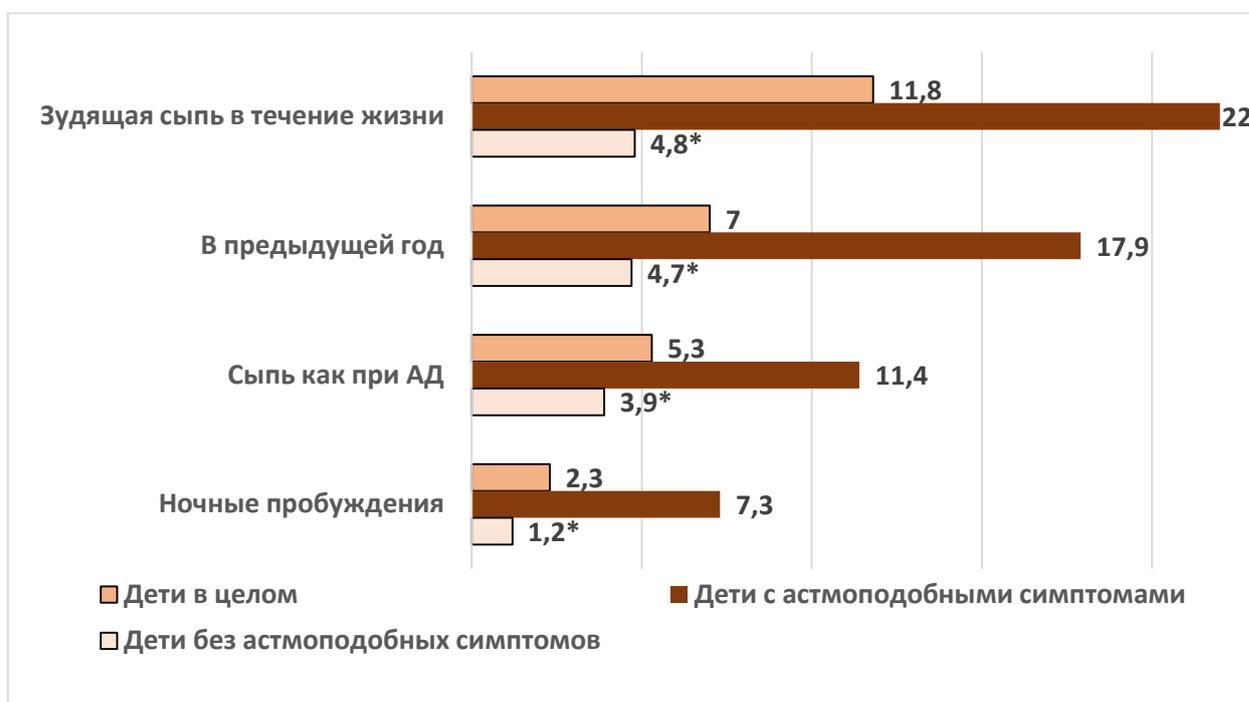
В группе обследуемых, имевших астмоподобные симптомы, частота неинфекционного ринита достоверно ($p=0,04$) больше (77,2% против 56,6%). Более одного раза в год такие симптомы встречаются у 46,8% школьников, при этом разница между имеющими и не имеющими астмоподобные симптомы еще более выражена (71,5% против 42,2%, $p=0,03$). При оценке влияния симптомов аллергического ринита на ежедневную активность обнаружено, что они вообще не влияют на данный параметр у 22,7% подростков, чаще у не имеющих астмоподобных симптомов (27,1% против 17,8%), «немного» влияют у 40,1% школьников, чаще у имеющих астмоподобные симптомы (50,5% против 28,1%), умеренно воздействуют в 8,9% случаев, также чаще у при наличии астмоподобных симптомов (14,7% против 5,3%), сильно влияют на качество жизни у 2,8% опрошенных, достоверно ($p=0,04$) чаще у испытывающих астмоподобные симптомы (6,3% против 1,3%) (Рисунок 11).



Примечание - *- $p < 0,05$ - достоверная разница между детьми с астмоподобными симптомами и без них

Рисунок 11 – Влияние симптомов неинфекционного ринита на ежедневную активность у детей по результатам ISAAC (%) в Хабаровском крае

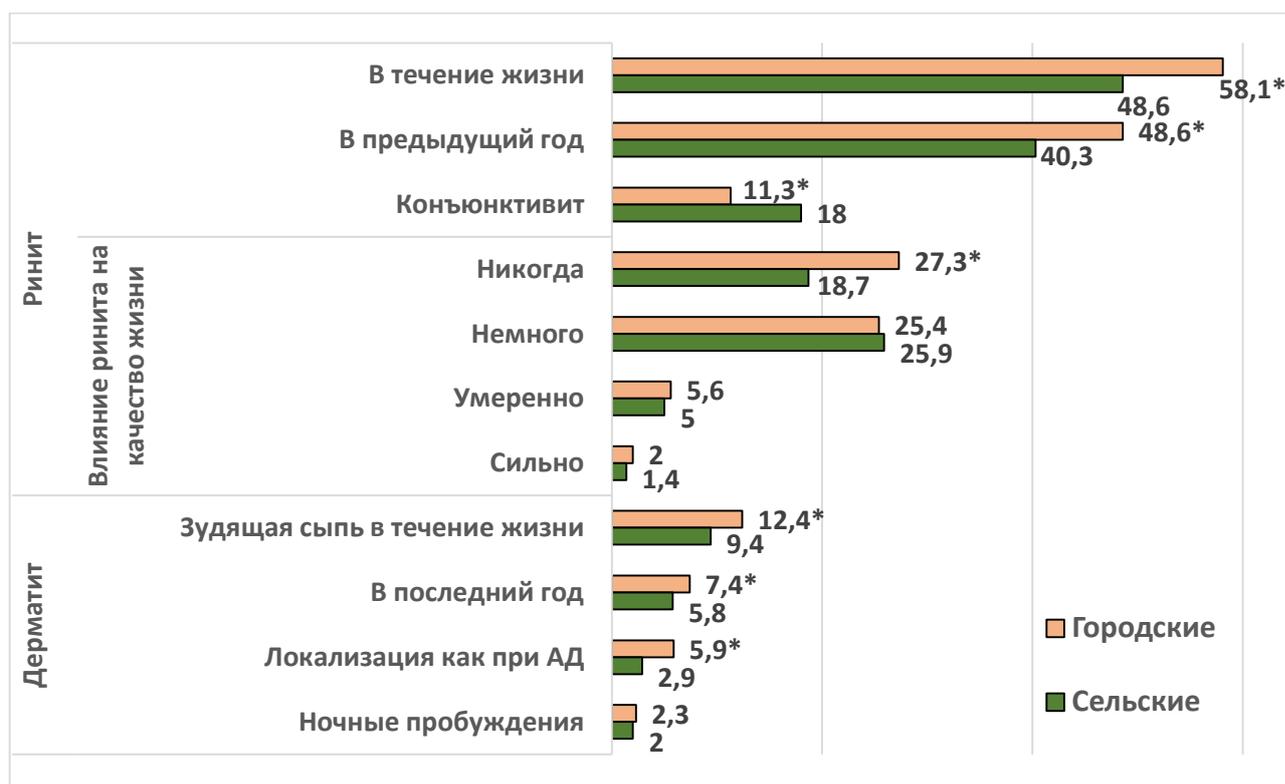
Обнаружено, что симптомы атопического дерматита встречаются у 11,8% пациентов, при чем чаще в сочетании с астмоподобными симптомами (22% против 4,8%). Такие кожные проявления выявляются чаще 1 раза в год – у 7% школьников, с астмоподобными симптомами – 17,9% (против 4,7%), локализуются в типичных для атопического дерматита местах – в 5,3% случаев, чаще при наличии астмоподобных симптомов (11,4% против 3,9%), осложняются ночным зудом, ведущим к пробуждению – у 2,3% опрошенных, чаще у испытывающих астмоподобные симптомы (7,3% против 1,2%) (Рисунок 12).



Примечание - *- $p < 0,05$ - достоверная разница между детьми с астмоподобными симптомами и без них

Рисунок 12 – Распространённость симптомов неинфекционного дерматита у детей по результатам ISAAC (%) в Хабаровском крае

При анализе распределения вышеописанных симптомов среди городских и сельских школьников обнаружено, что неастмоподобные симптомы атопии чаще встречаются у городских детей, за исключением конъюнктивита, при этом оказывают большее влияние на качество жизни у сельских пациентов. Более подробная сравнительная оценка обеих групп выявила, что частота симптомов неинфекционного ринита в течение всей жизни отмечена 58,1% против 48,6%, в течение предыдущего года – 48,6% против 40,3%, симптомы конъюнктивита – 11,3% против 18,0%. Симптомы ринита никогда не оказывают влияния на ежедневную активность у 27,3% городских школьников и 18,7% сельских, «немного» оказывают – 25,4% и 25,9%, умеренно 5,6% и 5,0%, сильно 2,0% и 1,4%. Зудящая сыпь имеет место у 12,4% опрошенных детей в городе и 9,4% на селе, в течении предыдущего года симптом отмечался у 7,4% и 5,8%, расположение сыпи характерное для атопического дерматита 5,9% и 2,9%, ночные пробуждения от зуда 2,3 и 2% соответственно (Рисунок 13).



Примечание - *- $p < 0,05$ - достоверная разница между детьми с неастмоподобными симптомами и без них

Рисунок 13 – Распространённость неастмоподобных симптомов атопии и их влияние на качество жизни (%) у сельских и городских детей по результатам ISAAC в Хабаровском крае

При оценке распределения неастмоподобных симптомов атопии в зависимости от наличия астмоподобных в городской и сельской группах опрошенных выявлено, что наиболее часто симптомы аллергического ринита обнаруживаются у городских подростков с астмоподобными симптомами (79,2%), а наиболее редко – у городских же, но без астмоподобных симптомов (43,0%). У сельских школьников отмечаются изменения той же направленности, но менее выраженные – при наличии астмоподобных симптомов 77%, без них – 52,7% (Рисунок 14).

При более детальном анализе проявлений неинфекционного ринита выявлено, что назальные симптомы в предыдущем году наиболее распространены группе сельских подростков с астмоподобными симптомами - 77,0% случаев, затем следуют, по убыванию частоты встречаемости - группа городских школьников с астмоподобными симптомами (70,8%), городские без астмоподобных симптомов

(42,7%), сельские без астмоподобных симптомов (31,9%).



Рисунок 14 – Распространённость симптомов неинфекционного ринита и их влияние на ежедневную активность у сельских и городских школьников по результатам ISAAC (%) в Хабаровском крае

Конъюнктивит, как внезапный признак неинфекционного ринита, тоже наиболее часто определяется у сельских школьников с астмоподобными симптомами (34,6%), несколько реже у городских с астмоподобными симптомами (30,2%), у сельских без астмоподобных симптомов (14,2%) и наименее часто у городских без астматических симптомов (7,4%).

Соответственно вопросам анкеты проводилась оценка одного из системных симптомов неинфекционного ринита – снижение ежедневной активности - по

следующим критериям: сильно, умерено, немного, никогда. Было выявлено, что эти симптомы не влияют на ежедневную активность при отсутствии астмоподобных симптомов у городских опрошенных – 28,5%, у сельских – 22,0%, среди школьников с астмоподобными симптомами – у 20,8% и 11,5% соответственно.

Небольшое влияние на ежедневную активность симптомы неинфекционного ринита оказывают при наличии астмоподобных симптомов у 41,7% городских и у 38,5% сельских подростков; среди школьников без астмоподобных симптомов наоборот: у городских – 21,6%, у сельских – 23,0%.

Умеренное влияние на ежедневную активность симптомы неинфекционного ринита оказывают при наличии астмоподобных симптомов с такой же направленностью у 11,5% опрошенных, проживающих в городе, и у 15,4%, проживающих на селе, без астмоподобных симптомов – у 4,4% городских и 2,7% сельских.

Сильно влияют на ежедневную активность симптомы неинфекционного ринита при наличии астмоподобных симптомов у 6,2% городских подростков и 3,8% сельских, без астмоподобных симптомов у 1,1% городских и 0,9% сельских.

При оценке распространённости симптомов, характерных для атопического дерматита и включённых в опросник ISAAC, обнаружено, что зудящая сыпь значительно чаще встречается у сельских школьников с астмоподобными симптомами – 23,1% против 21,8%, в группе без астмоподобных симптомов она, напротив, чаще встречается у городских подростков – 10,2% против 6,2% (Рисунок 15).

Зудящая сыпь чаще одного раза в год более распространена среди городских подростков как с астматическими симптомами, так и без них – 18,7% против 15,4% и 5,0% против 3,5%, соответственно. Выявленная сыпь располагается в типичных для атопического дерматита местах в 11,5% и у городских, и у сельских школьников с астмоподобными симптомами, без них у городских в 5,1 раза чаще (4,6% и 0,9% соответственно).

Ночные пробуждения на фоне зудящей сыпи чаще отмечаются у городских подростков, чем у сельских как с астмоподобными симптомами, так и без них – 6,2% против 3,8% и 1,1% против 0,9% соответственно.

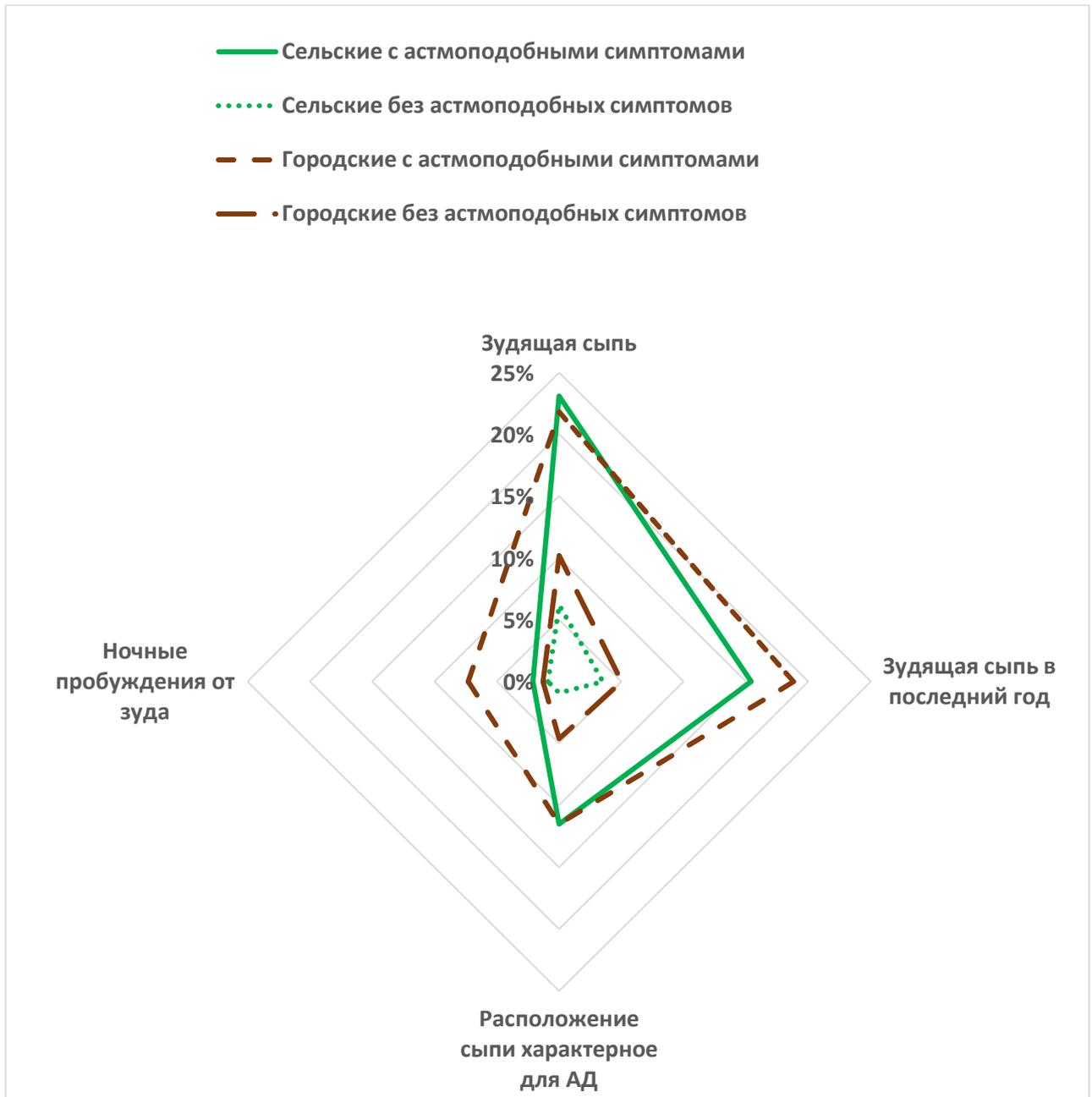


Рисунок 15 – Распространённость симптомов атопического дерматита у сельских и городских школьников по результатам ISAAC (%) в Хабаровском крае

При анализе данных по опросу школьников методом ISAAC и сопоставлении полученных результатов с литературными выявлено, что симптомы неинфекционного ринита среди школьников Хабаровского края (69,3%) встречаются чаще, чем в исследованиях, обнаруженных нами в доступной литературе (Рисунок 16).

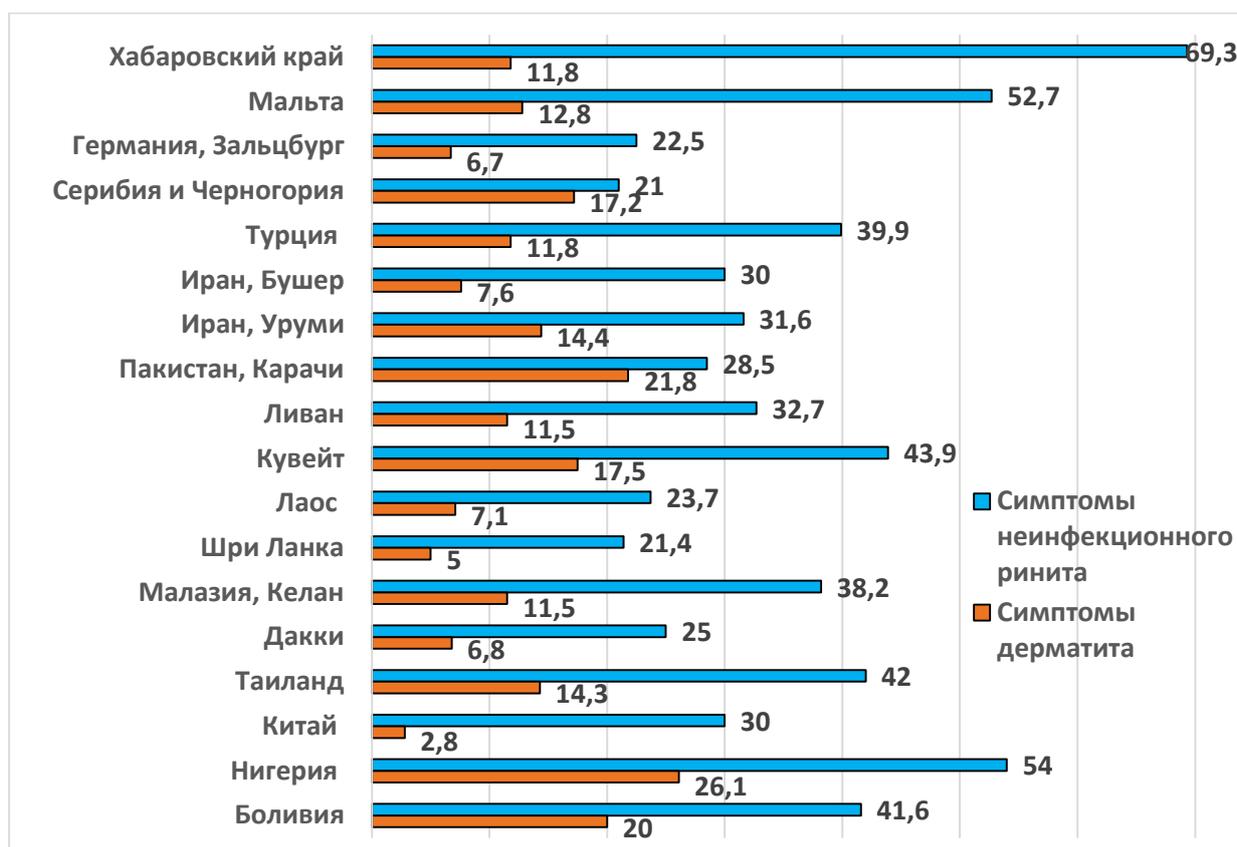


Рисунок 16 – Распространённость неастмоподобных симптомов атопии по результатам ISAAC (%) в мире (Хабаровский край - собственные данные, иные регионы - по данным литературы [3, 26, 58, 103, 107, 129, 159, 191, 203, 237, 243, 244, 245, 248, 271])

Аллергический ринит патогенетически наиболее тесно связан с БА, поскольку также представляет собой атопическое воспаление дыхательного тракта и, как правило, предшествует БА, а также в 70% случаев без лечения приводит к возникновению БА [69], поэтому обнаружение именно его симптомов является важным для профилактики БА. Это хорошо коррелирует с результатами нашего предыдущего исследования, которое показало, что астмоподобные симптомы в Хабаровском крае (17,9%) распространены наиболее широко среди регионов России, где когда-либо проводился такой опрос, и достаточно высоки в сравнении с мировыми результатами, более высокие показатели в доступных нам источниках отмечались только для Мальты (27,9%) [90] и Северной Англии (31,3%) [226], что также сопровождается высокой распространённостью симптомов аллергического ринита

(52,7% и 32,8% соответственно).

Проявления атопического дерматита в виде зудящей сыпи и ее характеристики в Хабаровском крае соответствуют средним показателям экономически развитых стран с преимущественно европеоидным населением.

Для распространённости неастматических симптомов атопических заболеваний характерна разнонаправленность данных в зависимости от географического и экономического положения региона. Возможно, это объясняется не только атопической природой этих проявлений. Например, в Нигерии [200] высокий уровень распространённости зудящей сыпи (26,1%) и признаков неинфекционного ринита (54,0%), в том числе осложненного конъюнктивитом (39,2%) на фоне относительно низкой распространённости астмоподобных симптомов (16,4%), может быть связан с высокой контаминацией населения различными паразитами, которая в некоторых регионах достигает 95% [190].

Особый интерес представляют данные, характеризующие различия изучаемых показателей у подростков, проживающих в городской и сельской местностях. Описание таких особенностей в доступной литературе встречается не часто [204, 208]. Проведя сравнительный анализ источников и выявленных нами данных, мы получили следующие результаты (Рисунок 17).

Во всех представленных на графике регионах отмечается большая встречаемость неастматических синдромов атопии у городских подростков, что соответствует общепринятой гигиенической теории, однако противоречит нашим предыдущим результатам, когда астмоподобные симптомы достоверно чаще ($p=0,03$) встречались у сельских школьников (18,7% и 17,6% соответственно).

Обращает на себя внимание, что по нашим результатам и по результатам, полученным в Боливии [204], такое осложнение, как конъюнктивит, чаще встречается у сельских школьников. По нашим данным, симптомы ринита чаще встречаются у городских детей, но оказывают большее влияние на качество жизни у сельских.

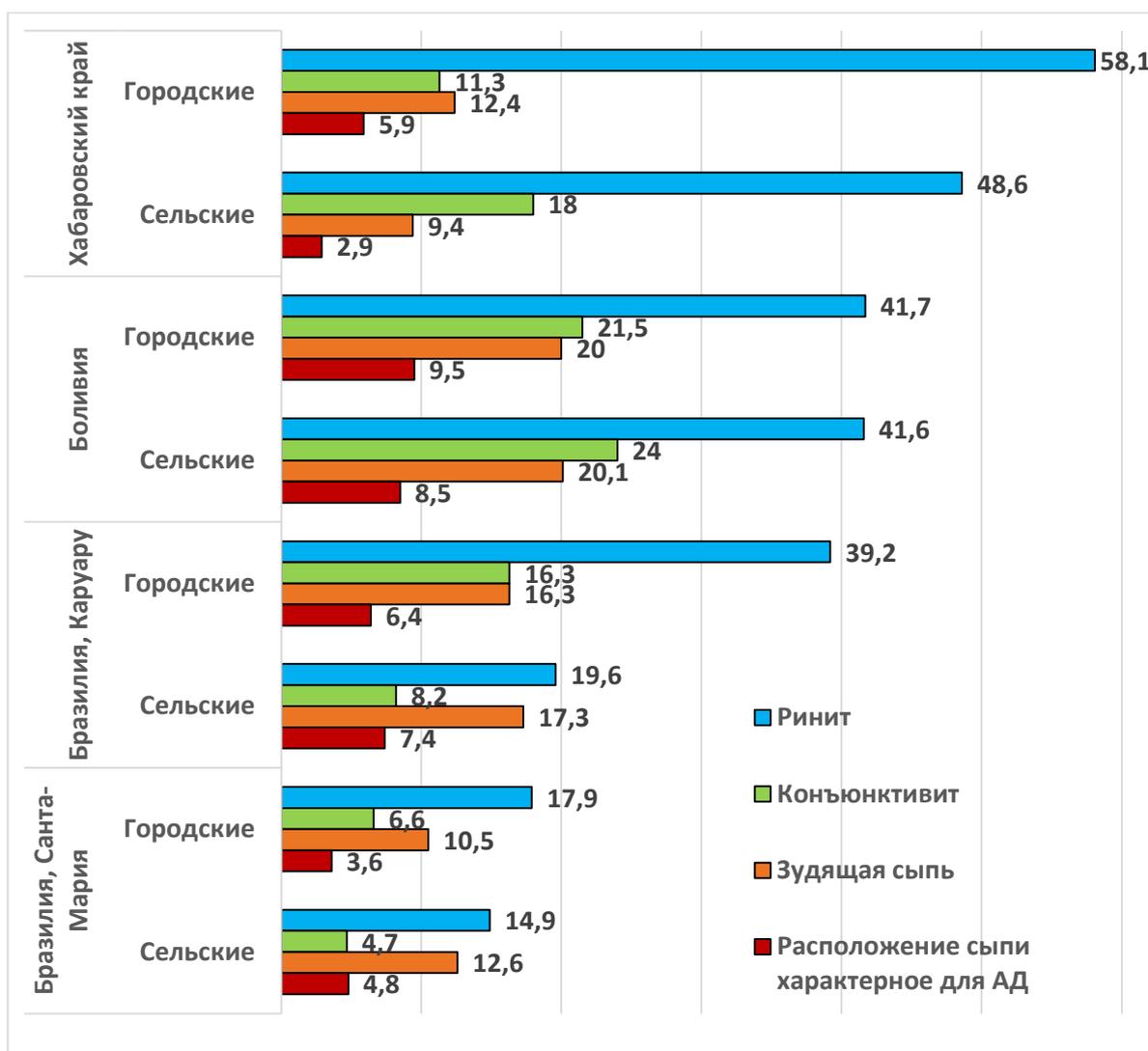


Рисунок 17 – Распространённость неатомподобных симптомов атопии у городских и сельских детей по результатам ISAAC (%) в мире (*Хабаровский край – собственные данные, иные регионы по данным литературы [203, 204]*)

Исходя из этого, можно предположить, что первые нозологии атопического марша – атопический дерматит и аллергический ринит – чаще встречаются у городских подростков, при этом качество диагностики, лечения, доступность медицинской помощи в городе выше, вследствие чего они реже реализуются в конечный пункт этого марша – БА. Это подтверждается тем, что при наличии симптомов атопии у сельских опрошенных детей такие симптомы протекают тяжелее, у городских детей – легче.

ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ СВОЕОБРАЗИЕ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ КОНТРОЛИРУЕМОМ И НЕКОНТРОЛИРУЕМОМ ТЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Несмотря на все достижения аллергологии, контроля над заболеванием, даже при исключении всех социальных факторов риска и влияния сопутствующих заболеваний, удаётся достигнуть только у 2/3 больных, в связи с чем возникает необходимость изучения различных факторов, в том числе эндогенных, модифицирующих патогенез заболевания. Большой интерес с этой точки зрения представляют генетические полиморфизмы сигнальных молекул иммунной системы как рецепторов первичного распознавания – Toll-подобных рецепторов, так и основных коммуникативных молекул иммунитета – цитокинов.

Уже на первом этапе исследований, при сравнении некоторых полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы у детей, страдающих БА и в группе сравнения нами обнаружена достоверная разница в их распространении (Таблица 9).

Таблица 9 – Частота встречаемости полиморфизмов генов некоторых цитокинов при БА и в группе сравнения (%)

	БА n=167	Группа сравнения n=40	Дост. (p) Z-критерий
IL4 - C589T (полиморфизм+)	30,0	50,0	0,05
TNF α - G308A (полиморфизм+)	56,6	20,0	0,04

Так, полиморфные аллели гена IL4 с заменой C589T достоверно чаще встречаются в группе сравнения, чем у детей, страдающих БА (50% против 30%). IL4 влияет на продукцию и секрецию IgE В-лимфоцитами, на переключение С-генов иммуноглобулинов на активацию Th₂-типа, накопление эозинофилов в тканях органов мишеней, экспрессию на В-лимфоцитах и тучных клетках низкоаффинного рецептора для IgE CD23. Он препятствует дифференцировке Th₁-клеток и продукции ими характерных цитокинов. Таким образом, снижение его активности на фоне полиморфизма кодирующего гена закономерно приводит к меньшей вероятности

развития атопических заболеваний и БА, в частности. Следует предполагать и снижение противоглистного иммунитета, однако в современных условиях это не является значимым негативным фактором.

Нами выявлено, что полиморфные аллели гена TNF α - G308A достоверно чаще (56,6%) встречаются у детей с БА, чем в группе сравнения (20,0%). Этот интерлейкин является одним из основных индукторов дифференцировки Th₁-клеток, активирует выработку интерферона гамма и реципрокно тормозит дифференцировку Th₂-клеток и продукцию, цитокинов характерных для этих клеток. Снижение активности TNF α на фоне однонуклеотидной замены в кодирующем гене неизбежно ведет к повышению вероятности развития атопии и БА как ее проявления, а также сопровождается снижением противовирусного иммунитета, что еще более способствует развитию атопии под специфическим иммунотаргетированным воздействием некоторых вирусов (РС-вирус, ЦМВ и т.п.).

Исходя из этого, предпринято более глубокое исследование генетики цитокинов и активирующих их продукцию Toll-подобных рецепторов в группах пациентов с неконтролируемой БА (Таблица 10).

Таблица 10 – Частота неконтролируемой БА (%) и ее степень тяжести (в баллах) при некоторых полиморфизмах генов сигнальных молекул иммунной системы

	Неконтролируемая БА, n=97			Тяжесть БА, n=167		
	Полиморфизм (-)	Полиморфизм (+)	Z-критерий (p)	Полиморфизм (-)	Полиморфизм (-)	Z-критерий (p)
TLR2 - Arg753Glu	56,2	60	0,4	2,8±0,07	3,1±0,09	0,049
TLR4 - Asp299Gly	92,2	56	0,0007	3,0±0,07	2,6±0,11	0,02
TLR4 - Thr399Ile	58,8	52	0,27	2,75±0,08	3,16±0,08	0,01
TLR9 - T1237C	76,1	46,7	0,008	2,96±0,05	2,47±0,19	0,001
TLR9 - A2848G	80,0	49,3	0,001	2,91±0,07	2,76±0,12	0,27
IL6 - C174G	53,8	59,8	0,25	2,70±0,09	3,02±0,09	0,017
IL10 - G1082A	61,5	54,4	0,23	2,68±0,11	2,93±0,08	0,08
IL10 - C592A	60,7	46,3	0,048	2,88±0,08	2,79±0,12	0,53
IL10 - C819T	56,0	56,9	0,53	2,95±0,09	2,90±0,08	0,76
IL12B - A1188C	55,8	57,1	0,61	2,92±0,09	2,88±0,09	0,77
TNF α - G308A	64,1	33,3	0,002	2,88±0,07	2,70±0,16	0,28

Среди исследованных выявлен ряд полиморфизмов, для которых не обнаружено достоверных различий в группах по течению БА и контролю над ней, соответственно анализ их реализации в иммунном ответе в дальнейшем не проводился. Клинические и иммуно-патогенетические проявления тех однонуклеотидных замен, для которых было выявлено достоверное влияние, представлено в данной главе (Рисунок 18).

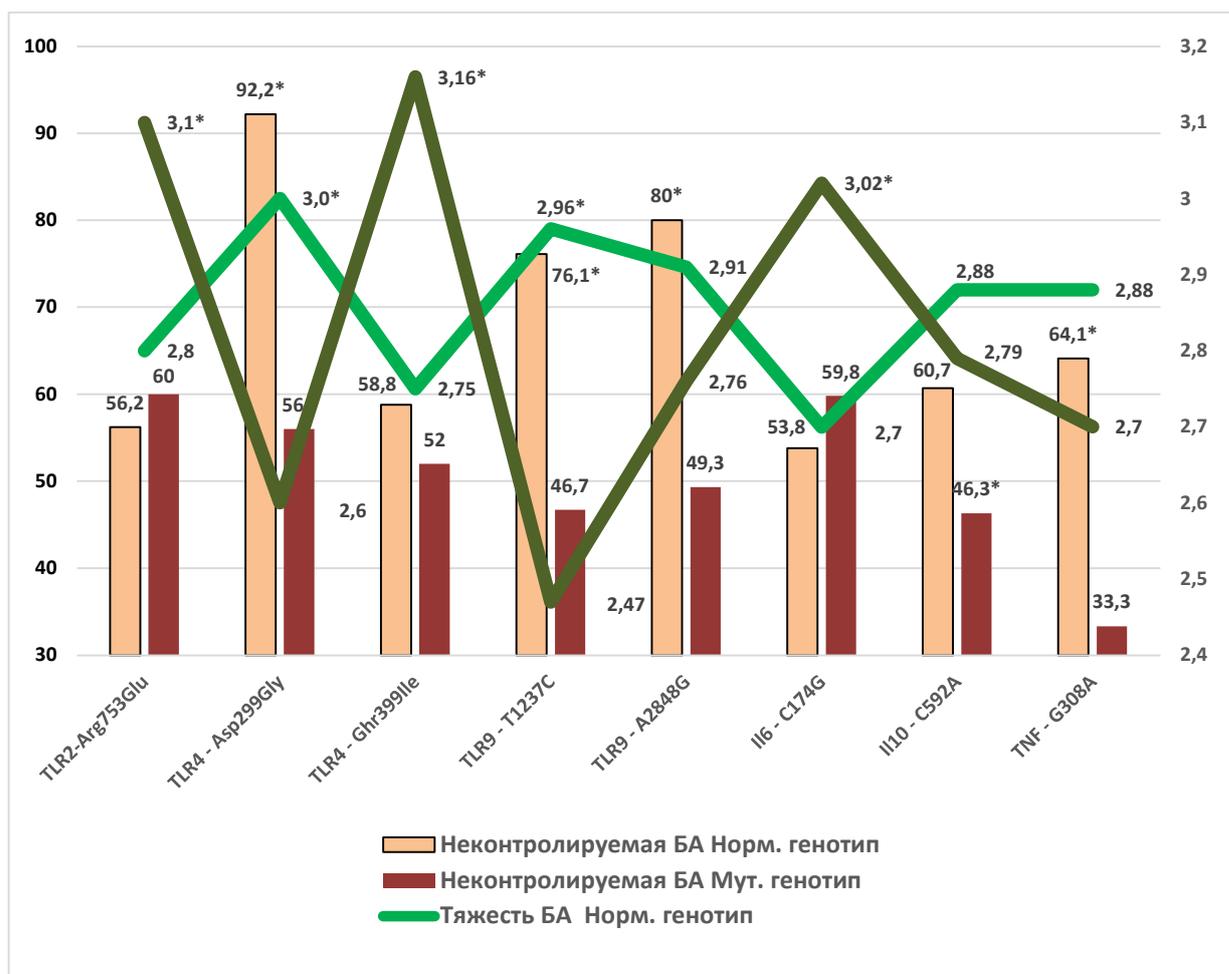


Рисунок 18 – Клинические проявления некоторых полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы

Для сравнения с литературными данными возникла необходимость оценки встречаемости полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы у всех обследованных пациентов II этапа в целом, были получены следующие результаты (Рисунок 19).

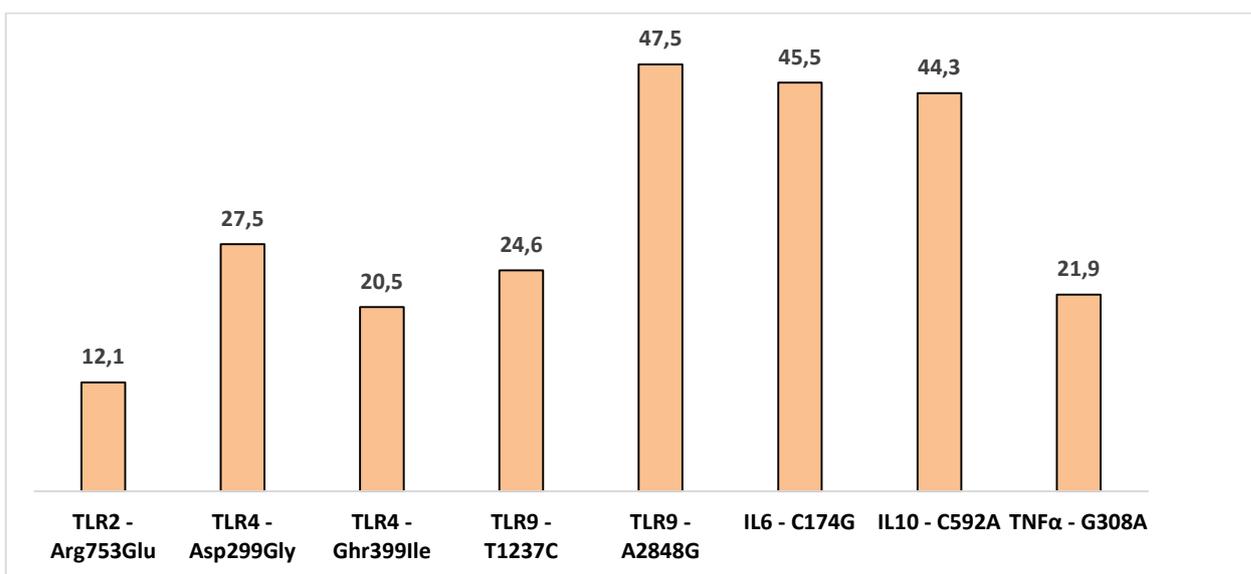


Рисунок 19 – Частота (%) встречаемости полиморфизмов генов сигнальных молекул у детей с БА (n=167)

Они соответствуют данным, приводимым в главе литературного обзора, для представителей белой расы (Таблицы 1-7). В связи этим дальнейшие исследования посвящены их взаимосвязи с неконтролируемым течением БА и выявлению её механизмов.

4.1. Клинико-иммунологические проявления полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов при контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астме

Toll-подобные рецепторы являются основными молекулами распознавания патогенных паттернов в иммунной системе человека. Поскольку любая аллергия является ошибкой распознавания, то полиморфизмы генов TLR могут иметь непосредственное и разнонаправленное влияние на характер течения воспаления и клинические проявления при БА.

В ходе проведенных исследований нами выявлен ряд однонуклеотидных замен, оказывающих влияние на клиническое течение БА и степень контроля над ней - TLR2-Arg753Glu, TLR4 - Asp299Gly и Thr399Ile, TLR9 - T1237C и A2848G. Сравнения по исследуемым параметрам проводилось в группах пациентов с наличием и

отсутствием полиморфных аллелей.

Ген, кодирующий TLR2, расположен на длинном плече хромосомы 4(4q32), где было идентифицировано несколько однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), TLR2 Arg753Gln (rs5743708, G2258A) является одним из наиболее частых. Он приводит к замене аргинина на глутамин в остатке 753, что снижает реакцию макрофагов на бактериальные пептиды [253] и меняет интерлейкиновый профиль пациента с такой мононуклеотидной заменой, это не может не сказаться на течении атопического воспаления, являющегося патогенетической основой БА. При сравнении пациентов, несущих полиморфизм TLR2-Arg753Gln и не имеющих такового, обнаружены следующие особенности (Таблица 11).

Таблица 11 – Клинические проявления полиморфизма TLR2-Arg753Gln

Клинические проявления	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-/Z-критерий
Контролируемая БА, %	43,8	40,0	0,4
Степень тяжести (в баллах)	2,8±0,07	3,1±0,09	0,042
ОФВ ₁ , %	103,3±2,98	111,1±8,73	0,18
ПОС, %	108,1±3,21	113,2±9,57	0,5
Проба с бронхолитиком (+), %	35,5	25,0	0,3
Доза ТГКС, мкг	225,0±27,8	441,6±93,3	0,03

Обладатели полиморфного генотипа имеют достоверно более тяжёлое течение БА (3,1 балла против 2,8), требуют достоверно больших доз топических глюкокортикостероидов (441,6 мкг против 225,0 мкг) для поддержания контроля.

Исследован их интерлейкиновый профиль (Таблица 12).

Установлен достоверно более высокий уровень сывороточного у IL4 (4,6 пг/л vs 1,4 пг/л), который играет ключевую роль в развитии атопического воспаления. Также отмечается достоверно более высокий уровень сывороточного уровня IL10 (172,0 пг/л vs 95,0 пг/л) и IL18 (255,1 пг/л vs 55,0 пг/л).

В отношении Th₁-типа воспаления они действуют разнонаправлено, IL10 его угнетает, а IL18 усиливает. Рост IL18 выражен значительно сильнее, с чем и связан результирующий вектор воспаления. Кроме того, IL18 играет важную роль в

дифференцировке наивных Т-клеток по Th₂-типу, стимулирует продукцию IL4, а также химических медиаторов, в частности, гистамина базофилами, усиливая таким образом атопическое воспаление [273].

Таблица 12 – Изменения цитокинового статуса при полиморфизме TLR2-Arg753Glu

Цитокины	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,4(0-28,9) 0,7-2,3	4,6(1,3-18,9) 1,3-18,9	0,049
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0(0-4,88) 0-0	0(0-0,015) 0-0	0,3
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,1(0-126) 0-4,9	0(0-110) 0-0,88	0,2
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0(0-289,1) 0-13,12	0(0-49,1) 0-14,69	0,4
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	6,0(0-396,5) 3,2-14,3	55,5(7,8-72,9) 7,8-72,9	0,56
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,63(0-34,1) 0-3,36	0,26(0-7,9) 0-1,46	0,3
IL10, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	95,0(0,7-309,5) 2,8-157	172(2,2-623,0) 3,8-571	0,049
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	5,0(0-329,0) 0,3-155,8	255,1(4,8-380,7) 4,8-380,7	0,02
TNF α , пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	2,46(0,42-7,76) 1,85-3,92	3,3(1,46-4,1) 1,46-4,1	0,9

У детей с этой мононуклеотидной заменой достоверно более низкая доля Т-лимфоцитов (61,4% vs 65,3%), в первую очередь за счет доли Т-хелперов с 33,5% vs 38,16% (Таблица 13).

Таблица 13 – Показатели иммунограммы при однонуклеотидной замене TLR2-Arg753Glu

Показатели иммунограммы	Полиморфизм- n=147	Полиморфизм+ n=20	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2747,3±85,3	2657,9±134,8	0,7
CD3, абс.	1806,9±73,8	1634,2±127,7	0,4
CD3, %	65,3±0,71	61,4±1,35	0,049
CD4, абс.	1089,2±58,5	878,0±71,1	0,18
CD4, %	38,16±0,74	33,53±1,6	0,028
CD8, абс.	647,7±39,0	728,3±74,1	0,3
CD8, %	24,5±0,63	27,7±1,14	0,049
CD4/CD8	1,6±0,06	1,25±0,09	0,047
CD16, абс.	362,8±20,3	462,3±62,8	0,049
CD16, %	13,8±0,6	16,0±1,3	0,2
CD19, абс.	412,9±19,7	430,1±59,9	0,76
CD19, %	14,9±0,42	16,1±1,31	0,34
IgE, ME	175,3±46,3	237,3±27,0	0,4
IgA, г/л	2,03±0,11	1,68±0,17	0,28
IgM, г/л	2,13±0,08	1,92±0,22	0,4
IgG, г/л	17,6±0,81	14,9±1,67	0,23
ЦИК, у.е.	61,6±4,8	45,5±13,5	0,25
ФАН сп., %	89,4±2,0	83,6±2,3	0,048
ФАН ст., %	84,4±1,87	92,7±1,18	0,046
ФР ФАН, %	5,4±1,06	8,9±2,24	0,21
ФЧ сп., ед.	6,7±0,08	4,5±0,04	0,008
ФЧ ст., ед.	7,8±0,09	6,0±0,04	0,04
ФР ФЧ, ед.	1,53±0,66	1,46±0,37	0,96
НСТ сп., %	30,2±2,8	11,9±1,9	0,01
НСТ ст., %	54,5±2,6	72,4±5,9	0,01
ФР НСТ, %	23,9±3,2	60,5±6,1	0,001

Отмечается и четкая тенденция к падению их абсолютного числа, доля Т-цитотоксических клеток напротив достоверно выше (27,7% vs 24,5%), что также подтверждается выраженной тенденцией к большему их абсолютному количеству, соответственно, мы наблюдаем достоверно более низкий ИРИ (1,25 vs 1,6).

Отмечается большее абсолютное число натуральных киллеров (462,3 клеток

vs 362,8 клеток) и тенденция к увеличению их доли в общем пуле лимфоцитов.

В фагоцитарном звене иммунитета отмечается достоверно более низкая спонтанная фагоцитарная активность нейтрофилов (83,6% vs 89,4%) и высокая стимулированная (92,7% vs 84,4%). Фагоцитарное число как спонтанное, так и стимулированное, достоверно ниже (4,5 vs 6,7 и 6,0 vs 7,8 соответственно). НСТ-тест демонстрирует аналогичную с ФАН направленность различий в группах, но более выраженную. Показаны достоверно более низкие спонтанные показатели 11,9% vs 30,2% и достоверно более высокие стимулированные 72,4% vs 54,5% и, естественно, фагоцитарный резерв (60,5% vs 23,9%).

Цитокиновый профиль активации TLR2 с исследуемой мононуклеотидной заменой в целом соответствует Th₁-типу реагирования [13, 17, 20] (Рисунок 20).

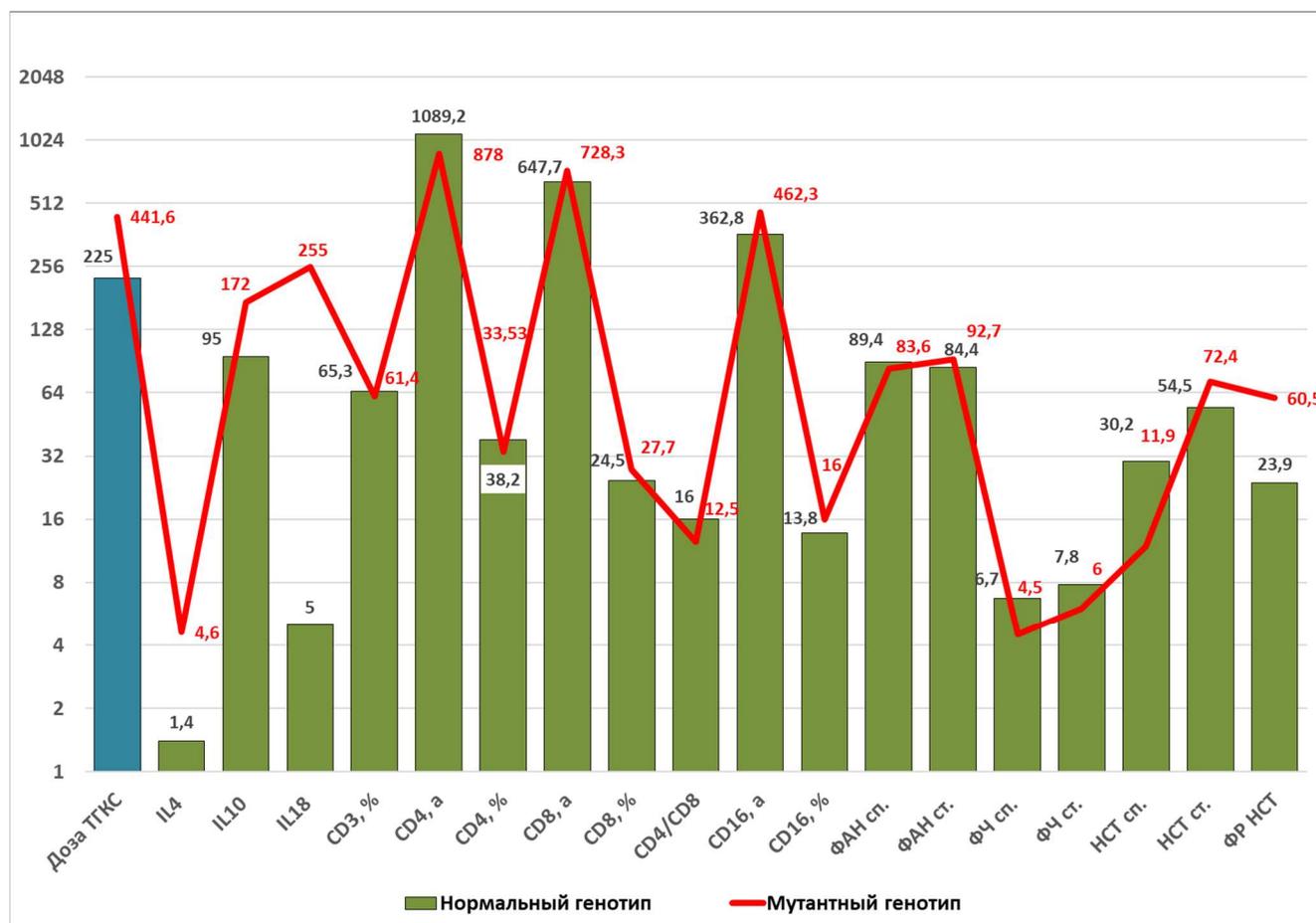


Рисунок 20 – Достоверно различимые клиничко-патогенетические проявления одонуклеотидной замены TLR2-Arg753Glu

Отмечено смещение равновесия в сторону Т-цитотоксических клеток и

натуральных киллеров, что подтверждается как ростом их относительного числа, так и изменением соотношения CD4/CD8. Это связано со снижением интенсивности Th₁₇ типа иммунного ответа на фоне более низкой чувствительности рецептора к бактериальным пептидам и реципрокным усилением. При этом изменения показателей фагоцитоза, характеризующие активность хемотаксиса, и обратные корреляции с ними в этой группе отражают состояние измененного рецептора.

На этом фоне отмечается более тяжелое течение БА и более высокая потребность в топических глюкокортикостероидах у пациентов, носителей этой однонуклеотидной замены, однако значимого влияния на степень контроля при заболевании эта мононуклеотидная замена не оказывает.

TLR4 считается IL10-ассоциированным рецептором, его активация стимулирует Th₂-тип иммунной реакции и, соответственно, должна усиливать атопическое воспаление [275]. Ген TLR-4 расположен в хромосоме 9q32-33, является поверхностным рецептором, который обнаруживает ряд паттернов патогенности: липополисахариды (ЛПС), характерные для грамотрицательных бактерий, маннаны – для грибов, белки оболочки малярийного плазмодия, ряд белков вирусных оболочек – в первую очередь, герпесподобных вирусов. Полиморфный участок Asp299Gly (rs4986790) гена TLR4 представляет собой однонуклеотидную замену аденина (A) на гуанин (G) в положении +896 экзона 3, приводящую к аминокислотной замене аспарагиновой кислоты (Asp) на глицин (Gly) в 299 положении полипептидной цепи рецептора. Такая замена приводит к снижению экспрессии TLR4 в клетках [215, 255, 256, 260, 275].

Носители Asp299Gly, страдающие БА, в нашем исследовании демонстрируют целый ряд особенностей, в большей степени благоприятных для течения заболевания (Таблица 14).

У этой группы пациентов астма течёт достоверно легче (2,6 баллов против 3), требуется меньшая доза ТГКС для контроля над заболеванием (176,1 мкг против 311,8 мкг), и, главное, носители этой мононуклеотидной замены по результатам исследований в 5,5 раз чаще (44,0% случаев против 7,8%) достигают полного контроля над БА.

Таблица 14 – Клинические проявления полиморфизма TLR4 - Asp299Gly

Клиническое проявление	олиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-/Z- критерий
Контролируемая БА, %	7,8	44	0,0007
Степень тяжести (в баллах)	3,0±0,07	2,6±0,11	0,02
ОФВ ₁ , %	106,1±2,4	100,8±4,1	0,3
ПОС, %	102,0±3,65	101,9±4,59	0,3
Пробы с бронхолитиком (+),%	35,1	31,2	0,4
Доза ТККС, мкг	311,8±38,5	176,1±29,8	0,041

Для данной группы больных характерны достоверные изменения интерлейкинового профиля, более низкий уровень IL4 (1,7 пг/л vs 1,9 пг/л), являющегося основным активатором атопического воспаления (Таблица 15).

Таблица 15 – Изменения цитокинового статуса при полиморфизме TLR4 - Asp299Gly

Цитокины	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,9 (0-29,0) 0,7-2,4	1,7 (0-3,1) 1,05-2,27	0,049
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0-1,88) 0-0	0 (0-4,88) 0-0	0,2
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,15 (0-126,2) 0-1,5	0 (0-102,7) 0-2,9	0,7
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0-164,5) 0-14,3	0 (0-289,1) 0-16,8	0,6
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	6,0 (0,3-396,5) 3,4-11,1	16,5 (0-128,0) 3,6-56,5	0,65
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,22 (0-7,9) 0-2,4	1,94 (0-34,1) 0-4,1	0,03
IL10, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	99,7 (0,7-531,1) 3,4-173,2	7,5 (2,12-200,7) 2,6-102,5	0,046
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	91,8±19,2 4,8 (0-380,7) 0,6-159,2	101,4±27,8 116,9 (0-262,2) 1,3-175,3	0,8
TNFα, пг/л	3,03±0,37	2,12±0,27	0,049

Также характерен более высокий уровень (1,94 пг/л vs 1,22 пг/л) IL9 – одного из основных регуляторов клеточного апоптоза, более низкий - в 12 раз IL10 (7,5 пг/л vs 99,7 пг/л), с которым изначально связывались полиморфизмы этого рецептора и который препятствует развитию Th2 пути воспаления; также более низкий уровень TNF α - 2,12 пг/л vs 3,03 пг/л.

Анализ показателей иммунограммы у детей с TLR4 - Asp299Gly выявил достоверные различия в исследуемых группах (Таблица 16).

Таблица 16 – Показатели иммунограммы при полиморфизме TLR4 - Asp299Gly

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2651,2±105,1	2879,8±192,6	0,27
CD3, абс.	1735,2±78,5	1868,8±123,4	0,37
CD3, %	65,0±0,82	64,5±1,05	0,72
CD4, абс.	992,0±43,9	1239,9±53,3	0,04
CD4, %	37,6±0,86	37,9±1,12	0,84
CD8, абс.	614,4±41,9	794,8±65,2	0,02
CD8, %	24,4±0,69	27,1±1,02	0,047
CD4/CD8	1,51±0,06	1,54±0,09	0,8
CD16, абс.	371,4±20,8	392,4±44,9	0,6
CD16, %	14,2±0,68	13,6±1,29	0,7
CD19, абс.	390,9±19,6	454,8±43,8	0,12
CD19, %	14,9±0,47	15,6±0,79	0,43
IgE, ME	240,2±29,5	183,2±43,4	0,30
IgA, г/л	2,02±0,13	1,96±0,20	0,8
IgM, г/л	2,08±0,09	2,20±0,17	0,5
IgG, г/л	17,9±0,85	15,7±1,55	0,17
ЦИК, у.е.	65,7±6,06	44,1±4,83	0,04
ФАН сп., %	79,85±2,06	80,6±3,52	0,85
ФАН ст., %	91,3±2,06	95,9±2,70	0,047
ФР ФАН, %	5,21±1,15	6,50±1,66	0,56
ФЧ сп., ед.	5,8±1,36	7,6±0,56	0,009
ФЧ ст., ед.	7,0±0,97	8,6±1,22	0,04
ФР ФЧ, ед.	1,29±0,68	2,33±1,27	0,4
НСТ сп., %	24,7±2,67	36,5±5,72	0,04
НСТ ст., %	64,1±2,75	80,8±5,4	0,02
ФР НСТ, %	27,7±3,4	30,1±7,66	0,7

Для субпопуляций лимфоцитов определяется большее абсолютное число Т-хелперов (1239,9 клеток против 992,0) и Т-киллеров (794,8 клеток против 614,4), при этом рост процентного содержания наблюдается лишь для последних (с 24,4% до 27,1%).

В гуморальном звене отмечается достоверно более низкое содержание ЦИК (44,1% против 65,7%) у лиц с данной мононуклеотидной заменой. В фагоцитарном звене отмечаются более высокие значения практически всех показателей: ФАН ст. (95,9% против 91,3%), ФЧ сп. (7,6 против 5,8), ФЧ ст. (8,6 против 7,0), НСТ тест сп. (36,5% против 24,7%), НСТ тест ст. (80,8% против 64,1%).

Цитокиновый профиль активации TLR4 традиционно акцентируется на IL10 и угнетении Th₁-типа иммунного ответа и реципрокной стимуляции Th₂ реакции, его активация должна усиливать атопическое воспаление [275] (Рисунок 21).

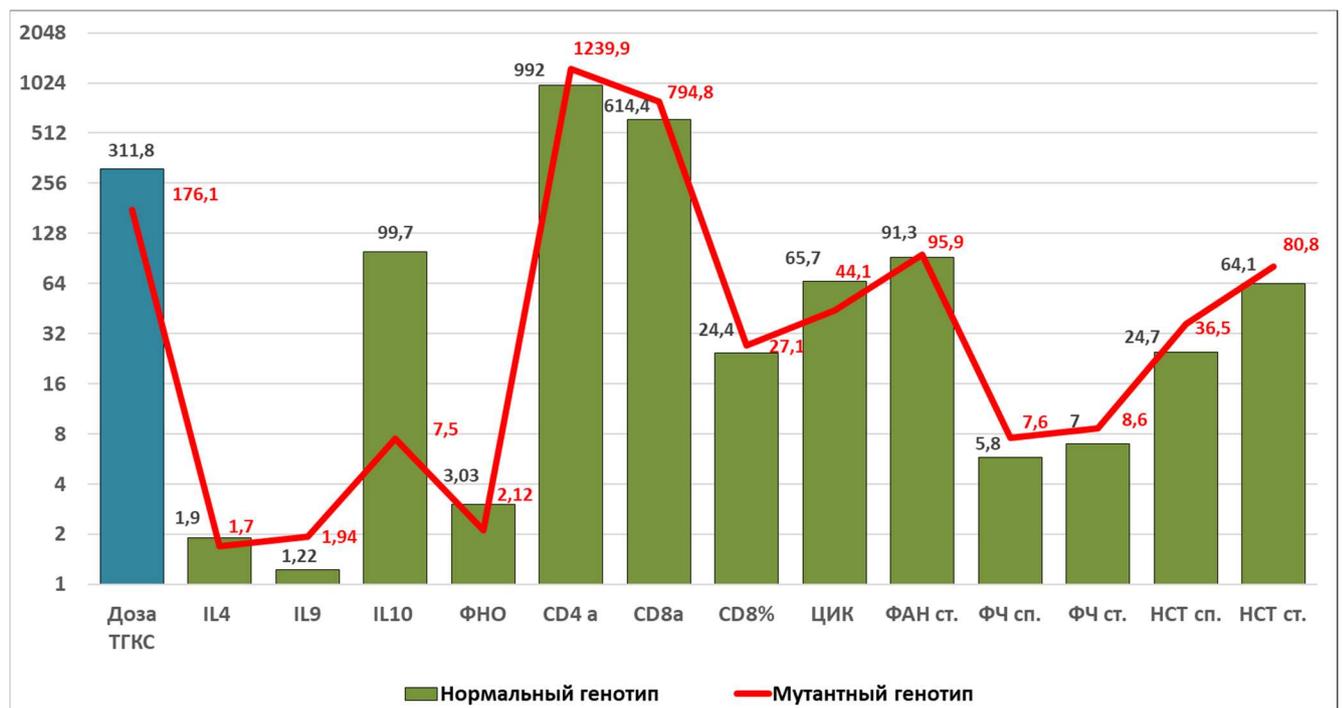


Рисунок 21 – Достоверно различимые клинико-патогенетические проявления однонуклеотидной замены TLR4 - Asp299Gly

Рассматриваемая мононуклеотидная замена снижает активность рецептора, это позволяет предположить меньшую интенсивность атопического воспаления на фоне снижения стимуляции Th₂ ответа. Это подтверждается тем, что именно пациенты, являющиеся носителями этого полиморфизма, имеют наиболее легкое

течение БА, требуют наименьшей дозы топических глюкокортикостероидов и чаще всего из всех исследованных контролируют течение своего заболевания.

Однонуклеотидная замена в гене TLR4 - Thr399Ile зачастую рассматривается как обратно коррелирующая с TLR4 - Asp299Gly. В нашем исследовании также отмечается эта корреляция, однако носители этих полиморфизмов демонстрируют противоположенные тенденции в клинических проявлениях БА (Таблица 17).

Таблица 17 – Клинические проявления полиморфизма TLR4 - Thr399Ile

Клинические проявления	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-/Z-критерий
Контролируемая БА, %	41,2	48,0	0,27
Степень тяжести (в баллах)	2,75±0,08	3,16±0,08	0,01
ОФВ ₁ , %	104,4±2,28	104,8±5,19	0,9
ПОС, %	108,9±3,31	108,9±6,74	0,9
Пробы с бронхолитиком (+), %	35,5	25,0	0,3
Доза ТГКС, мкг	266,5±33,9	220,0±42,3	0,59

Больные с полиморфным вариантом TLR4 - Thr399Ile демонстрируют достоверно более тяжелое течение БА (3,16 баллов против 2,75), но достоверных различий в доле контролируемого течения заболевания, дозе ТГКС, объективных показателях ФВД вне приступа не выявлено.

Единственным пересечением данного полиморфизма с однонуклеотидной заменой TLR4 - Asp299Gly в цитокиновом статусе (Таблица 18) является достоверно больший уровень IL9 - 3,24 пг/л vs 1,45 пг/л., кроме того, именно для этой мутации характерно более высокий уровень IL6 - 0,6 пг/л vs 0,1 пг/л., IL7 - 0,7 пг/л vs 0,1 пг/л. и, особенно, IL18, который при этой мутации выше в 22 раза – 134,9 пг/л vs 6,0 пг/л.

В показателях иммунограммы у детей с БА, несущих полиморфизм TLR4 - Thr399Ile, не только достоверных различий, но и выраженных тенденций практически не обнаруживается (Таблица 19).

Таблица 18 – Изменения цитокинового статуса при полиморфизме TLR4 - Thr399Ile

Цитокины	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,5(0-28,9) 0,71-2,3	1,4(0-18,9) 1,2-3,1	0,84
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0(0-4,9) 0-0	0(0-2,3) 0-0	0,73
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,1(0-94,9) 0-1,8	0,6(0-126,2) 0-10,4	0,045
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,1(0-164,5) 0-13,1	0,7(0-289,1) 0-20,4	0,049
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	6,5(0,3-396,5) 3,3-12,7	7,8(0-128,0) 4,6-23,1	0,86
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,45(0-34,1) 0-2,8	3,24(0-34,6) 0-5,49	0,048
IL10, пг/л	86,4±14,2	106,1±44,0	0,57
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	6,0(0-255,1) 0,45-154,1	134,9(0-380,7) 1,1-262,2	0,046
TNFα, пг/л	2,91±0,33	2,84±0,50	0,91

Таблица 19 – Показатели иммунограммы при полиморфизме TLR4 - Thr399Ile

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2723,5±107,5	2674,9±180,0	0,8
CD3, абс.	1858,2±92,9	1766,4±128,5	0,6
CD3, %	64,7±0,78	65,3±1,16	0,7
CD4, абс.	1074,7±65,1	1001,6±60,1	0,58
CD4, %	37,6±0,83	38,0±1,14	0,81
CD8, абс.	734,2±40,1	742,8±74,3	0,9
CD8, %	26,8±0,64	27,2±1,32	0,7
CD4/CD8	1,52±0,06	1,51±0,10	0,9
CD16, абс.	378,9±22,2	370,2±40,1	0,85

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-критерий
CD16, %	14,2±0,70	13,4±1,06	0,55
CD19, абс.	406,6±21,7	432,9±37,5	0,57
CD19, %	14,8±0,56	15,9±0,76	0,31
IgE, ME	224,3±27,5	226,2±54,4	0,97
IgA, г/л	2,02±0,12	1,92±0,22	0,59
IgM, г/л	2,10±0,09	2,14±0,16	0,84
IgG, г/л	18,1±0,90	14,4±0,90	0,04
ЦИК, у.е.	58,5±5,29	64,5±10,0	0,6
ФАН сп., %	79,7±2,05	81,5±3,43	0,69
ФАН ст., %	85,2±2,03	87,3±2,11	0,61
ФР ФАН, %	5,47±1,13	5,82±1,56	0,88
ФЧ сп., ед.	6,46±0,84	5,46±0,59	0,66
ФЧ ст., ед.	7,74±0,91	8,03±1,52	0,88
ФР ФЧ, ед.	1,28±0,61	2,56±1,54	0,38
НСТ сп., %	27,9±2,82	27,6±5,71	0,97
НСТ ст., %	59,3±2,69	49,3±6,10	0,11
ФР НСТ, %	31,1±3,65	21,7±6,38	0,24

Единственным исключением является достоверно более низкое (14,4 г/л против 18,1 г/л) содержание IgG в сыворотке крови.

Таким образом, мононуклеотидная замена TLR4 - Thr399Ile имеет меньшее количество клинико-патогенетических проявлений при БА, чем TLR4 - Asp299Gly (Рисунок 22).



Рисунок 22 – Достоверно различимые иммуно-патогенетические проявления однонуклеотидной замены TLR4 - Thr399Ile

Кроме того, при этой мутации имеют иную направленность изменения цитокинового статуса у пациентов с БА, усиливаются в первую очередь неспецифические механизмы воспаления.

TLR9 (CD289) локализуется внутриклеточно на эндоплазматическом ретикулуме с последующим перемещением в эндосомы после стимуляции. TLR9 реагирует на неметилированные молекулы ДНК, то есть его возбуждают преимущественно паттерны внутриклеточных патогенов, активируемый им цитокиновый профиль соответствует Th₁-типу реагирования [257, 197, 275]. При исследованиях носителей некоторых полиморфизмов в гене TLR9 также отмечены их разнообразные клинико-патогенетические проявления, и одна из них – мононуклеотидная замена TLR9 - T1237C – считается более значима. Эта мононуклеотидная замена происходит в промоторной части гена и, соответственно, влияет на количество экспрессируемого белка-рецептора. Известно, что носители полиморфной алели экспрессируют его более активно, в некоторых работах показана большая вероятность возникновения аутоиммунного процесса на фоне данной замены [254].

Наши исследования показали, что для ее носителей характерно достоверно более легкое течение БА (2,47 балла против 2,96 баллов) и они более чем в два раза чаще (53,3% против 23,9%), полностью контролируют заболевание, при этом объем терапии, требуемый для контроля, не различается (Таблица 20).

Таблица 20 – Клинические проявления полиморфизма TLR9 - T1237C

Клинические проявления	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-/Z-критерий
Контролируемая БА, %	23,9	53,3	0,008
Степень тяжести (в баллах)	2,96±0,05	2,47±0,19	0,02
ОФВ ₁ , %	106,0±2,40	101,1±4,06	0,27
ПОС, %	110,2±3,43	105,9±5,86	0,51
Пробы с бронхолитиком (+), %	32,4	37,5	0,37
Доза ТГКС, мкг	248,4±27,9	286,8±76,8	0,55

У носителей этой мононуклеотидной замены отмечают (Таблица 21) более низкие уровни основных индукторов атопического воспаления – IL4 и 5 (1,0 пг/л

vs 1,6 пг/л и 0,1 пг/л vs 0,50 пг/л, соответственно).

Таблица 21 – Изменения цитокинового статуса при полиморфизме TLR9 - T1237C

Цитокины	Полиморфизм (-) n=126	Полиморфизм (+) n=41	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,6(0,36-28,9) 0,9-2,4	1,0(0-18,9) 0,6-2,1	0,053
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,5(0-4,9) 0,0-0,18	0,1(0-1,9) 0,0-0,0	0,048
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,1(0-55,7) 0,0-0,0	0,6(0-126,2) 0,0-0,11	0,04
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0(0-164,5) 0,0-5,13	0(0-289,1) 0,0-25,5	0,34
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	7,1(0-396,5) 4,7-23,1	3,3(0,3-77,2) 2,5-8,1	0,044
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,3(0-31,6) 0,0-2,9	1,5(0-34,1) 0,0-3,6	0,4
IL10, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	11,2(0,7-531,1) 3,18-157	107,6(1,6-204,1) 2,27-172,8	0,79
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	75,1(0-380,7) 1,1-168,71	1,3(0-190,5) 0,3-137,3	0,22
TNF α , пг/л	2,82 \pm 0,28	3,14 \pm 0,79	0,64

При этом, у них определен более высокий (0,6 пг/л против 0,1 пг/л) уровень IL6 – основного индуктора неспецифического воспаления, вероятно именно с этим связано отсутствие различий в требуемой для достижения контроля дозе ТГКС. Кроме того, у таких пациентов отмечается достоверное, снижение уровня IL8 (3,3 пг/л против 7,1 пг/л), являющегося основным фактором хемотаксиса гранулоцитов, в том числе эозинофильных, и таким образом влияющего на atopическое воспаление.

При сравнении иммунограммы так же есть различия (Таблица 22).

Таблица 22 – Показатели иммунограммы при полиморфизме TLR9 - T1237C

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2710,8±92,8	2721,7±250,0	0,96
CD3, абс.	1753,8±65,4	1825,7±186,0	0,64
CD3, %	64,4±0,70	66,2±1,63	0,23
CD4, абс.	1061,0±64,6	1055,3±88,4	0,96
CD4, %	37,1±0,79	39,6±1,44	0,11
CD8, абс.	730,8±31,9	751,8±105,2	0,79
CD8, %	26,0±0,66	23,1±1,19	0,04
CD4/CD8	1,4±0,05	1,8±0,12	0,03
CD16, абс.	390,9±23,5	335,5±31,4	0,21
CD16, %	14,4±0,70	13,1±1,14	0,37
CD19, абс.	407,7±18,7	425,2±51,3	0,69
CD19, %	15,0±0,44	15,1±0,95	0,98
IgE, ME	227,9±28,8	214,9±46,6	0,92
IgA, г/л	1,4±0,12	1,8±0,19	0,04
IgM, г/л	2,08±0,08	2,22±0,21	0,47
IgG, г/л	17,5±0,83	16,8±1,69	0,67
ЦИК, у.е.	60,6±5,34	57,2±9,78	0,75
ФАН сп., %	79,1±2,05	83,0±3,54	0,34
ФАН ст., %	85,5±1,90	86,0±3,60	0,89
ФР ФАН, %	6,36±1,08	2,96±1,95	0,09
ФЧ сп., ед.	6,07±0,83	6,83±1,07	0,63
ФЧ ст., ед.	7,96±1,02	7,27±0,60	0,71
ФР ФЧ, ед.	1,89±0,67	0,44±1,17	0,28
НСТ сп., %	26,3±2,85	32,7±5,30	0,28
НСТ ст., %	54,2±2,82	66,8±4,94	0,03
ФР НСТ, %	27,6±0,57	34,2±2,79	0,38

В этой группе отмечается достоверное снижение (23,1% против 26,0%) доли Т-киллеров при отсутствии разницы в их абсолютном количестве, соответственно рост иммунорегуляторного индекса с 1,4 до 1,8.

Пациенты, несущие эту мононуклеотидную замену, имеют достоверно более высокий (1,8 г/л против 1,4 г/л) уровень IgA, обеспечивающего местную защиту, в том числе слизистых бронхов. У таких больных отмечается достоверно более

высокий уровень стимулированного НСТ теста, при отсутствии достоверных различий в иных показателях фагоцитоза.

Цитокиновый профиль активации TLR9 стимулирует Th₁-тип иммунного ответа и реципрочно угнетает Th₂ реакции, его активация должна снижать активность atopического воспаления (Рисунок 23).

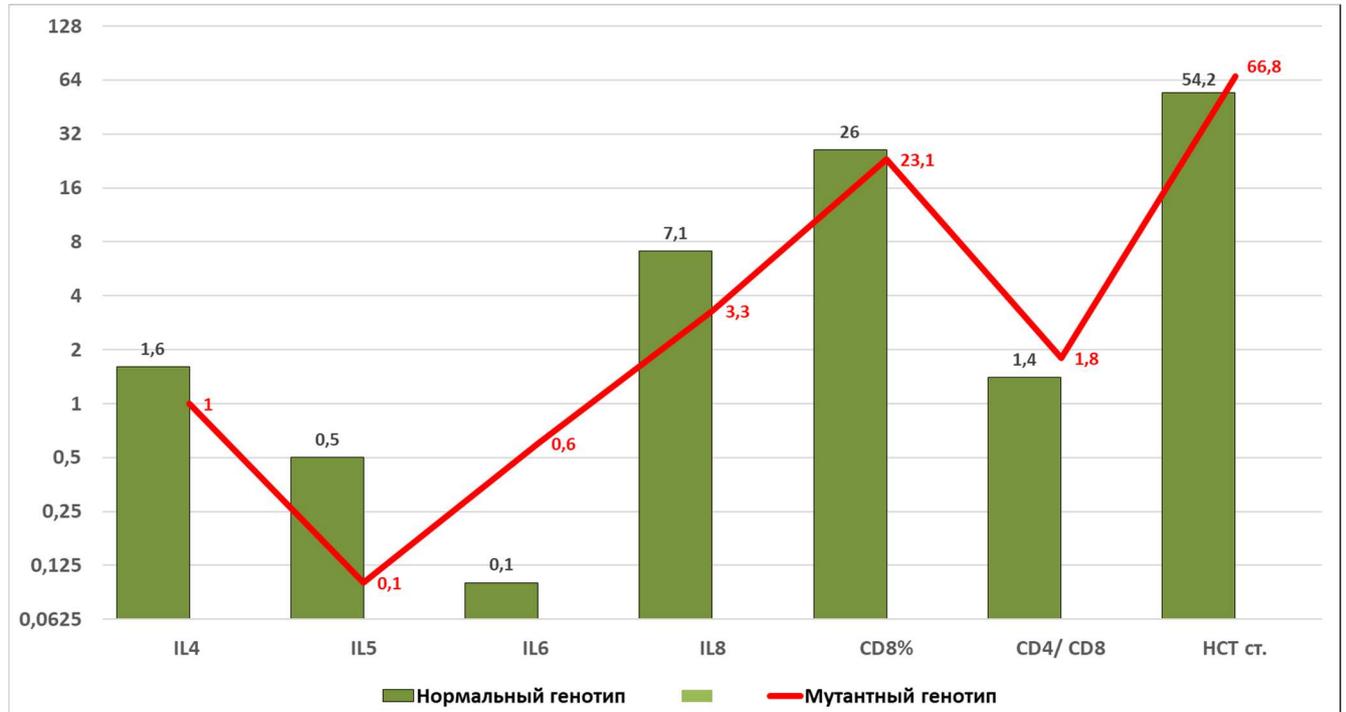


Рисунок 23 – Достоверно различимые иммуно-патогенетические проявления однонуклеотидной замены TLR9 - T1237C

Рассматриваемая мононуклеотидная замена увеличивает экспрессию рецептора, это позволяет предположить меньшую интенсивность atopического воспаления на фоне угнетения Th₂ ответа. Действительно, именно пациенты, являющиеся носителями этого полиморфизма, имеют более легкое течение БА и лучше контролируют течение своего заболевания.

В исследовании при однонуклеотидной замене TLR9 A2848G также отмечается более частый (51,7% против 20,0%) контроль над БА в группе носителей этой замены (Таблица 23). Только у носителей данного полиморфизма отмечается достоверно более высокий (111,1% vs 101,3%) уровень ОФВ1, при этом различия в тяжести заболевания нет.

Таблица 23 – Клинические проявления полиморфизма TLR9 - A2848G

Клинические проявления	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-/Z-критерий
Контролируемая БА, %	20,0	51,7	0,001
Степень тяжести (в баллах)	2,91±0,07	2,76±0,12	0,27
ОФВ ₁ , %	101,3±2,37	111,1 ±3,67	0,02
ПОС, %	109,9±3,65	106,5±4,92	0,69
Пробы с бронхолитиком (+), %	38,9	23,5	0,07
Доза ТККС, мкг	260,1±61,0	220,0±46,5	0,6

Так же, как и у пациентов с предыдущей однонуклеотидной заменой TLR9 - T1237C, у носителей этой замены TLR9 - A2848G достоверно, низкий уровень IL4 (1,4 пг/л vs 1,8 пг/л) – важного стимулятора атопического воспаления (Таблица 24). Уровень IL8 – фактора хемотаксиса гранулоцитов вообще и эозинофилов, в частности, достоверно, почти в 3 раза (6,6 пг/л vs 6,1 пг/л) повышен.

Таблица 24 – Изменения цитокинового статуса при полиморфизме TLR9 - A2848G

Цитокины	Полиморфизм (-) n=88	Полиморфизм (+) n=79	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,8(0-28,9) 0,9-2,4	1,4(0-19,9) 0,6-19	0,048
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0(0-2,3) 0,0-0,0	0(0-4,9) 0,0-0,0	0,55
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0(0-126,2) 0,0-0,74	0,72(0-102,7) 0,0-7,3	0,31
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0(0-289,1) 0,0-14,3	0(0-118,9) 0,0-5,1	0,77
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	6,1(0-128,0) 3,2-14,0	6,6(0,9-396,5) 4,0-20,5	0,049
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,3(0-31,6) 0,0-2,88	1,6(0-34,1) 0,12-3,71	0,46
IL10, пг/л Me (Min-Max)	50,3(1,0-531,1)	95,4(0,7-269,0)	0,61

Цитокины	Полиморфизм (-) n=88	Полиморфизм (+) n=79	Достоверность (p) t-/U-критерий
LQ - HQ	2,73-169,3	3,41-157,0	
IL18, пг/л			
Me (Min-Max)	94,9(0-380,7)	5,0(0-329,1)	0,74
LQ - HQ	1,3-185,4	0,3-137,3	
TNF α , пг/л	2,56 \pm 0,37	2,88 \pm 0,40	0,66

При этой однонуклеотидной замене отмечаются множественные, но разнонаправленные изменения в иммунограмме (Таблица 25).

Таблица 25 – Показатели иммунограммы при полиморфизме TLR9 - A2848G

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2683,9 \pm 142,4	2745,6 \pm 117,5	0,74
CD3, абс.	1709,1 \pm 102,8	1839,6 \pm 84,2	0,33
CD3, %	63,1 \pm 0,92	66,8 \pm 0,89	0,005
CD4, абс.	1028,3 \pm 89,1	1093,5 \pm 54,6	0,54
CD4, %	35,8 \pm 0,96	39,7 \pm 0,94	0,005
CD8, абс.	740,5 \pm 57,6	731,1 \pm 38,9	0,89
CD8, %	26,8 \pm 0,84	26,9 \pm 0,78	0,94
CD4/CD8	1,46 \pm 0,08	1,59 \pm 0,07	0,26
CD16, абс.	412,1 \pm 31,1	339,1 \pm 21,4	0,048
CD16, %	15,4 \pm 0,92	12,6 \pm 0,71	0,02
CD19, абс.	408,2 \pm 25,6	416,2 \pm 28,0	0,83
CD19, %	15,31 \pm 0,51	14,8 \pm 0,64	0,54
IgE, ME	231,1 \pm 35,5	217,7 \pm 33,8	0,78
IgA, г/л	1,65 \pm 0,12	2,39 \pm 0,16	0,0004
IgM, г/л	2,11 \pm 0,11	2,12 \pm 0,12	0,96
IgG, г/л	16,1 \pm 1,16	19,0 \pm 1,52	0,12
ЦИК, у.е.	54,4 \pm 8,40	66,2 \pm 7,94	0,31
ФАН сп., %	86,3 \pm 1,72	76,4 \pm 2,85	0,003
ФАН ст., %	91,5 \pm 1,19	82,8 \pm 2,76	0,004
ФР ФАН, %	5,18 \pm 1,41	6,40 \pm 1,79	0,59
ФЧ сп., ед.	6,01 \pm 0,36	6,97 \pm 1,77	0,58
ФЧ ст., ед.	6,98 \pm 0,41	8,97 \pm 2,05	0,32
ФР ФЧ, ед.	0,97 \pm 0,33	2,00 \pm 1,49	0,48
НСТ сп., %	25,7 \pm 3,73	27,6 \pm 4,24	0,74
НСТ ст., %	64,2 \pm 3,87	51,0 \pm 3,80	0,02
ФР НСТ, %	38,5 \pm 5,06	22,9 \pm 4,82	0,003

Обнаружено достоверное увеличение (66,8% против 63,1%) доли Т-лимфоцитов за счет роста (39,7% против 35,8%) доли Т-хелперов и снижения абсолютного числа и доли натуральных киллеров (339,1 против 412,1 и 12,6% против 15,4% соответственно).

Мононуклеотидная замена TLR9 A2848G происходит в участке гена, кодирующего TIR-домен рецептора, следовательно, влияет на проведение сигнала от него, полиморфизм в этой области приводит к более разнонаправленным изменениям, чем замена в области промотора, и тем более в интронной части гена. Отмечаются как противовоспалительные – падение уровня IL4, абсолютного числа и доли натуральных киллеров, спонтанной и стимулированной ФАН, симулированного НСТ и его резерва, так и провоспалительные – рост содержания IL8, TNF α , пг/л, Т-хелперов, IgA, эффекты данного полиморфизма (Рисунок 24).

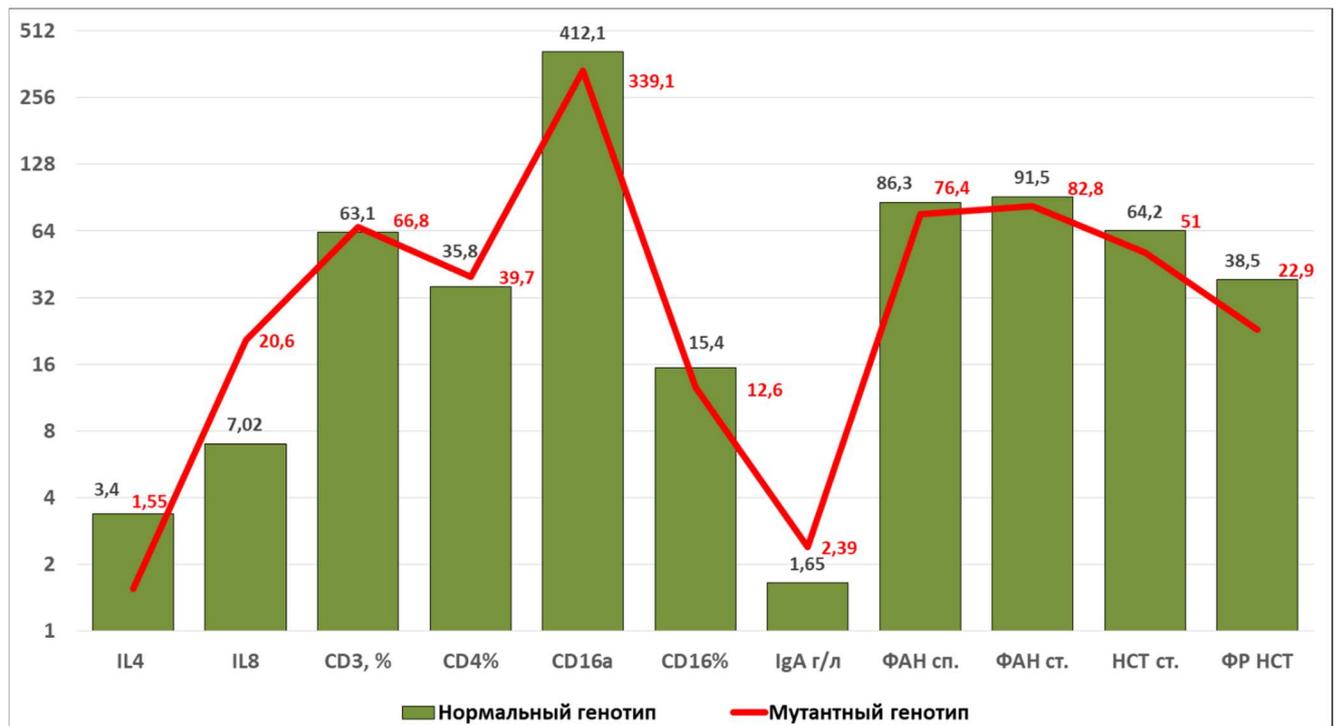


Рисунок 24 – Достоверно различимые иммуно-патогенетические проявления однонуклеотидной замены TLR9 - A2848G

4.2. Клинико-иммунологические проявления полиморфизмов генов цитокинов при контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астме

Следующим звеном сети сигнальных молекул иммунной системы являются интерлейкины. Это ключевые белковые регуляторы реакции хозяина на инфекцию и воспаление инициируют и модулируют иммунный ответ, а также системные и местные межклеточные регуляторные факторы. Появляется все больше свидетельств того, что цитокиновый ответ определяется генетически. У здоровых людей существуют стабильные и воспроизводимые различия в производстве цитокинов, и эти различия связаны с генетическими вариациями в кодирующих генах [81]. Таким образом, интерлейкиновый статус определяется не только реактивностью Toll-подобных рецепторов, полиморфизмы генов, которые представлены выше, но и однонуклеотидными заменами в самих генах интерлейкинов. Достоверную разницу с группой сравнения в клиническом течении БА в ходе исследования продемонстрировали пациенты с полиморфизмами IL6, 10 и фактора некроза опухолей.

IL6 является одним из самых мощных и неспецифических индукторов воспаления, активизирует практически все его звенья. В этой работе изучалась однонуклеотидная замена в гене IL6 C 174 G. Было отмечено, что при ее наличии чаще встречаются заболевания, связанные с неспецифическими воспалениями эндотелия, фиброзом, такие как атеросклероз, инфаркт миокарда, диабетическая ретинопатия [62].

В ходе исследования выявлено (Таблица 26), что дети с мононуклеотидной заменой IL6 C 174 G имеют более тяжелое течение БА (3,02 балла против 2,7).

Исследуемый полиморфизм находится в промоторном участке гена IL6, при этом ее влияние на уровень IL6 в сыворотке крови может быть разнонаправленным; так в некоторых работах показано его достоверное повышение у носителей полиморфного аллеля [141, 263], в других [234, 242], напротив, снижение. Это, вероятно, связано с различием в стимулах, воздействующих на измененный участок промотора. У наших пациентов получены следующие результаты (Таблица 27).

Таблица 26 – Клинические проявления полиморфизма П6 С174G

Клинические проявления	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-/Z-критерий
Контролируемая БА, %	46,2	40,2	0,25
Степень тяжести (в баллах)	2,70±0,09	3,02±0,09	0,022
ОФВ ₁ , %	105,1±2,43	102,9±4,10	0,65
ПОС, %	107,9±3,54	110,9±5,40	0,63
Пробы с бронхолитиком (+), %	35,1	31,2	0,39
Доза ТГКС, мкг	237,5±31,4	310,0±64,8	0,26

Таблица 27 – Изменения цитокинового статуса при полиморфизме П6 С174G

Цитокины	Полиморфизм (-) n=88	Полиморфизм (+) n=79	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,1 (0,0-28,9) 0,6-2,3	1,6 (0,0-18,9) 0,9-2,4	0,32
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0,0-4,9) 0,0-0,0	0 (0,0-2,3) 0,0-0,0	0,46
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,1 (0,0-55,7) 0,0-1,67	0,6 (0,0-126,2) 0,0-6,8	0,02
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0,0-118,9) 0,0-13,12	0 (0,0-189,1) 0,0-24,53	0,057
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	3,6 (0,3-396,5) 2,5-8,1	7,1 (0,0-128,0) 4,7-27,9	0,68
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,45 (0,0-34,1) 0,0-3,36	1,46 (0,0-31,6) 0,0-2,88	0,80
IL10, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	96,0 (1,6-220,0) 2,2-172,8	49,5 (0,7-531,1) 3,4-155,9	0,79
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	4,4 (0,0-205,2) 0,6-159,2	21,2 (0,0-380,7) 0,3-172,4	0,45
TNF α , пг/л	3,33±0,64	2,73±0,25	0,31

Обнаружен достоверно, в шесть раз более высокий (0,6 пг/л vs 0,1 пг/л)

уровень, собственно, IL6 и тенденция к повышению уровня IL7, который стимулирует размножение и пролиферацию как Т-, так и В-лимфоцитов и усиливает любое воспаление.

В показателях иммунограммы у носителей данного полиморфизма отмечается достоверно более низкое (279,0 против 412,8) абсолютное количество натуральных киллеров, достоверно меньшие доли и абсолютное количество зрелых В-лимфоцитов (13,9% против 16,0% и 295,2 против 382,2 соответственно) (Таблица 28).

Таблица 28 – Показатели иммунограммы при полиморфизме IL6 C174G

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2790,8±134,0	2679,0±128,2	0,55
CD3, абс.	1804,0±98,2	1771,0±89,8	0,81
CD3, %	64,1±1,01	65,7±0,77	0,25
CD4, абс.	1096,6±85,7	1027,8±53,4	0,51
CD4, %	36,8±1,01	38,5±0,92	0,21
CD8, абс.	760,7±51,6	730,9±48,1	0,67
CD8, %	27,07±0,75	26,8±0,90	0,83
CD4/CD8	1,46±0,07	1,57±0,08	0,32
CD16, абс.	412,8±63,5	279,0±56,0	0,05
CD16, %	15,6±2,1	12,4±1,7	0,27
CD19, абс.	382,2±35,1	295,2±23,7	0,049
CD19, %	16,0±0,73	13,9±0,81	0,047
IgE, ME	425,9±143,7	403,2±133,8	0,9
IgA, г/л	1,78±0,11	2,16±0,17	0,049
IgM, г/л	16,8±0,13	17,5±0,10	0,59
IgG, г/л	2,17±1,23	2,08±1,10	0,69
ЦИК, у.е.	61,4±7,13	64,8±7,48	0,74
ФАН сп., %	83,4±2,25	75,4±3,18	0,04
ФАН ст., %	87,9±1,96	82,7±2,7	0,047
ФР ФАН, %	4,65±1,37	9,56±2,27	0,049
ФЧ сп., ед.	6,10±0,52	6,33±1,39	0,86
ФЧ ст., ед.	6,66±0,35	9,10±0,71	0,061
ФР ФЧ, ед.	0,56±0,51	2,77±1,1	0,046
НСТ сп., %	25,6±3,24	30,6±3,92	0,32
НСТ ст., %	60,1±2,49	52,9±2,43	0,047
ФР НСТ, %	34,4±4,31	21,8±4,53	0,04

В гуморальном звене иммунограммы отмечается более высокий уровень IgA (2,16г/л против 1,78 г/л).

В фагоцитарном звене – достоверное снижение спонтанной и стимулированной фагоцитарной активности нейтрофилов (75,4% против 83,4% и 82,7% против 87,9% соответственно), рост (4,65 против 9,56) резерва фагоцитарной активности нейтрофилов и резерва фагоцитарного числа (2,77 против 0,56 соответственно), более низкие показатели НСТ – теста и его фагоцитарного резерва (52,9% против 60,1% и 21,8% против 34,4% соответственно).

В данном исследовании мононуклеотидная замена П6 С 174 G характеризуется как в целом провоспалительная, с чем и связано более тяжелое течение заболевания. Однако на специфические компоненты атопического воспаления ее влияния не выявлено (Рисунок 25).

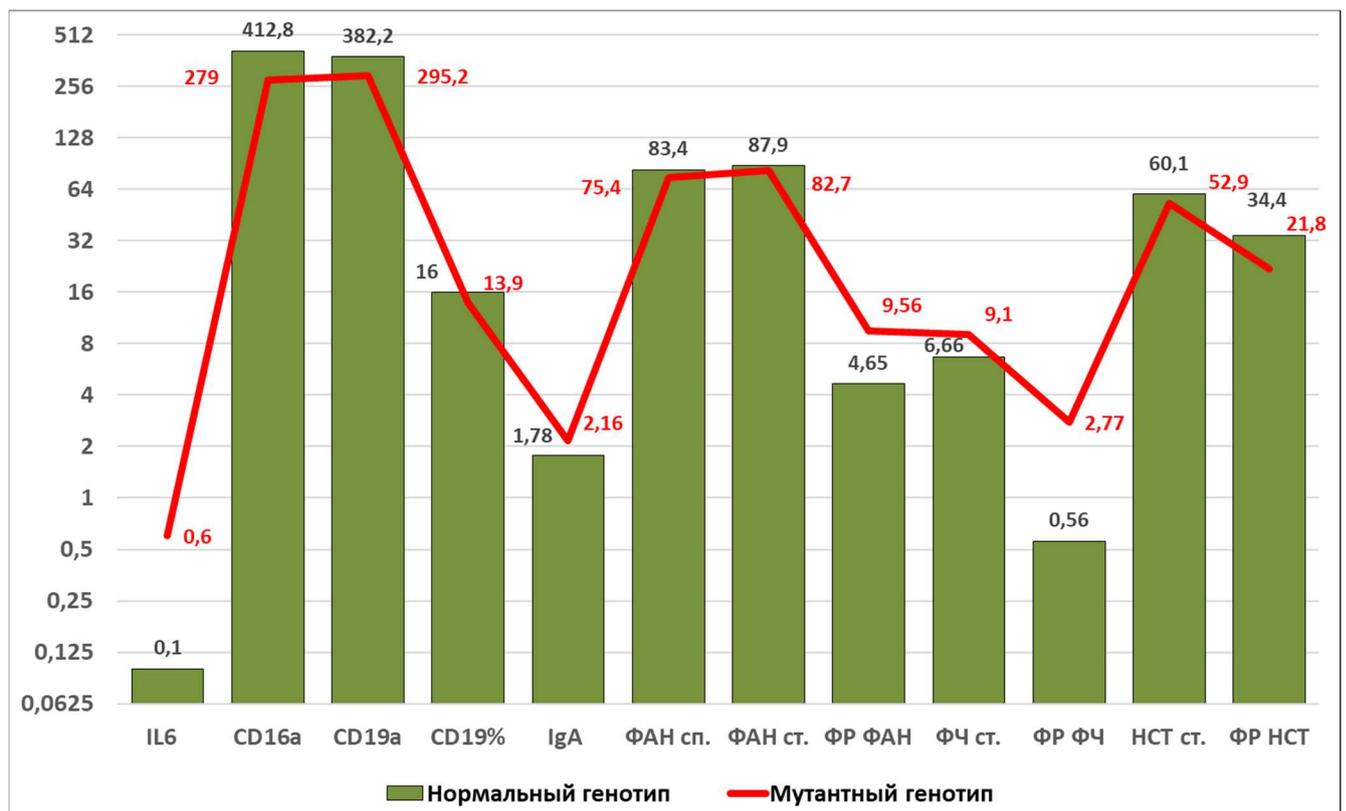


Рисунок 25 – Достоверно различимые иммуно-патогенетические проявления однонуклеотидной замены П6 С 174 G

IL10 снижает экспрессию цитокинов Th₁ и реципрокно усиливает созревание и дифференцировку Th₂, в результате улучшается выживаемость В-клеток,

увеличивается скорость их пролиферации и, в конечном итоге, выработка иммуноглобулинов всех типов. Таким образом, этот интерлейкин усиливает гуморальный ответ вообще и атопическое воспаление, в частности. Мононуклеотидная замена П10 С 592 А находится в промоторном участке гена и, таким образом, влияет на регуляцию экспрессии IL10.

Носители этого полиморфизма достоверно чаще (53,7% против 39,3%) способны контролировать течение БА, имеют тенденцию к более легкому ее течению (2,79 балла против 2,88 баллов), у них достоверно более высокий показатель ОФВ₁ вне обострения (110,5% против 101,1% у пациентов с нормальным генотипом) (Таблица 29).

Таблица 29 – Клинические проявления полиморфизма П10 С592А

Клинические проявления	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-/Z критерий
Контролируемая БА, %	39,3	53,7	0,047
Степень тяжести (в баллах)	2,88±0,08	2,79±0,12	0,53
ОФВ ₁ , %	101,1±2,74	110,5±2,88	0,03
ПОС, %	108,5±4,06	107,9±3,99	0,91
Пробы с бронхолитиком (+), %	33,3	36,8	0,62
Доза ТГКС, мкг	250,6±32,7	282,6±60,3	0,61

В интерлейкиновом статусе пациентов с этой однонуклеотидной заменой кроме достоверно более низкого уровня, собственно, IL10 (71,9 пг/л против 96,6 пг/л) отмечается достоверно, почти в два раза снижение (1,1 пг/л против 1,85 пг/л) IL4, являющегося одним из основных акторов атопического воспаления, отмечается и более низкий уровень IL8 (4,8 пг/л против 7,2 пг/л), что позволяет предположить снижение и неспецифического воспаления в этой группе больных с БА (Таблица 30).

При анализе показателей иммунограммы у носителей данной мононуклеотидной замены обнаружено достоверное повышение (66,3% против 63,7%) доли Т-лимфоцитов, вероятно за счет достоверно более высокого содержания Т-хелперов как абсолютного (1151,2 против 987,7), так и относительного (39,4% против 36,1%),

что привело и к достоверному росту (1,59 против 1,44) иммунорегуляторного индекса.

Таблица 30 – Изменения цитокинового статуса при полиморфизме II10 C592A

Цитокины	Полиморфизм (-) n=88	Полиморфизм (+) n=79	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,85 (0,0-28,9) 1,3-3,1	1,1 (0,0-14,4) 0,4-1,9	0,024
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0,0-4,9) 0,0-0,0	0 (0,0-1,9) 0,0-0,0	0,99
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0,0-126,2) 0,0-2,4	0,3 (0,0-94,9) 0,0-2,5	0,49
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0,0-289,1) 0,0-0,0	0 (0,0-164,5) 0,0-27,2	0,064
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	7,2 (0,0-396,5) 3,8-27,9	4,8 (0,0-73,5) 3,2-11,1	0,042
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,7 (0,0-7,9) 0,12-3,12	0,52 (0,0-34,1) 0,0-3,6	0,13
IL10, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	96,6 (1,6-531,1) 3,8-157,0	71,9 (0,7-220,0) 2,4-131,9	0,04
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	13,0 (0,0-380,7) 0,6-190,5	5,0 (0,0-194,8) 0,3-155,8	0,36
TNF α , пг/л	2,64 \pm 0,34	3,31 \pm 0,45	0,23

Кроме того, отмечается достоверно более низкая (14,2 против 15,6) доля активных В-лимфоцитов, что также вероятно обусловлено ростом доли Т-хелперов. В гуморальном звене отмечается достоверно более высокие уровни IgA и IgG (2,21г/л vs 1,79 г/л и 21,1 г/л vs 16,2 г/л соответственно). В фагоцитарном звене достоверно более низкие показатели спонтанного (75,4 vs 83,4) и стимулированного ФАН (81,7 vs 89,1) (Таблица 31).

Таблица 31 – Показатели иммунограммы при полиморфизме П10 С592А

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2725,5±128,7	2736,6±137,7	0,95
CD3, абс.	1757,1±95,4	1816,1±94,2	0,66
CD3, %	63,7±0,89	66,3±0,96	0,04
CD4, абс.	987,7±43,7	1151,2±87,0	0,047
CD4, %	36,1±0,8	39,4±1,0	0,01
CD8, абс.	753,8±51,9	738,1±49,2	0,82
CD8, %	27,4±0,85	26,5±0,76	0,44
CD4/CD8	1,44±0,06	1,59±0,05	0,049
CD16, абс.	388,3±29,1	371,2±26,4	0,67
CD16, %	14,3±0,89	13,6±0,77	0,57
CD19, абс.	388,3±29,1	399,6±30,6	0,79
CD19, %	15,6±0,50	14,2±0,66	0,046
IgE, ME	225,7±34,4	245,8±36,0	0,68
IgA, г/л	1,79±0,12	2,21±0,16	0,03
IgM, г/л	2,10±0,10	2,14±0,13	0,79
IgG, г/л	16,2±0,82	21,1±2,37	0,048
ЦИК, у.е.	62,3±7,84	47,5±8,97	0,47
ФАН сп., %	83,4±1,8	75,4±3,19	0,02
ФАН ст., %	89,1±1,53	81,7±3,14	0,02
ФР ФАН, %	5,66±1,19	6,23±1,62	0,77
ФЧ сп., ед.	6,06±0,53	6,39±1,39	0,81
ФЧ ст., ед.	7,28±0,64	8,35±1,59	0,51
ФР ФЧ, ед.	1,22±0,78	1,96±0,87	0,52
НСТ сп., %	26,4±3,32	29,8±3,89	0,51
НСТ ст., %	57,9±3,41	55,3±3,70	0,60
ФР НСТ, %	31,4±4,55	24,9±4,34	0,31

Наиболее значимым, с точки зрения атопического воспаления, проявлением мононуклеотидной замены П10 С 592 А оказалось снижение уровня IL4 и, соответственно, активности атопического воспаления, которое нашло свое выражение в изменениях иммуно-патогенетических параметров течения БА (Рисунок 26).

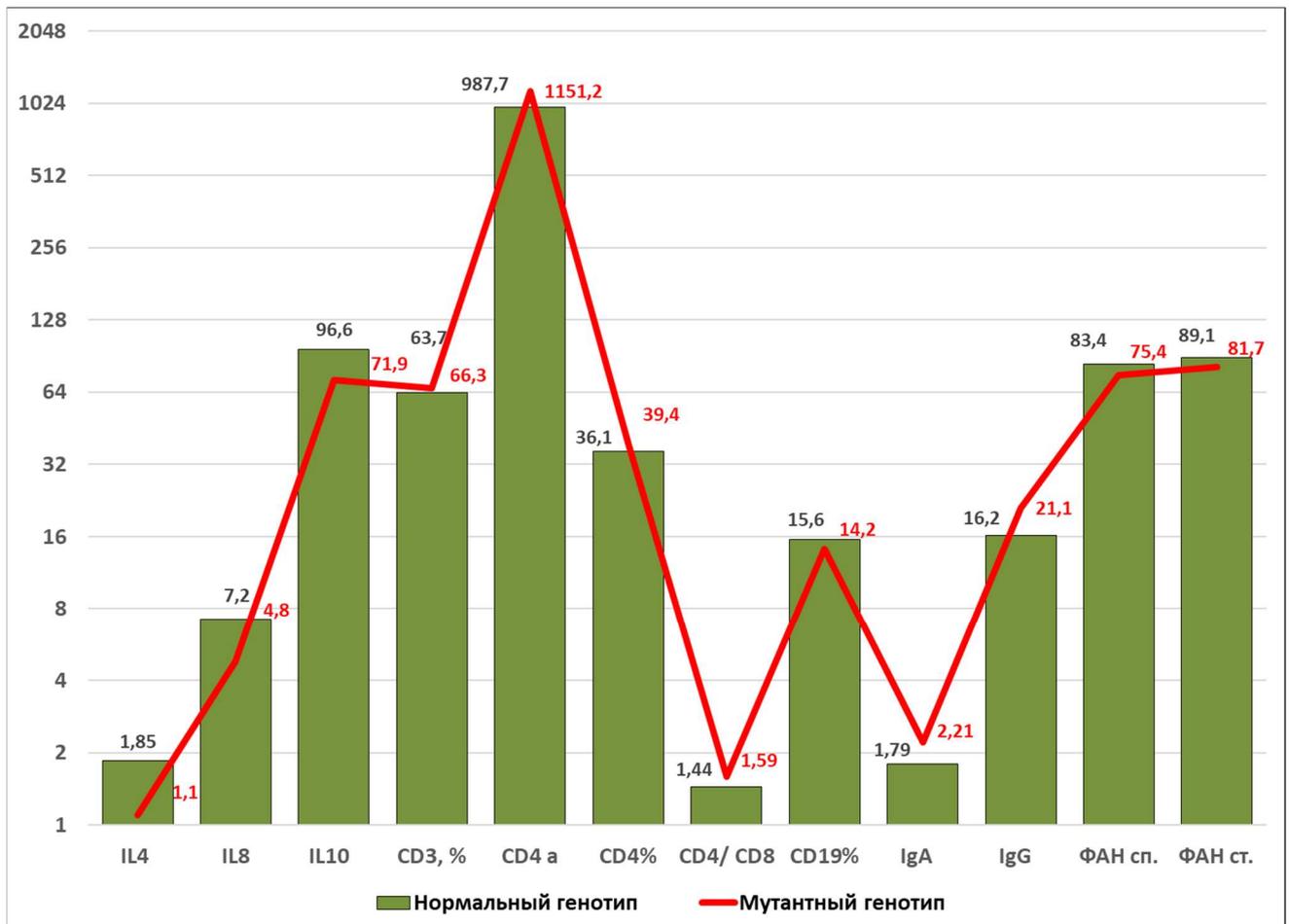


Рисунок 26 – Достоверно различимые иммуно-патогенетические проявления однонуклеотидной замены П10 С 592 А

Фактор некроза опухолей относится к провоспалительным цитокинам, однако в большей степени активирует Th_1 ответ и реципрочно угнетает Th_2 ответ. Однонуклеотидная замена $TNF\alpha$ G 308 А расположена в промоторном участке гена, она усиливает его экспрессию и синтез данного интерлейкина [250].

Носители этого полиморфизма достоверно, почти в два раза чаще (66,7% против 35,9%) имеют контролируемое течение БА, у них отмечена и тенденция к более легкому (2,7 балла против 2,88 балла) течению. Дети данной группы достоверно, более чем в три раза реже (12,5% против 38,6%) имеют положительную пробу с бронхолитиком вне обострения заболевания, для достижения контроля над БА им требуется достоверно более низкая доза топических глюкокортикостероидов (Таблица 32).

Таблица 32 – Клинические проявления полиморфизма TNF α G308A

Клинические проявления	Полиморфизм (-) n=134	Полиморфизм (+) n=33	Достоверность (p) t-/Z-критерий
Контролируемая БА, %	35,9	66,7	0,002
Степень тяжести (в баллах)	2,88 \pm 0,07	2,70 \pm 0,16	0,28
ОФВ ₁ , %	103,7 \pm 2,39	108,6 \pm 4,15	0,40
ПОС, %	107,7 \pm 3,22	111,7 \pm 7,44	0,62
Пробы с бронхолитиком (+), %	38,6	12,5	0,005
Доза ТККС, мкг	279,2 \pm 32,9	177,3 \pm 56,5	0,046

В цитокиновом статусе у носителей этой мононуклеотидной замены выявлен ряд изменений (Таблица 33).

Таблица 33 – Изменения цитокинового статуса при однонуклеотидной замене в гене TNF α G 308 A

Цитокины	Полиморфизм (-) n=88	Полиморфизм (+) n=79	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,8 (0,0-28,9) 1,4-3,1	1,7 (0,0-18,9) 0,75-2,32	0,87
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,27 (0,0-4,8) 0,0-0,0	0,01 (0,0-0,3) 0,0-0,0	0,049
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,01 (0,0-126,2) 0,0-1,8	0,4 (0,0-110,9) 0,0-5,18	0,53
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0,0-289,1) 0,0-0,14,69	0 (0,0-164,4) 0,0-0,0	0,96
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	6,0 (0,0-396,5) 3,4-15,8	7,4 (0,3-105,4) 2,8-27,86	0,74
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,2 (0,0-34,1) 0,0-312	2,2 (0,0-6,7) 1,46-3,6	0,93
IL10, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	96,6 (1,0-309,5) 3,18-173,2	11,2 (0,7-531,1) 2,27-119,4	0,89
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	5,0 (0,0-329,1) 0,3-155,81	99,1 (0,1-380,7) 0,8-179,92	0,5
TNF α , пг/л	2,83 \pm 0,10	3,15 \pm 0,12	0,048

Показано наличие достоверно более высокого уровня собственно TNF α (3,15 пг/л против 2,83 пг/л) отмечается достоверное, многократное снижение (0,01 пг/л против 0,27 пг/л) уровня IL5, являющегося одним из основных медиаторов местного атопического воспаления, аттрактором базофилов и эозинофилов, не только привлекающим их в место воспаления, но и усиливающим синтез биологически активных веществ в этих клетках.

Изучены показатели иммунограммы у больных - носителей данной замены. В клеточном звене иммунограммы достоверных различий между носителями нормального и полиморфного аллеля не выявлено

В гуморальном звене у детей с этим полиморфизмом отмечается достоверно более низкий уровень IgE, он все равно значительно превышает возрастную норму, что естественно для пациентов, страдающих атопическим заболеванием, но более чем в полтора раза ниже (212,2 МЕ/л против 355,2 МЕ/л).

В фагоцитарном звене отмечается достоверно более низкий уровень стимулированного ФАН (79,9% против 87,3%) (Таблица 34).

Таким образом, наиболее патогенетически значимыми проявлениями данного полиморфизма является падение уровня IL5, непосредственно регулирующего атопическое воспаление в месте развития аллергической реакции. А также снижение уровня в сыворотке крови IgE, являющегося прямым предиктором базофильной дегрануляции, которая приводит как к выделению гистамина, основного биологически активного вещества атопии, так и хемоаттракции эозинофилов, несущих еще большее количество и разнообразие медиаторов воспаления (Рисунок 27).

Таблица 34 – Показатели иммунограммы при однонуклеотидной замене в гене TNF α G 308 A

Показатели иммунограммы	Полиморфизм (-) n=147	Полиморфизм (+) n=20	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2757,6 \pm 120,8	2684,9 \pm 255,2	0,77
CD3, абс.	1806,9 \pm 82,0	1771,8 \pm 193,3	0,84
CD3, %	65,1 \pm 0,86	65,6 \pm 1,62	0,75
CD4, абс.	1096,7 \pm 83,5	1037,7 \pm 97,3	0,68
CD4, %	37,1 \pm 0,95	39,3 \pm 1,47	0,21
CD8, абс.	771,9 \pm 42,8	715,9 \pm 109,1	0,56
CD8, %	27,8 \pm 0,80	25,9 \pm 1,21	0,21
CD4/CD8	1,45 \pm 0,07	1,62 \pm 0,11	0,21
CD16, абс.	368,8 \pm 44,8	371,7 \pm 52,1	0,96
CD16, %	13,8 \pm 1,24	14,03 \pm 1,62	0,92
CD19, абс.	372,3 \pm 25,2	382,4 \pm 43,7	0,84
CD19, %	14,9 \pm 0,75	14,2 \pm 0,88	0,56
IgE, ME	355,2 \pm 57,1	212,2 \pm 37,1	0,047
IgA, г/л	1,89 \pm 0,13	2,08 \pm 0,15	0,40
IgM, г/л	2,26 \pm 0,11	1,94 \pm 0,13	0,09
IgG, г/л	16,5 \pm 1,12	17,2 \pm 0,77	0,70
ЦИК, у.е.	62,8 \pm 6,53	60,0 \pm 6,32	0,79
ФАН сп., %	81,1 \pm 1,7	74,6 \pm 5,46	0,13
ФАН ст., %	87,3 \pm 1,48	79,9 \pm 5,43	0,05
ФР ФАН, %	6,14 \pm 1,14	5,30 \pm 1,70	0,72
ФЧ сп., ед.	6,37 \pm 0,84	5,52 \pm 0,62	0,61
ФЧ ст., ед.	7,81 \pm 0,98	7,43 \pm 0,63	0,84
ФР ФЧ, ед.	1,43 \pm 0,71	1,91 \pm 0,59	0,73
НСТ сп., %	26,4 \pm 2,74	33,0 \pm 5,89	0,28
НСТ ст., %	57,5 \pm 2,75	53,4 \pm 5,69	0,50
ФР НСТ, %	30,7 \pm 3,51	20,4 \pm 6,99	0,18

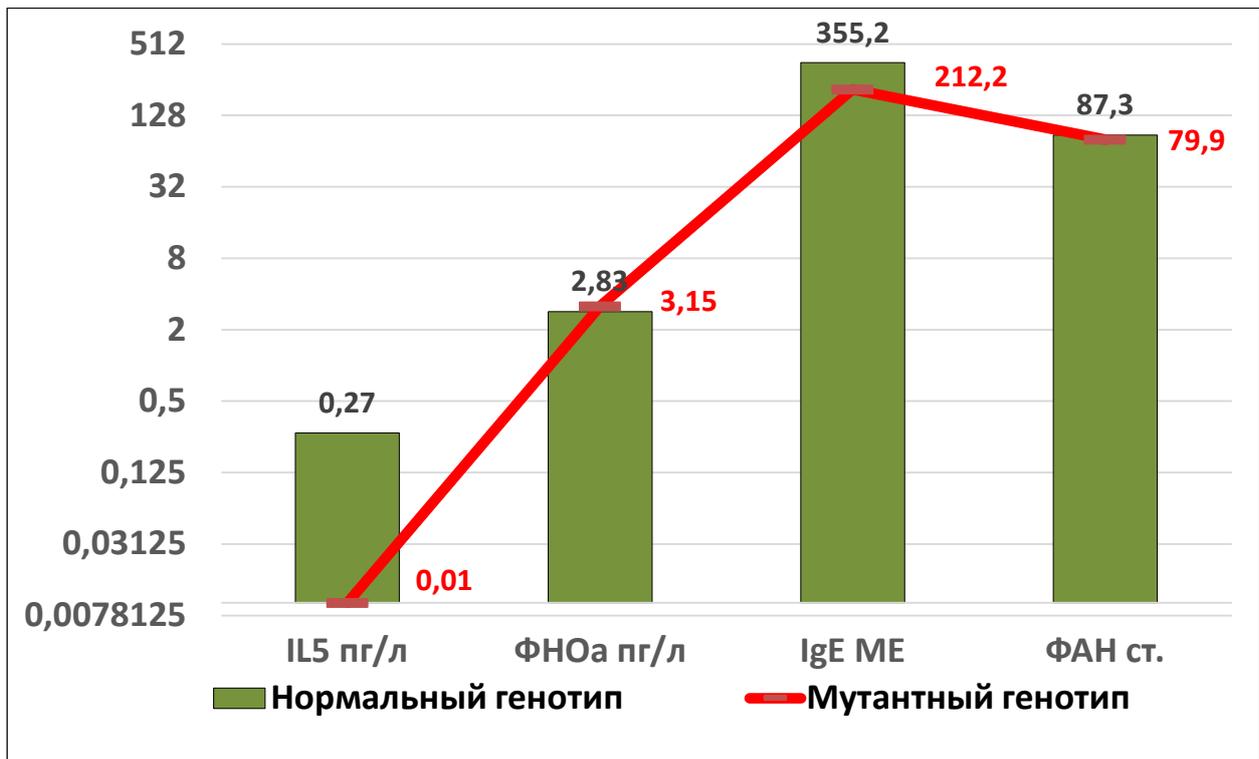


Рисунок 27 – Достоверно различимые иммуно-патогенетические проявления однонуклеотидной замены TNF α G 308 A

4.3. Оценка взаимодействия полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы

Сигнальные молекулы иммунитета в своей совокупности образуют коммуникативную систему, свойства которой не сводятся к уровню содержания и качеству каждой, но проявляются в их взаимодействии, то есть обладают свойством эмерджентности. Поэтому клинико-патогенетические последствия наличия того или иного полиморфизма генов сигнальных молекул иммунитета наиболее полно проявляются при изучении не только отдельных мононуклеотидных замен, но и их функциональных сочетаний.

При оценке взаимоотношения полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов между собой и полиморфизмами генов интерлейкинов обнаружена плотная сеть корреляций (на рисунке приведены лишь достоверные с $p < 0,05$), в центре которой находится полиморфизм TLR4 Asp299Gly (Рисунок 28), имеющий, как

показано выше и наибольшие достоверные клинико-патогенетические проявления.

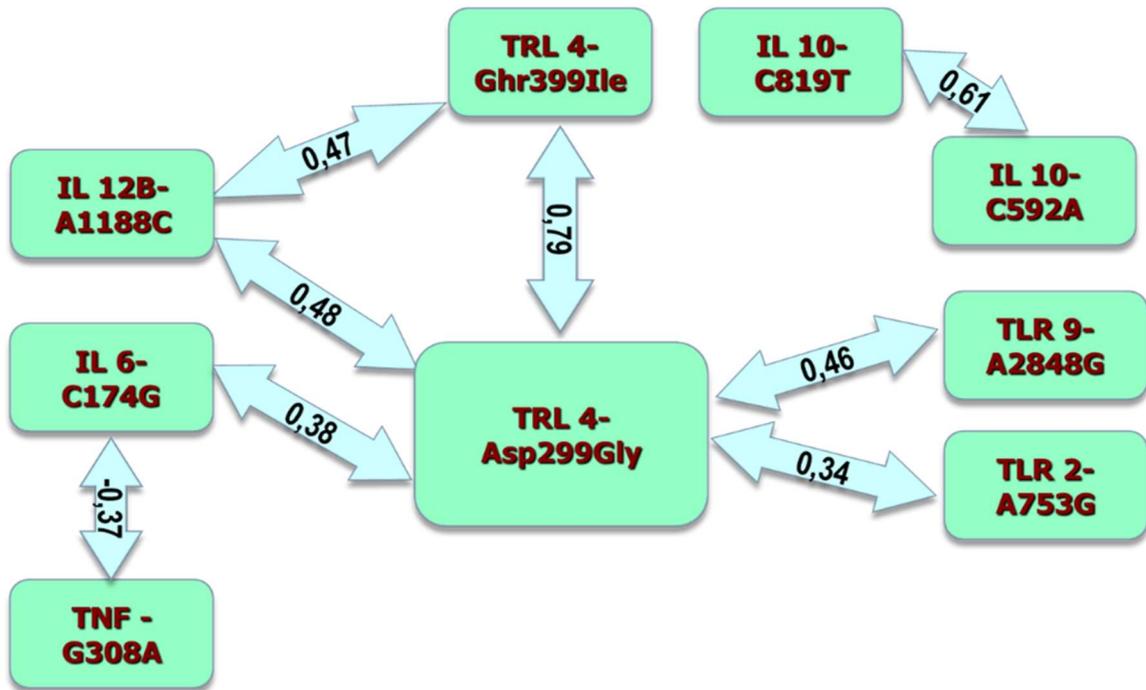


Рисунок 28– Взаимосвязи полиморфных аллелей генов Toll-подобных рецепторов и интерлейкинов

В частности, обнаружены достоверные зависимости: сильная прямая, ($r=0,79$) полиморфизмов генов белка рецептора TLR4 (Asp299Gly) и (Thr399Ile), средней силы ($r=0,46$) полиморфизмов гена белка рецептора TLR4 (Asp299Gly) и TLR9 (A2848G), ($r=0,34$) полиморфизмов гена белка рецептора TLR4 (Asp299Gly) и TLR2 (A753G). Кроме того, отмечается единичная достоверная прямая связь средней силы между полиморфизмами IL10 C819T и C592A. Отмечаются так же достоверные корреляционные взаимосвязи этого полиморфизма (TLR4-Asp299Gly) с полиморфизмом гена IL6 (C174G) $r=0,38$ и IL12 (A188C) $r=0,48$. Последний в свою очередь, имеет достоверную корреляционную связь средней силы с мононуклеотидной заменой TLR4-Thr399Ile ($r=0,47$), а полиморфизм IL6 (C174G) достоверную отрицательную связь средней силы с полиморфизмом TNF α G308A ($r=-0,37$).

При изучении корреляционных связей исследуемых полиморфизмов с содержанием некоторых сигнальных молекул иммунной системы в сыворотке крови

сложной корреляционной сети не обнаружено, однако выявлены отдельные достоверные прямые взаимосвязи средней силы (Рисунок 29)

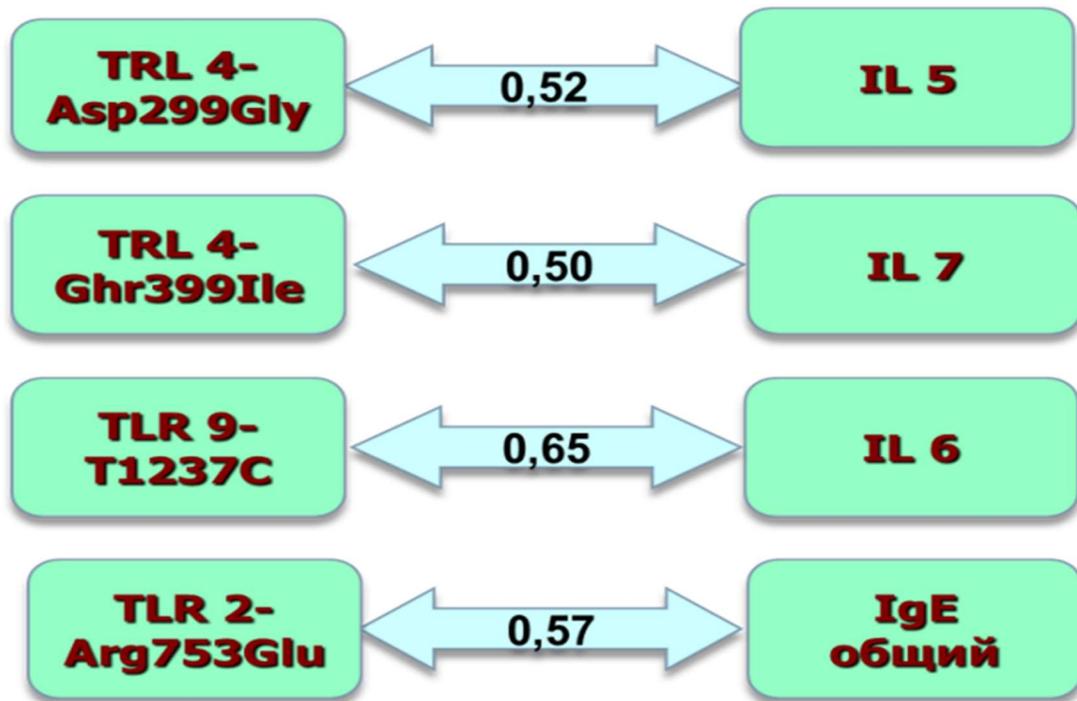


Рисунок 29 – Взаимосвязи полиморфных аллелей генов TRL и продукцией сигнальных молекул иммунной системы

В частности, между полиморфизмом TRL4-Asp299Gly и уровнем IL5 ($r=0,52$), TRL4-Thr399Ile и IL7 ($r=0,50$), TLR9-T1237C и IL6 ($r=0,65$), TLR2-Arg753Glu и IgE ($r=0,65$).

Выявленные генетические паттерны манифестируют и в клинических проявлениях заболевания (Рисунок 30). Обнаружена достоверная сильная обратная связь полиморфизма TLR9-T1237C ($r=-0,73$), TRL4-Asp299Gly ($r=-0,84$), TNF α G308A ($r=-0,84$) и степени тяжести заболевания. Достоверные прямые связи средней силы между контролем над БА и полиморфизма TRL4-Thr399Ile ($r=0,37$), TNF α G308A G308A ($r=0,35$).



Рисунок 30 – Взаимосвязи полиморфных аллелей генов TLR и интерлейкинов с клиническими проявлениями БА

Toll-подобные рецепторы являются основными молекулами распознавания патогенных паттернов в иммунной системе человека, активации каждого из них соответствует уникальный цитокиновый профиль, который и определяет направление борьбы иммунной системы с патогеном, несущим тот или иной паттерн.

Интерлейкины в свою очередь представляют собой основные коммуникативные молекулы иммунной системы, именно посредством интерлейкиновой сети осуществляется передача информации, полученной Toll-подобными рецепторами к эффекторному звену иммунитета.

Таким образом, совокупность полиморфизмов генов этих молекул определяет индивидуальные особенности иммунной реактивности организма конкретного пациента вообще и в ходе реализации atopического воспаления, в частности. При этом следует отметить, что интронные полиморфизмы могут приводить как к снижению специфичности и чувствительности Toll-подобных рецепторов или активности и авидности интерлейкинов, так и к их повышению, а промоторные - к изменению скорости синтеза этих молекул под воздействием различных факторов, причем в различных сочетаниях изменяемых параметров. Полученные нами данные подтверждают наличие такого влияния для изучаемых полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов и интерлейкинов.

Как отмечалось выше, большой интерес представляют не только отдельные однонуклеотидные замены в генах распознающих молекул, но и их сочетания, на примере обследования детей Приамурья с БА. Наиболее характерны сочетанные полиморфизмы генов TLR4, от результативной работы которого прямо зависит соотношение Th₁ и Th₂ типов иммунного ответа. Эти поражения часто сопровождаются полиморфизмами гена TLR9, его активация усиливает вероятность ответа по Th₁, реципрочно, угнетает Th₂ и влияет на течение атопического воспаления при БА у детей. Полиморфизмы генов Toll-подобных рецепторов сопряжены с таковыми в генах IL6, 10, 12 и TNF α .

В результате исследования выявлены характерные генетические паттерны сигнальных молекул иммунной системы – ансамбли полиморфизмов в генах TLR2, 4, 9, IL5, 6, 7, 10, 12, TNF α , связанные с вероятностью развития БА и клинико-иммунологическими характеристиками ее течения. Обнаружены изменения, характерные для полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов, в сигнальных сетях (уровни IL6, 7, 9), регуляторном (соотношение субпопуляций лимфоцитов) и эффекторном (уровень IgA, показатели фагоцитоза) звеньях иммунитета и их реализация в клинических проявлениях (тяжесть и степень контроля БА, объем терапии, необходимый для его достижения). Показаны достоверные различия по критериям у детей с контролируемой и неконтролируемой БА, на которые влияют полиморфизмы генов Toll-подобных рецепторов.

ГЛАВА 5. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ ПРИ КОНТРОЛИРУЕМОЙ И НЕКОНТРОЛИРУЕМОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Имеющиеся генетические предрасположенности у детей с БА находят свою реализацию в изменении показателей иммунного статуса. При этом каждая из мутаций затрагивает конкретные звенья иммунитета, поэтому пути усиления или ослабления воспаления, лежащего в основе патогенеза БА, для них различны. Большой интерес представляют не только изменения, вызванные конкретной мутацией, рассмотренные в предыдущей главе, но и интегральные отличия иммунного статуса у пациентов с контролируемой и неконтролируемой БА.

5.1. Характеристика цитокиновой сети у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой

Цитокиновая сеть является основным регуляторным звеном иммунной системы, именно соотношения цитокинов определяет конкретные параметры иммунного ответа, в том числе патологического, поэтому представляется рациональным начать анализ иммунного статуса у пациентов с контролируемой и неконтролируемой БА именно с него (Таблица 35).

В ходе анализа нами не обнаружено достоверных различий в уровне основных цитокинов атопического воспаления – IL4 и IL5 в группах с контролируемой и неконтролируемой БА. Это очевидно связано с тем, что часть предрасположенностей реализуется через изменения уровня IL4 (полиморфизмы генов TLR9 A2848G, TLR9 T1237C, TLR4 Asp299Gly, TLR2 Arg753Glu, Il10 C592A), а иные предрасположенности – через изменение уровня IL5 (полиморфизмы TLR9 T1237C, TNF α G538A), таким образом, в объединённых по клиническому признаку группах достоверных различий в этих интерлейкинах не выявлено.

Таблица 35 – Уровень содержания цитокинов в сыворотке крови у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

Цитокины	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) t-/U-критерий
IL4, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,1 (0,0-28,9) 0,36-2,24	1,4 (0,0-14,4) 0,7-2,0	0,4
IL5, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0 (0,0-7,3) 0,0-0,0	0 (0,0-4,9) 0,0-0,0	0,34
IL6, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	0,4 (0,0-126,2) 0,0-3,2	0 (0,0-102,7) 0,0-2,59	0,79
IL7, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	26,4 (0,0-289,1) 0,0-29,91	7,1 (0,0-82,7) 0,0-10,26	0,046
IL8, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	4,7 (0,0-128,0) 3,2-23,1	6,45 (0,7-396,5) 2,98-7,07	0,041
IL9, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	1,6 (0,0-34,1) 0,0-3,6	1,4 (0,0-7,9) 0,0-3,0	0,044
IL10, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	79,1±19,1 6,5 (0,7-531,1) 3,03-129,6	99,5±16,3 103,7 (1,4-309,5) 3,7-173,2	0,42
IL18, пг/л Me (Min-Max) LQ - HQ	99,9±17,3 105,9 (0,0-329,1) 1,1-179,9	68,3±16,6 4,2 (0,0-380,7) 0,3-112,51	0,19
TNFα, пг/л	2,79±0,33	3,53±0,48	0,21

Обнаружено достоверно, почти в четыре раза более низкое содержание IL7 (7,1 пг/мл против 26,4 пг/мл) у пациентов с неконтролируемой БА, этот интерлейкин является неспецифическим фактором пролиферации лимфоцитов, в предыдущей главе выявлено его снижение при вариантах гена TLR4 Thr399Ile и Il6 C174G, которые снижают вероятность контроля над заболеванием и повышают вероятность его более тяжелого течения.

Выявлено достоверное более высокое (в 5 раз) содержание IL8 (6,45 пг/мл против 4,7 пг/мл). Это основной фактор хемотаксиса гранулоцитов вообще и

эозинофилов, в частности, непосредственно оказывающий влияние на течение атопического воспаления. Ранее показано, что его уровень повышен при варианте гена TLR9 T1237C, это увеличивает вероятность неконтролируемого и более тяжелого течения БА.

Также выявлено достоверно более низкое содержание IL9 (1,4 пг/мл против 1,6 пг/мл), одного из основных регуляторов клеточного апоптоза, его снижение обнаруживается при вариантах генов TLR4 Thr 399 Ile и TLR4 Asp 299 Gly, связанных с более тяжелым и неконтролируемым течением БА.

Достоверных различий в содержании иных исследованных интерлейкинов не выявлено, хотя их значимость для реализации конкретных генетических предрасположенностей была показана в предыдущей главе, что также вероятно связано с нивелированием разнонаправленных воздействий полиморфизмов генов в интегральных группах, объединённых по клиническому признаку (Рисунок 31).

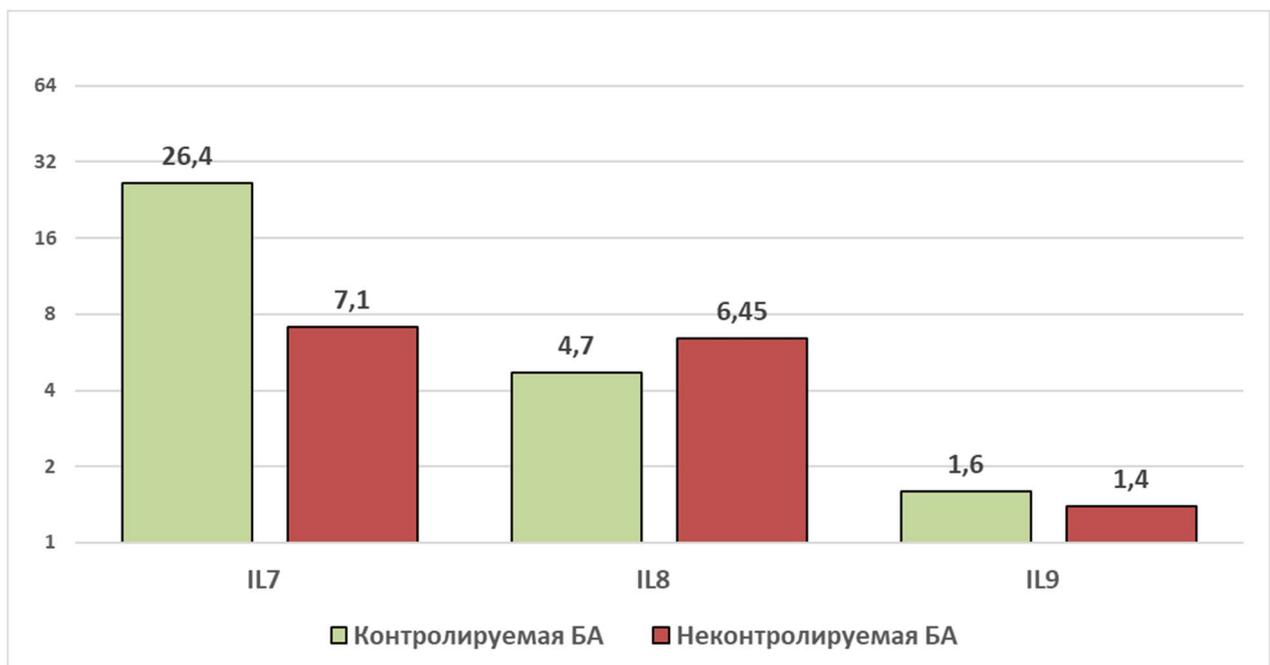


Рисунок 31 – Достоверные отличия в уровне содержания цитокинов в сыворотке крови у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

Таким образом, наиболее значимыми для интегральных групп с контролируемым и неконтролируемым течением оказались уровни интерлейкинов,

регулирующих в первую очередь местное воспаление – хемотаксис гранулоцитов, в том числе эозинофильных, и апоптоз

5.2. Сравнительный анализ субпопуляций лимфоцитов у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой

Изменения в цитокиновой сети находят свою реализацию в следующих звеньях иммунитета. В первую очередь они ведут к изменению абсолютных значений и соотношений субпопуляций лимфоцитов. Эти показатели имеют важное значение в развитии БА и значительно различаются у детей, которые страдают этим заболеванием, и условно здоровых, составивших группу сравнения.

У пациентов с БА отмечено в сравнении с условно здоровыми выявлены значимые различия (Таблица 36).

Таблица 36 – Субпопуляции лимфоцитов у детей с БА и в группе сравнения

Субпопуляции лимфоцитов	Гр. сравнения, n=40	БА, n=167	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	1762,74±20,46,53	2553,45±151,22	0,11
CD3 абс.	1152,36±165,22	1590,15±114,81	0,04
CD3, %	63,75±1,55	65,4±0,96	0,049
CD4, абс.	558,77±83,34	1055,7±62,48	0,046
CD4, %	31,86±1,16	37,85±1,05	0,047
CD8, абс.	450,92±65,75	752,8±50,41	0,12
CD8, %	24,64±1,26	27,3±0,89	0,24
CD16, абс.	88,90±18,99	374,65±13,59	0,35
CD16, %	5,82±0,84	1,5±0,52	0,47
CD19, абс.	249,72±42,22	405,7±22,72	0,11
CD19, %	14,96±1,15	13,7±0,71	0,12

Обнаружено достоверно более высокое, как абсолютное, так и относительное, содержание Т-лимфоцитов, (1495,10 против 1152,36 и 69,20% против 63,75%), в первую очередь за счет достоверного увеличения доли и абсолютного числа Т-хелперов (768,80 против 558,77 и 35,60% против 31,86%). Отмечается и тенденция к повышению других субпопуляций лимфоцитов – натуральных киллеров, В-лимфоцитов, что вполне ожидаемо в связи с неизбежным наличием хронического

воспаления у детей с БА.

При анализе субпопуляций лимфоцитов в группах контролируемой и неконтролируемой БА обнаруживается иная картина (Таблица 37). В группе неконтролируемой БА отмечается достоверно более высокое абсолютное количество лимфоцитов (2776,7 против 2330,2), достоверно выше и число Т-лимфоцитов (1796,4 против 1383,9). Кроме того, в группе с неконтролируемой БА отмечается достоверно более высокий уровень В-лимфоцитов, как абсолютный (439,9 против 371,5), так и относительный (15,7% против 14,1%). Остальные субпопуляции не имеют не только статистически значимых различий, но и видимых тенденций к ним.

Таблица 37 – Субпопуляции лимфоцитов у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

Субпопуляции лимфоцитов	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) t-критерий
Лимфоциты, абс.	2330,2±133,8	2776,7±109,6	0,047
CD3, абс.	1383,9±104,8	1796,4±70,5	0,049
CD3, %	65,9±1,04	64,9±0,73	0,42
CD4, абс.	1022,3±53,8	1089,4±70,5	0,49
CD4, %	38,4±1,01	37,3±0,77	0,37
CD8, абс.	755,5±59,8	750,1±33,4	0,93
CD8, %	27,3±0,82	27,3±0,71	0,96
CD4/CD8	1,52±0,07	1,48±0,06	0,65
CD16, абс.	374,3±31,3	375,0±22,3	0,98
CD16, %	14,1±0,94	13,3±0,59	0,47
CD19, абс.	371,5±21,4	439,9±23,6	0,03
CD19, %	14,1±0,49	15,7±0,49	0,02

Однако соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов (Рисунок 32), которые, как показано ранее, имеют большое значение в реализации конкретных генетических предрасположенностей к неконтролируемому и более тяжелому течению БА, достоверно не различаются.

Выявлены достоверно более высокая доля и абсолютное число В-лимфоцитов (15,7% против 14,1% и 439,9 против 371,5 соответственно), в предыдущей главе отмечено снижение этих показателей у носителей вариантов генов IL6 и IL10. увеличивающих вероятность неконтролируемого и тяжёлого течения БА. В-

лимфоциты непосредственно производят иммуноглобулины всех классов, в том числе и имеющий особое значение для атопического воспаления IgE, и основной фактор местного специфического иммунитета IgA и IgM, свидетельствующие об остром инфекционном процессе, текущем в организме.

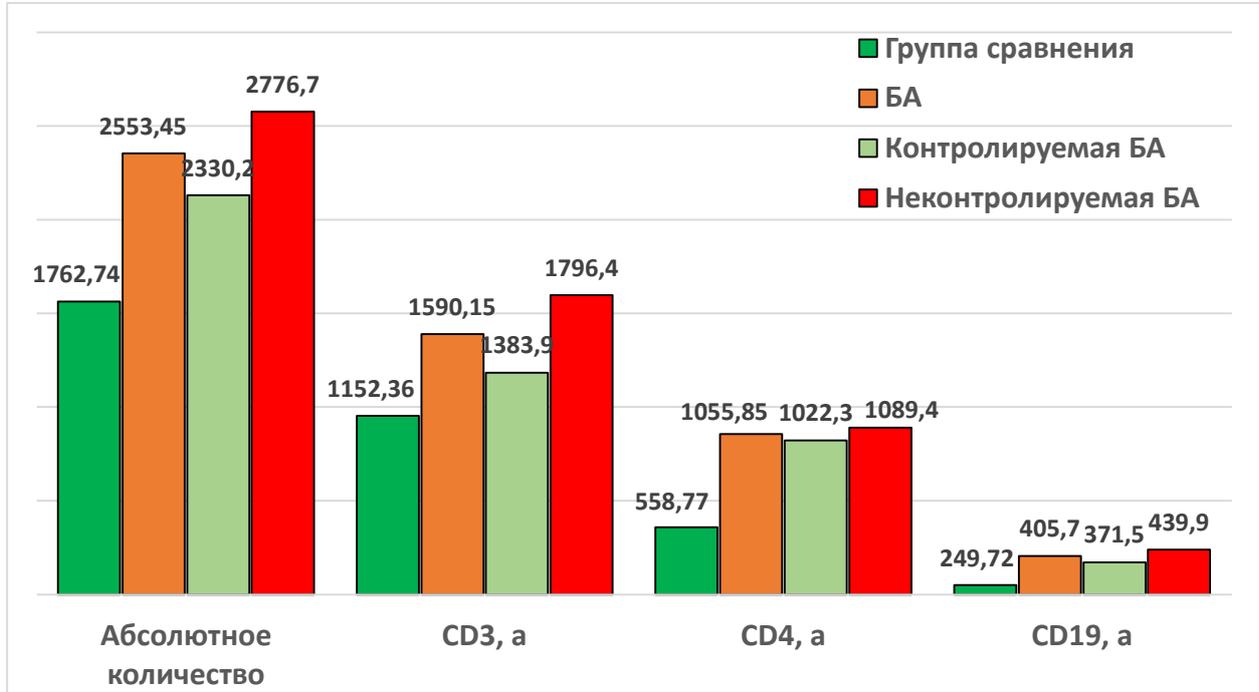


Рисунок 32 – Достоверные различия субпопуляций лимфоцитов в группе сравнения и при БА в зависимости от контроля заболевания

При анализе результатов исследования гуморального иммунитета у детей с контролируемой и неконтролируемой БА были получены следующие результаты (Таблица 38).

Таблица 38 – Показатели гуморального иммунитета у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) t-критерий
IgE, ME	220,6±20,1	271,5±26,7	0,047
IgA, г/л	2,58±0,14	1,92±0,13	0,049
IgM, г/л	1,93±0,10	2,19±0,09	0,043
IgG, г/л	16,5±1,01	17,3±0,80	0,55
ЦИК, у.е.	59,0±5,49	57,6±5,89	0,86

У детей с неконтролируемым течением БА отмечается достоверно более

высокий уровень сывороточного IgE (271,5 МЕ против 220,6МЕ), являющегося прямым актором атопического воспаления, достоверно более высокий его уровень отмечался ранее и у носителей варианта гена TNF α , увеличивающего вероятность неконтролируемого и более тяжелого течения БА (Рисунок 33).

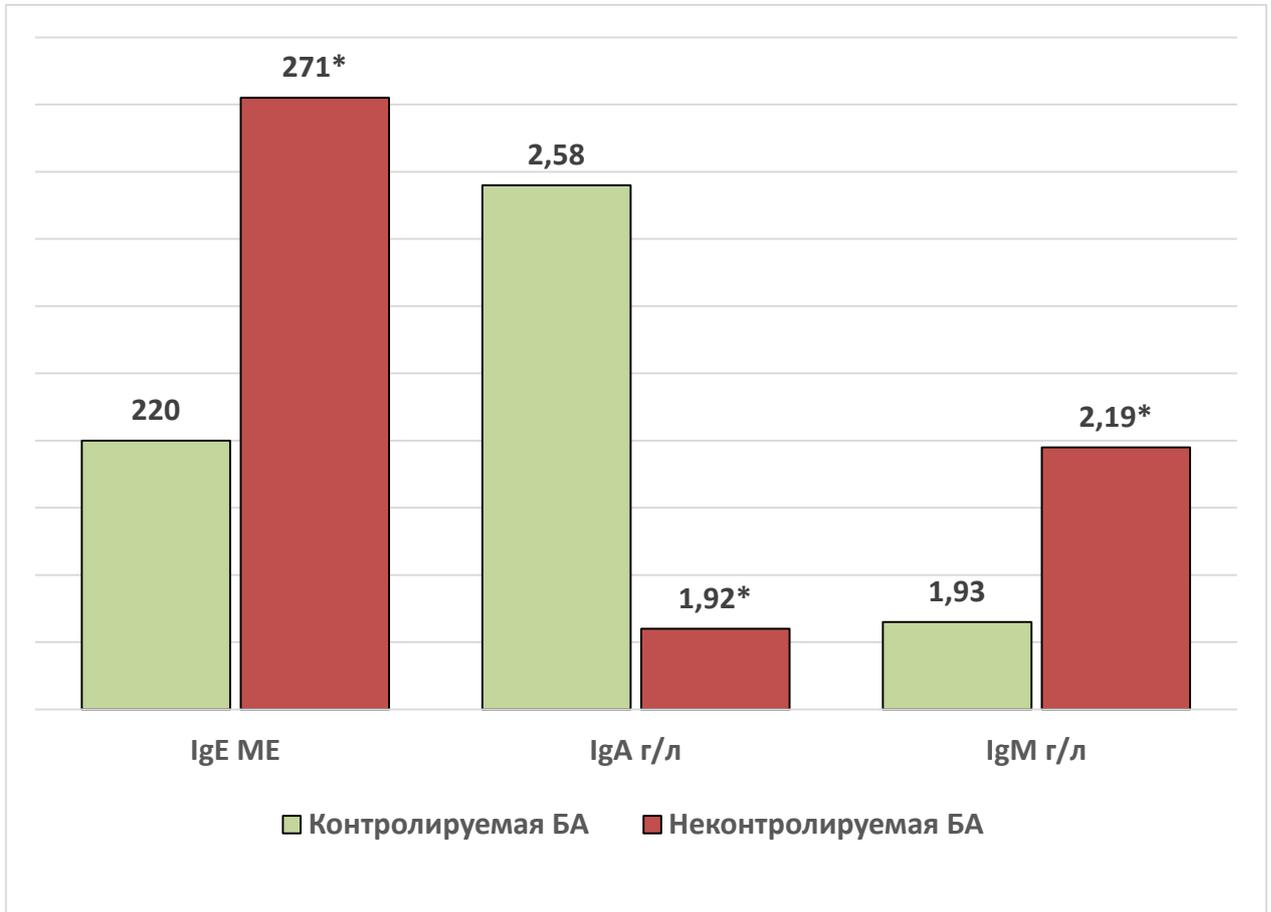


Рисунок 33 – Уровни сывороточных иммуноглобулинов, достоверно различающиеся у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

Также у детей с неконтролируемым течением заболевания отмечается достоверно более низкий уровень IgA (1,92 г/л против 2,58 г/л), обеспечивающего, в том числе, и местную противoinфекционную защиту слизистых бронхов. Более низкий уровень этого показателя отмечается и у детей с полиморфизмами генов IL6, 10 и TLR9, которые способствуют неконтролируемому и более тяжелому течению БА. Кроме того, у пациентов с неконтролируемой БА отмечается достоверно более высокий IgM в сыворотке крови (2,19 г/л против 1,93 г/л), что может свидетельствовать о более частых острых инфекционных заболеваниях

5.3. Характеристика показателей нейтрофильного фагоцитоза у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой

Одним из конечных, эффекторных звеньев иммунного ответа является нейтрофильный фагоцитоз. Несмотря на то, что он не участвует непосредственно в атопической реакции, его показатели у детей с БА и в группе сравнения достоверно различаются, поскольку он является неотъемлемым компонентом местного воспаления – патогенетической основы БА.

В данном исследовании выявлены значимые различия в группе сравнения и у детей с БА (Таблица 39).

Таблица 39 – Показатели нейтрофильного фагоцитоза у детей с БА

Показатели фагоцитоза	Группа сравнения, n=40	БА, n=167	Достоверность (p) t-критерий
ФАН сп., %	55,80±3,73	77,7±1,69	0,01
ФАН ст., %	61,45±3,30	84,1±1,58	0,01
ФЧ сп., ед.	9,32±1,03	5,94±0,57	0,03
ФЧ ст., ед.	9,81±1,14	7,33±0,66	0,047
НСТ сп., %	52,10±3,84	28,15±2,24	0,01
НСТ ст., %	60,90±4,01	54,8±2,24	0,18

Отмечаются достоверно более высокие показатели как спонтанной, так и стимулированной фагоцитарной активности у детей с БА (77,7% против 55,8% и 84,1% против 61,5% соответственно), что говорит о более высокой стимуляции нейтрофилов в этой группе пациентов. Спонтанное и стимулированное фагоцитарное число (5,94 против 9,32 и 7,33 против 9,81 соответственно) и НСТ тест (28,2 против 52,1 и 54,8 против 60,9 соответственно) снижены, что свидетельствует о менее эффективном захвате и переваривании нейтрофилов в этой группе пациентов.

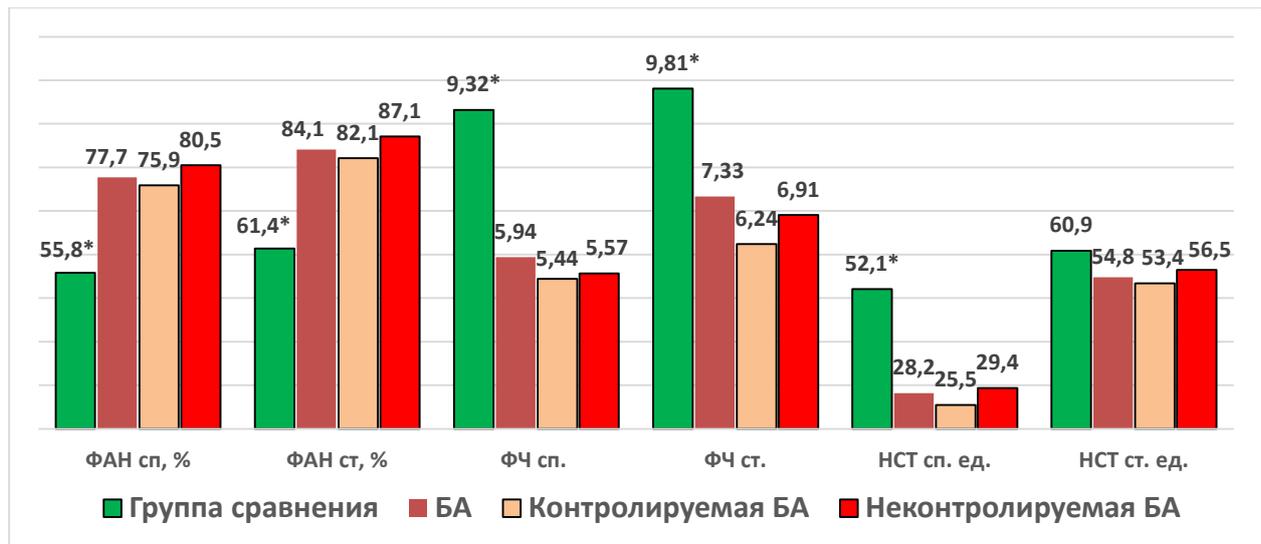
При анализе показателей нейтрофильного фагоцитоза у пациентов с контролируемой и неконтролируемой БА достоверных различий не выявлено (Таблица 40). Вероятно, это связано с различными патогенетическими путями реализации конкретных предрасположенностей, которые в группе, объединённой по клиническому, но не патогенетическому признаку, нивелируют друг друга.

Таблица 40 – Показатели нейтрофильного фагоцитоза у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

Показатели фагоцитоза	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) t-критерий
ФАН сп., %	75,9±2,89	80,5±1,82	0,16
ФАН ст., %	82,1±2,96	87,1±1,27	0,10
ФР ФАН, %	6,26±1,43	6,58±1,16	0,86
ФЧ сп., ед.	5,44±0,55	5,57±0,30	0,82
ФЧ ст., ед.	6,24±0,38	6,91±0,56	0,35
ФР ФЧ, ед.	0,80±0,56	1,33±0,52	0,49
НСТ сп., %	25,5±2,57	29,4±3,40	0,38
НСТ ст., %	53,4±3,56	56,5±2,95	0,34
ФР НСТ, %	27,9±3,76	25,9±4,38	0,7

Однако отмечается отчетливая тенденция к более высоким значениям всех показателей нейтрофильного фагоцитоза как спонтанных, так и стимулированных у детей с неконтролируемым течением БА.

Показатели нейтрофильного фагоцитоза в изучаемых группах обобщены на Рисунке 34. Они свидетельствуют о более интенсивном течении местного воспаления и корреспондируют с результатами анализа уровней сывороточных интерлейкинов.



Примечание - достоверность показателей группы сравнения с каждой из групп БА : *- p≤0,05

Рисунок 34 – Показатели нейтрофильного фагоцитоза у детей с контролируемой и неконтролируемой БА и в группе сравнения

5.4. Оценка мембранного потенциала митохондрий иммунокомпетентных клеток крови как маркера их функционального состояния у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой

Вне зависимости от характера воспаления его основными акторами являются иммунокомпетентные клетки крови (ИКК). Описывающие их количественные показатели проанализированы выше.

Но реализация воспалительного процесса находится в прямой зависимости от функционального состояния этих клеток, которое во многом определяется работой важнейшей органеллы энергетического обмена – митохондрии, отражением которого являются изменения мембранного потенциала митохондрий (МПМ, $\Delta\psi$).

При исследовании МПМ ИКК у детей с БА и в группе сравнения обнаружено (Таблица 41), что для детей с БА вообще характерна большая доля иммунокомпетентных клеток со сниженным МПМ во всех популяциях. Только для лимфоцитов доля достоверно выше 46,1% против 34%, а для моноцитов (12% против 9%) и гранулоцитов (11,3% против 7%) отмечены тенденции к увеличению.

Таблица 41 – Частота встречаемости ИКК со сниженным МПМ у детей с БА и в группе сравнения (%)

ИКК	Группа сравнения, n=40	БА, n=167	Достоверность (p) Z-критерий
Лимфоциты	34,0	46,1	0,049
Моноциты	9,0	12,0	0,22
Гранулоциты	7,0	11,3	0,11

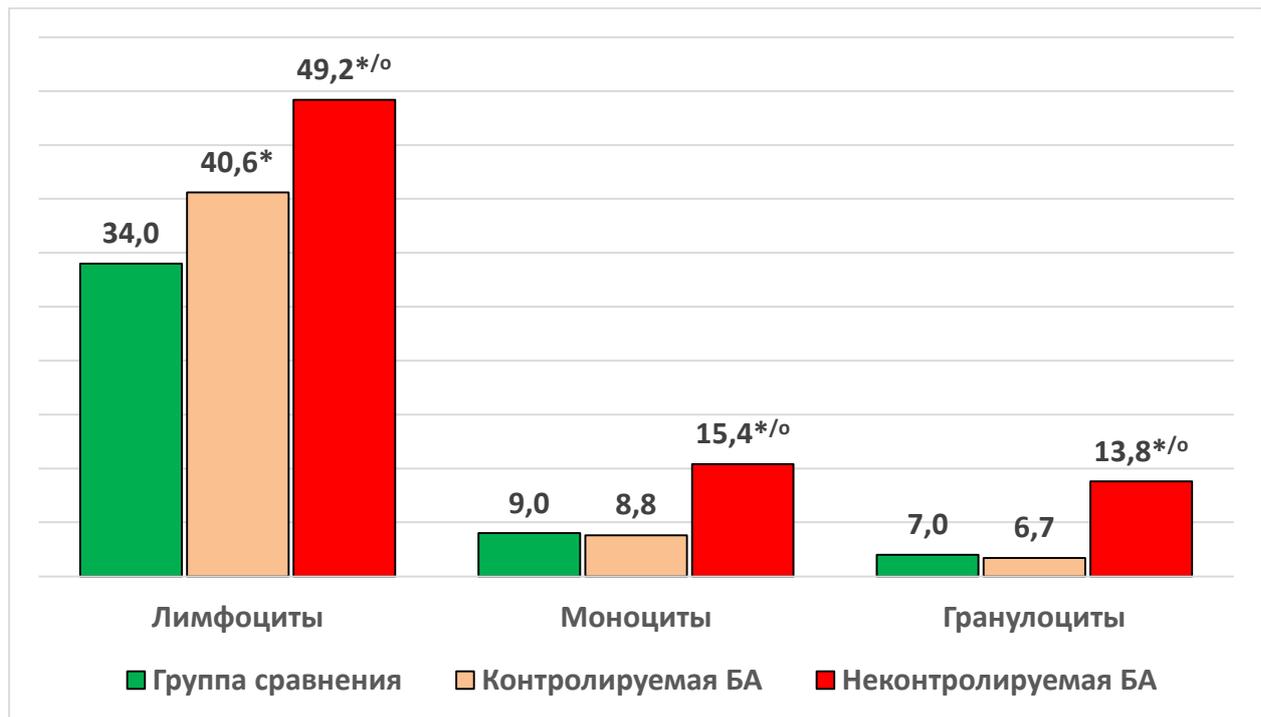
Полученные данные поставили вопрос о функциональном состоянии ИКК при различном течении БА. При сравнении их МПМ у пациентов с контролируемой и неконтролируемой БА обнаружено (Таблица 42), что для детей с неконтролируемым течением заболевания характерна большая доля всех типов ИКК с пониженным МПМ: лимфоцитов 49,2% против 40,6%, гранулоцитов, достоверно, в 1,8 раза (15,4% против 8,8%) и моноцитов, более чем в 2 раза (13,8% против 6,7%).

Таблица 42 – Частота встречаемости ИКК со сниженным МПМ у детей с

контролируемой и неконтролируемой БА (%)

ИКК	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) Z-критерий
Лимфоциты	40,6	49,2	0,07
Моноциты	8,8	15,4	0,047
Гранулоциты	6,7	13,8	0,03

Таким образом, доля лимфоцитов со сниженным МПМ выше при БА вне зависимости от контроля, а доля моноцитов и гранулоцитов практически равна таковой в группе сравнения и при контролируемой БА (9% против 8,8% и 7% против 6,7% соответственно), но резко увеличивается при неконтролируемой БА – моноциты 15,4%, гранулоциты 13,8%. Это еще раз подтверждает важность местного воспаления именно для неконтролируемого течения БА (Рисунок 35).



Примечание: достоверность показателей с группой сравнения: *- $p \leq 0,05$; с контролируемой БА: ^o- $p \leq 0,05$

Рисунок 35 – Доля ИКК со сниженным МПМ в группе сравнения и у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

5.5. Способ комплексной оценки энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови

Полученные данные показали значимость энергообеспеченности ИКК для понимания патогенеза воспалительного процесса и возможность их использования в ранней диагностике и прогнозе вероятных путей его развития, легли в основу разработанного и защищенного патентом способа комплексной оценки энергообеспеченности ИКК крови (Патент на изобретение №2766747 от 15.04.2022).

Ранее было показано, что увеличение количества лейкоцитов со сниженным МПМ указывает на уменьшение энергообеспечения клеток, кислородное голодание и предрасположенность к развитию клеточной гипоксии [32, 34, 41]. Известен и способ диагностики нарушения энергетического метаболизма лимфоцитов при внебольничной пневмонии у детей, который заключался в определении степени нарушений энергообеспеченности лимфоцитов крови методом проточной цитометрии по проценту лимфоцитов со сниженным мембранным потенциалом митохондрий (RU 2579317 С1 10.04.2016). Однако в этих исследованиях следует отметить ряд недостатков:

- оценка общей лейкоцитарной популяции или только отдельных пулов ИКК;
- отсутствие комплексной оценки энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови;
- отсутствие возможности оценить степень выраженности энергодефицита ИКК крови, что особенно важно для обоснования, объема и подбора доз лечебно-профилактических мероприятий.

Устранение этих недостатков позволит улучшить диагностику иммунозависимых заболеваний, возможность доклинического определения и упрощения интерпретации данных при высокой точности комплексной оценки энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови (лимфо-, грануло- и моноцитов) в случае риска или уточненной патологии среди наблюдаемых пациентов; даст возможность ранней доклинической, технически быстрой диагностики и комплексной оценки степени дефицита энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови

путем учета процента лимфо-, грануло- и моноцитов периферической крови с пониженным МПМ ($\Delta\psi$) методом проточной цитометрии.

На основании полученных результатов были рассчитаны верхние границы значений, сниженных МПМ для детей лимфоциты - более 35%, гранулоциты - более 3%, моноциты - более 5%.

В зависимости от сочетания ИКК крови со сниженным МПМ выделены 3 степени энергодифицита: первая степень - моновариантные композиции ИКК (лимфоциты, или гранулоциты, или моноциты); вторая степень энергодифицита - одновременные бивариационные композиции (лимфоциты и гранулоциты, или лимфоциты и моноциты, или гранулоциты и моноциты); третья степень дефицита энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови - одномоментное увеличение количества клеток со сниженным мембранным потенциалом митохондрий всех типов (лимфоциты, гранулоциты и моноциты) (Таблица 43).

Таблица 43 – Частота встречаемости различных степеней энергообеспеченности ИКК крови у детей с БА

Степень энергодифицита	Типы ИКК крови	n	%
0 степень		24	14,3
1 степень		40	23,8
	лимфоциты	20	50,0
	гранулоциты	16	40,0
	моноциты	4	10,0
2 степень		57	33,3
	лимфоциты/гранулоциты	20	35,7
	лимфоциты/моноциты	32	57,1
	гранулоциты/моноциты	4	7,1
3 степень		47	28,6

Использование разработанного способа комплексной оценки энергообеспеченности ИКК крови как дополнительного к утвержденным медицинским стандартам метода, выполненного технически в быстрые сроки и с высокой точностью, позволяет провести раннюю доклиническую диагностику дефицитных состояний при БА; по степени выявленных нарушений возможно обоснованно определить выбор, объем необходимой терапии и оценить эффективность лечения.

Преимущества предлагаемого способа:

1. Комплексная оценка энергообеспеченности 3-х пулов лейкоцитарной популяции клеток крови в разных вариациях позволяет судить о выраженности митохондриальной недостаточности ИКК.
2. Изменения МПМ ИКК опережают клиническую картину и другие данные иных способов диагностики.
3. Использование высокотехнологического метода проточной лазерной цитометрии и специализированной программы Cell Quest Pro позволяют одновременно на большом количестве клеток проанализировать отдельно все субпопуляции лейкоцитов с высокой точностью измерения.
4. Определение степени энергодефицита ИКК крови является доклинической диагностикой, дает возможность обоснования и выбора схем коррекции выявленных нарушений, а также оценкой их эффективности.

Далее приведены примеры использования заявляемого способа среди различных групп населения.

Пример 1. Пациентка К., 15 лет. Поступила в стационар с жалобами на малопродуктивный кашель, одышка в покое и при физической нагрузке, шумное дыхание. Ребенок от 2-ой беременности, протекавшей на фоне токсикоза 1 половины, гестоза – 2-ой половины беременности. Роды 1-е, срочные. Длительный безводный период. Оценка по шкале Апгар 3-7-8 баллов, получала ИВЛ маской - 3 минуты.

С раннего возраста у пациентки К. отмечались проявления аллергической реакции по типу крапивницы (причина не выяснена), чихание, затрудненное носовое дыхание при контакте с кошкой, полынью, сиренью. Наследственный анамнез не отягощен. Динамика развития настоящего заболевания: в 2014 г. ребенку установлен диагноз: БА, средней степени тяжести. Получала базисную терапию: Серетид 125/25 1 т*2 раза до 2015 г, затем фликсотид 50 мкг по 1 т*2 раза, с 2016 года - монтелукаст с положительным клиническим эффектом, регулярно наблюдалась у аллерголога НИИ Омид. В конце 2016 года в связи с ремиссией заболевания базисная терапия отменена аллергологом. В сентябре 2017 г. у ребенка на фоне ОРВИ появился кашель, приступы затрудненного вдоха, показатели пикфлоуметра были

ниже нормы. В связи с обострением заболевания находилась на госпитализации в клинике НИИ ОМиД, выписана с основным диагнозом: БА, легкая, персистирующая, обострение. Приступ средней степени тяжести; сопутствующий диагноз: аллергический ринит, среднетяжелого течения. При обследовании на аллергены методом ИФА выявлена сенсibilизация к плесени. После выписки в качестве базисной терапии рекомендован Серетид 25/50 мкг по 1 толчку 2 раза в день через спейсер. На фоне терапии положительная динамика в течение года. В связи с повторным обострением основного заболевания (приступ снят амбулаторно), с апреля 2018 г. (по данным осмотра аллерголога), получала Серетид 25/125 мкг по 1 толчку 2 раза в день. В декабре 2018 г. обострение на фоне ОРВИ, увеличена доза Серетид 25/250 мкг по 1 толчку 2 раза в день. На фоне усиления базисной терапии явлений бронхиальной обструкции не отмечено в течение 3 месяцев. Со слов девочки, с марта 2019 г. получала Серетид 25/125 мкг по 1 толчку 2 раза в день с положительным эффектом. Настоящее обострение с 13.06.19 связано с увеличением количества цветущих деревьев. Появился надсадный кашель, одышка. Получала Серетид в той же дозировке, беродуал эпизодически в момент усиления одышки при физической нагрузке. На фоне терапии сохранялся кашель, затрудненный вдох. Обратились к аллергологу НИИ ОМиД, направлены на госпитализацию. На рентгенограмме ОГК от 17.06.19 - усиление легочного рисунка, инфильтративные изменения отсутствуют. Установлен диагноз: БА, средней тяжести, неконтролируемая, обострение, приступ бронхиальной обструкции тяжелого течения. Персистирующий аллергический ринит средней тяжести.

При исследовании выявлено снижение МПМ во всех трех пулах иммунокомпетентных клеток крови: процент лимфоцитов со сниженным МПМ – 95,6%, моноцитов – 87,43%, гранулоциты – 90,21%. Заключение: у ребенка имеет место энергетический дефицит ИКК крови 3 степени (резкое снижение всех 3-х пулов: лимфо-, грануло- моноцитов), что соответствует тяжести состояния на данный момент, приступный период, и неконтролируемому течению основного заболевания.

Пример 2. Пациент А., 15 лет. Жалоб при поступлении активно не предъявляет. Динамика развития настоящего заболевания: в 2007 году установлен диагноз:

БА, легкая персистирующая, получал базисную терапию фликсотидом. Наблюдался в НИИ ОМид, госпитализация в стационар в 2007, 2009 гг. по поводу обострения заболевания. Сенсibilизация к клещу домашней пыли. Базисную терапию получал непродолжительное время. Наблюдался аллергологом-иммунологом, в динамике отмечено значительное улучшение. Эпизодов обструкции в течение 10 лет не было. Занимается активно спортом (хоккей), физическую нагрузку переносит хорошо. Направлен на плановое стационарное обследование. С учетом анамнеза, длительности заболевания, отсутствием обследования в течение продолжительного времени, госпитализирован в педиатрическое отделение с целью оценки состояния бронхолегочной системы. Объективно признаков обструкции не отмечено, ФВД в пределах нормы, проба с бронхолитином – отрицательная, подтверждена сенсibilизация к клещу домашней пыли. Установлен диагноз: БА, интерметирующая, контролируемая, длительная клиническая ремиссия. В базисной терапии не нуждается.

При исследовании выявлено незначительное снижение МПМ в лимфоцитах до 44,9%, в остальных пулах процент снижения МПМ в пределах референтных возрастных показателей: моноцитов – 1,4%, гранулоцитов – 0,46%. Заключение: у ребенка имеет место легкий энергодефицит ИКК крови, 1 степени (моновариантное снижение МПМ в лимфоцитах).

Таким образом, приведенные примеры показали диагностическую значимость определения степени энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови у детей с БА, необходимость ранней диагностики, разработки прогностических и лечебно-профилактических рекомендаций.

ГЛАВА 6. ФАКТОРЫ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ ТЕЧЕНИЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Рост распространенности БА обусловлен изменением совокупного генотипа населения развитых стран, в связи с чем он практически не поддается коррекции, поэтому усилия медицинского сообщества направлены на повышение эффективности контроля заболевания. Однако несомненная наследственная предрасположенность – как главный фактор развития БА – модифицируется воздействием окружающей среды [38]. Ряд проведенных в нашей стране исследований показал, что распространённость БА в различных регионах страны может различаться почти в три раза; структура тяжести БА также изменяется от региона к региону [24, 26]. Эти различия ставят перед нами задачу по выявлению факторов, обуславливающих своеобразие течения БА в конкретном субъекте страны.

6.1. Полиморфизмы генов детоксикации, как фактор контролируемости течения бронхиальной астмы и эффективности ее терапии

Существует не менее 100 генов-кандидатов, ассоциированных с развитием и течением БА, включающих как ключевые гены, так и гены-модификаторы, фенотипический эффект которых зависит от факторов внешней среды. Их можно разделить на пять групп: гены антигенного распознавания, медиаторов воспаления, гуморального иммунитета, внутриклеточных сигнальных молекул, системы детоксикации (некоторые из них уже рассматривались выше). С точки зрения контроля над уже текущим заболеванием, интересной представляется последняя группа. Гены системы детоксикации оказывают непосредственное влияние на взаимодействие организма с привходящими чужеродными веществами, к которым относятся как сенсibiliзирующие агенты-аллергены, так и средства базисной терапии. В связи с этим исследуемые гены влияют как на вероятность развития БА в качестве клинической манифестации врожденной атопии, скорость нарастания и интенсивность атопического воспаления, так и на эффективность применяемых терапевтических

мер. В настоящее время для детей, страдающих БА и получающих лечение, оценка контроля над заболеванием имеет большее значение, чем определение тяжести БА. Формальная тяжесть, согласно клиническим рекомендациям, определяется объемом терапии, однако при сохранении полного контроля даже у пациентов с тяжелой астмой уровень воспаления низок, по сути, на современном этапе базисная терапия – один из элементов, определяющих патогенез БА. Работа генов детоксикации напрямую влияет на фармакокинетику средств базисной терапии и уже поэтому значима для контроля над заболеванием.

При анализе полученных данных выявлено, что у пациентов с полиморфизмами в генах детоксикации контроль над БА достигался чаще, чем в группе с их отсутствием. Указанная особенность характерна для всех исследуемых полиморфизмов, но в разной степени (Таблица 44).

Таблица 44 – Доля (%) детей с контролируемой БА при полиморфизмах генов детоксикации

Полиморфизмы	Полиморфизм-	полиморфизм+	Достоверность (p) Z-критерий
GSTM+T (n=91/76)	29,2	36,6	0,047
Из них:			
GSTM		40,9	
GSTT		52,0	
GSTM/GSTT		33,3	
GSTP1-Ile105Val (n=114/53)	33,0	100,0	0,0005
GSTP1-Ala114Val (n=143/24)	31,5	44,4	0,04

Так, наибольшая (в 3 раза), достоверная разница наблюдалась при мононуклеотидной замене GSTP1 Ile105Val у обладателей полиморфного генотипа, контролируемая астма имела место в 100% обследованных случаев и лишь в 33,0% – у носителей нормального генотипа. В остальных случаях разница менее выражена, но её направленность сохраняется: при мононуклеотидной замене GSTP1

Ala114Val в группе с полиморфным генотипом БА контролировалась в 44,4%, с нормальным – в 31,5%, а при делециях GSTM+T – в 36,6% и 29,2% соответственно.

При исследовании эффективности приема топических глюкокортикостероидов (ТГКС) в этих группах обнаружена значимая разница в дозе, необходимой для контроля над заболеванием у носителей полиморфизма и при ее отсутствии (Таблица 45).

Таблица 45 – Доза ТГКС (мкг) у детей с БА при полиморфизмах генов детоксикации

Полиморфизмы	Полиморфизм (-)	Полиморфизм (+)	Достоверность (p) U-критерий
GSTM+T (n=91/76) LQ - HQ	269,0±49,3 100-250	257,0±37,1 100-250	0,34
Из них:			
GSTM LQ - HQ		240,9±50,5 100-250	0,74
GSTT LQ - HQ		291,7±93,1 250-250	0,78
GSTM/GSTT LQ - HQ		261,1±68,1 250-250	0,97
GSTP1-Ile105Val (n=114/53) LQ - HQ	242,8±16,4 100-250	297,7±8,1 250-250	0,043
GSTP1-Ala114Val n=143/24 LQ - HQ	275,5±13,9 100-250	195,0±7,4 100-250	0,047

Пациенты с мононуклеотидной заменой GSTP1 (Ala114Val) требовали в среднем достоверно меньшей дозы топических глюкокортикостероидов для достижения контроля над БА в сравнении с носителями нормального генотипа по данному аллелю (195 мкг против 275,5 мкг), носители полиморфизма GSTM+T демонстрировали сходную по направленности, но менее выраженную тенденцию, для контроля им необходимо в среднем 257 мкг против 269 мкг у носителей нормального генотипа.

Дети с БА, имеющие мононуклеотидную замену GSTP1 (Ile105Val), наоборот требуют достоверно более высокой дозы ТГКС для достижения контроля над БА

(297 мкг против 242 мкг у пациентов без этого полиморфизма), несмотря на то, что процент детей, достигших контроля над заболеванием, в этой группе остаётся более высоким, чем у пациентов, не обладающих данным полиморфизмом (Рисунок 36).

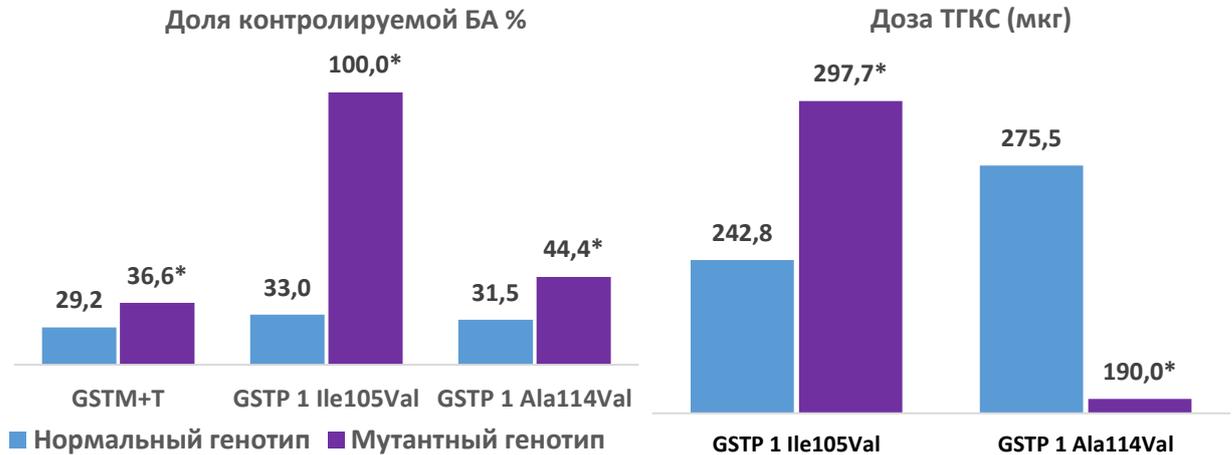


Рисунок 36 – Клинические проявления полиморфизмов генов детоксикации у детей при БА

Таким образом, снижение активности генов детоксикации вероятно приводит к тому, что при одинаковой получаемой дозе базисной терапии пациенты с такими полиморфизмами генов имеют большую фактическую экспонируемую дозу - это ведет к более надежному контролю над заболеванием.

6.2. Климатический температурный режим как экзогенный триггерный фактор бронхиальной астмы

Наиболее общим фактором, воздействующим на органы дыхания, как в физиологическом состоянии, так и при патологии, в том числе БА, является климат. Хабаровский край расположен в муссонном климате умеренных широт, характеризующимся экстремальной годовой амплитудой температуры воздуха, с холодной сибирской зимой и тропически жарким и знойным летом.

Среднесуточная температура воздуха за исследуемый период составила 2,7°

с обоими экстремумами в 2014 году: минимальное значение $-27,8^{\circ}$ – 26 декабря и максимальное $+27,3^{\circ}$ – 3 июня. Суточные изменения средней температуры, усредненные за два года, показывают среднее значение $+2,1^{\circ}$ с двумя пиками в переходный сезон: в марте-мае и сентябре-октябре. Случаи с резкими суточными изменениями (более 95-го перцентиля за 2-летний период) показывают, что частота таких дней выше в 2014 г. с пиками в переходный период (апрель-май, октябрь) и в декабре. Изменения 2013 г. менее выражены, с максимальной частотой (10,0%) как в марте, так и в октябре. В целом погода летом более стабильна, без резких перепадов температур (Рисунок 37).

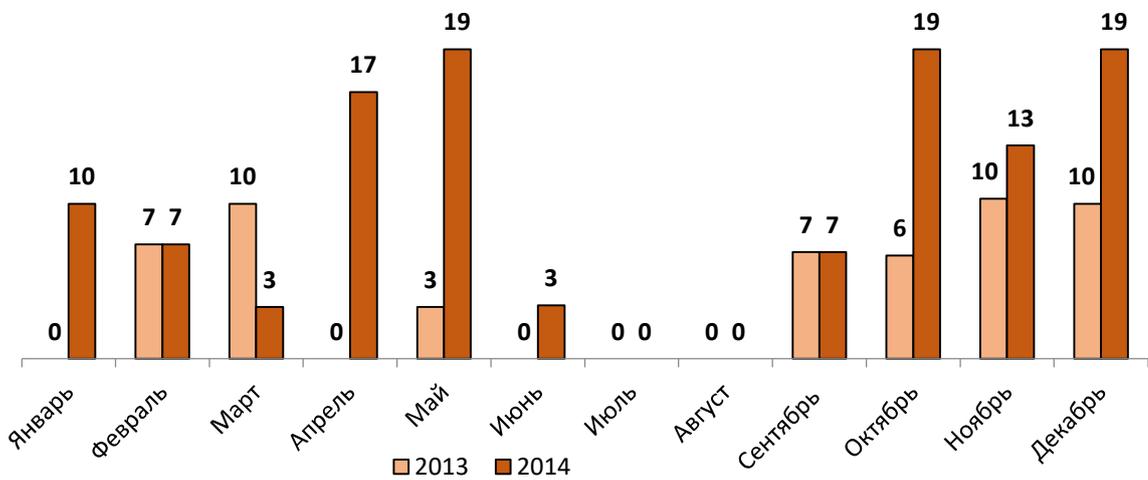


Рисунок 37 – Частота дней (%) с изменением температуры более 95-го перцентиля

Показано распределение ежемесячных посещений больных с БА за исследуемый период с использованием метрики IS (индекс сезонности обострений БА $IS = (M_i / M_m) * 100$, где M_i – среднее количество посещений за данный месяц, а M_m – среднее количество посещений за месяц в текущем году [94]), (Рисунок 38).

Выявлено, что частота обострений БА была самой высокой в ноябре-декабре 2013 года (262% и 177% соответственно), а весной с марта по май 2014 года – в апреле (201%). Оценивалась взаимосвязь между изменениями температуры и количеством обострений БА.

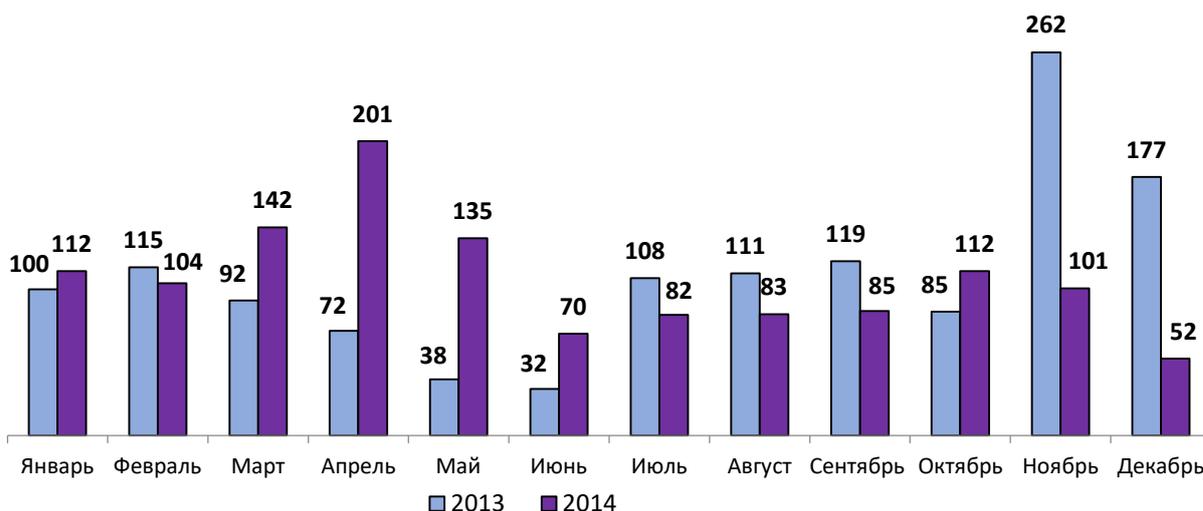


Рисунок 38 – Индекс сезонности обострений БА в Хабаровске

Коэффициенты корреляции для среднемесячных dT_{mean} (суточные изменения среднесуточных температур) и IS составляют 0,47 и 0,49 в 2013, 2014 годах соответственно. Более выраженные корреляции отмечаются при рассмотрении частоты дней с резкими изменениями суточной температуры F_{mean} (частота дней в каждом месяце со средними изменениями температуры более 95-го перцентиля): $r = 0,69$ в 2013 и 0,43 в 2014 годах. Полученные данные свидетельствуют о достаточно сильной зависимости частоты обострений и, соответственно, степени контроля БА у детей от погоды и ее изменений (Рисунок 39, указаны только достоверные корреляции, $p < 0,05$).

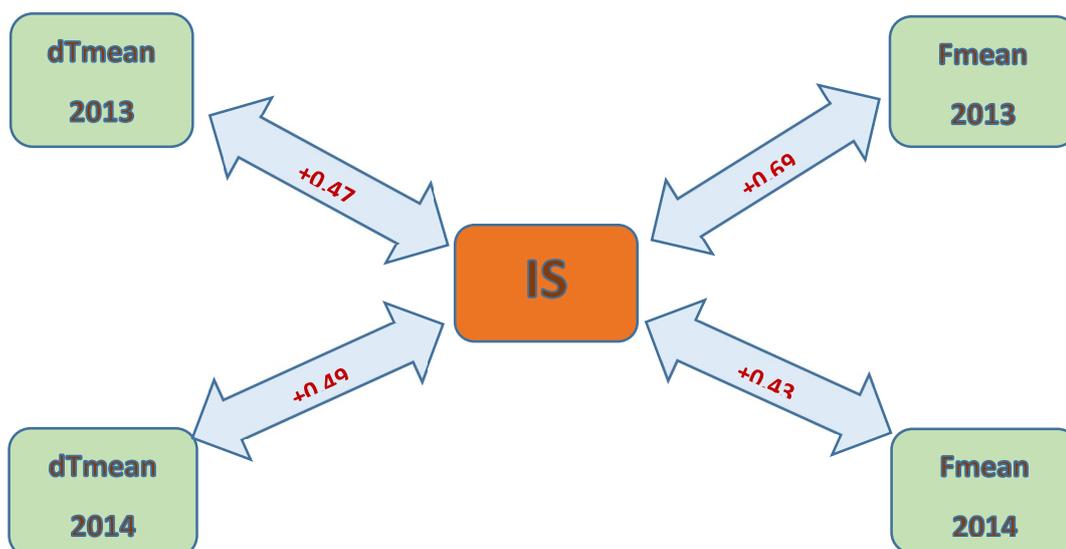


Рисунок 39 – Взаимосвязи индекса сезонности обострений БА и температурных показателей

Погода в Хабаровске характеризуется очень жарким летом и чрезвычайно холодной зимой в сочетании с резкими погодными изменениями, которые происходят в переходные сезоны. Полученные результаты свидетельствуют о высоком риске обострения БА как весной, так и осенью. Вторичный скачок зимой (декабрь 2013 г.) показывает, что низкая температура (экстремально низкая 28 декабря 2014 г.) может усугубить сезонные заболевания, в первую очередь респираторные вирусные инфекции, вызывая дополнительную нагрузку на детей с БА. Ранее Driessen et al. [150] обсуждали снижение функции легких при охлаждении дыхательных путей у детей с астмой. Относительно большие и быстрые изменения температуры и давления воздуха, характерные для переходных сезонов, приводят к изменениям содержания кислорода в воздухе, которые в совокупности связаны с легочной и сердечной недостаточностью и бронхолегочными заболеваниями [135]. Дальний Восток России, особенно его южная часть, является районом муссонного климата с сильными дождями и чрезвычайно высокой влажностью в теплое время года, особенно в период с июля по середину сентября [136], что создает сырость и плесень как внутри, так и снаружи жилища. Документально подтверждено, что тропически влажная знойная погода с горячим и влажным воздухом вызывает дополнительное обострение БА [99]. Известно, что тепловые потери организма человека от дыхания зимой в 1,5 раза выше, чем в переходные сезоны, и в два раза выше, чем летом. Этот контраст может быть причиной повышенной респираторной заболеваемости в осенне-весенний период. Как правило, наиболее сильное тепловое напряжение возникает при переходе от горячего к холодному в осенний период [111]. Безусловно, это еще одна причина скачков обращаемости пациентов с БА весной и осенью с пиками в ноябре и апреле, что подробно показано в [110]. Дополнительно можно отметить, что теплое время года – это период цветения аллергенных растений, с обострением различных аллергических заболеваний и респираторных инфекций вирусного типа [160, 236], провоцирующих дополнительные случаи посещения и госпитализации больных БА.

Таким образом, проведенный анализ данных показывает, что обострения БА

у детей и, соответственно, частота посещений врача находятся в зависимости от изменений природной среды: резкие перепады температуры воздуха вызывают увеличение частоты клинических проявлений БА и, как следствие, снижение уровня контроля над заболеванием.

6.3. Оценка уровня витамина Д в крови у детей как фактора контролируемости бронхиальной астмы

Климатические особенности региона влияют на течение БА различными способами. В частности, город Хабаровск неоднократно признавался самым солнечным городом России (2449 солнечных часов в год), но экстремальные температурные перепады и влажность, характерные для нашего климата, не позволяют в полной мере воспользоваться этим, поскольку большую часть года хабаровчане вынуждены носить одежду, прикрывающую практически всю поверхность тела, и проводить много времени в помещении, в связи с этим для жителей Дальнего Востока характерен скорее дефицит витамина Д, чем его избыток. Интерес к витамину Д, как модификатору атопического воспаления при БА обусловлен его некальцимическими эффектами, реализуемыми через VDR-рецепторы иммунных клеток. Однако инсоляция одинакова для всех проживающих в данном регионе, но реализуется в каждом конкретном случае, индивидуально, значимость полиморфизмов VDR рецепторов для патогенеза БА известна [43, 44]. Исходя из этого, большой интерес представляет взаимосвязь уровня витамина Д и контролируемости течения БА, а также механизмы ее реализации.

В ходе исследований выявлено (Рисунок 40), что у детей с контролируемой БА уровень витамина Д достоверно ($p=0,006$) выше ($64,5\pm 12,8$ нг/мл), чем у пациентов с неконтролируемым течением заболевания ($29,8\pm 5,4$ нг/мл).

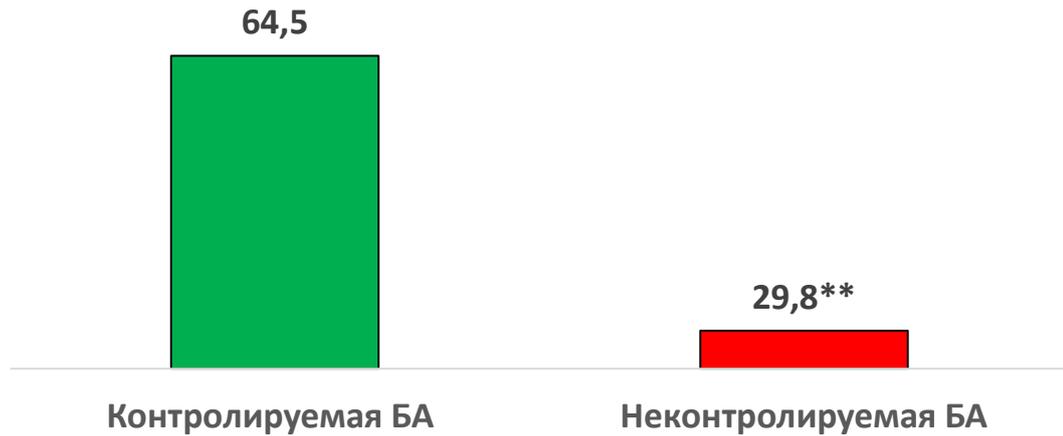


Рисунок 40 – Уровень витамина Д при БА у детей

Средние показатели содержания витамина Д у больных с контролируемым течением находились в пределах нормы (более 30,0 нг/мл), у детей с неконтролируемым – ниже референсных значений.

При анализе влияния уровня витамина Д на некоторые клиничко-патогенетические показатели при БА выявлены следующие закономерности (Таблица 46). При изучении некоторых показателей иммунного статуса выявлено, что дети с дефицитом витамина Д, страдающие БА, имеют достоверно в 3 раза более высокий уровень IL5 (0,62 пг/мл против 0,22 пг/мл), непосредственно активизирующего атопическое воспаление, но при этом достоверно (в 4,5 раза) более низкие показатели IL4 (0,2 пг/мл против 0,94 пг/мл).

Таблица 46 – Иммунологические показатели пациентов с БА в зависимости от уровня витамина Д

Цитокины	Уровень витамина Д		Достоверность (p) U-/t-/Z-критерий
	<30,0 нг/мл, n=69	≥30,0 нг/мл, n=98	
IL4, пг/м Me (Min-Max) LQ - HQ	0,2(0-13,1) 0,0-0,0	0,94(0-25,5) 0,0-0,62	0,037
IL5, пг/м Me (Min-Max) LQ - HQ	0,62(0-7,8) 0,0-0,56	0,22(0-4,3) 0,0-0,0	0,044
CD19, абс.	366,0±31,7	427,0±24,2	0,049
CD19, %	13,7±1,05	16,1±1,2	0,048

Обнаружена достоверно более низкая доля активных В-лимфоцитов (13,7% против 16,1%), и их абсолютное число (366 против 427), то есть при изменении уровня витамина Д меняются именно те иммунные показатели, которые играют основную роль в атопическом воспалении.

Выявленные иммунно-патогенетические особенности имели четкую клиническую реализацию. В частности, у пациентов с дефицитом витамина Д требовалась достоверно большая доза ТГКС для достижения контроля над заболеванием (347,3 мг против 285,5 мг) (Рисунок 41).

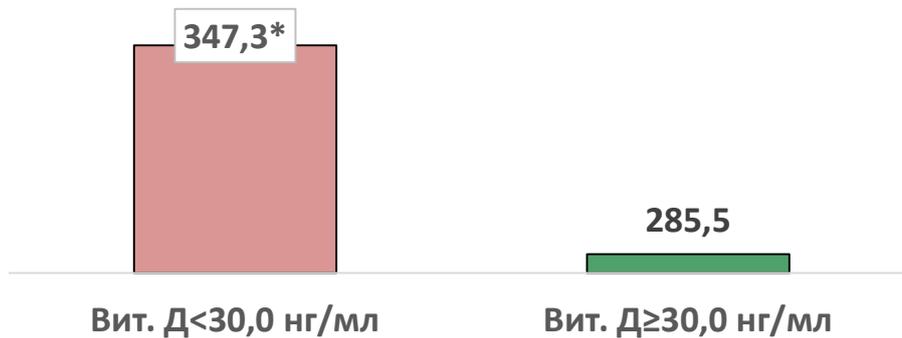


Рисунок 41 – Доза ТГКС, требуемая для достижения контроля над заболеванием при дефиците витамина Д у детей с БА

Кроме того, дети с дефицитом витамина Д (Рисунок 42) достоверно в 2,8 раза чаще, выделяют из зева ДНК вируса герпеса 6 типа (в 50,0% случаев против 17,6%). О роли этого вируса подробнее изложено ниже.

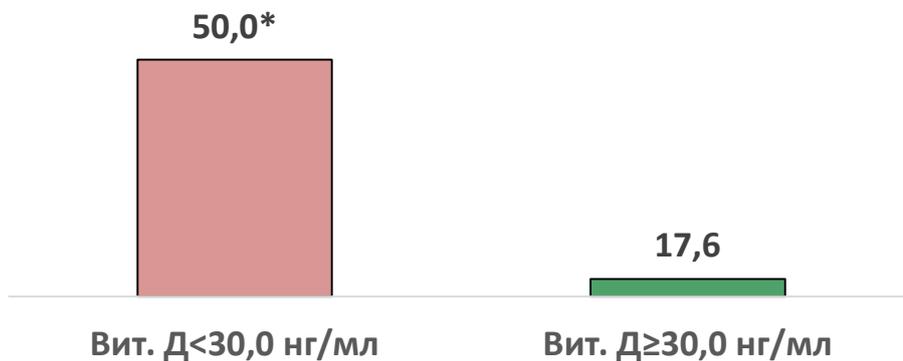


Рисунок 42 – Доля выделения ДНК герпеса человека 6 типа с мокротой при дефиците витамина Д у детей с БА

Таким образом, содержание витамина Д оказывает значимое воздействие на

уровень контроля БА у детей, влияет на патогенетически важные для атопического воспаления показатели иммунного статуса и вероятность персистенции вируса герпеса человека 6 типа. Определение и коррекция дефицита витамина Д могут быть рекомендованы при неконтролируемом течении БА у детей.

6.4. Взаимосвязь уровня микроэлементов в сыворотке, форменных элементах крови и показателей иммунного статуса при бронхиальной астме

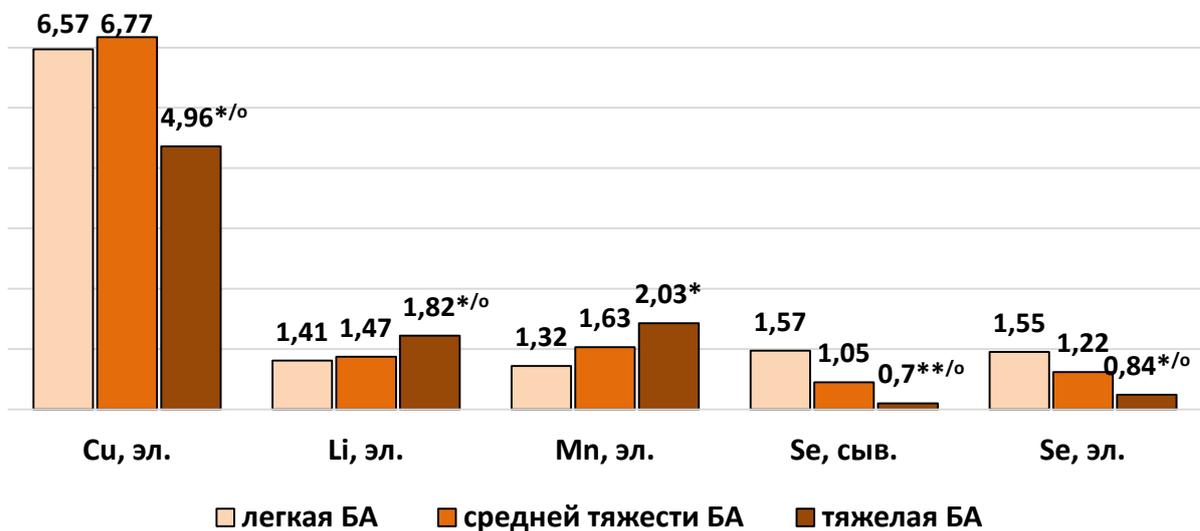
Еще одним аспектом, обуславливающим различия среды, являются геохимические особенности регионов. Для Хабаровского края характерно повышенное содержание Mn, Cu, Cr, Co, Zn, Mo и недостаток Se в окружающей среде, техногенное загрязнение Pb, содержание которого значимо выше фонового [15, 16, 64]. Факторы внешней среды воздействуют одинаково на всех членов локальной популяции, но ассоциируемые с ними нарушения имеют место лишь в определенном проценте случаев, поэтому большой интерес представляет изучение усвоения микроэлементов и их включение в метаболические процессы при БА.

В ходе обследования детей с БА и в группе сравнения выявлено достоверное повышение Co в форменных элементах крови (1,2 мкмоль/л против 0,96 мкмоль/л), Pb в сыворотке (0,0051 мкмоль/л против 0,0 мкмоль/л) и в форменных элементах (1,81 мкмоль/л против 1,28 мкмоль/л), снижение содержания Zn в сыворотке (34,05 мкмоль/л против 39,27 мкмоль/л), Cu (6,42 мкмоль/л против 10,56 мкмоль/л) и Se (1,27 мкмоль/л против 1,96 мкмоль/л) в форменных элементах крови (Таблица 47).
Таблица 47 – Содержание микроэлементов в сыворотке и форменных элементах крови (мкмоль/л) у детей с БА и в группе сравнения

Микроэлементы	Гр. сравнения, n=40	БА, n=167	Достоверность (p) t-критерий
Co, эл.	0,96±0,086	1,20±0,0638	0,048
Cu, эл.	10,65±0,658	6,42±0,2699	0,001
Se, эл.	1,96±0,186	1,27±0,1321	0,001
Pb, сыв.	0,0 ±0,173	0,0051±0,0017	0,01
Pb, эл.	1,28±0,1786	1,81±0,0654	0,046
Zn, сыв.	39,27±0,6937	34,05±1,961	0,049

Из более широкого спектра определяемых микроэлементов крови в таблице 6.4 представлены данные только с достоверной разницей их содержания в наблюдаемых группах. Обращает на себя внимание относительное снижение наряду с Se, микроэлементов, широко распространенных в нашем геохимическом регионе (Cu, Zn) у больных БА, что может свидетельствовать о нарушениях их усвоения, а не поступления. Относительно более низкое содержание Se и высокие токсикантов – Pb и Ni ожидаемо, исходя из патогенетической модели заболевания (Рисунок 43).

При сравнении содержания микроэлементов у пациентов с БА в зависимости от тяжести обнаружен ряд достоверных отличий. Выявлено достоверное снижение содержания Cu в форменных элементах крови у больных с тяжелой степенью заболевания в сравнении со средней и легкой (легкая – $6,57 \pm 0,61$ мкмоль/л, средняя – $6,77 \pm 0,38$ мкмоль/л и тяжелая – $4,95 \pm 0,49$ мкмоль/л соответственно), снижение содержания Se как в сыворотке крови ($1,57 \pm 0,26$ мкмоль/л, $1,05 \pm 0,07$ мкмоль/л и $0,70 \pm 0,11$ мкмоль/л соответственно), так и в форменных элементах ($1,55 \pm 0,36$ мкмоль/л, $1,22 \pm 0,14$ мкмоль/л и $0,84 \pm 0,07$ мкмоль/л соответственно) (Рисунок 6.8).



Примечание - достоверность показателей групп легкой и тяжелой степени БА:

*- $p \leq 0,05$; **- $p \leq 0,01$; групп средней и тяжелой степени БА: ^o- $p \leq 0,05$

Рисунок 43 – Содержание микроэлементов (мкмоль/л) в сыворотке и форменных элементах крови в зависимости от тяжести БА

По мере нарастания тяжести заболевания от легкой до тяжелой степени у детей с БА отмечено повышение содержания Li ($1,41 \pm 0,09$ мкмоль/л, $1,47 \pm 0,08$ мкмоль/л и $1,82 \pm 0,16$ мкмоль/л), Mn ($1,32 \pm 0,13$ мкмоль/л, $1,63 \pm 0,13$ мкмоль/л и $2,03 \pm 0,26$ мкмоль/л) в форменных элементах и Pb в сыворотке крови ($0,01 \pm 0,01$ мкмоль/л, $0,00 \pm 0,01$ мкмоль/л и $0,05 \pm 0,01^*$ мкмоль/л).

По результатам корреляционного анализа выявлены значимые взаимосвязи между показателями иммунного и микроэлементного статусов у детей с БА (Рисунок 44). Обращает на себя внимание большое количество обнаруженных зависимостей. Уменьшение степеней свободы взаимоотношений, ужесточение иммуно-микроэлементных взаимоотношений может свидетельствовать о напряжении компенсаторно-адаптационных резервов организма.

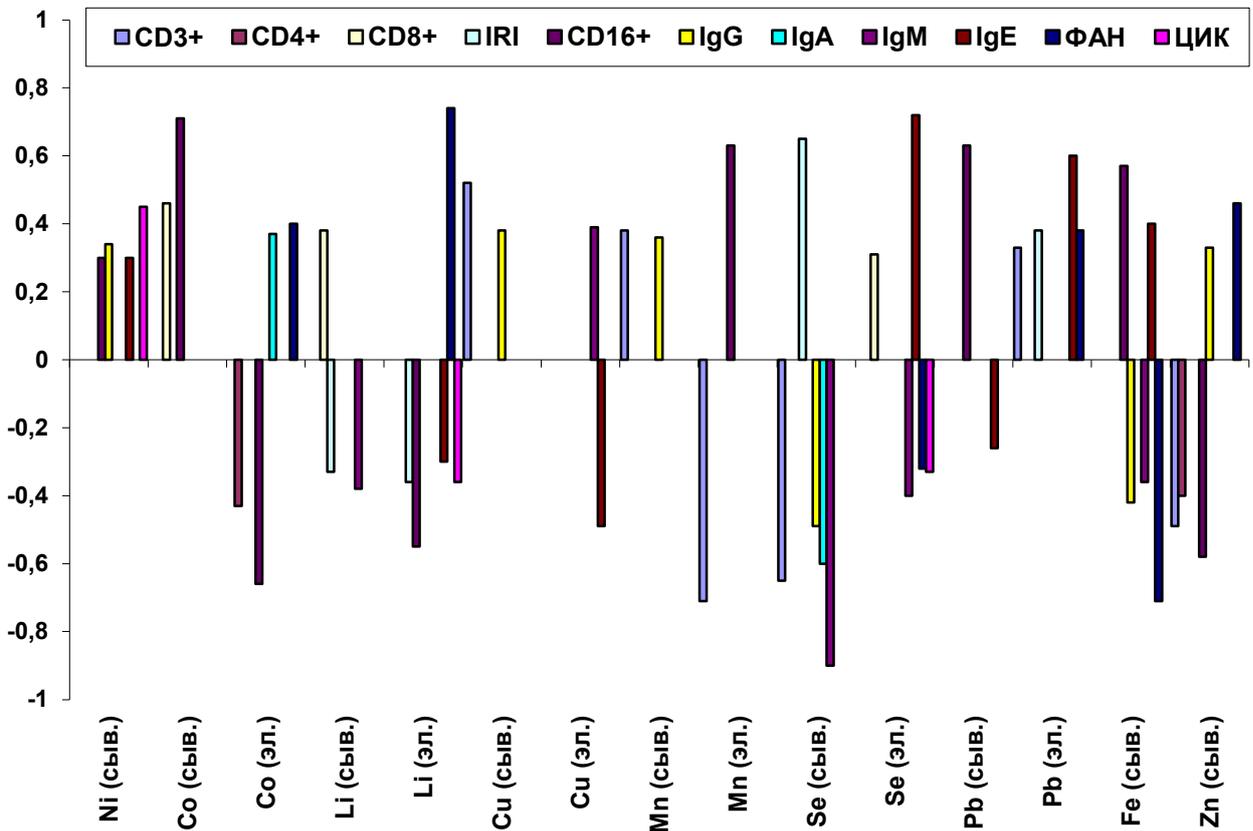


Рисунок 44 – Взаимосвязи содержания микроэлементов в сыворотке и форменных элементах крови с показателями иммунного статуса

При исследовании влияния содержания микроэлементов на развитие обострения БА выявлено, что его относительный риск возрастает у детей с

повышенным содержанием Pb (ОШ=7,8, $p\chi^2=0,0001$) и Co (ОШ=3,1, $p\chi^2=0,0005$) в форменных элементах.

Таким образом, обнаружено, что несмотря на единый геохимический регион проживания, имеют место статистически достоверное снижение содержания Cu, Se, Zn и повышение Pb, Ni, Co в крови у пациентов с БА. Отмечено снижение Se, Cu и нарастание Pb, Mn, Li по мере нарастания тяжести БА. С утяжелением течения заболевания связаны и изменения содержания и направленности по тем же элементам, достоверная разница которых отмечалась при сравнении пациентов с БА и практически здоровых детей. Результаты свидетельствуют о важности их роли в патогенезе заболевания.

6.5. Трансформация эритроцитов, как модель состояния мембран при контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астме

Наряду с врожденной атопией значимую роль в формировании и развитии заболевания играет гиперреактивность бронхов, как врожденная, так и приобретенная. В свою очередь, гиперреактивность бронхов во многом связана с состоянием мембран эпителия бронхов. Изменения этих мембран не только активно развиваются в ходе патологического процесса, но и предшествуют ему, снижая барьерную функцию бронхов, обеспечивая облегченный доступ, физическим и химическим ирритантам, потенциальным аллергенам.

Таким образом, изучение состояния мембран клеток эпителия бронхов могло бы позволить оценить характер течения БА [41]. Однако получение клеток бронхиального эпителия подразумевает проведение диагностической бронхоскопии с биопсией, это сложная, инвазивная процедура, требующая квалифицированного персонала, да и гиперреактивность бронхов является относительным противопоказанием к ней, поэтому в широкой клинической практике такое исследование неприменимо.

В то же время существует метод интегральной оценки клеточных мембран организма посредством анализа трансформации мембран эритроцитов. Эта клетка не имеет собственного метаболизма, поэтому является показательной моделью

состояния клеточных мембран организма в целом [27, 28]. Ранее этот метод применялся у детей с БА, однако не были выявлены взаимосвязи изменения трансформации эритроцитарных мембран и особенностей течения БА, а также связь компенсаторных возможностей клеточных мембран и выраженности основного заболевания [13].

Всем детям проводилась оценка спонтанной трансформации эритроцитов путем микроскопирования под световым микроскопом в нативном мазке взвеси цельной крови. Основными показателями, характеризующими трансформацию эритроцитов, являются количество дискоцитов, переходных (сфероиды, 2-х ямочные, эхиноциты, стоматоциты) и дегенеративных (сфероциты, щизоциты пойкилоциты) форм [27, 28].

У практически здоровых людей количество эритроцитов правильной формы (дискоцитов) находятся в пределах от $75,2 \pm 1,3$ %. Число переходных форм, способных при благоприятных условиях вновь принимать правильную форму и выполнять свою функцию, составляет около $12,86 \pm 0,38$ %. На долю эритроцитов, утративших свою морфологию и способность к функционированию, приходится $1,2 \pm 0,6$ %. При различной патологии этот показатель может достигать 11,2-26,0%.

В ходе исследований выявлено более высокое содержание дискоцитов и более низкое – переходных и деструктивных форм в группе сравнения, при чем у детей с БА изменения этих показателей нарастают по мере роста степени тяжести заболевания (Рисунок 45).

Дискоциты составляют достоверно меньшую долю эритроцитов у детей с тяжелой (60,1%) и БА средней тяжести (66,7%), относительно группы сравнения (83,0%), в группе с легким течением заболевания тоже имеется тенденция к снижению этого показателя (72,4%). Переходные и деструктивные формы, напротив, составляют достоверно большую долю у детей с тяжелой БА (34,6% и 4,5% соответственно), у пациентов со средней степенью тяжести (28,9% и 3,6% соответственно) в сравнении с детьми без БА (23,9% и 1,6% соответственно), нет тенденций к росту этих показателей и у детей с легкой БА (24,2% и 2,8% соответственно).



Примечание - достоверность показателей: *- разница с группой сравнения ($p \leq 0,05$), ^- разница с группой БА легкого течения ($p \leq 0,05$)

Рисунок 45 – Показатели трансформации эритроцитов у детей с БА различной степени тяжести и в группе сравнения

Интегральным критерием возможностей мембраны вернуться к норме является показатель компенсаторной трансформации (ПКТ) – соотношение переходных и деструктивных форм, который отражает возможности адаптации клеточных мембран без гибели самой клетки. В наших исследованиях показано достоверное снижение ПКТ у детей, страдающих БА, в сравнении с практически здоровыми (15,2), с тенденцией к снижению по мере усиления тяжести у пациентов с БА: легкая – 8,5, средняя – 8, тяжелая – 7,65.

Изменение формы эритроцитов может быть результатом нарушения состояния клеточной мембраны под действием всего спектра эндо- и экзогенных факторов, т.е. клетки могут подвергаться различным обратимым и необратимым трансформациям и идти 2-мя путями: эхиноцитарным и стоматоцитарным.

На настоящий момент выявлен ряд эхиноцитогенных и стоматоцитогенных агентов. Прогрессирующее снижение способности эхиноцитов к деформации происходит параллельно с уменьшением АТФ, накоплением кальция и изменением формы эхиноцита. Стоматоцитарный путь обусловлен снижением трансмембранного градиента рН, что может ингибировать кальциевый насос и вызывать

характерные изменения формы клеток по кальций-зависимому механизму [56].

В ходе исследований обнаружены значимые различия соотношения этих путей у детей с БА и в группе сравнения. Среди переходных форм наименее поврежденной являются сфероиды, и их ожидаемо достоверно больше в группе сравнения (36% против 23,7%) (Рисунок 46).

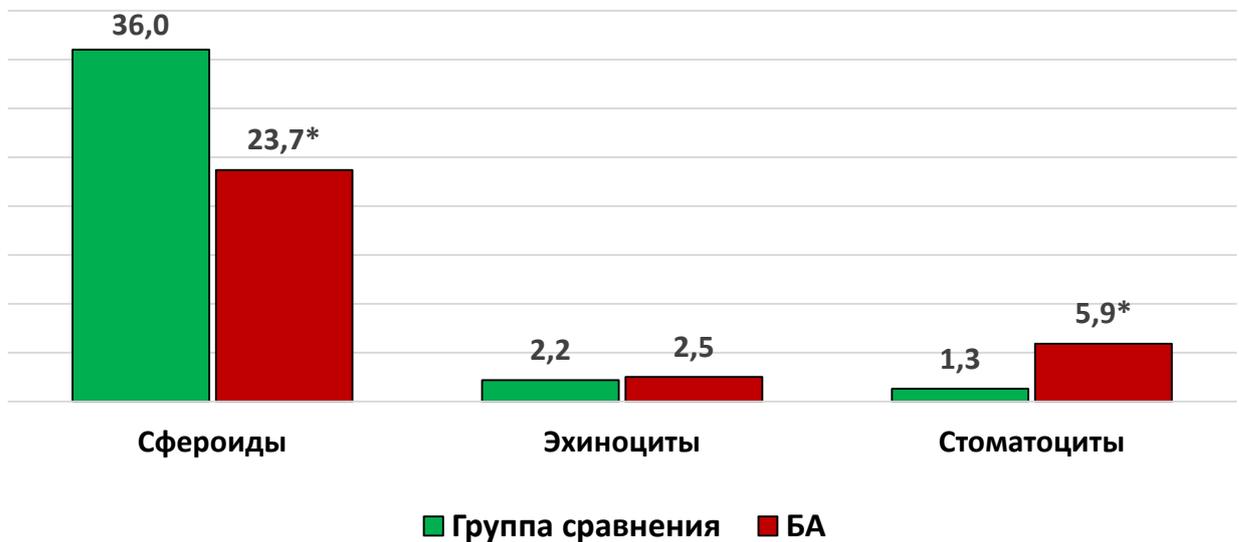


Рисунок 46 – Распределение переходных форм эритроцитов (%) при БА и в группе сравнения

Дальнейшая трансформация происходит по одному из вышеописанных путей, обнаружено, что стоматоциты достоверно, почти в пять раз чаще (5,9% против 1,3%) встречаются в крови у детей с БА, то есть для этой нозологии характерен стоматоцитарный путь трансформации, что делает маловероятным объяснение этих изменений как вторичных, вызванных гипоксией, поскольку таковые обычно ведут к реализации эхиноцитарного пути патологической трансформации эритроцитов.

Выявлены взаимосвязи показателей трансформации эритроцитов с основными клиническими и лабораторными проявлениями БА, в частности, таким объективным параметром, как оценка функции внешнего дыхания. В ходе анализа данных исследования показана достоверная, сильная обратная корреляционная связь между показателем ОФВ1 и долей переходных и деструктивных форм ($R=-0,82$ и $R=-0,70$ соответственно), а также достоверная сильная прямая корреляционная

связь ($R=0,76$) между уровнем ОФВ₁ и ПКТ (Рисунок 47, приведены только достоверные корреляции $p<0,05$).

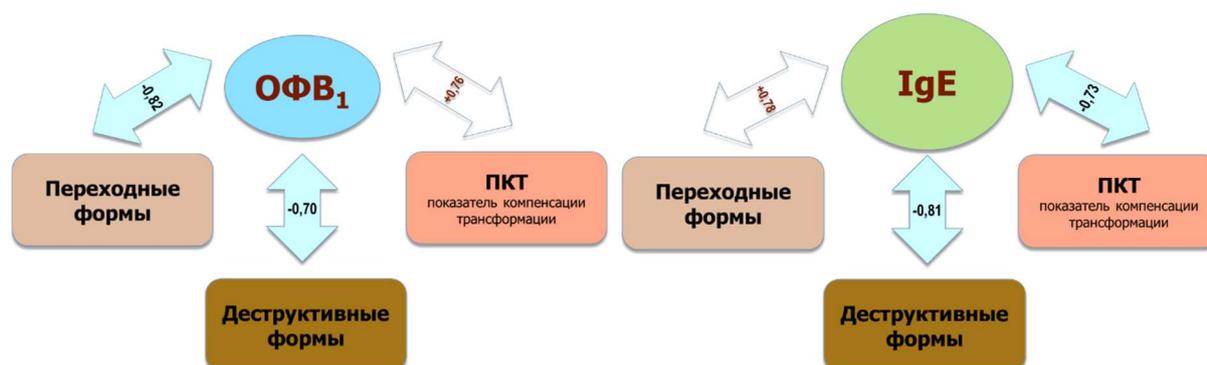


Рисунок 47 – Корреляционные связи показателей трансформации эритроцитов и клиничко-патогенетических характеристик БА

Также выявлено влияние показателей трансформации эритроцитов и иммунитета, отражающих характеристики местного воспаления (Рисунок 48, приведены только достоверные корреляции $p<0,05$), значимость которого неоднократно демонстрировалась выше. Обнаружена достоверная сильная обратная связь ($R=-0,70$) между долей переходных форм эритроцитов и индуцированной фагоцитарной активностью нейтрофилов. Однако намного более частое облако корреляций сопровождается дегенеративные формы, отмечаются их сильные достоверные обратные связи со спонтанной и индуцированной фагоцитарной активностью нейтрофилов ($R=-0,70$ и $R=-0,77$), а также со спонтанным и индуцированным фагоцитарным числом ($R=-0,76$ и $R=-0,84$).

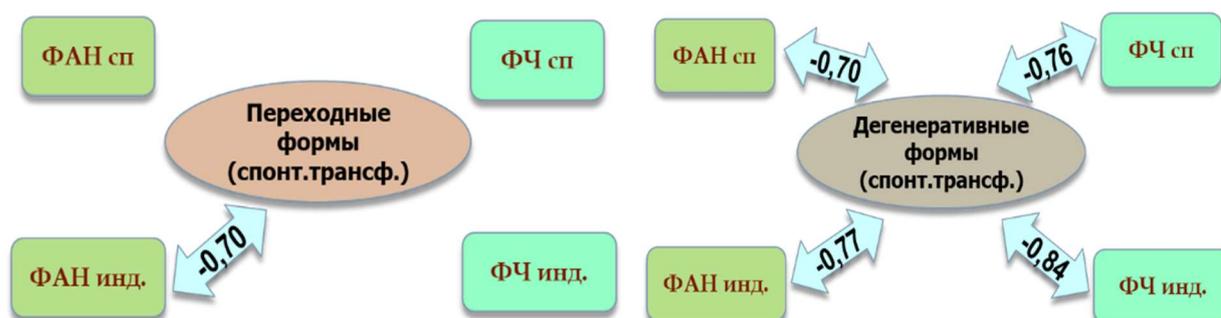


Рисунок 48 – Корреляционные связи показателей спонтанной трансформации эритроцитов и показателей нейтрофильного фагоцитоза

При анализе полученных результатов обнаружено, что достоверных различий в трансформации эритроцитов в группах контролируемой и неконтролируемой БА нет, не выявлено и четких тенденций изменения этих показателей в исследуемых группах (Таблица 47). Таким образом, спонтанная трансформация эритроцитов не является релевантным признаком по критерию контроля БА.

Вероятно, это связано с тем, что состояние мембран, которое как показано выше, имеет большое значение для тяжести течения, в меньшей степени поддается терапевтической коррекции и соответственно практически не оказывает влияния на контролируемость БА, так как контролируемость в большей степени обусловлена откликом на терапию.

Таблица 47 – Показатели спонтанной трансформации эритроцитов у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) Z-критерий
Дискоциты, %	62,0±0,90	60,9±1,07	0,45
Переходные, %	36,0±0,84	35,7±0,99	0,77
Дегенеративные, %	1,94±0,29	2±0,38	0,94
ПКТ	3,05±0,40	3,02±0,50	0,95
Сфероиды, %	23,19±0,44	23,27±0,56	0,25
Эхиноциты, %	1,6±0,21	2,15±0,33	0,11
Стоматоциты, %	3,51±0,31	3,14±0,26	0,36

Однако большой интерес представляет не только нативное состояние клеточной мембраны у таких детей, но и ее чувствительность к различным неблагоприятным воздействиям. В качестве модельного токсиканта нами выбран Рb – один из наиболее распространенных. Он содержится и в автомобильных выхлопах, поэтому присутствует во всех регионах.

Выявлено, что на фоне стимуляции Рb происходит снижение уровня доли дискоцитов и, соответственно, рост переходных и деструктивных форм эритроцитов, при чем при всех степенях тяжести (Рисунок 49).

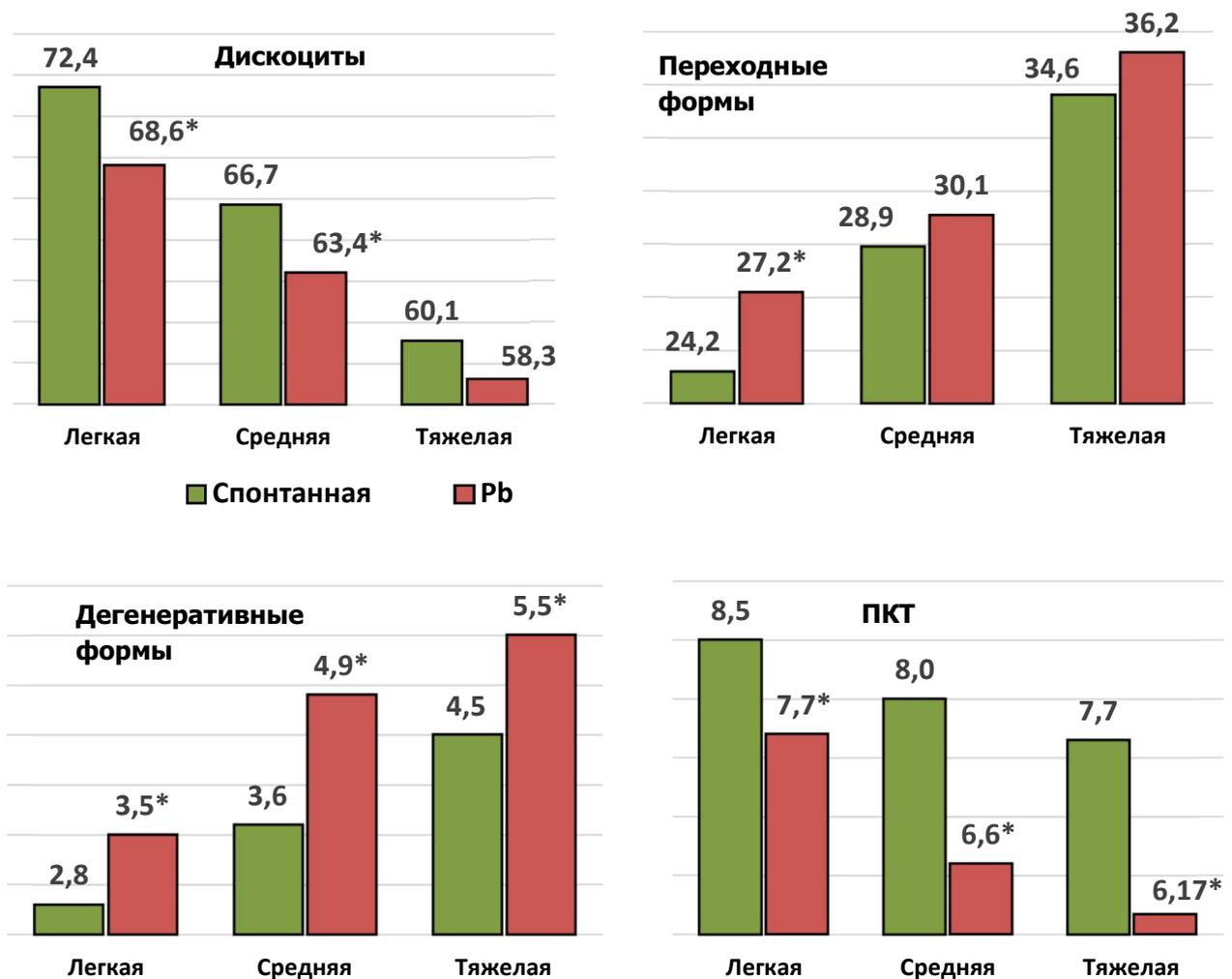


Рисунок 49 – Показатели трансформации эритроцитов спонтанной и стимулированной Pb у детей с БА в зависимости от степени тяжести

Доля дискоцитов при спонтанной трансформации у детей с легкой БА ($n=37$) достоверно выше – 72,4%, чем при стимулированной Pb – 68,6% ($p=0,048$), у пациентов с средней степенью заболевания ($n=114$) – 66,7% и 63,4% ($p=0,043$) соответственно, у больных с тяжелой БА ($n=16$) прослеживается такая же тенденция – 60,1% и 58,3% ($p=0,07$) соответственно. Доля переходных и дегенеративных форм растёт при стимуляции Pb: у детей с легким течением – 24,2% против 27,2% ($p=0,047$) и 2,8% против 3,5% ($p=0,046$) соответственно, у пациентов со средней тяжестью заболевания – 28,9% против 30,1% ($p=0,08$) и 3,6% против 4,9% ($p=0,03$) соответственно, у больных с тяжелой БА – 34,6% против 36,2% ($p=0,08$) и 4,5% против 5,5% ($p=0,041$) соответственно.

ПКТ, отражающий возможность восстановления эритроцитов, на фоне воздействия Рв достоверно снижается при любой степени тяжести БА: 8,5 против 7,7 ($p=0,043$) при легкой; 8,0 против 6,5 ($p=0,032$) при средней и 7,7 против 6,17 ($p=0,048$) при тяжелой.

Полученные результаты подтверждены корреляционными связями между тяжестью течения БА и степенью воздействия Рв на клеточные мембраны. В частности, обнаружена сильная достоверная обратная корреляционная связь ($R=-0,74$) между степенью тяжести заболевания и изменением количества дискоцитов под воздействием Рв, сильная прямая корреляционная связь ($R=0,73$) между тяжестью заболевания и изменением количества переходных форм эритроцитов (Рисунок 50, приведены только достоверные корреляции $p<0,05$).

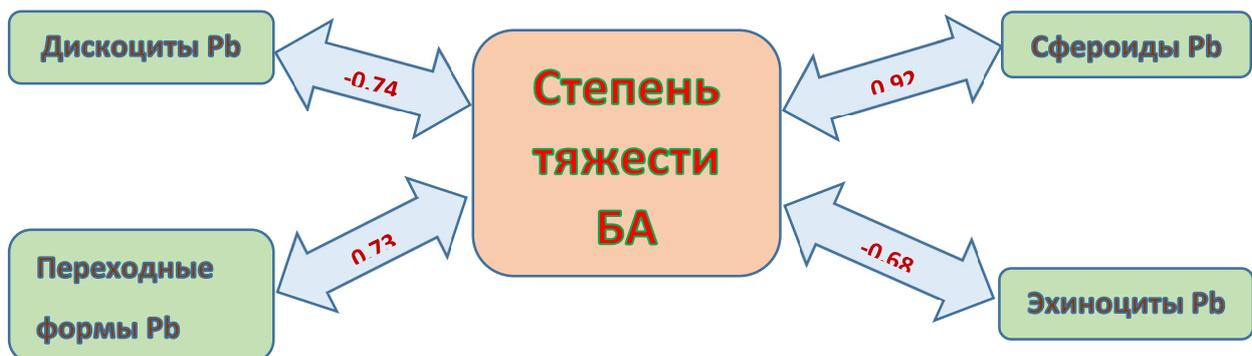


Рисунок 50 – Корреляционные связи степени тяжести БА и показателей трансформации эритроцитов под воздействием Рв

Что же касается конкретных видов переходных форм эритроцитов, то обнаружена сильная прямая достоверная корреляционная связь ($R=0,92$) между степенью тяжести БА и количеством сфероидов с одной стороны, и сильная обратная связь ($R=-0,68$) степени тяжести заболевания и количества эхиноцитов с другой.

Также отмечена взаимозависимость трансформации эритроцитов, стимулированной Рв, и показателей нейтрофильного фагоцитоза (Рисунок 51, приведены только достоверные корреляции $p<0,05$). Но облако корреляций при такой стимуляции наступает уже на стадии переходных форм, а дегенеративный, напротив, коррелируют весьма скудно. Доля переходных форм эритроцитов имеет достоверные

сильные обратные связи с фагоцитарной активностью нейтрофилов, спонтанной ($R=-0,86$) и индуцированной ($R=-0,80$), и фагоцитарным числом, спонтанным ($R=-0,72$) и индуцированным ($R=-0,70$).

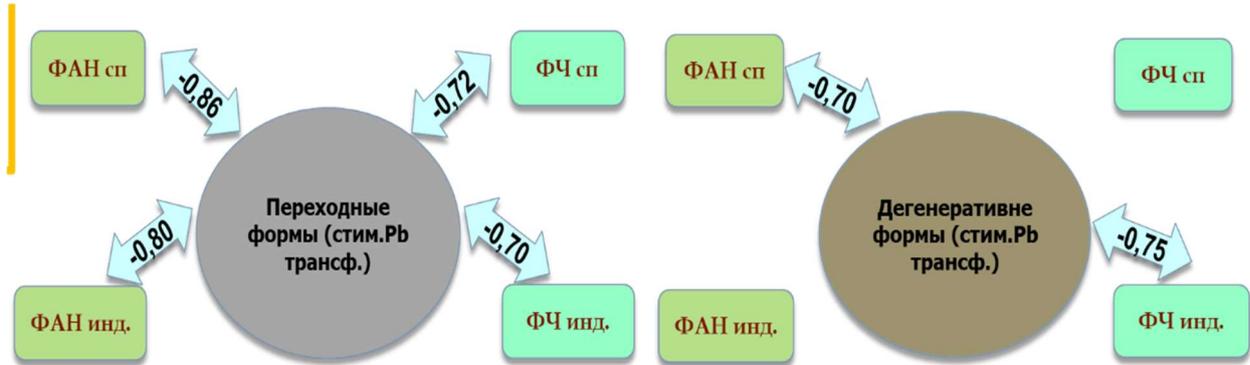


Рисунок 51 – Корреляционные связи показателей трансформации эритроцитов стимулированной свинцом и показателей нейтрофильного фагоцитоза

Доля дегенеративных форм имеет достоверные сильные обратные связи лишь со спонтанной фагоцитарной активностью нейтрофилов ($R=-0,70$) и индуцированным фагоцитарным числом ($R=-0,75$), а это свидетельствует о более раннем включении и снижении компенсаторных механизмов.

При анализе показателей трансформации эритроцитов, стимулированной Рв, в группах с контролируемой и неконтролируемой БА, как и при спонтанной трансформации достоверных различий и значимых тенденций не выявлено (Таблица 48).

Таблица 48 – Показатели трансформации эритроцитов со Рв у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) Z-критерий
Дискоциты, %	61,35±0,92	61,15±1,15	0,89
Переходные, %	36,44±0,81	36,82±1,08	0,78
Дегенеративные, %	2,22±0,35	2,02±0,31	0,71
ПКТ	3,06±0,40	3,18±0,42	0,83
Сфероиды, %	23,19±0,42	22,37±0,53	0,27
Эхиноциты, %	1,59±0,19	2,15±0,31	0,15
Стоматоциты, %	3,71±0,32	4,19±0,25	0,18

Вероятно, классическая противоастматическая терапия не оказывает значимого влияния на чувствительность мембран к токсикантам, в частности Рв.

С учетом полученных данных по спонтанной и стимулированной токсикантом трансформации, а также дефицита и избытка ряда микроэлементов была исследована трансформация эритроцитов, стимулированная Se, который является известным мембранным протектором; его снижение, нарастающее с тяжестью, показано для больных с БА. Однако достоверных различий показателей трансформации эритроцитов, стимулированной Se в группах с контролируемой и неконтролируемой БА, не выявлено (Таблица 49).

Таблица 49 – Показатели трансформации эритроцитов с Se у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) Z-критерий
Дискоциты, %	63,08±0,95	61,89±1,04	0,53
Переходные, %	35,42±0,78	36,17±0,96	0,68
Дегенеративные, %	1,49±0,33	1,94±0,29	0,31
ПКТ	2,76±0,38	2,86±0,42	0,80
Сфероиды, %	23,41±0,58	22,54±0,62	0,31
Эхиноциты, %	1,57±0,22	1,84±0,49	0,62
Стоматоциты, %	3,48±0,36	3,61±0,34	0,79

Таким образом, у больных с БА отмечаются изменения трансформации эритроцитов по сравнению с условно здоровыми детьми. Имеется прямая зависимость между степенью тяжести заболевания и выраженностью изменений трансформации мембран эритроцитов, поэтому трансформация эритроцитов может быть использована для скрининговой оценки состояния клеточных мембран у детей с высоким риском БА и эффективности комплексной терапии.

Рв в большей степени повреждает клеточные мембраны у больных с более тяжелым течением БА, что выражается в большем снижении количества нормальных форм эритроцитов – дискоцитов и, соответственно, повышении переходных форм – сфероидов. Что касается дальнейшего пути трансформации, то наличие обратной сильной корреляционной связи степени тяжести с числом эхиноцитов

позволяет предположить, что Рb стимулирует трансформацию по стоматоцитарному пути, который, характерен для детей, страдающих БА, и при спонтанной трансформации эритроцитов.

Не выявлено значимых различий как в спонтанной, так и в стимулированной токсикантами и антиоксидантами трансформации эритроцитов в группах с контролируемой и неконтролируемой БА, несмотря на значимые различия у детей с БА в зависимости от степени тяжести. Это вероятно обусловлено тем, что те элементы патогенеза БА, которые связаны с состоянием мембран, не подвержены влиянию классической противоастматической терапии, поэтому их изменение не сказывается на контролируемости заболевания.

6.6. Влияние активации ВЭБ и вируса герпеса человека 6 типа на течение бронхиальной астмы у детей

Еще одним значимым в патогенезе БА фактором являются инфекционные агенты различной природы. Для достижения стойкого улучшения контроля при БА наиболее важно выявление роли персистирующих пневмотропных инфекций, способных к длительному поддержанию и усилению аллергического воспаления, к которым относятся и вирусы группы герпеса. В наших предыдущих исследованиях показана роль ЦМВ в иммунопатогенезе и течении БА, и клиническая эффективность подавления его репликации [10, 55]. Это поставило перед нами вопрос о влиянии на течение БА активации иных вирусов этой группы.

В ходе исследований выявлено, что выделяют с мокротой ДНК ВЭБ 14,2% больных с БА, вируса герпеса 6 типа – 19,0%, ДНК обеих возбудителей – 14,4%, соответственно 52,4% пациентов не выделяют ДНК (Рисунок 52).

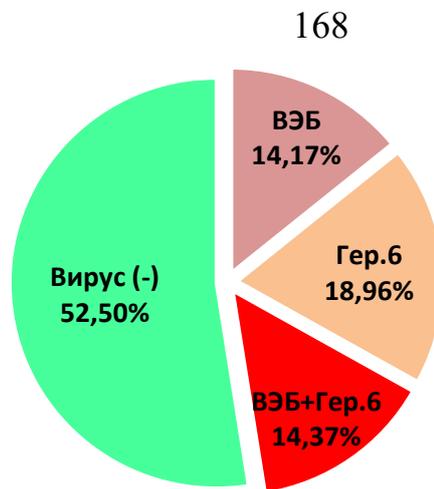


Рисунок 52 – Частота обнаружения (%) ДНК вирусов группы герпеса в мазках из зева у детей с БА

При анализе распространенности выделения ДНК вирусов в группах с контролируемой (n=70) и неконтролируемой (n=97) астмой получены следующие результаты: пациенты с контролируемой БА достоверно чаще - 63,6% против 51,2% (p=0,044) не выделяют ДНК вирусов, больные с неконтролируемой астмой достоверно чаще - 17,1% против 4,5% (p=0,01) выделяют ДНК ВЭБ, у них есть тенденция к более частому, 19,5% против 13,6% (p=0,14) выделению ДНК вируса герпеса, четких различий в одномоментном выделении ДНК обоих вирусов нет – 13,6 и 12,3 (p=0,42) (Рисунок 53).

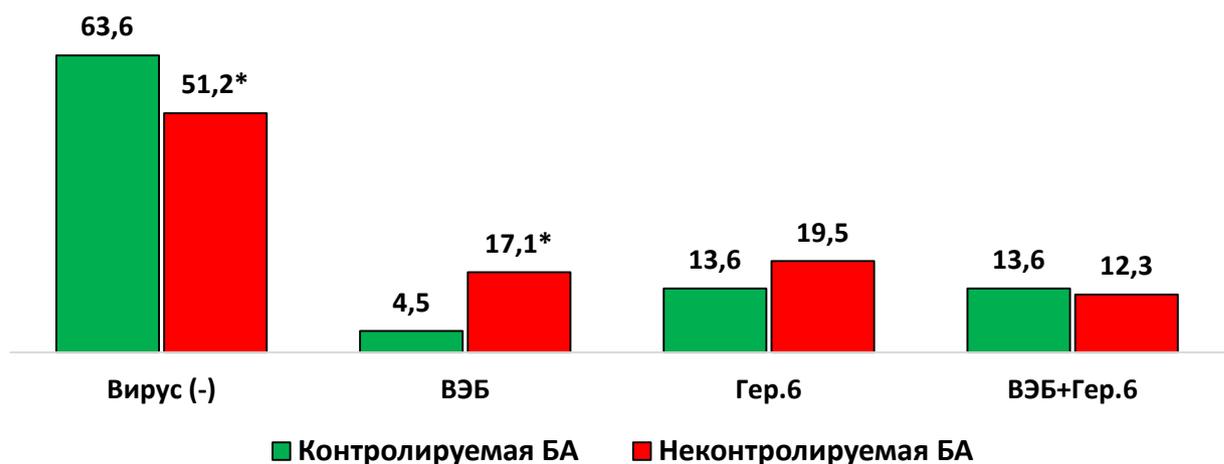
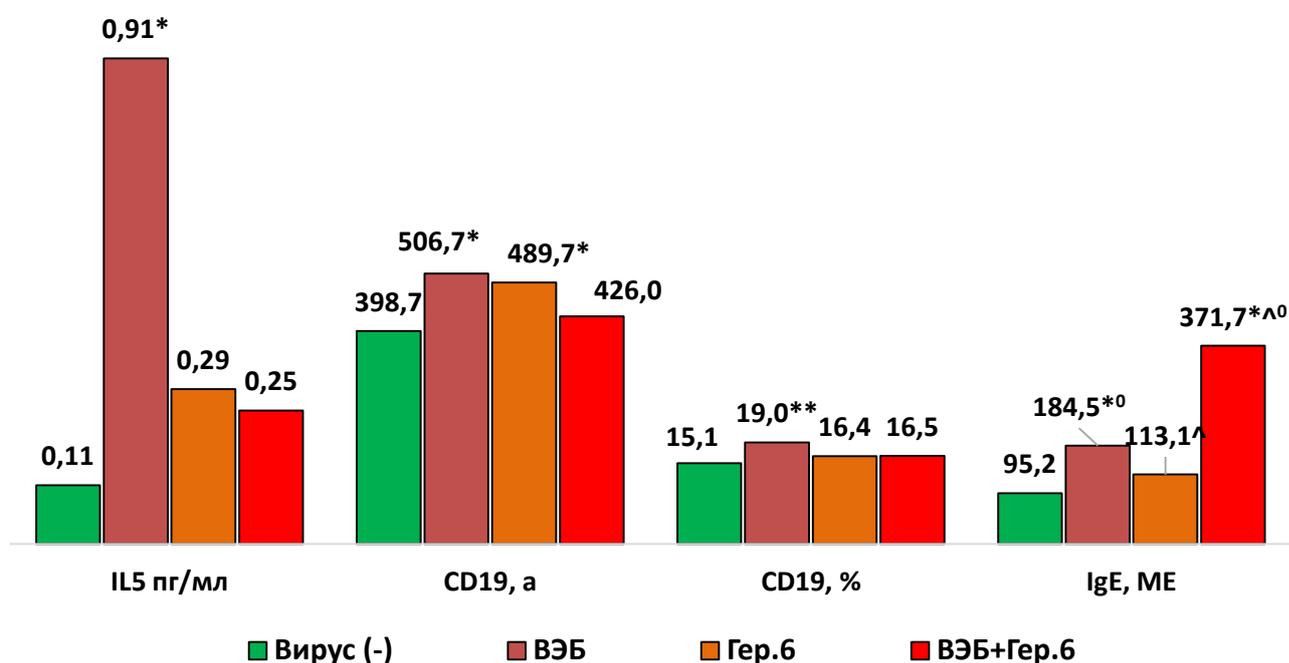


Рисунок 53 – Выделение ДНК ВЭБ и вируса герпеса 6 типа (%) из зева у детей с БА в зависимости от контролируемости

При оценке иммунологических показателей у детей с БА в зависимости от выделения ДНК вирусов были получены статистически различающиеся результаты (Рисунок 54).



Примечание - *- разница с группой Вирус (-) достоверна ($p \leq 0,05$), ^-разница с группой ВЭБ течения достоверна ($p \leq 0,05$), 0 - разница с группой герпеса 6 типа течения достоверна ($p \leq 0,05$)

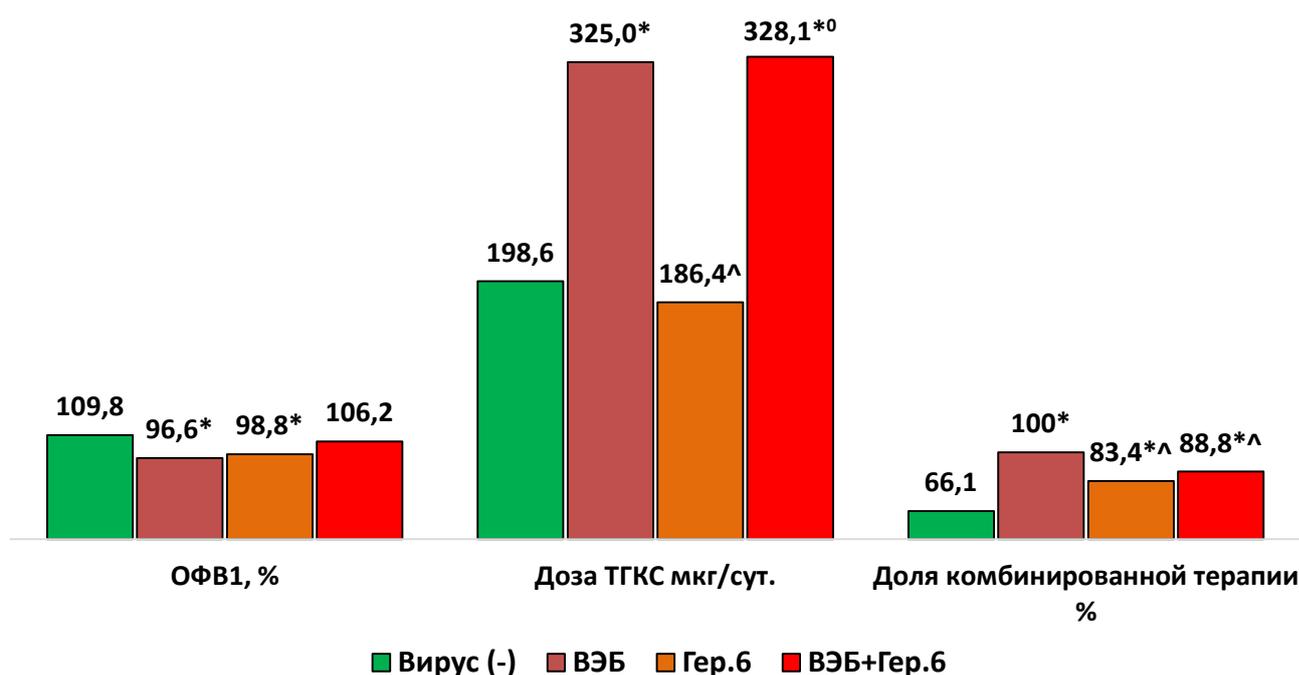
Рисунок 54 – Иммунологические показатели у детей с БА в зависимости от выделения ДНК ВЭБ и вируса герпеса 6 типа

Уровень IL5, во многом определяющего атопическое воспаление, достоверно выше у детей, выделяющих ДНК ВЭБ, в сравнении с пациентами, не выделяющими ДНК вирусов ($0,91 \pm 0,8$ пг/мл против $0,11 \pm 0,07$ пг/мл), тенденция к повышению этого показателя есть и у детей, выделяющих герпес 6 типа – $0,29 \pm 0,19$ пг/мл и оба вируса – $0,25 \pm 0,23$ пг/мл.

У детей, выделяющих ДНК исследуемых вирусов, выше содержание В-лимфоцитов, непосредственно вырабатывающих IgE как абсолютное, так и относительное: достоверно у детей с активацией ВЭБ – $506,7 \pm 54,0$ против $398,7 \pm 23,7$ и $19 \pm 2,26\%$ против $15,1 \pm 0,53\%$ соответственно; при герпесе 6 типа – $489,7 \pm 60,2$ и $16,4 \pm 1,44\%$ соответственно; у выделяющих оба вируса имеет место тенденция той же направленности – $426,0 \pm 64,4$ и $16,5 \pm 2,17\%$ соответственно.

У пациентов с активацией вирусов выше и уровень IgE, непосредственно инициирующего атопическое воспаление в тканях-мишенях, достоверно у выделяющих ДНК ВЭБ – $184,5 \pm 21,1$ МЕ против $95,2 \pm 8,3$ МЕ и продуцирующих оба вируса – $371,7 \pm 31,8$ МЕ, и тенденция той же направленности с активацией вируса герпеса 6 типа – $113,1 \pm 18,7$ МЕ. Следует отметить, что больные выделяющие ДНК обоих вирусов, имеют достоверно более высокий уровень IgE в сравнении со всеми остальными группами, а выделяющие ВЭБ не только в сравнении с непродуцирующими ДНК вирусов, но и с выделяющими герпес 6 типа.

При анализе клинических показателей в этих группах выявлено достоверное снижение ОФВ₁ у пациентов, выделяющих ДНК ВЭБ и герпеса 6 типа в сравнении с не выделяющими вирусы - $96,6 \pm 6,9\%$ и $98,8 \pm 5,45\%$ от должествующего против $109,8 \pm 2,5\%$, и тенденция к таковому у продуцирующих оба вируса, их ОФВ₁ составил $106,2 \pm 3,23\%$ (Рисунок 55).



Примечание - *- разница с группой Вирус (-) достоверна ($p \leq 0,05$), ^ - с группой ВЭБ достоверна ($p \leq 0,05$), 0 - с группой герпеса 6 типа достоверна ($p \leq 0,05$)

Рисунок 55 – Клинические показатели у детей с БА в зависимости от выделения ДНК ВЭБ и вируса герпеса 6 типа

Дети, выделяющие ДНК ВЭБ, потребляют достоверно большие дозы ТГКС в

сравнении с не выделяющим вирусом. При чем, как в случае изолированного продуцирования ДНК ВЭБ - $325 \pm 68,2$ мкг против $198,6 \pm 25,9$ мкг, так и при совместной активации с вирусом герпеса 6 типа – $328,1 \pm 78,1$ мкг, пациенты с изолированным выделением герпеса 6 типа достоверных различий с невыделяющими вирусом не имеют, потребляя в сутки $186,4 \pm 27,9$ мкг. Дети с БА, выделяющие вирусы, достоверно более часто, чем не выделяющие, нуждаются в комбинированной терапии, при продукции ВЭБ в 100%, герпеса 6 типа в 83,4%, при комбинированном выделении в 88,8%, пациенты не продуцирующие ДНК вирусов лишь в 66,1%.

Таким образом, полученные нами данные показывают влияние активизации ВЭБ и герпеса 6 типа в эпителии дыхательных путей на иммунопатогенез и течение БА. Активизация ВЭБ имеет более выраженное влияние на течение заболевания, изолированно он оказывает большее влияние, чем в комбинации с герпесом 6 типа.

6.7. Частота сенсibilизации респираторными аллергенами у детей с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой

Несмотря на то, что атопическое воспаления является основой патогенеза для БА независимо от места проживания пациента, конкретный набор респираторных аллергенов имеет региональные особенности. Спектр сенсibilизации, характерный для Дальнего Востока, известен. В отличие от западных районов нашей страны, где наиболее частым сезонным аллергеном является пыльца деревьев, в частности березы, в нашем регионе наиболее часто встречается сенсibilизация к сорным травам, в частности, полыни и амброзии, в связи с влажным климатом чаще отмечается и реакция на плесневые аллергены. Но интерес представляет влияние конкретных респираторных аллергенов на контролируемость заболевания.

Изучена частота встречаемости сенсibilизации к основным, характерным для нашего региона респираторным аллергенам (микст клеща домашней пыли, кошка, собака, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, микст деревьев, микст луговых трав, микст сорных трав) в группах с контролируемой и неконтролируемой БА (Таблица 50).

Таблица 50 – Частота встречаемости (%) сенсibilизации к респираторным аллергенам у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

	Контролируемая, n=70	Неконтролируемая, n=97	Достоверность (p) Z-критерий
Микст клещ домашней пыли	85,7	85,0	0,8
Кошка	61,9	60,0	0,3
<i>Aspergillus niger</i>	10,0	24,5	0,048
<i>Candida albicans</i>	5,0	12,5	0,15
Микст пыльцы деревьев	19,0	32,5	0,06
Микст пыльцы луговых трав	4,7	12,5	0,08
Микст пыльцы сорных трав	14,3	35,0	0,04

Ожидаемо, наиболее частыми сенсibilизантами является клещ домашней пыли и кошка, однако они не оказывают значимого влияния на контролируемость БА поскольку практически в равной мере присутствуют у пациентов наблюдаемых групп. Обнаружены и аллергены со значимой раницей в исследуемых группах, так, у детей с неконтролируемой БА достоверно чаще встречается сенсibilизация к *Aspergillus niger* (24,5% против 10,0%) и сорным травам (35,0% против 14,3%), выражена тенденция к более частой сенсibilизации пылью деревьев (32,5% против 19,0%), луговых трав (12,5% против 4,7%) и *Candida albicans* (12,5% против 5%).

Концентрация пыльцевых аллергенов зависит исключительно от региона проживания и сезона, и практически не поддается управлению со стороны человека. В то время как концентрация спор грибов и их видовой состав во многом зависит от условий проживания. Антигены плесневых грибов являются не самым частным (5-24% в спектре сенсibilизации в зависимости от региона проживания детей, страдающих БА), но одним из самых опасных аллергенов, вызывающих БА. Показано, что заболевание, вызванное грибковой сенсibilизацией, течет более тяжело и хуже поддается лечению, чем обусловленное более частыми аллергенами, например, клещом домашней пыли. Аллергенными свойствами обладают свыше

300 видов микромицетов, доминирующую роль в формировании сенсibilизации населения играют плесневые грибы родов *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.*, *Mucor spp.*, *Cladosporium spp.* Роль плесневых грибов в целом при БА изучена достаточно глубоко, но динамика сенсibilизации их антигенами на фоне изменений климата и природных катаклизмов изучены недостаточно полно. Для данного исследования модельным стало наводнение 2013 года и вызванное им подтопление в некоторых районах Приамурья. Это тема представляет большой интерес в связи с климатическими изменениями, которые все чаще приводят к затоплениям жилых районов в различных регионах нашей страны и всего мира.

Непосредственно после наводнения обследовано 104 ребенка из общей группы наблюдаемых на первом этапе (n=538), средний возраст которых $7,8 \pm 1.4$ года. Изучено влияние наводнения на частоту и спектр сенсibilизации к антигенам плесневых грибов и течение БА у детей Нижнего Приамурья (Рисунок 56).

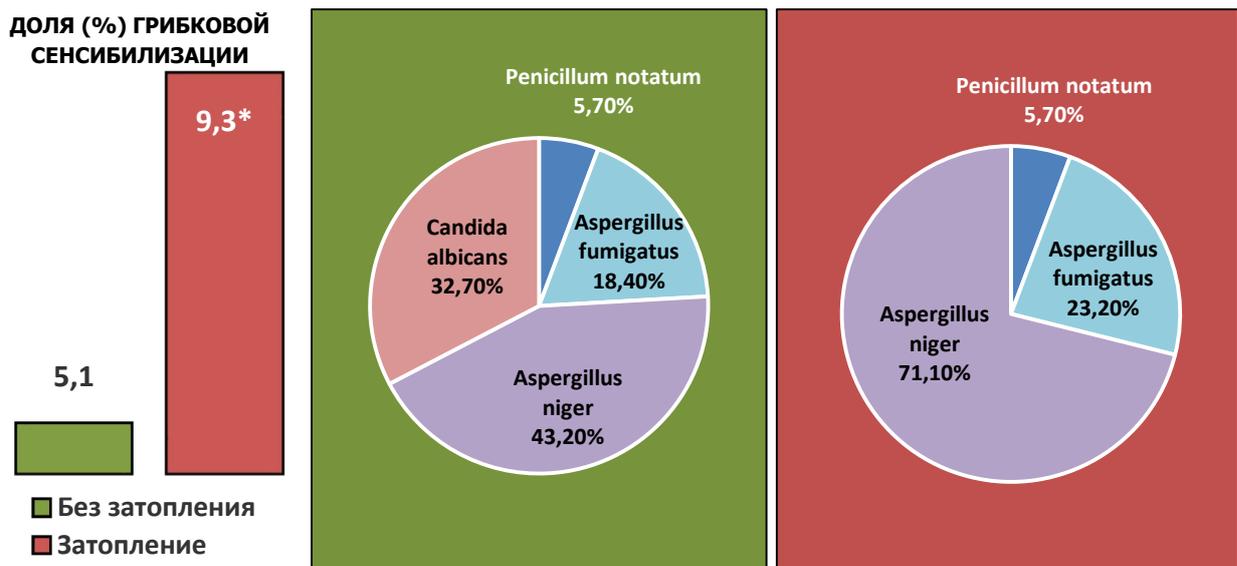


Рисунок 56 – Грибковая сенсibilизация в районах, подвергшихся и не подвергавшихся затоплению

Сенсibilизация к плесневым грибам в районах, подвергшихся затоплению, встречается почти в два раза чаще (9,1%), чем в незатопленных (4,9%), разница достоверна ($p=0,01$), в этих районах отмечается следующее распределение сенсibilизантов: сенсibilизация к *Aspergillus niger* – 71%, на втором месте *Aspergillus*

fumigatus – 23%, на третьем – *Penicillium notatum* – 6%; в районах, не подвергавшихся затоплению, распределение иное: сенсibilизация к *Aspergillus niger* – 43,2%, на втором месте *Aspergillus fumigatus* – 18,4%, на третьем – *Penicillium notatum* – 5,7%, *Candida albicans* – 32,7%, то есть на фоне наводнения *Aspergillus* встречается чаще чем *Candida albicans* преимущественно за счет *Aspergillus niger*.

Эти изменения в спектре сенсibilизации нашли свое выражение в изменении клинического течения заболевания (Рисунок 57). Обращает на себя внимание почти двукратная разница частоты приступов (2,8 и 1,6 в неделю, соответственно) у детей из подтопленных и неподтопленных районов ($p < 0,05$). У детей в районах, подвергшихся затоплению, более чем в три раза чаще приступы протекают тяжело (16,7% и 5,3% соответственно, $p < 0,05$), имеется тенденция и к более частым приступам средней тяжести (41,7% и 38,6% соответственно).

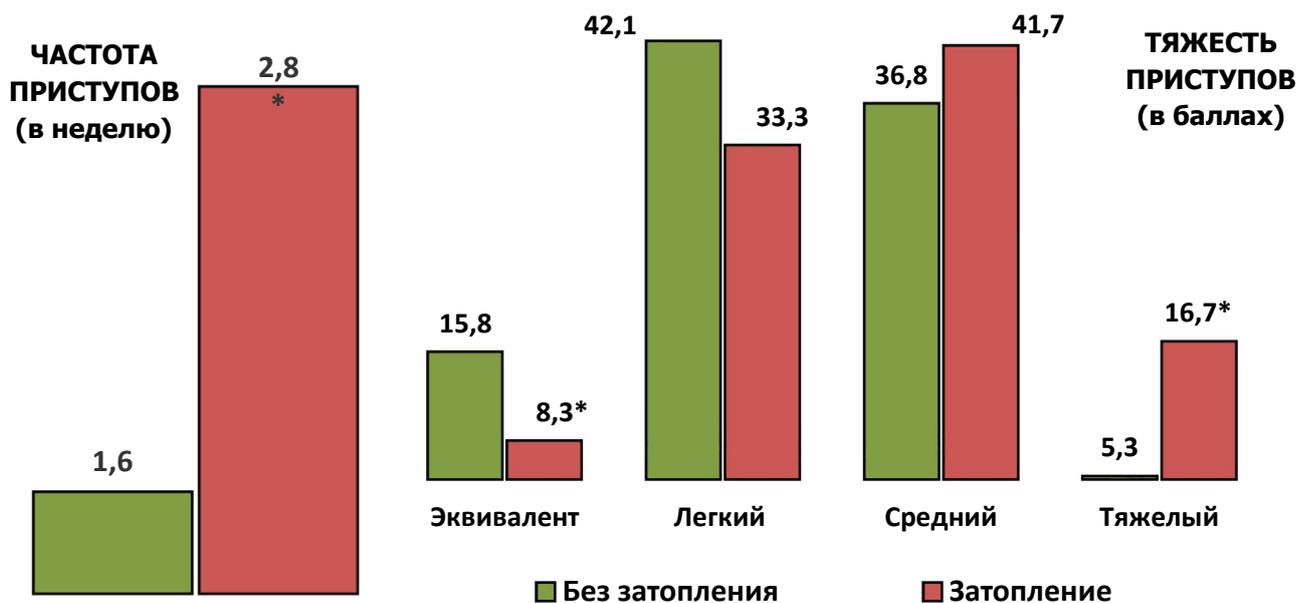


Рисунок 57 – Клинические проявления затопления на фоне наводнения 2013 г.

Напротив, дети из неподтопленных районов чаще переносят приступы легко (42,1% и 33,3% соответственно), либо вообще в виде эквивалента (15,8% и 8,3% соответственно), то есть подтверждено нарастание тяжести заболевания на фоне более частой грибковой сенсibilизации и изменения ее спектра.

Таким образом, влиянием на контролируемость БА обладают не самые

частые, но зависящие от региона проживания и сезона аллергены, такие как пыльца растений и споры грибов. Подтопление жилых районов оказывает значимое влияние на спектр сенсibilизации, в первую очередь, грибковой и течение БА.

ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ УРОВНЕЙ КОНТРОЛЯ ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ ПРИАМУРЬЯ

Как показано в главах 4 и 5 на течение БА и контроль над этим заболеванием влияют не столько отдельные полиморфизмы генов и вызываемые ими изменения в конкретных цепочках реализации иммунного ответа, сколько их сочетания, приводящие к интерференции сигналов в регуляторных сетях иммунитета. В связи с этим методы классической статистики при поиске конкретных факторов риска и оценки их влияния на клинические характеристики БА у детей оказываются недостаточно эффективны. В таких ситуациях, характеризующихся нечеткими и взаимодействующими параметрами с нелинейным характером их влияния и взаимодействием, заведомой неполнотой анализируемых данных и неочевидным алгоритмом получения результата, наиболее оптимальным статистическим инструментом являются обучающиеся нейронные сети.

Анализ полиморфизмов генов сигнальной системы позволяет осуществлять наиболее ранний прогноз развития неконтролируемой БА, даже до клинической манифестации самого заболевания как такового, если у нас есть основания предполагать высокий риск его возникновения. При классическом анализе нами были получены следующие результаты (Таблица 51).

Таблица 51 – Основные статистические показатели значимости полиморфизмов генов сигнальных молекул и системы детоксикации, как факторов неконтролируемого течения БА

Гены	Полиморфизмы	Уилкса	Частная	F-исключ.	p-уров.	Толер.	1-толер.
TRL2	Arg753Glu	0,722037	0,992971	0,343320	0,710270	0,897993	0,102007
TRL4	Asp299Gly	0,718146	0,998350	0,080151	0,923038	0,872193	0,127807
TRL4	Thr399Ile	0,735279	0,975088	1,239106	0,294186	0,701250	0,298750
TRL9	T1237C	0,736554	0,973399	1,325403	0,270464	0,792887	0,207113
TRL9	A2848G	0,762659	0,940081	3,091304	0,049948	0,886165	0,113835
II4	C 589 T	0,722214	0,992727	0,355311	0,701864	0,785150	0,214850
II6	C 174 G	0,718719	0,997554	0,118917	0,888011	0,783499	0,216501
II10	G 1082 A	0,717035	0,999897	0,005013	0,995000	0,901374	0,098626

Гены	Полимор- физмы	Уилкса	Частная	F-исключ.	p-уров.	Толер.	1-толер.
И10	C 592 A	0,744021	0,963631	1,830494	0,165829	0,666920	0,333080
И10	C 819 T	0,726440	0,986952	0,641185	0,528885	0,718785	0,281215
И12В	A 1188 C	0,724568	0,989502	0,514561	0,599385	0,827870	0,172130
TNF	G 308 A	0,759405	0,944109	2,871168	0,061458	0,869208	0,130792
GSTM+T	GSTM_T	0,735233	0,975148	1,236024	0,295072	0,791848	0,208152
GSTP 1	Ile105Val	0,774101	0,926186	3,865282	0,024259	0,793451	0,206549
GSTP 1	Ala114Val	0,720542	0,995031	0,242217	0,785360	0,781872	0,218128

Для анализа имеющейся в данной работе информации о генетических предрасположенностях к неконтролируемому течению БА была использована нейросетевая модель со следующими характеристиками.

1. Модель построена на основе архитектуры многослойного перцептрона MLP (15-9-3) со слоем из 15 входными нейронами (по количеству анализируемых переменных), скрытым промежуточным слоем из 9 нейронов и выходным слоем из 3 нейронов по количеству значений классифицируемой переменной (Контроль).

2. Алгоритм обучения выбран BFGS как наиболее адекватный задаче классификации.

3. Функция ошибок выбрана традиционно в виде суммы квадратов отклонений.

4. Функция активации выходных нейронов – софтмакс (экспоненциальная функция).

5. Функция активации промежуточного слоя – гиперболическая.

6. Объем обучающей выборки составил 88 наборов.

7. Объем выборок для тестирования и контроля качества модели составил 36 наборов.

В итоге полученная модель смогла предсказать 79,01% правильных значений целевой переменной - уровень контроля БА (контролируемая, частично контролируемая, неконтролируемая).

Показатели стандартной иммунограммы являются наиболее доступными для

анализа маркерами иммуннопатогенетической реализации генетической предрасположенности к неконтролируемому течению БА. В отличие от полиморфизмов генов сигнальных молекул они изменчивы во времени, и, соответственно, с их помощью можно отслеживать динамику вероятности развития неконтролируемого течения БА, что важно при выявлении групп риска среди детей с манифестными клиническим проявлениями заболевания.

Показатели иммунограммы были разделены на две группы из организационных соображений. Показатели нейтрофильного фагоцитоза могут быть определены в лаборатории любого уровня, для этого необходима лишь световая микроскопия с использованием стандартных красителей, в то время как показатели гуморального, и тем более лимфоцитарного звена иммунитета требуют наличия оснащенной лаборатории, способной осуществлять иммуноферментный анализ и проточную цитометрию. Поэтому в качестве первого этапа прогнозирования неконтролируемого течения БА в динамики предлагается использование показателей нейтрофильного фагоцитоза. При классическом анализе нами были получены следующие результаты (Таблица 52).

Таблица 52. – Основные статистические показатели значимости нейтрофильного фагоцитоза, как факторов неконтролируемого течения БА

	БЕТА	Ст.Ош.	В	Ст.Ош.	t(118)	p-знач.
ФП_Фан ст.%	0,086597	0,188749	0,004135	0,009014	0,458796	0,647225
ФР-ФАН	-0,027156	0,131884	-0,002162	0,010502	-0,205910	0,837216
ФЧ_Фан сп.ед.	0,000722	0,160027	0,000174	0,038475	0,004513	0,996406
ФЧ_Фан ст.ед.	0,009856	0,179491	0,002000	0,036422	0,054912	0,956302
ФР-ФЧ	0,008511	0,190286	0,001590	0,035542	0,044730	0,964398
НСТ сп.	0,020472	0,164533	0,000667	0,005359	0,124425	0,901191
НСТ ст.	0,004321	0,168072	0,000136	0,005308	0,025708	0,979534
ФР-НСТ	-0,012918	0,194389	-0,000339	0,005106	-0,066453	0,947130
ФП_Фан сп. %	0,184906	0,087551	0,008084	0,003828	2,111983	0,036662

Для анализа имеющейся в данной работе информации о нейтрофильном фагоцитозе как фактора неконтролируемого течения БА была использована нейросетевая модель со следующими характеристиками.

1. Модель построена на основе архитектуры многослойного перцептрона

MLP (9-5-3) со слоем из 9 входными нейронами (по количеству анализируемых переменных), скрытым промежуточным слоем из 5 нейронов и выходным слоем из 3 нейронов по количеству значений классифицируемой переменной (Контроль).

2. Алгоритм обучения выбран BFGS как наиболее адекватный задаче классификации.
3. Функция ошибок выбрана традиционно в виде суммы квадратов отклонений.
4. Функция активации выходных нейронов – софтмакс (экспоненциальная функция).
5. Функция активации промежуточного слоя – гиперболическая.
6. Объем обучающей выборки составил 90 наборов.
7. Объем выборок для тестирования и контроля качества модели составил 38 наборов.

В итоге полученная модель смогла предсказать 85,94% правильных значений целевой переменной - уровень контроля БА (контролируемая, частично контролируемая, неконтролируемая).

Наиболее полно патогенетические механизмы реализации генетической предрасположенности из стандартной иммунограммы отражают абсолютные и относительные показатели популяций лимфоцитов и уровень сывороточных иммуноглобулинов. При классическом анализе этих критериев получены следующие результаты (Таблица 53).

Для анализа представленной в данном исследовании информации о лимфоцитарных популяциях и уровнях сывороточных иммуноглобулинов как факторе неконтролируемого течения БА была использована нейросетевая модель со следующими характеристиками.

Таблица 53. – Основные статистические показатели значимости лимфоцитарных популяций и уровней сывороточных иммуноглобулинов, как факторов неконтролируемого течения БА

	Уилкса	Частная	F-ис-ключ	p-уров.	Толер.	1-толер.
CD3 %	0,778466	0,989297	0,654561	0,521500	0,023969	0,976031
CD3 абс.	0,787382	0,978095	1,354956	0,261844	0,005577	0,994423
CD4 %	0,778951	0,988681	0,692627	0,502232	0,038746	0,961254
CD4 абс.	0,790389	0,974374	1,591176	0,207918	0,462000	0,538000
CD8 %	0,772074	0,997487	0,152415	0,858797	0,029394	0,970606
CD8 абс.	0,773481	0,995673	0,262919	0,769242	0,020159	0,979841
CD16 %	0,773903	0,995130	0,296095	0,744254	0,039888	0,960112
CD16 абс.	0,773521	0,995621	0,266093	0,766815	0,041372	0,958628
CD19 %	0,776931	0,991251	0,533960	0,587654	0,076002	0,923998
CD19 абс.	0,770179	0,999942	0,003520	0,996487	0,043440	0,956560
ИРИ	0,778238	0,989587	0,636610	0,530846	0,081906	0,918094
Ig E	0,788810	0,976324	1,467105	0,234664	0,695777	0,304223
Ig A	0,780438	0,986797	0,809471	0,447489	0,820254	0,179746
Ig M	0,797575	0,965594	2,155722	0,120247	0,807771	0,192229
Ig G	0,777127	0,991002	0,549343	0,578762	0,898672	0,101328
ЦИК	0,775637	0,992906	0,432268	0,650034	0,918486	0,081514
абс. кол-во лимфоцитов	0,798440	0,964549	2,223610	0,112622	0,006389	0,993611

1. Модель построена на основе архитектуры многослойного перцептрона MLP (17-20-3) со слоем из 17 входных нейронов (по количеству анализируемых переменных), скрытым промежуточным слоем из 20 нейронов и выходным слоем из 3 нейронов по количеству значений классифицируемой переменной (Контроль).

2. Алгоритм обучения выбран BFGS, как наиболее адекватный задаче классификации.

3. Функция ошибок выбрана традиционно в виде суммы квадратов отклонений.

4. Функция активации выходных нейронов – софтмакс (экспоненциальная функция).

5. Функция активации промежуточного слоя – гиперболическая.

6. Объем обучающей выборки составил 98 наборов.

7. Объем выборок для тестирования и контроля качества модели составил 42 набора.

В итоге полученная модель смогла предсказать 85,71% правильных значений целевой переменной - уровень контроля БА (контролируемая, частично контролируемая, неконтролируемая).

Полученные результаты были использованы для создания комплекса электронных программ предназначенных для прогнозирования неконтролируемого течения БА на различных этапах развития заболевания, включая донозологический – «Прогнозирование неконтролируемого течения БА на основе разнообразия полиморфизмов генов молекул сигнальной системы», «Прогнозирование неконтролируемого течения БА по показателям нейтрофильного фагоцитоза», «Прогнозирование неконтролируемого течения БА по показателям стандартной иммунограммы (популяции лимфоцитов и уровень сывороточных иммуноглобулинов)». Данные программы в настоящий момент находятся на стадии регистрации.

ГЛАВА 8. ПРИМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРОДУКТА ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Существующая классическая терапия БА направлена на купирование её основного механизма – воспаления, в первую очередь атопического. Однако в приведенных выше исследованиях было показано значение экзо- и эндогенных неспецифических, неатопических факторов, таких как климат, уровень витамина Д в сыворотке крови, микроэлементный состав сыворотки и форменных элементов крови, общее состояние клеточных мембран организма в патогенезе БА. Это заставляет искать возможности использования дополнительных методов, корректирующих влияние, в том числе и этих факторов. Одним из таких методов является использование биологически активных веществ гидробионтов, в частности, бурых водорослей, энтеросорбирующее, антиоксидантное и иммунокорректирующее влияние которых известно издревле.

Проведена комплексная оценка эффективности дополнительного использования функционального продукта питания на основе дальневосточных бурых водорослей в лечении БА. Были сформированы 2 группы пациентов с установленным диагнозом бронхиальная астма, получавших классическую базисную терапию (GINA 2021), рандомизированных по возрасту, полу и клиническим проявлениям (степень тяжести и степень контроля) с обследуемой группой в целом. Исследуемая группа (n=20) получала базисную терапию и, дополнительно, продукт функционального питания, группа сравнения (n=36) - только базисную терапию. Получены следующие результаты.

Анализ показателей общего анализа крови выявил определенные изменения (Таблица 54). У детей с БА, получавших Доромарин, отмечены тенденции к уменьшению воспалительных процессов за счет некоторого снижения лейкоцитов, числа эозинофилов (Рисунок 58).

Таблица 54 – Показатели гемограммы у детей Приамурья с БА при использовании функционального продукта питания «ДороМарин»

Показатели гемограммы	Основная группа, n=20		Досто- верность t-крите- рий (p)	Группа сравнения (n=36)	Досто- верность t-крите- рий (p)
	До приема	После при- ема			
Нв	142,84±2,23	140,62±2,34	0,72	137,19±2,36	0,38
Ег	5,07±0,1	4,92±0,1	0,81	4,90±0,1	0,89
Тромбоциты	269,4±15,1	264,7±7,2	0,68	279,7±10,8	0,45
Нст	40,4±0,72	38,7±0,77	0,73	38,4±0,88	0,85
Лейкоциты	8,2±0,8	7,3±0,5	0,09	6,46±0,3	0,16
п/я	0,16±0,08	0,06±0,06	0,31	0,19±0,08	0,29
с/я	47,0±2,72	43,4±2,37	0,56	43,15±1,63	0,92
баз.	0,21±0,12	0,81±0,26	0,11	0,4±0,12	0,12
эоз.	5,84±1,34	4,25±0,76	0,09	6,9±0,94	0,08
Лимфоциты	38,8±2,33	44,0±2,43	0,10	42,5±1,39	0,56
Моноциты	8,47±0,36	6,81±0,67	0,03	6,8±0,58	0,96
СОЭ, мм/час.	9,11±1,17	6,31±0,85	0,047	6,94±0,74	0,61

Это подтверждается достоверным снижением моноцитов и СОЭ.

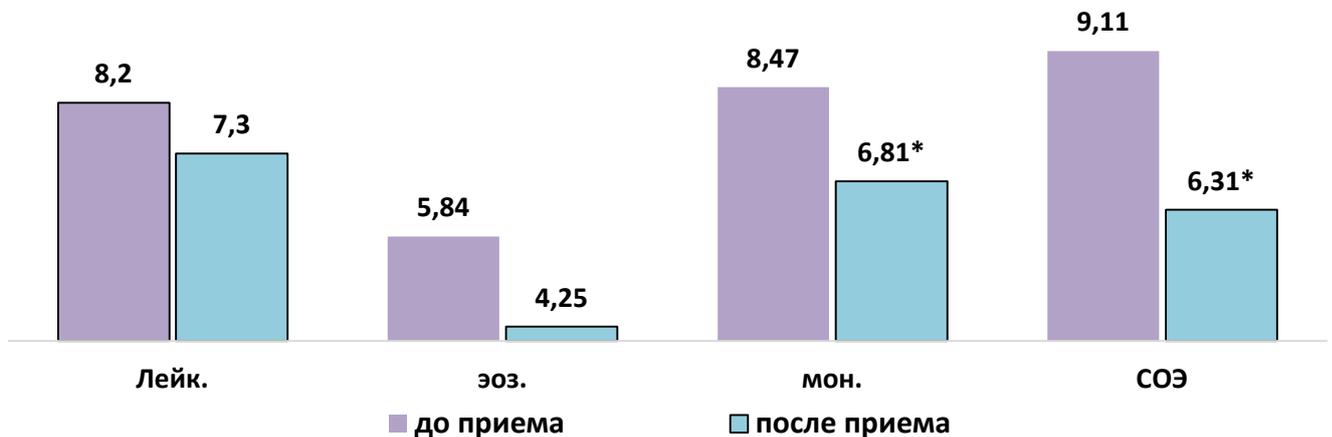


Рисунок 58 – Показатели гемограммы, характеризующие воспаление у детей с БА до и после приема функционального продукта питания «ДороМарин»

Течение воспалительного процесса, в первую очередь, определяется соотношениями сигнальных молекул иммунной системы – цитокинов, именно их содержание в средах организма и микроокружении модулирует дифференцировку

специфических иммунокомпетентных клеток и конкретные пути иммунного ответа.

В ходе наших исследований показано значимое влияние функционального продукта питания на основе бурых дальневосточных водорослей «ДороМарин» на интерлейкиновый статус детей с БА (Таблица 55).

Таблица 55 – Показатели цитокинового статуса крови у детей Приамурья с БА при дополнительном использовании функционального продукта питания «ДороМарин»

Цитокины	До приема n=20	После приема n=20	t/U (p)	Группа сравнения (n=36)	t/U (p)
IL4, пг/мл Me (Min-Max) LQ - HQ	2,94(0-26,8) 0,9-2,4	2,54(0-19,1) 1,6-3,4	0,16	3,86(0-28,7) 1,7-8,39	0,22
IL6, пг/мл Me (Min-Max) LQ - HQ	40,1(0,3-112,1) 5,4-84,6	0,89(0-6,4) 0,3-1,5	0,001	16,2(0-52,3) 3,4-30,8	0,001
IL10, пг/мл Me (Min-Max) LQ - HQ	166,1(1,1-311,2) 103,7-200,8	3,3(0-23,1) 2,0-7,5	0,001	150,5(1,3-211,4) 90,2-185,7	0,001
IL18, пг/мл Me (Min-Max) LQ - HQ	2,36 (0-9,6) 0,0-3,2	205,5 (1,8-357,3) 137,3-262,2	0,001	1,3(0-8,4) 0,3-2,3	0,001
TNF α , пг/мл	2,82 \pm 0,43	2,9 \pm 0,31	0,26	5,05 \pm 0,91	0,003

Значимых различий в уровне IL4, непосредственно регулирующего атопическое воспаление, не обнаружено. Однако обнаружены достоверные различия в интерлейкинах неспецифического воспаления, роль которых в патогенезе БА была показана выше. Отмечается достоверное, многократное падение (с 40,5 пг/мл до 0,89 пг/мл) уровня IL6, основного интерлейкина неспецифического воспаления в группе сравнения падения достоверно менее выражено; достоверное, многократное падение (с 166,1 пг/мл до 3,3 пг/мл) IL-10, блокирующего Th₁-тип воспаления и соответственно реципрокно усиливающего Th₂-тип, в группе сравнения достоверное снижение отсутствует; достоверный, многократный рост (с 2,36 пг/мл до 205,5 пг/мл) IL18, который прямо ингибирует действие IL4 и соответственно атопическое воспаление, кроме того он активирует Th₁ иммунного ответа, в группе

сравнения этот интерлейкин достоверно снижается (Рисунок 59).

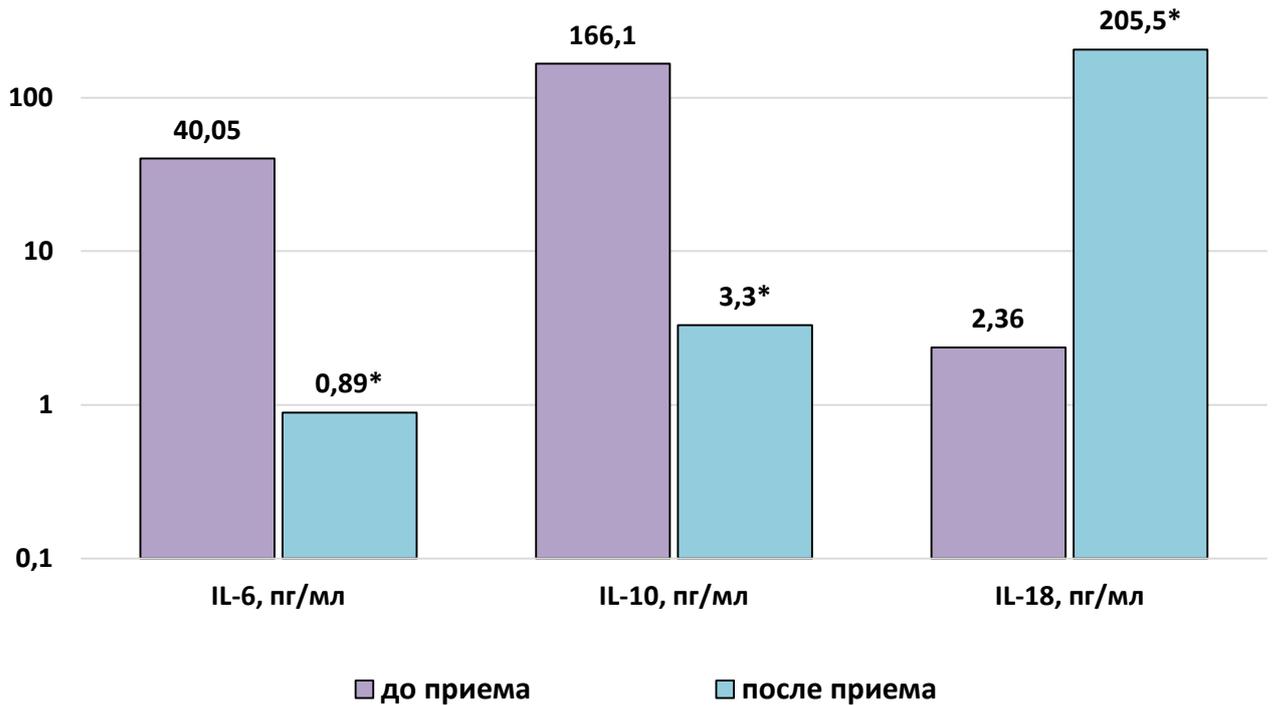


Рисунок 59 – Показатели цитокинового статуса крови у детей Приамурья с БА при дополнительном использовании функционального продукта питания

Изменения соотношений цитокиновой сети находят свою реализацию в следующих звеньях иммунитета. При исследовании влияния продукта функционального питания «ДороМарин» на лимфоцитарное звено иммунного ответа у детей с БА получены следующие результаты (Таблица 56).

На фоне приема продукта «ДороМарин» в лимфоцитарном звене иммунитета не выявилось достоверных различий, но имел место ряд выраженных тенденций: выявлено снижение абсолютного количества всех лимфоцитов с $3110,2 \pm 320,47$ клеток до $2889,9 \pm 193,9$.

Для абсолютного числа Т-лимфоцитов отмечено некоторое падение с $2112,6 \pm 244,7$ до $1999,2 \pm 141,6$ клеток, при этом их процентное содержание до и после коррекции продуктом практически не менялось - $68,6 \pm 1,29\%$ против $69,2 \pm 1,69\%$. Обнаружена тенденция к росту абсолютного числа и процентного содержания Т-хелперов с $1157,4 \pm 115,8$ до $1193,9 \pm 100,7$ клеток и с $38,6 \pm 1,9\%$ до $41,2 \pm 1,8\%$. Установлено снижение абсолютного числа и процентного содержания

T-киллеров с $938,4 \pm 146,6$ до $780,3 \pm 62,17$ клеток и с $29,9 \pm 1,77\%$ до $27,4 \pm 1,70\%$. Также снижались абсолютное количество клеток и доля натуральных киллеров с $371,4 \pm 36,12$ до $303,8 \pm 35,56$ клеток и с $12,75 \pm 1,1\%$ до $10,56 \pm 1,1\%$. Абсолютное количество и процентное содержание активных В-лимфоцитов не имело различий до и после приема продукта. Имуннорегуляторный индекс имел четкую тенденцию к росту с $1,436 \pm 0,13$ до $1,638 \pm 0,15$.

Таблица 56 – Показатели иммунограммы у детей Приамурья с БА при использовании функционального продукта питания «ДороМарин»

Показатели иммунитета	До приема, n=20	После приема, n=20	t-критерий (p)	Группа сравнения (n=36)	t-критерий (p)
Лимф, абс.	$3110,2 \pm 320,47$	$2889,9 \pm 193,9$	0,57	$2690,3 \pm 174,02$	0,48
CD 3, абс.	$2112,6 \pm 244,7$	$1999,2 \pm 141,6$	0,71	$1910,9 \pm 125,1$	0,67
CD 3, %	$68,6 \pm 1,29$	$69,2 \pm 1,69$	0,77	$68,9 \pm 1,13$	0,9
CD 4, абс	$1157,4 \pm 115,8$	$1193,9 \pm 100,7$	0,81	$1093,7 \pm 77,7$	0,75
CD 4, %	$38,6 \pm 1,9$	$41,2 \pm 1,8$	0,33	$39,5 \pm 1,2$	0,48
CD 8, абс.	$938,4 \pm 146,6$	$780,3 \pm 62,17$	0,37	$801,7 \pm 60,1$	0,82
CD 8, %	$29,9 \pm 1,77$	$27,4 \pm 1,70$	0,33	$29,2 \pm 0,87$	0,3
CD 16, абс.	$371,4 \pm 36,12$	$303,8 \pm 35,56$	0,19	$344,5 \pm 39,29$	0,51
CD 16, %	$12,75 \pm 1,1$	$10,56 \pm 1,1$	0,16	$12,17 \pm 0,96$	0,31
CD 19, абс.	$429,5 \pm 44,4$	$422,9 \pm 43,1$	0,91	$356,4 \pm 26,4$	0,17
CD 19, %	$14,4 \pm 0,81$	$14,5 \pm 1,05$	0,93	$13,1 \pm 0,64$	0,25
ИРИ	$1,436 \pm 0,13$	$1,638 \pm 0,15$	0,33	$1,432 \pm 0,09$	0,23

Анализ показателей гуморального звена иммунитета, полученных до и после употребления продукта «ДороМарин», дал следующие результаты (Таблица 57).

Не обнаружено даже тенденций в уровне IgA, отвечающего, в первую очередь за местный иммунитет на уровне слизистых оболочек. Напротив, IgM и IgG имели тенденцию к снижению с $1,91$ г/л до $1,82$ г/л и с $18,14$ г/л до $16,27$ г/л. Вероятно, это связано со снижением общей инфекционной нагрузки на фоне использования препарата.

Таблица 57 – Показатели гуморального звена иммунитета крови у детей Приамурья с БА при использовании продукта «ДороМарин»

Показатели иммунитета	До приема, n=20	После приема, n=20	Достоверность t-критерий (p)	Группа сравнения (n=36)	Достоверность t-критерий (p)
Ig E, Me	215,7±36,1	224,3±37,3	0,88	395,9±47,9	0,27
Ig A, г/л	2,55±0,3	2,6±0,3	0,38	3,5±0,9	0,49
Ig M, г/л	1,91±0,06	1,82±0,04	0,68	4,06±2,14	0,47
Ig G, г/л	18,14±0,47	16,72±0,27	0,46	18,14±1,17	0,48
ЦИК, у.е.	72,85±10,9	71,56±9,4	0,93	62,89±8,3	0,53

В ходе исследования нейтрофильного фагоцитоза до и после приема «ДороМарина» обнаруживаются разнонаправленные тенденции (Таблица 58).

Таблица 58 – Показатели фагоцитарного звена иммунитета крови у детей с БА при использовании функционального продукта питания «ДороМарин»

	До приема, n=20	После приема, n=20	Достоверность t-критерий (p)	Группа сравнения (n=36)	Достоверность t-критерий (p)
ФАН сп., %	75,5±3,0	76,5±4,5	0,85	65,7±4,1	0,11
ФАН ст., %	83,8±2,5	79,7±3,9	0,37	71,9±4,6	0,29
ФР ФАН, %	8,16±3,27	3,18±3,13	0,28	6,27±3,4	0,57
ФЧ сп., ед.	5,64±1,5	4,24±0,4	0,39	4,4±0,44	0,83
ФЧ ст., ед.	6,75±1,9	7,79±2,5	0,73	4,89±0,49	0,11
ФР ФЧ ед.	1,2±2,47	3,55±2,5	0,51	0,48±0,32	0,88
НСТ сп., %	41,7±6,8	27,8±4,9	0,11	32,24±4,3	0,53
НСТ ст., %	47,61±4,3	44,18±4,8	0,59	45,6±4,4	0,84
ФР НСТ, %	5,94±5,9	16,37±5,7	0,22	13,4±3,0	0,61

Достоверных различий в этом звене иммунитета не обнаружено. Выявлена тенденция к росту спонтанной ФАН - 75,5±3,0% против 76,5±4,5%, стимулированная ФАН - снижение с 83,8±2,5% до 79,7±3,9%.

Как обсуждалось ранее, большой интерес представляют не только количественные, но и функциональные показатели иммунокомпетентных клеток крови при бронхиальной астме, поэтому было проведено исследование изменений МПМ

этих клеток (Таблица 59).

Таблица 59 – Частота встречаемости (%) ИКК крови со сниженным МПМ у детей Приамурья с БА при дополнительном использовании функционального продукта питания «ДороМарин»

	До приема, n=20	После приема, n=20	Достоверность Z-критерий (p)	Группа сравнения (n=36)	Достоверность Z-критерий (p)
Лимфоциты	58,25±2,19	57,07±3,44	0,42	56,16±2,46	0,47
Гранулоциты	16,49±3,79	6,51±1,56	0,03	16,32±3,40	0,01
Моноциты	26,81±3,33	17,46±2,71	0,04	29,94±3,90	0,03

Выявлено достоверное уменьшение доли клеток со сниженным МПМ в пуле гранулоцитов с 16,49±3,79 до 6,51±1,56 (p=0,03) и моноцитов с 26,81±3,33 до 17,46±2,71, (Рисунок 60), при чем в группе сравнения такого снижения не произошло. Это доказывает положительный эффект дополнительной коррекции использования функционального продукта питания на основе дальневосточных водорослей, при чем именно на функцию клеток местного воспаления, роль которого в патогенезе БА неоднократно подтверждалась в предыдущих главах данной работы.

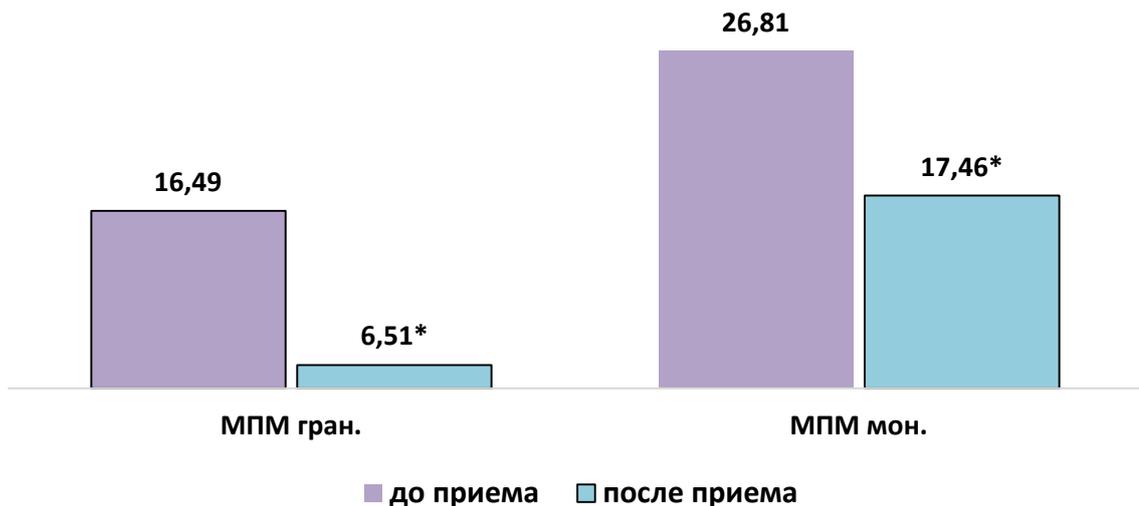


Рисунок 60 – Частота (%) ИКК крови со сниженным (МПМ) у детей Приамурья с БА при дополнительном использовании функционального продукта питания «ДороМарин»

Таким образом, после приема продукта на основе дальневосточных водорослей «ДороМарина» отмечается умеренное угнетение процессов неспецифического воспаления, выраженное в тенденции к снижению общего числа лимфоцитов, увеличению иммунорегуляторного индекса как за счет роста количества Т-хелперов, так и снижения Т-киллеров. Это подтверждается ранее описанными изменениями в ОАК (снижением моноцитов и СОЭ). Но более выраженные изменения отмечаются в эффекторном звене иммунитета.

Вышеописанные иммуностропные эффекты продукта «ДороМарин» в группе больных, страдающих БА, привели к выраженному клиническому эффекту. Процент пациентов с полностью контролируемой БА на фоне его использования вырос более чем в два раза, с 42,1% до 84,6% ($p=0,003$), в первую очередь за счет детей, у которых заболевание ранее контролировалось частично, их доля упала почти в 6 раз, с 42,1% до 7,7% ($p=0,006$). Доля детей с неконтролируемой БА имеет недостоверную тенденцию к снижению с 15,8% до 7,7% ($p=0,21$) (Рисунок 61).

Это подтверждает функциональный характер изменений, происходящих под действием продукта «ДороМарин» в организме пациентов с БА.

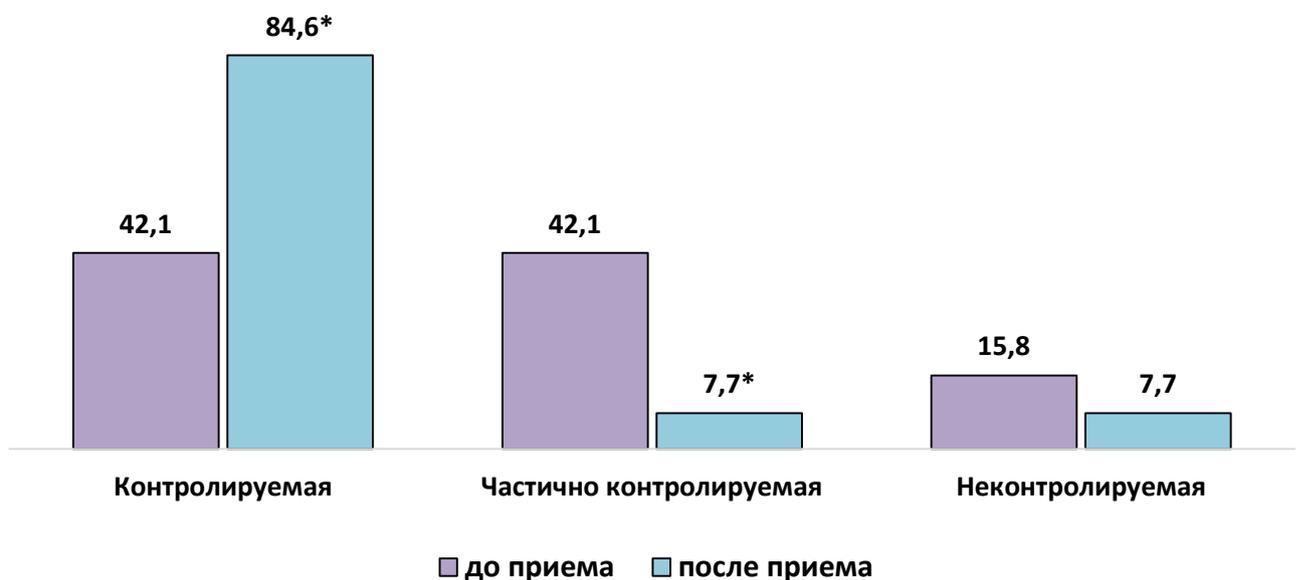


Рисунок 61 – Уровень контроля БА (%) у детей Приамурья при дополнительном использовании функционального продукта питания «ДороМарин»

Таким образом, иммуномодулирующее действие продукта подтвердилось

положительной клинической динамикой при БА. На основании полученных данных нам был разработан и заявлен к патентованию «Способ иммуномодуляции у детей» (Регистрационный № 2021140125 заявки ФИПС от 31.12.2021) путем дополнительного приема функционального продукта питания на основе бурых водорослей (ламинарии дальневосточной гомогенизированной) «ДороМарин». Полученные результаты использования предлагаемого способа могут быть подтверждены следующими примерами.

Пример 1. Пациентка Анастасия, 13 лет. Поступила первично в стационар с жалобами на малопродуктивный кашель, одышку при физической нагрузке.

В анамнезе с раннего возраста отмечались проявления аллергической реакции по типу дерматита, причина не выяснена, к 3-м годам проявления купированы на фоне эмпирической диеты. Наследственный анамнез отягощен: у матери респираторный аллергоз. Динамика развития настоящего заболевания: Диагноз БА и аллергический ринит установлены с 3-х лет, когда была выявлена сенсibilизация к клещу домашней пыли, шерсти животных, березе. Неоднократно повышалась доза базисной терапии, контроль не достигнут, сохранялась одышка при физической нагрузке, перепаде температур. В 10 лет получала Серетид 50/100 х 2 р/день, в 11 лет – Серетид 25/125 х 2 р/день. Амбулаторно по ФВД – признаки обструкции. Осмотрена аллергологом НИИ ОМиД, увеличена доза базисной терапии: Серетида до 25/250 х 2 р/сутки, что соответствует четвертой ступени терапии (тяжелая астма) согласно Клиническим рекомендациям 2021 года, дополнительно назначен Назонекс, рекомендовано стационарное обследование.

При данной госпитализации установлен диагноз: БА тяжелого течения, частично контролируемая, персистирующий аллергический ринит средней тяжести. Отмечалось снижение ФЖЕЛ до 77%, ОФВ₁ до 79% от возрастной нормы, проба с бронхолитиком - положительная. Обнаружено наличие ДНК ВЭБ и Герпеса 6 типа в мазках из зева, выявлены следующие показатели интерлейкинового статуса: IL 4 – 2,3 пг/мл, IL 6 – 44,0 пг/мл, IL 10 – 110,7 пг/мл, IL 18 – 2,3 пг/мл, TNF – 2,75 пг/мл. Сохранена базисная терапия серетидом до 25/250 х 2 р/сутки, Назонекс и в комплексе с ней назначен - продукт функционального питания для детей - напиток

безалкогольный «ДороМарин» («DoroMarine») на основе бурых водорослей (ламинарии дальневосточной гомогенизированной) с добавлением яблочного сока по схеме: 15 мл x 2 раза в день утром за 20-30 мин. до еды и вечером через 1,5-2 часа после еды в течение 2-х месяцев.

При повторной госпитализации, через 3 мес, клинические проявления обструкции купированы полностью, установлен диагноз - БА тяжелого течения, контролируемая, персистирующий аллергический ринит средней тяжести. При исследовании ФВД: ФЖЕЛ увеличилось до 112%, ОФВ₁ - до 106% от возрастной нормы, проба с бронхолитиком - отрицательная. ДНК ВЭБ и Герпес 6 типа в мазке из зева не обнаружены. Отмечено снижение содержания в сыворотке крови ИЛ 4 – с 2,3 пг/мл до 0,9 пг/мл, ИЛ 6 – с 44,0 пг/мл до 1,5 пг/мл, ИЛ 10 – с 110,7 пг/мл до 2,4 пг/мл; увеличение ИЛ 18 – с 2,3 пг/мл до 194,8 пг/мл, уровень TNF практически не изменился – 2,75 пг/мл и 2,8 пг/мл соответственно.

Заключение. На фоне комплексной терапии с включением продукта бурых водорослей (ламинарии дальневосточной) «ДороМарин» отмечается изменение интерлейкинового профиля, характерное для снижения интенсивности воспалительных процессов (падение ИЛ 4, 10, рост ИЛ 18), что свидетельствует о его иммуномодулирующем действии. Выявлено прекращение активной репликации вируса Эбштейна-Барра и вируса герпеса 6 типа. Имеет место положительная динамика показателей функции внешнего дыхания за счет повышения функциональной жизненной емкости легких, объема форсированного выдоха, проба с бронхолитиком отрицательная, что свидетельствует об отсутствии бронхоспазма. Клинические проявления обструкции, кашель, одышка, купированы полностью, течение астмы стало контролируемым.

Пример 2. Пациентка Ярослава, 12 лет. Поступила первично в стационар с жалобами на сухой кашель, в том числе ночной, одышку и кашель при физической нагрузке.

В анамнезе с раннего возраста отмечались проявления аллергической реакции по типу дерматита, причина не выяснена, к 2,5-м годам проявления купированы на фоне соблюдаемой диеты. Наследственный анамнез отягощен: у отца БА.

Динамика развития настоящего заболевания: с 3-х лет отмечались эпизоды бронхообструктивного синдрома. Амбулаторно осмотрена пульмонологом в 2018 году, отмечено повышение иммуноглобулина Е, по спирографии – проба положительная. В связи с этим у ребенка установлена БА, назначена базисная терапия. В дальнейшем неоднократно проводилась коррекция базисной терапии. В настоящий момент получает Симбикорт 80/4,5 по 1 дозе x 2 р/день, что соответствует третьей ступени базисной терапии (астма средней тяжести) согласно Клиническим рекомендациям 2021 года. На фоне терапии сохраняется кашель при физической нагрузке, ночной кашель. Осмотрена аллергологом, направлена в НИИ ОМиД на госпитализацию.

При данной госпитализации установлен диагноз: БА средней тяжести, не контролируемая. При обследовании отмечалось снижение ФЖЕЛ до 89%, ОФВ₁ до 94% от возрастной нормы, проба с бронхолитиком - положительная. Обнаружено наличие ДНК ВЭБ в мазках из зева, выявлены следующие показатели интерлейкинового статуса: IL 4 – 7,9 пг/мл, IL 6 – 7,6 пг/мл, IL 10 – 106,5 пг/мл, IL 18 – 0,1 пг/мл, TNF – 1,85 пг/мл. Сохранена базисная терапия Симбикортом 80/4,5 по 1 дозе x 2 р/день и в комплексе с ней назначен - продукт функционального питания для детей - напиток безалкогольный «ДороМарин» («DoroMarine») на основе бурых водорослей (ламинарии дальневосточной гомогенизированной) с добавлением яблочного сока по схеме: 15 мл x 2 раза в день утром за 20-30 мин. до еды и вечером через 1,5-2 часа после еды в течение 2-х месяцев.

При повторной госпитализации, через 3 мес, клинические проявления обструкции купированы полностью, установлен диагноз - БА средней тяжести, контролируемая. При исследовании ФВД: ФЖЕЛ увеличилось до 115,4%, ОФВ₁ – до 125,7% от возрастной нормы, проба с бронхолитиком – отрицательная. ДНК ВЭБ в мазке из зева не обнаружено. Отмечено снижение содержания в сыворотке крови IL 4 – с 7,9 пг/мл до 1,2 пг/мл, IL 6 – с 7,6 пг/мл до 0,4 пг/мл, IL 10 – с 106,5 пг/мл до 2,2 пг/мл; увеличение IL-18 – с 0,1 пг/мл до 134,8 пг/мл, уровень TNF α практически не изменился – 1,85 пг/мл и 1,9 пг/мл соответственно.

Заключение. На фоне комплексной терапии с включением продукта бурых водорослей (ламинарии дальневосточной) «ДороМарин» отмечается изменение

интерлейкинового профиля, характерное для снижения интенсивности воспалительных процессов (падение IL 4, 6, 10, рост IL 18), что свидетельствует о его иммуномодулирующем действии. Определено прекращение активной репликации вируса Эбштейна-Барра. Имеет место положительная динамика показателей функции внешнего дыхания за счет функциональной жизненной емкости легких, объема форсированного выдоха, проба с бронхолитиком отрицательная, что свидетельствует об отсутствии бронхоспазма. Клинические проявления обструкции, кашель, одышка, купированы полностью, течение астмы стало контролируемым.

Пример 3. Пациент Артем, 16 лет. Поступил первично в стационар с жалобами на сухой кашель, одышку чаще на фоне ОРВИ.

В анамнезе с раннего возраста отмечались проявления аллергической реакции по типу дерматита, причина не выяснена, к 3-м годам проявления купированы на фоне эмпирической диеты. Наследственный анамнез отягощен: у бабушки по отцу БА. Динамика развития настоящего заболевания: Диагноз БА выставлен в 2017 году. Получал ингаляционный ТККС – Серетид 25/125x2 в день, затем Сертид 25/50 2 раза в день, наблюдался аллергологом амбулаторно. С 2019 года и ТККС отменены, получает Монтелукаст в дозе 10 мг 1 раз в день. Несмотря на получение препарата около полугода, вышеперечисленные жалобы сохраняются. Осмотрен педиатром и направлен на обследование в НИИ ОМиД в плановом порядке.

При данной госпитализации установлен диагноз: БА средней тяжести, не контролируемая. Показатели функции внешнего дыхания в пределах возрастной нормы: ФЖЕЛ – 100%, ОФВ₁ – 101%, но проба с бронхолитиком – положительная. Выявлены следующие показатели интерлейкинового статуса: IL 4 – 4,3, пг/мл, IL 6 – 1,3 пг/мл, IL 10 – 118,5 пг/мл, IL 18 – 0,2 пг/мл, TNF – 1,62 пг/мл. Проведено обследование ребенка на предмет активации вирусов герпетической группы (ВЭБ и Герпес 6 типа) в мазках из зева. Получены отрицательные результаты. Проведена коррекция базисной терапии, назначен Серетид 25/125x2 в день и в комплексе с ним - продукт функционального питания для детей - напиток безалкогольный «ДороМарин» («DoroMarine») на основе бурых водорослей (ламинарии дальневосточной гомогенизированной) с добавлением яблочного сока по схеме: 15 мл x 2 раза в

день утром за 20-30 мин. до еды и вечером через 1,5-2 часа после еды в течение 2-х месяцев.

При повторной госпитализации, через 3 мес, клинические проявления обструкции купированы полностью, установлен диагноз – БА средней тяжести, контролируемая. При исследовании динамика ФВД положительная: ФЖЕЛ увеличилось до 108,0%, ОФВ₁ – до 111,3% от возрастной нормы, проба с бронхолитиком – отрицательная. Отмечено снижение содержания в сыворотке крови ИЛ 4 – с 4,3 пг/мл до 2,3 пг/мл, ИЛ 6 – с 1,3 пг/мл до 0,2 пг/мл, ИЛ 10 – с 118,5 пг/мл до 0,2 пг/мл; увеличение ИЛ 18 – с 0,2 пг/мл до 109,6 пг/мл, TNF α – с 1,62 пг/мл до 5,3 пг/мл.

Заключение. На фоне комплексной терапии с включением продукта бурых водорослей (ламинарии дальневосточной) «ДороМарин» отмечается изменение интерлейкинового профиля, характерное для снижения интенсивности воспалительных процессов (падение ИЛ 4, 6, 10, рост ИЛ 18), что свидетельствует о его иммуномодулирующем действии. Имеет место положительная динамика показателей функции внешнего дыхания за счет функциональной жизненной емкости легких, объема форсированного выдоха, проба с бронхолитиком отрицательная, что свидетельствует об отсутствии бронхоспазма. Клинические проявления обструкции, кашель, одышка, купированы полностью, течение астмы стало контролируемым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Распространенность БА у детского населения демонстрирует неизменный рост во всем мире в течение последних лет [35, 38, 115, 130, 185]. Несмотря на все достижения аллергологии, контроля над заболеванием, даже при исключении максимального количества социальных факторов риска и влияния сопутствующих заболеваний, удается достигнуть только у 2/3 больных [3, 188], в связи с чем возникает необходимость изучения индивидуальных особенностей атопического воспаления, являющегося основой патогенеза БА у детей, эндогенных и экзогенных факторов, модифицирующих патогенез заболевания и, следовательно, оказывающих влияние на его течение и возможность контроля над ним.

Однако, прежде чем приступить непосредственно к изучению патоморфоза БА, следует максимально полно изучить ситуацию с ее распространённостью и структурой в регионе. Такая необходимость вытекает из того, что в большинстве стран распространённость БА выявляется на основе популяционных исследований, как правило с использованием стандартизированных опросников, в первую очередь по методике ISAAC, а в России распространённость учитывается по обращаемости, что приводит не только к снижению учтенной частоты встречаемости БА, но и искажает ее структуру по степени тяжести [3, 26, 103, 91, 203, 271]. По данным мета-анализа и ряда авторов в некоторых регионах РФ стандартизированные опросы по методике ISAAC были осуществлены и выявили кратно большую распространённость астмоподобных симптомов, чем при учете по обращаемости [7, 24, 131]. В Хабаровском крае до настоящего момента таких исследований не проводилось. В ходе данной работы опрошено 5,3% 13-14-летних жителей г. Хабаровска и 7,3% - Хабаровского сельского района. В результате установлено, что распространённость астмоподобных симптомов среди подростков Хабаровска и Хабаровского района при использовании стандартного опросника ISAAC в 7,5 раз (17,9%) превосходит таковую, выявленную по обращаемости (2,5%) в том же 2018-2019 гг. Уровень астмоподобных симптомов у подростков Хабаровского края является самым высоким среди регионов России, где проводилось их определение по

стандартизированной методике, и значительно, более чем в 3 раза, превышает уровень близлежащих регионов (Владивосток - 5,8%, Благовещенск - 5,3%) [7]. Выявленная в ходе опроса частота и структура астмоподобных симптомов характерна для индустриально развитых стран [243, 244, 245, 271]. Следует отметить, что распространенность и тяжесть астмоподобных симптомов в Хабаровском сельском районе значительно, по некоторым параметрам в разы выше, чем в городе Хабаровске, что входит в некоторое противоречие с популярной в настоящее время «гигиенической гипотезой».

В стандартном опроснике ISAAC кроме блока, позволяющего выявить астмоподобные симптомы, имеются и блоки, направленные на обнаружение неастмоподобных симптомов атопии, ассоциированных с такими заболеваниями, как аллергический ринит и атопический дерматит. Эти нозологии входят в стандартный «атопический марш» и по сути являются высоко релевантными предикторами БА, поэтому их выявление представляет большой интерес с точки зрения обнаружения групп риска по формированию БА [80]. При коморбидном течении они с высокой вероятностью ведут к более тяжелой БА и нарушают контроль над ней, поэтому представляют интерес и с точки зрения выявления групп риска по тяжелой и/или неконтролируемой БА [181, 210, 211, 231, 270].

Выявленная в ходе опроса частота и структура неастмоподобных симптомов характерна для индустриально развитых стран. Распространённость симптомов аллергического ринита среди подростков Хабаровского края, определенная с использованием стандартизированного опросника ISAAC выше, чем в других регионах и странах, где проводилось данное исследование. Встречаемость симптомов атопического дерматита также достаточно высока, но остаётся в пределах, характерных для европейских стран. Следует отметить, что распространенность неастмоподобных симптомов (ринита и дерматита) в городе Хабаровске значительно выше, чем в Хабаровском сельском районе, однако симптомы неинфекционного ринита на селе выражены более тяжело. Такое соотношение позволяет предположить, что атопия, как таковая, чаще проявляется у детей, проживающих в городе (в полном соответствии с «гигиенической гипотезой»), но ее реализация в более тяжелый и

поздний вариант атопического заболевания – БА – в силу социально-экономических причин чаще и в более раннем возрасте происходит у детей, проживающих на селе. Таким образом, полученные данные не вступают в противоречие с общемировыми, но выявляют некоторые региональные особенности распространённости и формирования БА.

Эти, впервые выявленные региональные особенности, а также различия в городской и сельской местности, уже в проведенном объёме исследования позволят улучшить качество и своевременность диагностики БА и других атопических заболеваний, профилактики БА в Хабаровске и Хабаровском районе, уменьшить время от обнаружения первых симптомов до установки диагноза и своевременного лечения. Они требуют исследования факторов, обуславливающих течение БА в целом, и в нашем регионе, в частности.

Наиболее фундаментальным эндогенным фактором развития БА является врожденная предрасположенность, для детей – в первую очередь – к атопии [18, 19, 40]. В основе атопии, как и любой аллергической реакции, лежат нарушения иммунного распознавания, главными молекулами которого являются Toll-подобные рецепторы, поэтому однонуклеотидные замены в генах, распознающих белки, могут иметь непосредственное и разнонаправленное влияние на характер течения воспаления и его клинические проявления при БА [17, 120, 194, 235]. Не меньшее значение имеют и сигнальные молекулы иммунной системы, в первую очередь цитокины, которые транслируют и интерпретируют информацию, полученную Toll-подобными рецепторами. Полиморфизмы генов, отвечающих за синтез цитокинов, приводят к изменению интенсивности их выработки и могут изменять конфигурацию, что также ведет к разнообразным изменениям в механизмах иммунного ответа и, следовательно, в течении и клинической реализации воспаления [51, 96, 146, 268]. Для выявления этого влияния исследовались полиморфизмы генов Toll-подобных рецепторов (TLR2-Arg753Glu, TLR4-Asp299Gly, TLR4-Thr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G), интерлейкинов (IL4-C589T, IL6-C174G, IL10-G1082A, IL10-C592A, IL10-C819T, IL12B-A1188C, TNF α -G308A), IL 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 18, TNF α , субпопуляции лимфоцитов (CD3, CD19, CD4, CD8, CD16), уровни Ig A, M,

G, E и показатели фагоцитоза, оценка степени тяжести БА и уровня ее контроля проводились согласно критериям клинических рекомендаций по БА Минздрав РФ 2019 года [26].

Изучены клиничко-патогенетические проявления исследованных полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов (Рисунок 62) и цитокинов (Рисунок 63).

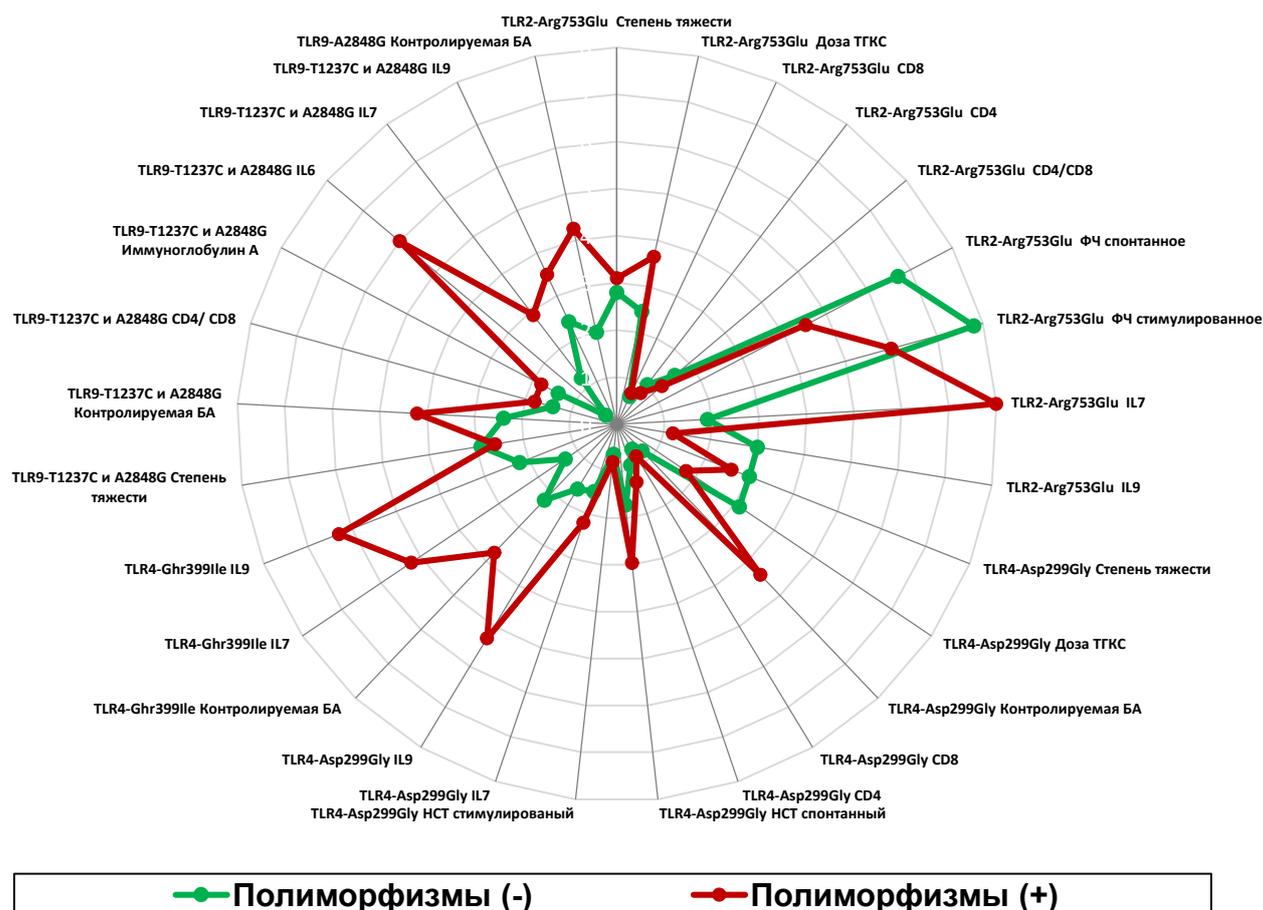


Рисунок 62 – Клиничко-патогенетическое проявление одно нуклеотидных замен в генах Toll-подобных рецепторов при бронхиальной астме (БА)

Достоверно определено, что при мононуклеотидных заменах в генах TLR4-Asp299Gly, TLR9-T1237C характерно более легкое течение БА и более полный контроль над ней; полиморфизмы генов TLR9-A2848G, IL10-C592A, TNF α -G308A способствуют лучшему контролю и с тенденцией к более легкому течению; дети с мононуклеотидными заменами в генах TLR2-Arg753Glu, TLR4-Thr399Ile, IL6-C174G переносят заболевание тяжелее с тенденцией к снижению контроля. Кроме

того, мононуклеотидные замены в генах сигнальных молекул иммунной системы модифицируют atopическое воспаление, ослабляя (TLR4-Asp299Gly, TNF α -G308A) или усиливая (TLR2-Arg753Glu) его, что приводит к изменению (уменьшению либо увеличению) дозы ТГКС соответственно.

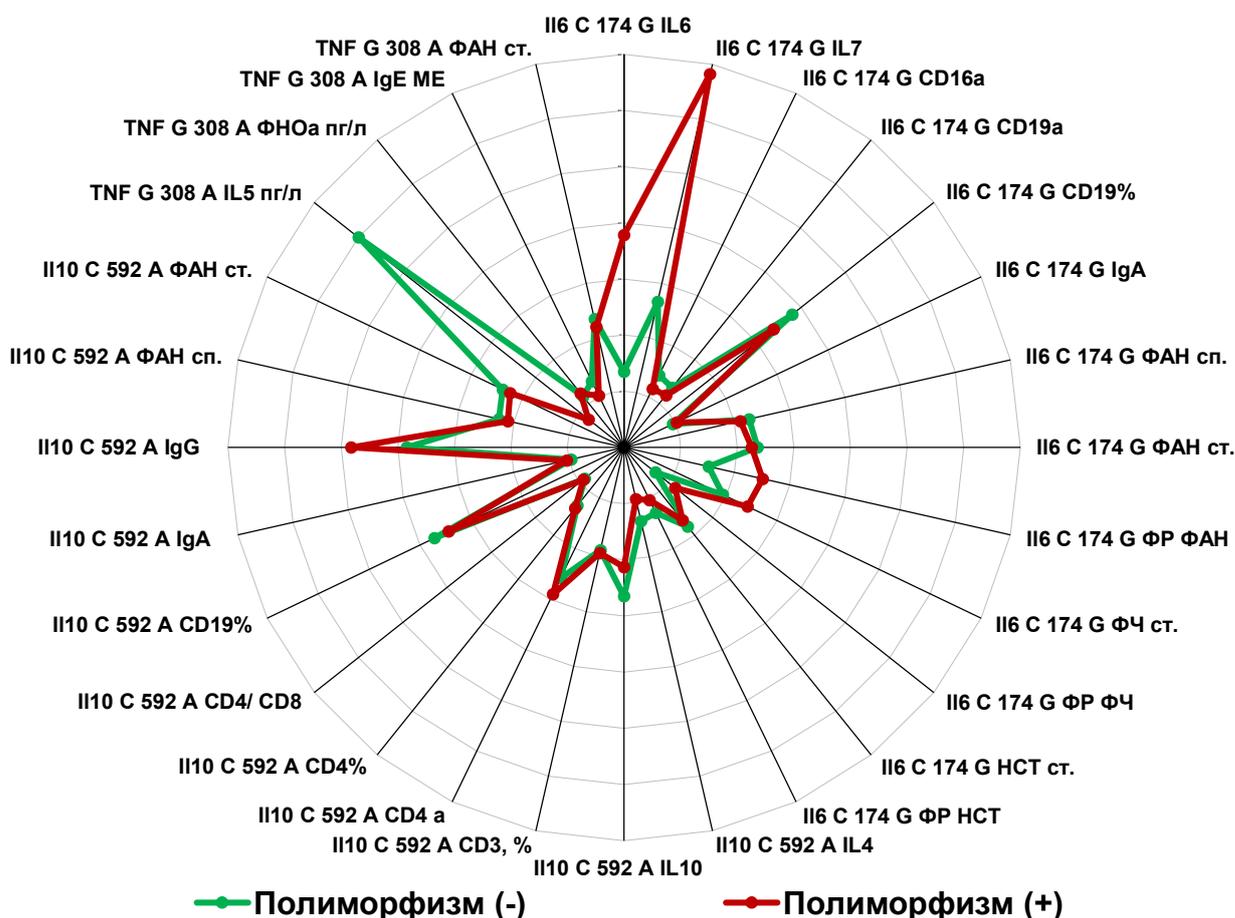
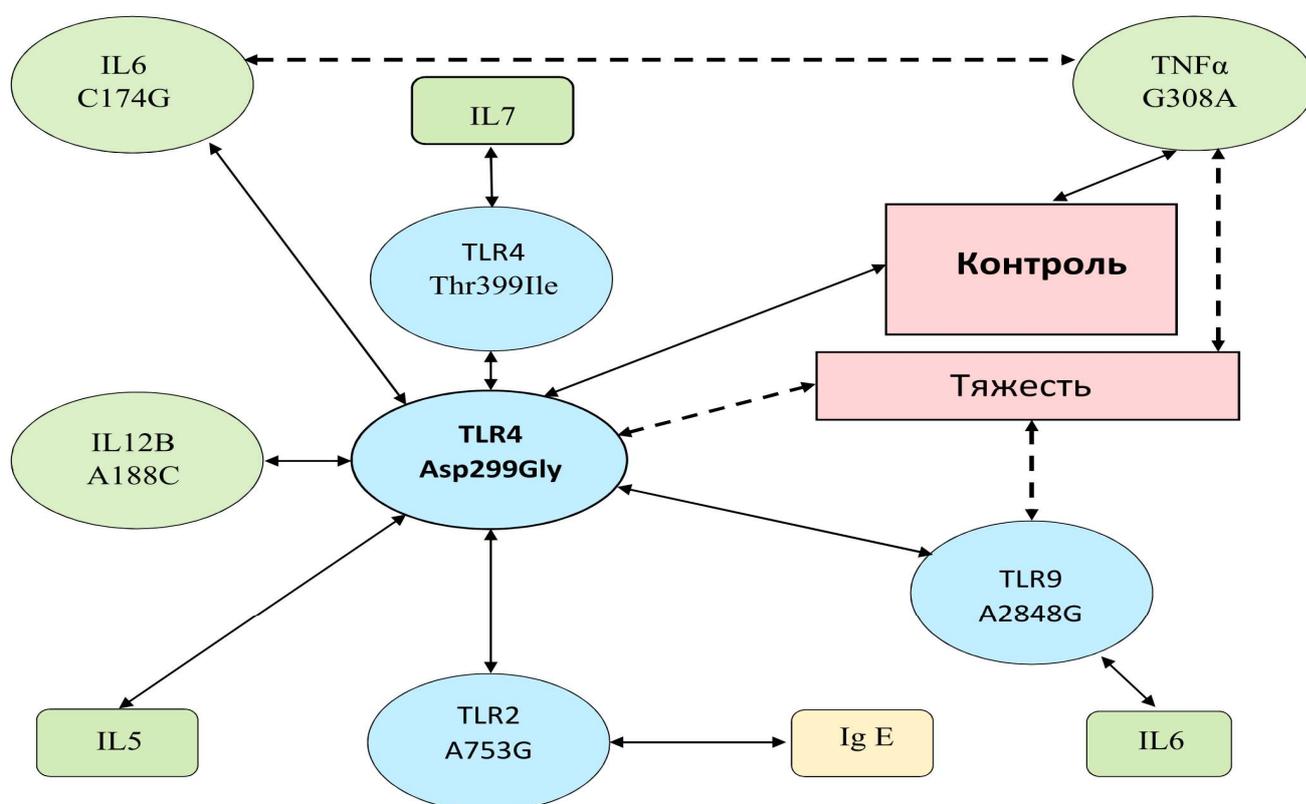


Рисунок 63 – Клинико-патогенетическое проявление однонуклеотидных замен в генах цитокинов при бронхиальной астме

Наиболее характерным для генотипов с более высокой долей контролируемой астмы и/или более легким течением заболевания является снижение уровня IL 4, 5, 6, 18, а для IL 8 и TNF α наблюдаются разнонаправленные изменения. В лимфоцитарных показателях иммунограммы у носителей таких генотипов отмечается повышение общего количества лимфоцитов и Т-хелперов, снижение натуральных киллеров, для Т-цитотоксических и -лимфоцитов отмечаются разнонаправленные изменения при разных полиморфизмах генов, облегчающих течение БА и/или

контроль над ней. В гуморальном звене у таких пациентов выявлен более высокий уровень иммуноглобулинов А и G, в фагоцитарном – чаще встречаются более высокие показатели нейтрофильного фагоцитоза.

Ни один из рассматриваемых генотипов не приводит ко всем перечисленным изменениям сразу, для каждого конкретного полиморфизма отмечалось уникальное сочетание изменений интерлейкинового профиля и показателей иммунного статуса, приводящих к сходному результату, очевидно, разными патогенетическими путями (Рисунок 64).



Примечание -

↔ прямая корреляционная связь; ← - → обратная корреляционная связь

Рисунок 64 – Иммуногенетические паттерны и их клинические проявления при БА у детей

Поэтому особый интерес представляют сочетания этих мононуклеотидных замен, приводящие к интерференции и взаимному усилению или ослаблению их воздействия, такие сочетания формируют генетические паттерны, отличающие детей, страдающих БА, от условно здоровых и различные по тяжести течения и

контролю над заболеванием.

При БА характерна высокая вероятность сочетаний мононуклеотидных замен в генах Toll-подобных рецепторов 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) и 9 (A2848G), IL-6 (C174G), 12 (A1188C) и TNF α (G308A). Эти полиморфизмы генов связаны тесной сетью корреляций не только между собой, но и с уровнем интерлейкинов и IgE в сыворотке крови, уровнем контроля и степенью тяжести заболевания, поэтому полученные нами данные позволяют предположить наличие генетических паттернов, характеризующих различные по степени контроля и течению группы пациентов с БА.

В частности, обнаружены достоверные зависимости: сильная прямая – однонуклеотидных замен генов белка рецептора Toll 4 (Asp299Gly) и (Thr399Ile), средней силы – мононуклеотидных замен генов Toll 4 (Asp299Gly) и Toll 9 (A2848G), между полиморфизмами генов белка рецептора Toll 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) и гена интерлейкина 12B (A1188C). Активация конкретного набора Toll-подобных рецепторов приводит к выработке того или иного комплекса интерлейкинов, которые и определяют, в каком направлении произойдет активация иммунного ответа и произойдет ли она вообще. Соответственно мононуклеотидные замены в генах Toll-подобных рецепторов изменяют взаимодействия в интерлейкиновой цепи. Обращает на себя внимание центральная роль полиморфизма TRL4-Asp299Gly в этой сложной цепи взаимодействий. Все приведенные параметры коррелируют либо непосредственно с ним, либо с ним же, максимум через один интермедиатор. Данная однонуклеотидная замена расположена непосредственно в экзоне кодирующем распознающий домен рецептора и приводит к снижению его чувствительности и повышению специфичности.

Реализация выявленных врождённых особенностей атопии осуществляется через изменения в сигнальных сетях, регуляторном и эффекторном звеньях иммунитета. На следующем этапе оценивались показатели цитокинового статуса и стандартной иммунограммы в интегрированных группах контролируемой и неконтролируемой БА, и в этих группах отмечается достоверная разница по иным показателям (Рисунок 65).

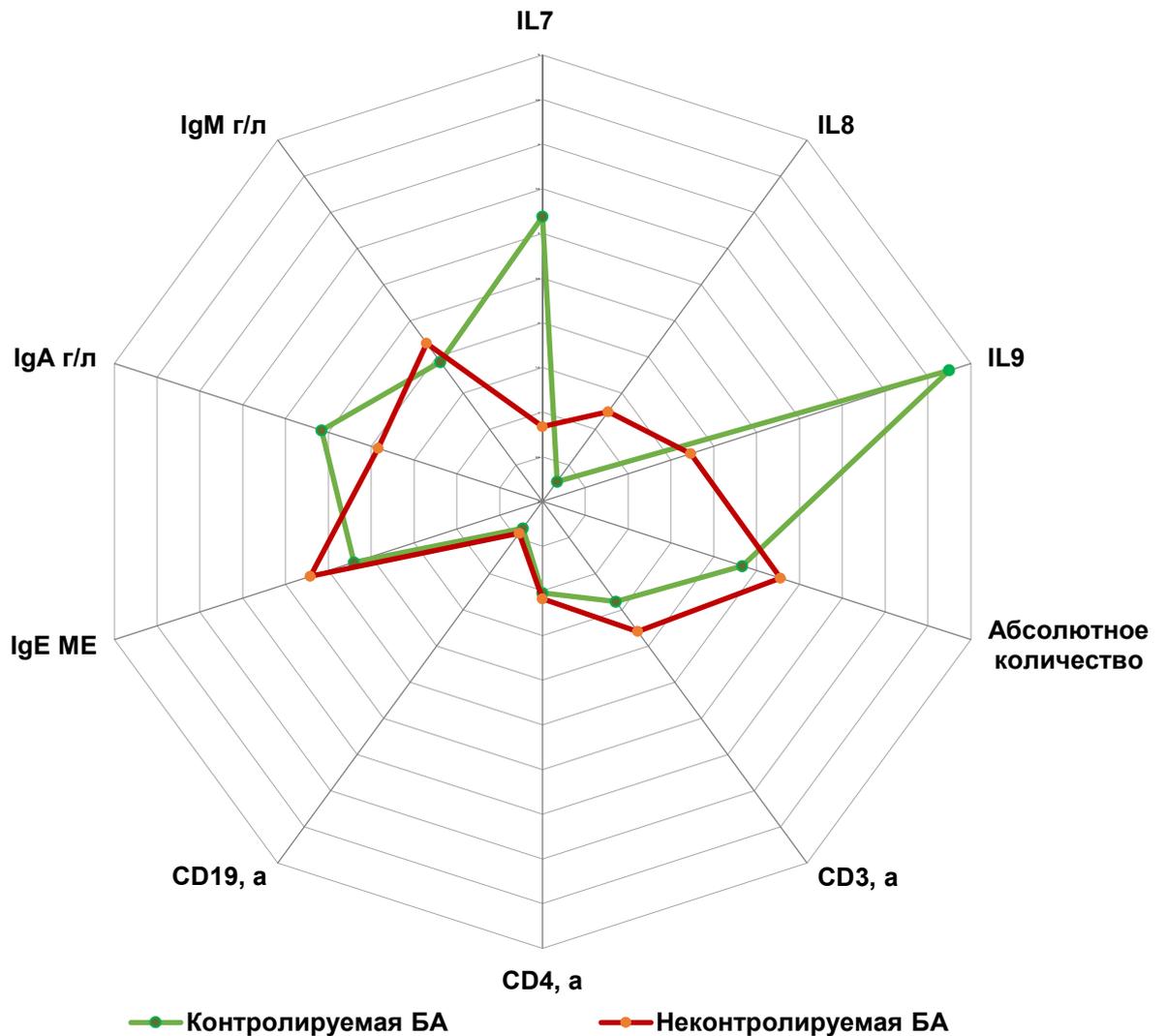


Рисунок 65 – Достоверно различимые показатели иммунного статуса при БА в зависимости от контроля заболевания

Очевидно, патогенетические пути, диктуемые различными полиморфизмами генов при интерференции, частично нивелируют друг друга, а в некоторых случаях усиливают. В группе с неконтролируемой астмой, отмечалось снижение уровня ИЛ 7, 9 и рост ИЛ 8, в популяции географически близкого региона (Приморский край), показано его увеличение у детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания [45], но менее выраженное, чем при неконтролируемой БА в условиях Приамурья. У детей с БА в Хабаровском крае также отмечается более высокий уровень В-лимфоцитов, Ig E и M, и более низкий – Ig A, подобные изменения, но менее выраженные, ранее выявлялись при сравнении пациентов с БА и условно здоровых, а также

легкого и тяжелого течения БА [71, 122, 180, 220]. Из чего можно заключить, что влияние полиморфизмов генов, при которых чаще наблюдается более легкое и/или контролируемое течение БА, не сводится к изменениям конкретных показателей цитокинового и иммунного статуса, но влияет на соотношения регуляторных сетей в них.

Обращает на себя внимание то, что большее влияние на контроль заболевания БА оказывают не цитокины атопии, отвечающие за сам факт атопического воспаления, а цитокины общего воспаления, такие как интерлейкин 6, 7, 8, 9, TNF α , регулирующие выраженность воспаления вообще, особенно интересна роль IL8, как цитокина хемотаксиса гранулоцитов, регулирующего местное воспаление.

Важным для оценки особенностей иммунного реагирования при контролируемой и неконтролируемой БА представляют не только количественные, но и функциональные показатели состояния иммунных клеток крови. Одним из способов оценки такого состояния, в том числе при БА, является анализ мембранного потенциала их митохондрий (МППМ) [34, 41, 53, 114, 149]. Выявлено, что этот потенциал снижен в группе детей с БА в сравнении со здоровыми во всех пулах иммунокомпетентных клеток (ИКК) – лимфоцитах, моноцитах, гранулоцитах. При сравнении этого показателя в группах контролируемой и неконтролируемой БА достоверных различий для лимфоцитов не выявлено, но обнаружено достоверное снижение мембранного потенциала митохондрий в пулах моно- и гранулоцитов, что свидетельствует об особой роли местного воспаления в неконтролируемом течении БА. Использование этого метода позволяет на более ранней стадии выявлять нарушения функционирования ИКК крови. Но сам метод в настоящее время не является рутинным, и оценка его результатов в применении к конкретному больному часто вызывает определенные затруднения, в связи с чем был разработан и запатентован «Способ комплексной оценки энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови» (патент на изобретение №2766747, государственная регистрация в Государственном реестре изобретений РФ 15.03.22). Степени энергодефицита, установленные согласно этой методике, релевантны наличию, тяжести и степени контроля БА, что демонстрируют приведенные в соответствующем разделе клинические

примеры.

Большой интерес в изучении патоморфоза БА представляют и гены детоксикации. Они оказывают непосредственное влияние на взаимодействие организма с ксенобиотиками, к которым относятся как сенсibiliзирующие агенты-аллергены, так и средства базисной терапии. В связи с этим, исследуемые гены влияют как на вероятность развития БА в качестве клинической манифестации врожденной атопии, скорость нарастания и интенсивность атопического воспаления, так и на эффективность применяемых терапевтических средств [85, 132, 133, 175, 178]. В ходе данной работы определялись полиморфизмы генов детоксикации: GSTM, GSTT, GSTM/GSTT, GSTP 1 (Ile105Val), GSTP 1 (Ala114Val), связанные с вероятностью неконтролируемого течения БА, и было выявлено, что во всех случаях при полиморфных аллелях вероятность сохранения контроля над БА выше. При этом ответ на базисную терапию достоверно различается при разных полиморфизмах генов детоксикации. При делециях GSTM+T достоверной разницы в дозе необходимой терапии нет, при одной из мононуклеотидных замен GSTP1 (Ile105Val) требуется на 1/3 – меньшая дозировка ТГКС, чем в группе с нормальным аллелем. При другой мононуклеотидной замене в этом гене (Ala114Val) требуется большая доза, но при этом показано, что несмотря на большую дозу ТГКС требуемую для контроля, доля пациентов с контролируемым течением БА не снижается.

Выявление полиморфизмов генов детоксикации у детей с БА может помочь в формировании групп риска по неконтролируемому течению болезни и индивидуализации схем терапии, а в сочетании с выделением иных генов-предикторов, влияющих на контроль заболевания, описанных выше, обнаруживаются генетические паттерны неконтролируемого и/или устойчивого к стандартной терапии БА, которые составляют основу персонифицированной и предиктивной диагностики, профилактики и терапии заболевания.

Классическим экзогенным фактором, влияющим на состояние организма, является климат, в частности, температурный режим окружающей среды пациента. Интересно, что исследования в этой области, проводимые в разных регионах мира, и соответственно, в различных климатических зонах, дают сходные по

направленности факторов, но разноречивые по их значимости, результаты [9, 14, 135, 164, 213, 249]. В ходе работы нами проанализирована зависимость между температурой воздуха и частотой обострений БА у детей Приамурья. В результате выяснилось, что наибольшее значение имеют не их абсолютные значения, даже в экстремуме, а перепады в течение суток. Именно они, достигая 95 перцентиля, достоверно увеличивают частоту обострений заболевания в нашем регионе. Она представлена как индекс сезонности (IS), имеет достоверные прямые корреляционные связи с суточными изменениями среднесуточных температур, частотой дней в каждом месяце со средними изменениями температуры более 95-го перцентиля, для второго показателя эта связь более выражена.

Одним из географически обусловленных факторов внешней среды, влияющим на адаптационные и патологические процессы, протекающие в организме, является сочетание микроэлементов в гидро-, лито- и биосфере, уникальное для каждого конкретного региона и во многом определяющее его биогеохимическое своеобразие. Эссенциальные (жизненно необходимые) элементы в качестве коферментов участвуют во всем разнообразии физиологических процессов, от базисных, таких как клеточное дыхание, до самых специализированных, таких как микробицидная активность фагоцитарных ферментов. Исходя из этого, их содержание и соотношения не могут не оказывать влияние на патогенез, в том числе БА [75, 229, 264, 274]. В ходе данного исследования обнаружено, что, несмотря на единый геохимический регион проживания, имеют место достоверные различия содержания микроэлементов у пациентов с БА относительно группы сравнения (условно здоровые). В связи с этим, статистически достоверное снижение содержания в крови таких элементов как Cu, Se, Zn и повышение Pb, Ni, Co расценено как эндогенный фактор, влияющий на atopическое воспаление. Определена связь между изменениями микроэlementного статуса и степенью тяжести заболевания. По мере нарастания тяжести БА отмечено снижение Se, Cu и нарастание Pb, Mn, Li. Густое облако корреляционных связей, ассоциирующих уровень микроэлементов и основные показатели иммунного статуса, демонстрирует уменьшение степеней свободы взаимодействий, ужесточение иммуно-микроэлементных взаимоотношений, что

свидетельствует о напряжении компенсаторно-адаптационных резервов организма в данной области.

Исследование состояния эритроцитарных мембран – как модельный вариант – позволяет оценить состояние клеточных мембран организма в целом и, имеющих особое значение для БА, мембран слизистой оболочки бронхов, в частности [13, 27, 98]. Из полученных результатов очевидна нестабильность клеточных мембран эритроцитов у детей, переносящих БА, которая усиливается по мере нарастания степени тяжести и является одной из причин утраты контроля над заболеванием. Выявленный специфический (стоматоцитарный) путь этого ослабления исключает его вторичный характер на фоне гипоксии. Токсиканты, в частности свинец, в большей степени повреждают клеточные мембраны у больных с более тяжелым течением БА, что выражается в более значительном снижении количества нормальных форм эритроцитов – дискоцитов и, соответственно, повышении количества переходных и дегенеративных (необратимых) форм, проявляется снижением коэффициента компенсации трансформации.

Воздействие солей металлов (Pb, Se) на функциональное состояние клеточных мембран по данным трансформации эритроцитов у пациентов с БА достоверно зависит от степени тяжести заболевания, что подтверждено корреляционными связями. Полученные данные открывают возможности индивидуализации диагностики, прогнозирования и коррекции микроэлементных нарушений у больных с БА с учетом оценки стабильности клеточных мембран.

Примером того, что климатические факторы не всегда влияют на течение патогенетического процесса очевидным образом, является высокая распространённость среди детей Хабаровского края дефицита витамина Д. Хабаровск является одним из самых инсолируемых городов России, число солнечных дней в году превосходит 300, но иные климатические и социально-культурные особенности не позволяют проживающим здесь детям в полной мере использовать это преимущество. Дефицит витамина Д регистрируется практически у половины из них [2, 36]. Влияние уровня витамина Д на иммунную реактивность в целом, и развитие БА частности, известно [1, 73, 137, 224, 269], однако, в силу его природы, интересны

региональные особенности и конкретные механизмы такого влияния. В данном исследовании подтверждено, что, несмотря на равную инсоляцию, уровень витамина Д у пациентов с БА ниже, чем в группе сравнения, и снижается по мере нарастания тяжести заболевания. Также обнаружено, что у детей с неконтролируемой БА содержание этого витамина достоверно ниже в сравнении с пациентами, контролирующими заболевание. Выявлены некоторые механизмы влияния дефицита витамина Д на патогенез и течение БА. Определено более низкое содержание IL 4, более высокое – IL 5 в сыворотке крови, снижение абсолютного числа и доли В-лимфоцитов у этих детей в сравнении с больными БА без дефицита витамина Д. На этом фоне требуется значительно большая доза ТГКС для достижения контроля над БА. Пациенты, страдающие БА, в сочетании со снижением уровня витамина Д в половине случаев выделяют ДНК ВЭБ, в то время как дети с БА и нормальным содержанием витамина Д – менее, чем в 1/5 части случаев. Определение уровня витамина Д у детей с БА позволяет выделить группу риска по неконтролируемому течению заболевания и персонифицировать для таких детей терапию.

Являясь атопическим заболеванием БА в своем развитии неизбежно зависит и от спектра конкретных аллергенов-сенсibilизантов каждого пациента [68, 117, 161, 228, 252]. При оценке влияния спектра сенсibilизации на контролируемость течения БА показано особое значение пыльцы сорных трав и спор *Aspergillus niger* для нашего региона. Подтопление жилых районов, случившееся в 2013 году, т.е. повышение влажности в окружающей среде, оказало значимое влияние на частоту сенсibilизации к плесневым грибам у детей, страдающих БА, что и ведет к более тяжелому течению заболевания и утрате контроля над ним.

Значение вирусной инфекции при БА широко известно и отражено в доступной литературе, в том числе в виде глобального метаанализа [218]. Изучалось и влияние вирусов группы герпеса, которые длительное время, часто пожизненно, персистируют в слизистой бронхов и неизбежно принимают участие в патоморфозе БА [31, 60, 124, 167, 177], однако их влияние на контролируемость заболевания и механизмы этого влияния изучены недостаточно полно. Полученные нами данные показывают воздействие активизации ВЭБ и вируса герпеса 6 типа в эпителии

дыхательных путей на иммунопатогенез и течение БА. Больные с неконтролируемой астмой достоверно чаще, более чем в 3 раза для ВЭБ и в 1,5 раза для вируса герпеса 6 типа, выделяют ДНК вирусов в мазках из зева. У таких детей более высокий (для ВЭБ – в 9 раз, для герпеса 6 типа – в 3 раза) уровень IL 5, также более высокий (для ВЭБ в 2 раза) уровень Ig E, достоверно более низкий уровень ОФВ₁. Пациенты, выделяющие ДНК ВЭБ, требуют на 40% более высоких доз ТГКС для достижения контроля над заболеванием. Таким образом, оба вируса ухудшают течение и контроль БА, а активизация ВЭБ имеет более выраженное влияние на течение заболевания.

На основе изученных, патогенетически значимых факторов и выявленных биологических маркеров был создан комплекс программ для ЭВМ, предназначенных для прогнозирования неконтролируемого течения БА на различных этапах развития заболевания, использовался статистический метод обучающихся нейронных сетей и архитектура многослойного перцептрона MLP с алгоритмом обучения BFGS. Это связано со сложными нечеткими связями параметров с нелинейным характером распределения, взаимодействия генетических и эпигенетических факторов [6, 12, 23, 37, 48]. Своевременный анализ полиморфизмов генов сигнальной системы иммунитета, детоксикации позволили осуществлять наиболее ранний прогноз возникновения БА и развития неконтролируемого течения, начиная с раннего постнатального периода.

Первый этап комплексных программ прогнозирования контролируемости БА включает генотипирование TRL 2, 4, 9, GSTM+T, GSTP, IL 4, 6, 10, 12B, TNF, соответственно поставленным задачам при достаточно высокой достоверности прогноза – 79,01%.

Показатели стандартной иммунограммы являются наиболее доступными для анализа маркерами иммунопатогенетической реализации генетической предрасположенности к неконтролируемому течению БА. Они были разделены на две группы с учетом возможностей лабораторий разного уровня. На начальном этапе оценки иммунограммы при прогнозировании неконтролируемого течения БА в динамике предлагается использование показателей нейтрофильного фагоцитоза. Получена

более высокая достоверность прогноза – 85,94%.

Научно и практически обоснован 3 этап прогнозирования, основанный на патогенетических механизмах реализации генетической предрасположенности, через абсолютные и относительные показатели популяций лимфоцитов и уровень сывороточных иммуноглобулинов. Полученная модель смогла предсказать 85,71% правильных значений целевой переменной - степени контроля БА (полный контроль, неполный контроль, отсутствие контроля).

Итогом изучения выявленных взаимодействий явилась государственная регистрация следующих программ для ЭВМ: «Прогнозирование неконтролируемого течения БА на основе разнообразия полиморфизмов генов молекул сигнальной системы», «Прогнозирование неконтролируемого течения БА по показателям нейтрофильного фагоцитоза», «Прогнозирование неконтролируемого течения БА по показателям стандартной иммунограммы (популяции лимфоцитов и уровень сывороточных иммуноглобулинов)».

С целью компенсации некоторых из выявленных, негативно влияющих на течение БА факторов, было решено дополнительно использовать функциональный продукт питания «Доромарин», произведенный на основе ламинарии дальневосточной гомогенизированной. Биологические, в том числе иммуномодулирующие эффекты содержащихся в них веществ подтверждены [8, 20, 51, 72, 165], но их механизмы особенно при БА освещены недостаточно. В данной работе на фоне приема этого продукта отмечались изменения интерлейкинового профиля (IL 6, IL 10, IL 18), характерное для снижения интенсивности воспалительных процессов. Улучшение энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови (гранулоцитов и моноцитов), снижение числа пациентов с активной репликацией ВЭБ и вируса герпеса 6 типа свидетельствуют о его иммуномодулирующем действии. Результатом этих изменений явилась положительная динамика показателей контроля над БА. Полученные результаты были положены в основу полученного нами патента «Способ иммуномодуляции у детей при бронхиальной астме или обменных нарушениях при заболеваниях почек» № 2790970 от 28 февраля 2023 и подтверждены клиническими примерами в соответствующем разделе работы.

Обобщая все вышесказанное, была создана концептуальная модель патогенеза БА, ее неконтролируемого течения и показана в данной работе (Рисунок 66).

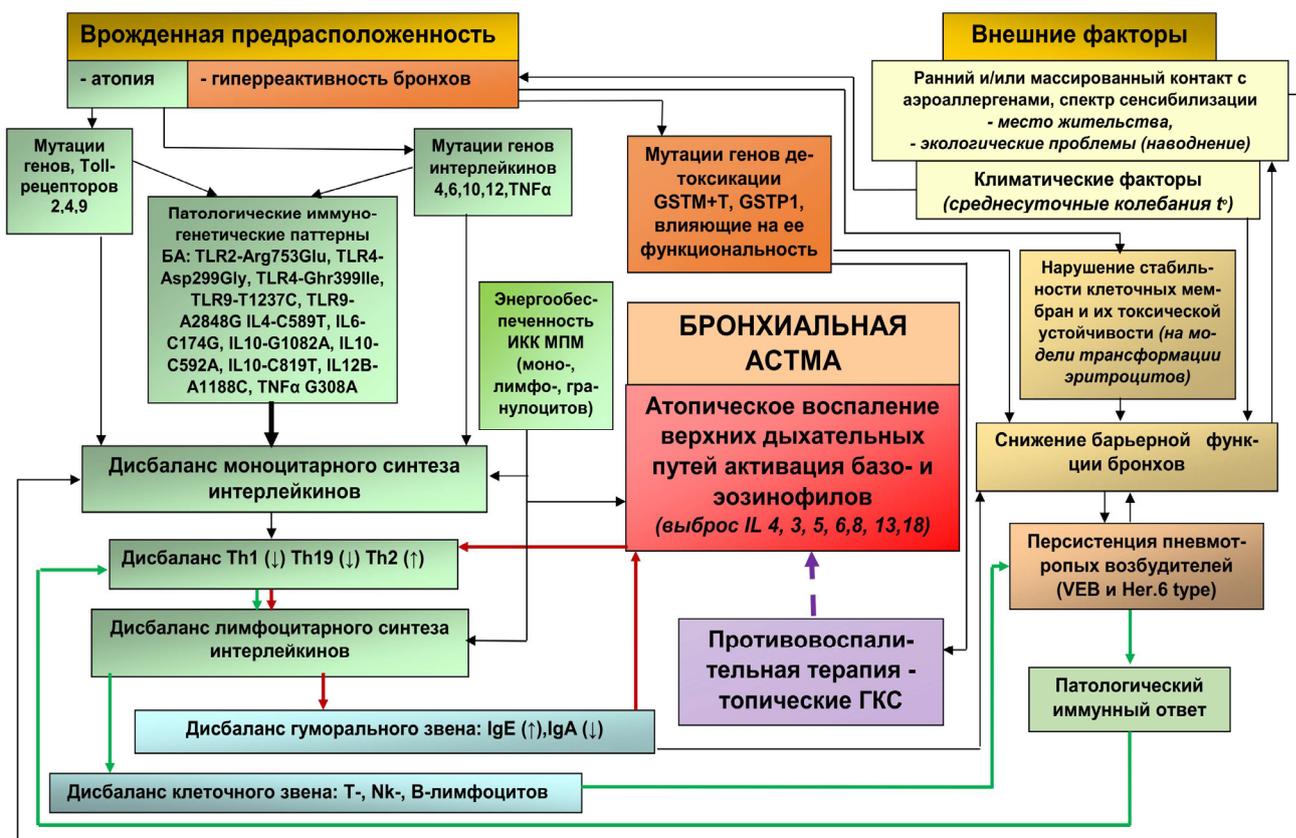


Рисунок 66 – Концептуальная схема патогенеза БА и ее неконтролируемого течения

В данной модели врожденная предрасположенность представлена атопией и гиперреактивностью бронхов. Атопия, в свою очередь, находит выражение в патологических иммуногенетических паттернах, объединяющих полиморфизмы генов сигнальных молекул иммунной системы, ведущих к дисбалансу моноцитарного синтеза интерлейкинов, что нарушает дифференцировку Т-хелперов различных типов, нарушает их соотношение и изменяет синтез лимфоцитарных цитокинов. В свою очередь, дисрегуляция цитокиновой сети приводит к патологическому функционированию эффекторного звена иммунитета. С одной стороны, повышается выработка Ig E, при чем специфически реагирующего на нативно безопасные белки респираторных аллергенов. Это приводит к атопическому воспалению дыхательных путей, в ходе которого выделяется еще больше цитокинов, усиливающих

дифференцировку Th₂-хелперов, замыкая порочный круг (красный).

С другой стороны, нарушения на уровне Т-киллеров, натуральных киллеров и В-лимфоцитов ведут к более частой активизации пневмотропной персистирующей флоры, в частности, вирусов группы герпеса. Их активность не только снижает барьерную функцию слизистой дыхательных путей, но провоцирует патологический иммунный ответ и приводит к еще большему дисбалансу дифференцировки Т-хелперов различных типов, замыкая еще один порочный круг (зеленый).

Гиперреактивность бронхов связана с дисфункцией их эпителиальных клеток на различных уровнях. С одной стороны, это находит выражение в изменении клеточных мембран, их устойчивости к внешним факторам и приводит к снижению барьерной функции бронхов. С другой стороны, происходят изменения детоксикационной функции бронхиального эпителия, которые не только приводят к еще более выраженному снижению указанной функции, но и изменяют метаболизм ТГКС, используемых в терапии БА.

Внешние факторы, такие как антропогенные и природные токсиканты, перепады температур, также могут снижать барьерную функцию бронхиального эпителия. Их влияние наиболее выражено у пациентов, предрасположенных к нарушениям этой функции. Такие изменения бронхов увеличивают вероятность активизации пневмотропных возбудителей, сплетаясь с вышеописанными порочными кругами, а кроме того, ведут к более раннему проникновению и более высокой концентрации потенциальных респираторных аллергенов, что в условиях атопии вызывает еще большее нарушение моноцитарного синтеза цитокинов, замыкая еще один патологический круг (внешний черный контур).

Таким образом, данное исследование раскрывает некоторые аспекты иммунопатогенеза БА, включающие в себя несколько кругов положительных и отрицательных обратных связей, следовательно, терапия, необходимая для достижения контроля БА должна быть персонифицирована, для чего требуется своевременная углубленная диагностика, в том числе генетическая, с последующим прогнозированием риска неконтролируемого течения БА.

ВЫВОДЫ

1. Изучена частота встречаемости астмоподобных симптомов у детей Хабаровского края (17,9%), выявленная стандартизированным опросником ISAAC, которая кратно превышает заболеваемость БА по обращаемости (2,4%) и является одной из самых высоких среди регионов России (5-14%), в сельской местности показатели несколько выше. Изучена встречаемость неастмоподобных симптомов атопии: для аллергического ринита (69,3%) она также высока и превышает таковую за рубежом (21,4-52,7%), для атопического дерматита (11,8%) - соответствует показателям индустриально развитых стран с преимущественно европеоидным населением (6,8-12,8%).

2. Выявлены генетические паттерны сигнальных молекул иммунной системы и детоксикации – ансамбли полиморфизмов в генах TLR (2, 4, 9), IL (6, 10, TNF α), GSTM, GSTT, GSTP у детей с БА в зависимости от течения и контроля заболевания. Достоверно определено, что при мононуклеотидных заменах в генах TLR4-Asp299Gly, TLR9 - T1237C характерно более легкое течение БА и более полный контроль над ней; полиморфизмы генов TLR9-A2848G, IL10-C592A, TNF α -G308A, GSTM+T, GSTP1 (Ile105Val, Ala114Val) способствуют лучшему контролю заболевания, с тенденцией к более легкому течению; дети с мононуклеотидными заменами в генах TLR2-Arg753Glu, TLR4-Thr399Ile, IL6-C174G напротив переносят заболевание тяжелее с тенденцией к снижению контроля.

3. Определены некоторые патогенетические механизмы реализации выявленных полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов и интерлейкинов в иммунном статусе:

- в сигнальных сетях в виде изменения уровня интерлейкинов в сыворотке крови (повышение IL 4, 10, 18 при мононуклеотидных заменах TLR2-Arg753Glu; IL 9 – TLR4-Asp299Gly; IL 6, 7, 9, 18 – TLR4-Thr399Ile; IL 6 – TLR9-T1237C; IL 8 – TLR9-A2848G; IL 6, 7 при однонуклеотидных заменах непосредственно IL6-C174G и TNF α – TNF α -G308A; понижение IL 4, 10, TNF α при мононуклеотидных заменах TLR4-Asp299Gly; IL 4, 5, 8 – TLR9-T1237C; IL 4 – TLR9-A2848G; IL 4, 8, 10 – IL10-

C592A и IL 5 – TNF α -G308A);

- в регуляторном (разнонаправленные изменения соотношений субпопуляций лимфоцитов);

- эффекторном (повышение уровня IgA при полиморфизмах генов TLR9-T1237C, TLR9-A2848G, IL6-C174G, IL10-C592A; снижение Ig E при TNF α -G308A; дисбаланс показателей фагоцитоза, снижающий кислородзависимые механизмы бактерицидности в виде стимулированного НСТ-теста и фагоцитарного резерва (при TLR9-A2848G, IL6-C174G) звеньях иммунитета.

4. Выявлены механизмы реализации врожденной предрасположенности, определяющие дозу ТГКС, необходимую для достижения контроля над БА: мононуклеотидные замены в генах сигнальных молекул иммунной системы модифицируют atopическое воспаление, ослабляя (при TLR4-Asp299Gly, TNF α -G308A) и усиливая (при TLR2-Arg753Glu) его, что приводит к уменьшению либо увеличению дозы ТГКС соответственно; варианты полиморфизмов генов детоксикации изменяют метаболизм препаратов и, как следствие, их воздействие, снижая (при GSTP1-Ala114Val) и повышая (при GSTP1-Ile105Val) необходимую дозу соответственно.

5. Обнаружены соотношения субпопуляций лимфоцитов, характерные для неконтролируемого течения БА в детском возрасте: повышение общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов, в том числе Т-киллеров, Т-хелперов, зрелых В-лимфоцитов и снижение натуральных киллеров. Выявлены особенности гуморального (снижение уровня Ig A и рост уровня Ig E) и фагоцитарного (снижение показателя НСТ теста спонтанного, стимулированного) звеньев иммунитета. У всех детей с БА выявлены нарушения энергообеспеченности ИКК в виде низкого процента лимфоцитов с нормальным МПМ, при неконтролируемом течении заболевания определена митохондриальная недостаточность всех трех пулов клеток (моно-, лимфо- и гранулоцитов).

6. Определены неспецифические эндогенные факторы и клеточно-молекулярные особенности, влияющие на течение atopического воспаления и контроль БА у детей:

- дисбаланс эссенциальных микроэлементов в сыворотке и форменных элементах крови в виде снижения Cu, Se, Zn, повышения Co, по мере нарастания тяжести БА - присоединение повышения Mn и Li, как дополнительный фактор риска тяжести и контроля БА – повышенный уровень Pb в сыворотке и форменных элементах;

- своеобразие трансформации эритроцитов – как модели состояния клеточных мембран в организме – представленное снижением доли дискоцитов и ПКТ, ростом дегенеративных и переходных форм эритроцитов, преимущественно стоматоцитарным типом апоптоза, усугубляющееся при более тяжелом течении заболевания; большей подверженностью воздействия токсикантов (Pb) на клеточные мембраны;

- дефицит витамина D в 2 раза более выраженный при неконтролируемом течении БА, способствующий атопическому воспалению через 3-кратное повышение IL 5.

7. Выявлено влияние экзогенных факторов на атопическое воспаление при БА и его клиническую реализацию:

- экологических (климатические особенности - частота среднесуточных колебаний температур с необычно высокой (95 – перцентиль) разницей, увеличивающая количество обострений и, соответственно, снижающая степень контроля над БА);

- спектра сенсibilизации (пыльца сорных трав и споры *Aspergillus niger*, влияющие на степень контроля БА) у детей Приамурья;

- активизация вирусов группы герпеса (ВЭБ, герпес человека 6 типа), значимо модифицирующая атопическое воспаление при БА, усиливая тяжесть течения и объем терапии, необходимой для достижения контроля.

8. Дано научное обоснование дополнительного включения в комплексную терапию БА функционального продукта питания на основе ламинарии дальневосточной гомогенизированной, при котором отмечается изменение интерлейкинового профиля, характерное для снижения интенсивности воспалительных процессов (IL 6, IL 10, IL 18), улучшение энергообеспеченности ИКК, снижение частоты

активной репликации ВЭБ и вируса герпеса 6 типа, положительная динамика показателей контроля над БА.

9. Создан комплекс электронных программ, предназначенных для прогнозирования неконтролируемого течения БА на различных этапах развития заболевания, включая донозологический, на основе проведенного анализа полученных данных (генотипирования, показателей клеточного и гуморального иммунитета) и выявленных патогенетических взаимодействий с использованием обучающихся нейросетей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью формирования групп риска по развитию БА и оценки встречаемости астмоподобных и неастмоподобных симптомов атопии у детей школьного возраста (7-8 лет, 13-14), наблюдаемых медицинским персоналом в образовательных учреждениях, необходимо ежегодное проведение скринингового сплошного опроса с помощью стандартизированного опросника ISAAC (Рисунок 67).

2. Для дополнительной оценки вероятности развития неконтролируемого течения БА проводить исследования уровня витамина Д и наличия ДНК вирусов группы герпеса методом ПЦР в мазках из ротоглотки.

3. На основе комплекса разработанных электронных программ, предназначенных для прогнозирования неконтролируемого течения БА на различных этапах развития заболевания, включая донозологический, рекомендуется расширить спектр обследования детей из группы риска по БА и состоящих на учете с диагнозом БА с учетом лабораторных возможностей лечебных учреждений.

4. Рекомендовано дополнительное использование функционального продукта питания на основе дальневосточных бурых водорослей («ДороМарин») у детей с БА по следующей схеме в течение 2-х месяцев: детям с массой тела 20-50 кг – 10 мл х 2 раза в день утром за 20-30 мин. до еды и вечером через 1,5-2 часа после еды; более 50 кг – 15 мл х 2 раза в день утром за 20-30 мин. до еды и вечером через 1,5-2 часа после еды в возрастной группе 5-17 лет.

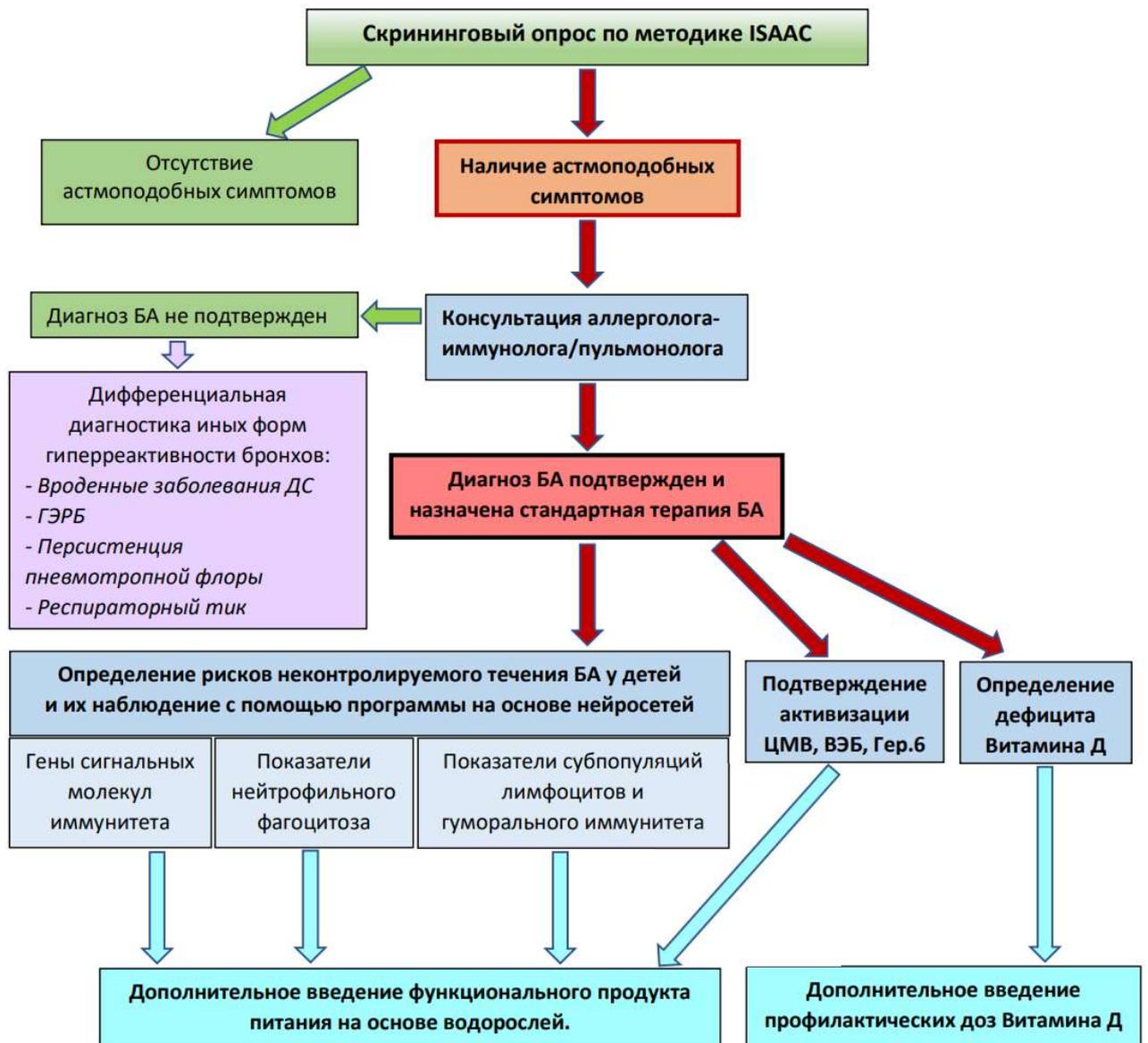


Рисунок 67 – Алгоритм определения групп риска развития и неконтролируемого течения БА у детей, их наблюдение

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – атопический дерматит

АР – аллергический ринит

БА – бронхиальная астма

ИКК – иммунокомпетентные клетки крови

МОС25 – мгновенная объемная скорость на выдохе 25% от ФЖЕЛ

МОС50 – мгновенная объемная скорость на выдохе 50% от ФЖЕЛ

МОС75 – мгновенная объемная скорость на выдохе 75% от ФЖЕЛ

МП – многослойный персептрон

МПИМ – мембранный потенциал митохондрий

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОШ – отношение шансов

ОФВ1 – объем форсированного выдоха за первую секунду

ПСВ – пиковая скорость выдоха

ТГКС – топические глюкокортикостероиды

ФВД – функция внешнего дыхания

ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

ISAAC – (International Study on Asthma and Allergy in Childhood) –

Международное исследование по вопросам астмы и аллергии в детстве

OR – относительный риск

PAMP – патогенассоциированные молекулярные паттерны

ROC – рок-анализ

SNP – синглетный (однонуклеотидный) полиморфизм

TLR – (Toll-Like receptor) – Toll-подобные рецепторы

TNF – фактор некроза опухолей

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллахвердиева, Л.И. Влияние фармакологической коррекции витамином D на цитокиновый ответ у детей с атопической бронхиальной астмой / Л.И. Аллахвердиева, Н.Г. Султанова, А.О. Джафарова // Казанский мед. журн. – 2019. - № 100 (1). – С. 135–139.
2. Антонова, А.А. Влияние витамина D на течение кариозного процесса у детей в Хабаровском крае / А.А. Антонова, О. Л. Шевченко, И.Ю. Литвина // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2020. - №. 2 (80). - С. 39-41.
3. Архипов, В.В. Контроль над бронхиальной астмой в России: результаты многоцентрового наблюдательного исследования НИКА / В.В. Архипов, Е.В. Григорьева, Е.В. Гавришина // Пульмонология. - 2011. - № 6. - С. 87-93.
4. Ассоциация полимофизма помоторной области гена TNFA с развитием атопической бронхиальной астмы / Ю.В. Останкова, Т.Э. Иващенко, Н.А. Келембет и др. // Экологическая генетика. – 2005. – Т. 3, № 3. – С. 33-37.
5. Баранов В.С. Полиморфизм генов, экогенетические болезни и генетический паспорт / В.С. Баранов // Экологическая генетика. – 2011. Т. 9, № 3. – С. 3-14.
6. Барский, А.Б. Логические нейронные сети: учебное пособие / А.Б. Барский. - М.: Бином, 2013. - 352 с.
7. Батожаргалова, Б. Ц. Метаанализ распространенности астмоподобных симптомов и бронхиальной астмы в России (по результатам программы ISAAC) / Б.Ц. Батожаргалова, Ю.Л. Мизерницкий, М.А. Подольная // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. - № 61 (4). - С.59-69.
8. Беседнова, Н.Н. Полисахариды морских водорослей - перспективные средства патогенетической терапии воспалительных процессов / Н.Н. Беседнова, Т.Н. Звягинцева // В книге: Функциональные пищевые продукты на основе полисахаридов из морских водорослей / Т.С. Запорожец, Т.А. Кузнецова, С.П. Крыжановский и др. - Владивосток, 2020. - С. 140-167.
9. Веремчук, Л.В. Определение диапазонов ответной реакции функции

внешнего дыхания на воздействие факторов климато-техногенной среды города Владивостока у больных с бронхиальной астмой / Л.В. Веремчук, Е.Е. Минеева // Системный анализ в медицине : материалы XII международной научной конференции 18-19 октября 2018 года. – Благовещенск, 2018. - С. 102-106.

10. Влияние персистенции цитомегаловируса на течение бронхиальной астмы у детей / В.К. Козлов, О.И. Морозова, М.В. Ефименко, Е.Н. Супрун // Медицинская иммунология. - 2012. - Т. 14, № 3. - С. 201-206.

11. Влияние полиморфизмов генов IL-17A (G197/197A), TNF α (G308/308A), IL-6 (C74/174G) на спонтанную и стимулированную *in vitro* продукцию основных провоспалительных цитокинов при бронхиальной астме. / Руденко К.А., Тугуз А.Р., Анохина Е.Н., Муженя Д.В. // Иммунология. - 2014. - № 2. – С. 92-94.

12. Галушкин, А.И. Нейронные сети: основы теории. / А.И. Галушкин. - М.: РиС, 2015. - 496 с

13. Глазова, Т.Г. Морфофункциональное состояние эритроцитов при персистирующем течении бронхиальной астмы у детей / Т.Г. Глазова, А.И. Рывкин, Н.С. Побединская // Педиатрия. - 2012. - № 2. - С. 19-23.

14. Григорьева, Е.А. Межсуточные изменения температуры воздуха на юге дальнего востока России / Е.А. Григорьева // Региональные проблемы. - 2021. - Т. 24, № 2-3. - С. 19-24.

15. Диагностика уровня сенсибилизации к микроэлементам у детей с бронхолегочной патологией / Г.П. Евсеева, С.В. Супрун, Т.В. Пивкина и др. // Микроэлементы в медицине. - 2018. - Т. 19, № 2. - С. 41-48.

16. Динамика состояния здоровья беременных женщин и детей, проживающих в условиях микроэлементного дисбаланса / С.В. Супрун, В.К. Козлов, Г.А. Аристова, О.А. Яхина // Дальневосточный медицинский журнал. - 2019. - № 4. - С. 5.

17. Изменение показателей врожденного иммунитета при тяжелой бронхиальной астме у детей / Л.В. Ганковская, Л.С. Намазова-Баранова, Г.В. Порядин и др. // Медицинская иммунология. – 2019. - № 1. – С. 99-106.

18. Иммунные механизмы формирования бронхиальной астмы

контролируемого и частично контролируемого течения / Т.И. Виткина, Т.П. Новгородцева, Е.П. Калинина и др. // Медицинская иммунология. - 2019. - Т. 21, № 3. - С. 495-502.

19. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей / М.В. Смольникова, С.В. Смирнова, Н.А. Ильенкова, О.С. Коноплева // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19, № 4. - С. 453-460.

20. Иммуномодулирующая активность каррагинанов из красных водорослей дальневосточных морей / И. М. Ермак, В. Н. Давыдова, Д. Л. Аминин и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. - №. 3 (37). - С. 40-45.

21. Испаева, Ж.Б. Иммуногенетика и полиморфизм генов при бронхиальной астме / Ж.Б. Испаева, А.Ж. Сарсенбаева, Р.Б. Бекмагамбетова // Вестник КазНМУ. - 2020. - №1. - С.316-321.

22. К вопросу о митохондриальной дисфункции при хронической обструктивной болезни легких / Ю.К. Денисенко, Т.П. Новгородцева, Т.И. Виткина и др. // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – Вып. 60. - С. 28-33.

23. Каллан, Р. Нейронные сети: Краткий справочник / Р. Каллан. - М.: Вильямс И.Д., 2017. - 288 с.

24. Камалтынова, Е.М. Сравнительная эпидемиологическая характеристика бронхиальной астмы по данным программы «Международное исследование астмы и аллергии у детей» (International Study of Asthma and Allergy in Childhood) / Е.М. Камалтынова, И.А. Деев, Е.Г. Белоногова // Бюллетень сибирской медицины. - 2009. - № 4. - С. 92- 97.

25. Клинико-генетические предикторы бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни лёгких / И.И. Черкашина, С.Ю. Никулина, Н.И. Логвиненко и др. – Красноярск: КрасГМУ, 2010. – 165 с.

26. Клинические рекомендации. Бронхиальная астма. Министерство здравоохранения Российской Федерации – URL: http://spulmo.ru/upload/kr_bronhastma_2019.pdf (Дата обращения: 12.07.2019).

27. Козинец, Г.И. Исследование системы крови в клинической практике /

Г.И. Козинец, В.А. Макарова. - М.: Триада-Х, 1998. - 480 с.

28. Козинец, Г.И. Клетки крови и костного мозга / Г.И. Козинец. - М.: МИА, 2004. - 203 с.

29. Козлов, В.К. Бронхиальная астма и персистенция цитомегаловируса у детей // В.К. Козлов, Е.Н. Супрун, М.В. Ефименко - Хабаровск: Арно, 2012. - 128 с.

30. Комплексное исследование химического состава бурых водорослей белого моря / К.Г. Боголицын, П.А. Каплицин, Н.В. Ульяновский, О.А. Пронина // Химия растительного сырья. - 2012. - № 4. - С. 153-160.

31. Конищева, А.Ю. Вирусы семейства Herpesviridae и аутореактивность у больных бронхиальной астмой / А.Ю. Конищева, В.Б. Гервазиева // Рос. иммунол. журн. – 2019. -№ 22 (2-1). – С. 320–322.

32. Ляпина, С.А. Реактивные изменения нейтрофилов при бронхолегочных заболеваниях / С.А. Ляпина, Г.Г. Федотова // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 6. – С. 66.

33. Матишов, Г.Г. Промысловые и перспективные для использования водоросли и беспозвоночные Баренцева и Белого морей. - Апатиты : КНЦ РАН, 1998. - 628 с.

34. Морфофункциональное состояние митохондрий клеток крови при бронхиальной астме / Ю.К. Денисенко, Т.П. Новгородцева, Е.В. Кондратьева и др. // Клиническая медицина. – 2015. - Вып. 93, №. 10. – С. 47-51.

35. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». — 5-е изд., перераб. и доп. — Москва: Оригинал-макет, 2017. — 160 с.

36. Национальная программа «Недостаточность витамина D у детей и подростков Российской Федерации: современные подходы к коррекции» / Союз педиатров России и др. - М.: ПедиатрЪ, 2018. - 96 с.

37. Нейронные сети для прогнозирования динамики развития заболеваний. / А.Г. Хасанов, Д.Г. Шайбаков, С.В. Жернаков и др. // Креативная хирургия и онкология. – 2020. - №10 (3). – С. 198-204.

38. О состоянии службы охраны здоровья женщин и детей в Хабаровском крае (статистические материалы) 2020. – URL: <https://miac.medkhv.ru/federal-reports> (Дата обращения: 15.03.2021).

39. Особенности легкой бронхиальной астмы в России: результаты исследования SYGMA2. От имени российских исследователей SYGMA2 / З.Р. Айсанов, С.Н. Авдеев, В.В. Архипов и др. // Терапевтический архив. – 2021. – Т. 93, № 4. – С. 449–455.

40. Особенности цитокинового профиля у больных бронхиальной астмой в сочетании с ожирением / М.В. Антонюк, Т.А. Гвозденко, Т.П. Новгородцева и др. // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20, № 6. - С. 913-920.

41. Патогенетические особенности мембранных нарушений иммунокомпетентных клеток при сочетанном течении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких / Ю.К. Денисенко, Т.П. Новгородцева, М.В. Антонюк и др. // Пульмонология. – 2018. - № 28 (6). - С. 647–654.

42. Полиморфизмы генов Toll-подобных рецепторов, ассоциированные с наследственной отягощенностью и возрастом манифестации бронхиальной астмы. / К.А. Руденко, А.Р. Тугуз, Е.Н. Анохина, Д.В. Муженя // Иммунология. – 2014. – Т. 35, № 3. – С. 160-163.

43. Потапова, Н.Л. Ассоциация полиморфизма гена VDR и вентиляционного баланса при бронхиальной астме / Н.Л. Потапова, И.Н. Гаймоленко, Н.Н. Страмбовская // Сибирское медицинское обозрение. – 2020. - № 1. – С. 20-26.

44. Потапова, Н.Л. Клиническое значение полиморфизма гена рецептора витамина Д при бронхиальной астме у детей / Н.Л. Потапова, А.И. Марковская, И.Н. Гаймоленко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2021. - Вып. 80. - С. 51–56.

45. Просекова, Е.В. Полиморфизм генов, спонтанная и индуцированная продукция клетками периферической крови интерлейкина 4 и интерферона гамма при бронхиальной астме у детей / Е.В. Просекова, М.С. Долгополов, В.А. Сабыныч // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2020. - № 4 (1). – С. 10-14.

46. Пульмонология. Национальное руководство. Краткое издание ; под ред.

А. Г. Чучалина. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 800 с.

47. Ревич, Б.А. Риски здоровью российского населения от погодных экстремумов в начале XXI в. Часть 1. Волны жары и холода / Б.А. Ревич, Е.А. Григорьева // Проблемы анализа риска. - 2021. - Т. 18, № 2. - С. 12-33.

48. Рутковская, Д. Нейронные сети, генетические алгоритмы и нечеткие системы / Д. Рутковская, М. Пилиньский, Л. Рутковский. - М.: РиС, 2013. - 384 с.

49. Рябова, Л.В. Местные и системные иммунные механизмы хронического воспаления у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести / Л.В. Рябова, А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков // Медицинская иммунология. - 2009. - Т. 11, № 2-3. - С. 169-176.

50. Семенова, Е.В. Использование морских водорослей в медицине и фармации / Е.В. Семенова, А.С. Билименко, В.В. Чеботок // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 5. – С. 118.

51. Симбирцев, А.С. Цитокины в иммунопатогенезе аллергии / А.С. Симбирцев // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2021. - № 5 (1). – С. 32-37.

52. Смольникова, М.В. Полиморфизм генов цитокинов при атопической бронхиальной астме / М.В. Смольникова, С. В. Смирнова, О. С. Тютинина // Сибирское медицинское обозрение. - 2013. - № 2 (80). – С. 3-9.

53. Современные методы оценки функционального состояния митохондрий / Г.А. Фрелих, Н.Ю. Поломеева, А.С. Васильев, В.В. Удут // Сибирский медицинский журнал. - 2013. - Т. 28, № 3. - С. 7-13.

54. Стандартизированные эпидемиологические исследования аллергических заболеваний у детей. Адаптация программы «Международное исследование астмы и аллергии у детей («ISAAC»)» в России : пособие для врачей ; под ред. акад. РАМНА.Г. Чучалина. – М., 1998. – 30 с.

55. Супрун, Е.Н. Обоснование необходимости целенаправленной терапии цитомегаловируса у детей с бронхиальной астмой / Е.Н. Супрун, В.К. Козлов // Медицинская иммунология. - 2013. - Т. 15, № 3. - С. 269-276.

56. Супрун, С.В. Анемические состояния у беременных женщин (клинико-патогенетические аспекты, исходы) / С.В. Супрун, В.К. Козлов. - Хабаровск:

Арно, 2013. - 305 с.

57. Супрун, С.В. Морфологическая характеристика эритроцитов у беременных женщин Приамурья / С.В. Супрун, В.К. Козлов, Т.В. Пивкина, // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2009. – Т. 39-40, № 4-5. – С. 189-191.

58. Титова, О.Н. Динамика показателей заболеваемости и смертности от бронхиальной астмы взрослого населения Северо-Западного федерального округа / О.Н. Титова, В.Д. Куликов // Медицинский альянс. – 2021. – Т. 9, № 3. - С. 31-39.

59. Уровень контроля бронхиальной астмы и приверженность терапии у пациентов молодого возраста / Н.М. Леонтьева, И.В. Демко, Е.А. Собко, О.П. Ищенко // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2020 – Т. 4, № 4. - С. 180-185.

60. Чернышева, О.Е. Клинико-иммунологические особенности бронхиальной астмы у детей, протекающей на фоне персистирующих внутриклеточных инфекций / О.Е. Чернышева // Здоровье ребенка. – 2015. - № 1 (60). – С. 69-76.

61. Шевченко, А.В. Особенности полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов IL1, IL4, IL5, IL6, IL10 и TNF- α у европеоидного населения Западной Сибири / А.В. Шевченко, О.В. Голованова, В.И. Коненков // Иммунология. – 2010. – № 4. – С. 176-181.

62. Шувалова, Ю.А. Вклад полиморфизмов генов системы интерлейкина-6 в развитие атеросклероза / Ю.А. Шувалова, С.А. Москаленко, А.И. Каминный // Атеросклероз и дислипидемии. – 2020. - № 4 (41). – С. 5–11.

63. Шуматова, Т.А. Роль генов второй фазы детоксикации ксенобиотиков в патогенезе мультифакториальных заболеваний / Т.А. Шуматова, Д.В. Коваленко // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2021. - № 4. – С. 16–20.

64. Эколого-этнические особенности микроэлементного статуса крови у беременных женщин Приамурья / С.В. Супрун, Г.П. Евсеева, О.С. Кудряшова и др. // Микроэлементы в медицине. - 2021. - № S1. - С. 65-66.

65. Яхьяева, Г.Э. Нечеткие множества и нейронные сети : учебное пособие / Г.Э. Яхьяева. - М.: БИНОМ. ЛЗ, ИНТУИТ.РУ, 2012. - 316 с.

66. A case-control study of innate immunity pathway gene polymorphisms in

Puerto Ricans reveals association of toll-like receptor 2 +596 variant with asthma. / M.G. Ortiz-Martinez, O. Frias-Belen, S. Nazario-Jimenez et al. // BMC Pulm Med. - 2016. - № 16. - P. 112.

67. Advances and recent developments in asthma in 2020 / L. Cevhertas, I. Ogulur, D.J. Maurer et al. // Allergy. – 2020. - № 75. – P. 3124–3146.

68. Airway wall thickness of allergic asthma caused by weed pollen or house dust mite assessed by computed tomography / Liu Liping, Li Guangrun, Yuemei Sun et al. // Respiratory Medicine. – 2015. - Vol. 09, № 3. – P. 339-346.

69. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Guidelines – 2016 Revision / J.L. Brożek, J. Bousquet, I. Agache et al. // Journal of Allergy and Clinical Immunology. - 2017. - Vol. 140 (4) – P. 950-958.

70. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis / T. Aoki, T. Hirota, M. Tamari et al. // J. Hum Genet. – 2006. – Vol. 51, № 8. – P. 677-685.

71. Analysis of Peripheral B Cell Subsets in Patients With Allergic Rhinitis / J. Luo, H. Guo, Z. Liu et al. // Allergy Asthma Immunol Res. – 2018. - № 10 (3). - P. 236-243.

72. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds / M.C. Rosha de Souza, C.T. Marques, C.M. Guerra Dore et al. // Journal of Applied Physiology. - 2007. - Vol. 19.- P. 153–160.

73. Asociación del déficit grave de vitamina D con la función pulmonar y el control del asma / S. Beyhan-Sagmen, O. Baykan, B. Balcan, B. Ceyhan // Arch Bronconeumol. – 2017. - № 53. - P. 186–191.

74. Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in the toll-like receptor 4 and the susceptibility of allergic asthma. / R.M. Liu, J.M. Wu, T. Cui, Y. Li // Chin J Microbiol Immunol. - 2005. - № 25. – P. 94–97.

75. Assessment of Trace Elements Status in Bronchial Asthma International / Neeru Bhaskar, Shikha Mahajan, Jeevan Bhandari et al. // Journal of Research & Review. – 2019. - Vol. 6, № 1. – P. 109- 114.

76. Association between tumor necrosis factor- α rs1800629 polymorphism and

risk of asthma: a meta-analysis. / G. Yang, J. Chen, F. Xu et al. // PLoS One. – 2014. - Vol. 17, № 9 (6). - P. e99962.

77. Association of cytokine gene polymorphisms with bronchial asthma in Macedonians. / D. Trajkov, J. Mirkovska-Stojkovikj, T. Arsov et al. // Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2008. – Vol. 7, № 3. – P. 143-156.

78. Association of Gene Polymorphisms in Interleukin 6 in Infantile Bronchial Asthma / E. Babusikova, J. Jurecekova, M. Jesenak, A. Evinova // Archivos de Bronconeumología (English Edition). – 2017. – Vol. 53, № 7. – P. 381-386.

79. Association of Interleukin-12A rs568408 with Susceptibility to Asthma in Taiwan / T.C. Shen, C.W. Tsai, W.S. Chang et al. // Sci Rep. – 2017. - № 7. – P. 3199.

80. Association of polymorphisms in TLR2 and TLR4 with asthma risk: An update meta-analysis. / J. Zhao, H. Shang, X. Cao et al. // Medicine (Baltimore). – 2017 – Vol. 96, № 35. – P. e7909.

81. Association of TNF- α G-308 a Promoter Polymorphism with the Course and Out-come of COVID-19 Patients / A. Saleh, A. Sultan, M. Elashry et al. // Immunological Investigations. – 2020. doi: 10.1080/08820139.2020.1851709.

82. Association of Toll-like receptor 2 gene polymorphisms with lung function in workers in swine operations / Z. Ann. Gao, J.A. Dosman, D.C. Rennie et al. // Allergy Asthma Immunol. – 2013. - № 110. – P. 44-50.

83. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha 308 G/A Polymorphism with Asthma in Pakistani Population. / N. Saba, O. Yusuf, S. Rehman et al. // Iran J Allergy Asthma Immunol. – 2015. - № 14 (3). – P. 287-291.

84. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. / H.D. Shin, B.L. Park, L.H. Kim et al. // Hum Mol Genet. – 2004 - Vol. 15, № 13 (4). - P. 397-403.

85. Associations Between Glutathione-S-Transferase Genotypes and Bronchial Hyperreactivity Patients With Di-isocyanate Induced Asthma. A Follow-Up Study / J. Leppilahti, M-L. Majuri, T. Sorsa et al. // Front. Med. – 2019. - № 6. – P. 220.

86. Associations of IL-18 and IL-9 expressions and gene polymorphisms with asthma / L.-X. CHEN, C.-M. XU, F. GAO et al. // European Review for Medical and

Pharmacological Sciences. – 2020. - № 24. – P. 6931-6938.

87. Asthma and rhinitis have different genetic profiles for IL13, IL17A and GSTP1 polymorphisms / E.P. Resende, A. Todo-Bom, C. Loureiro et al. // *Rev Port Pneumol.* – 2017. - № 23 (1). – P. 10-16.

88. Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis und atopischer Dermatitis bei Salzburger Schulkindern [Prevalence and severity of bronchial asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis in Salzburg school children] / W. Eder, A. Gamper, G. Oberfeld et al. // *Wien Klin Wochenschr.* – 1998. - Oct 16. - № 110 (19). – P. 669-677.

89. Asthma control is associated with economic outcomes, work productivity and health-related quality of life in patients with asthma. / L.K. Lee, K. Ramakrishnan, G. Safiotti et al. // *BMJ Open Respir Res.* – 2020 - № 7 (1). - P. e000534.

90. Asthma, rhinitis and eczema in Maltese 13-15 year-old schoolchildren - prevalence, severity and associated factors [ISAAC]. International Study of Asthma and Allergies in Childhood / S. Montefort, H.M. Lenicker, S. Caruna, H. Agius Muscat // *Clin Exp Allergy.* – 1998. – Sep.28, № 9. – P.1089-1099.

91. Atopic cough and fungal allergy / H. Ogawa, M. Fujimura, N. Ohkura, K. Makimura // *J Thorac Dis.* – 2014. - № 6 (S7). – P. 689-698.

92. Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case-control study. / L. Smit, S. Bongers, H. Ruven et al. // *Clin Exp Allergy.* – 2007. - № 37. – P. 1602–1608.

93. Attempted replication of 50 reported asthma risk genes identifies a SNP in RAD50 as associated with childhood atopic asthma. / W. Murk, K. Walsh, L.I. Hsu et al. // *Hum Hered.* – 2011. - № 71 (2). - P. 97-105.

94. Bart, N. Lambrecht The Cytokines of Asthma. / Bart N. Lambrecht, Hamida Hammad, John V. Fahy // *Immunity.* - 2019. – Vol. 50, № 4. - P. 975-991.

95. Bragina, E.Yu. Genetics of «atopic march» syntropy / E.Yu. Bragina, M.B. Freidin, V.P. Puzyrev // *Siberian Scientific Medical Journal.* – 2020. -№ 40 (5). – P. 4–17.

96. Branchett, W. Regulatory cytokine function in the respiratory tract / W. Branchett, C. Lloyd // *Mucosal Immunol.* – 2019. - № 12 (3). – P. 589–600.

97. Brightling, C. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma / C. Brightling, M. Berry, Y. Amrani // *J Allergy Clin Immunol.* – 2008. - № 121 (1). – P. 5-12.
98. Bronchial epithelium in children: a key player in asthma / A. Carsin, J. Mazenq, A. Ilstad et al. // *European Respiratory Review Jun.* – 2016. - № 25 (140). – P. 158-169.
99. Bronchoconstriction triggered by breathing hot humid air in patients with asthma / J. Don Hayes, P.B. Collins, M. Khosravi et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2012. - № 185 (11). – P. 1190–1196.
100. CARD15 and TLR4 genes polymorphisms in atopic bronchial asthma. / O.E. Voron'ko, E.V. Dmitrieva-Zdorova, E.A. Latysheva et al. // *Mol Biol (Mosk).* - 2011. - № 45. – P. 831–839.
101. CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. / L.A. Smit, V. Siroux, E. Bouzigon et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2009 - № 179 (5). – P. 363-368.
102. Chen M. Lower Circulating Zinc and Selenium Levels Are Associated with an Increased Risk of Asthma: Evidence from a Meta-Analysis / M. Chen, Y. Sun, Y. Wu // *Public Health Nutrition.* – 2020. -Vol. 23, №. 9. - P. 1555–1562.
103. Chung, K.F. Asthma Insights and Realities in Europe, Difficult-to-Treat Severe Asthma / K.F. Chung, E.H. Bel, S.E. Wenzel // *European Respiratory Society Monograph*, 2011. – Vol. 51. – 310 p.
104. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma / A. Yokoyama, N. Kohno, S. Fujino et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 1995. - № 151 (5). – P. 1354-1358.
105. Circulating levels of soluble interleukin-6 receptor in patients with bronchial asthma / A. Yokoyama, N. Kohno, K. Sakai et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 1997. - № 156 (5). – P. 1688-1691.
106. Cleavage of fibrinogen by proteinases elicits allergic responses through Toll-like receptor 4/ V.O. Millien, W. Lu, J. Shaw et al. // *Science.* – 2013. - № 341. – P. 792–796.

107. Cooking fuels and prevalence of asthma: a global analysis of phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) for the ISAAC Phase Three Study Group / GWK Wong, B. Brunekreef, P. Ellwood et al. // *Lancet Resp Med* – 2013. - Vol 1. - P. 386-394.

108. Cytokine gene polymorphism and asthma susceptibility, progress and control level. / S. Daneshmandi, A.A. Pourfathollah, Z. Pourpak et al. // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39, № 2. – P. 1845-1853.

109. Cytology and molecular study for GSTP1 effect on asthma Iraqi patients / I.H. Hamzah, F.A.A. Shafi, S.A.H. Al Sharqi et al. // *Clin Mol Allergy.* – 2019. - № 17. – P. 4.

110. Davis, R.E Respiratory hospital admissions and weather changes: a retrospective study in Charlottesville, Virginia, USA / R.E. Davis, K.B. Enfield // *Int J Biometeorol.* - 2018. - № 62 (6). – P. 1015–1025.

111. de Freitas, C.R. Role of acclimatization in weather related human mortality during the transition seasons of autumn and spring in a thermally extreme mid-latitude continental climate / C.R. de Freitas, E.A. Grigorieva // *Int J Environ Res Public Health.* – 2015. - № 12 (12). – P. 14974–14987.

112. Development of a novel severe triple allergen asthma model in mice which is resistant to dexamethasone and partially resistant to TLR7 and TLR9 agonist treatment / M.J. Duechs, C. Tilp, C. Tomsic et al. // *PLoS One.* – 2014. - Vol. 9 (3). – P. e91223.

113. Differential association of tumour necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphism (-308) with tuberculosis and bronchial asthma / V. Kumar, R. Khosla, V. Gupta et al. // *Indian J. Med. Sci.* – 2008. – Vol. 62, № 8. – P. 323-330.

114. Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immuno-metabolism / A. Angajala, S. Lim, J.B. Phillips et al. // *Front. Immunol.* – 2018. - Vol. 9. – P. 1605.

115. Douglas, G. Asthma / G. Douglas, K.S. Elward. – London: Manson Pub, 2010. – 176 p.

116. Effect of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms on work-related respiratory symptoms and sensitization to wheat flour in bakery workers / H.J. Cho, S.H. Kim,

J.H. Kim et al. // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2011. - № 107. – P. 57–64.

117. Effects of ambient pollen concentrations on frequency and severity of asthma symptoms among asthmatic children / C.T. DellaValle, E.W. Triche, B.P. Leaderer, M.L. Bell // *Epidemiology.* – 2012. - № 23 (1). – P. 55-63.

118. Effects of IL-6 Polymorphisms on Individual Susceptibility to Allergic Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. / Y. Yang, J. Xiao, L. Tang et al. // *Front. Genet.* – 2022. - № 13. – P. 822091.

119. Effects of Single-Nucleotide Polymorphisms in the TLR7 and TLR9 Genes of Asthmatic Children. / L. Shan, P. Hou, X. Kang, Y. Shang // *Ann Clin Lab Sci.* – 2018. - № 48 (5). – P. 601-607.

120. Elevated Toll-Like Receptor-Induced CXCL8 Secretion in Human Blood Basophils from Allergic Donors Is Independent of Toll-Like Receptor Expression Levels. / M. Steiner, T. Hawranek, M. Schneider et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11 (2) – P. e0149275

121. Epidemiology of comorbidities and their association with asthma control / G. Tomisa, A. Horváth, B. Sánta et al. // *Allergy Asthma Clin Immunol.* – 2021. - № 17. – P. 95.

122. Epigenetic changes in B lymphocytes associated with house dust mite allergic asthma / M. Pascual, M. Suzuki, M. Isidoro-Garcia et al. // *Epigenetics.* – 2011. - № 6 (9). – P. 1131-1137.

123. Estimation of serum immunoglobulin E level in asthma and its correlation with Epstein Barr Virus (EBV) infection / Younis, Alaa & Al-Hamadany, Alaa & Mahdy, Alaa // *Tikrit Journal of Pure Science* - 2018. – Vol. 23 (9). – P. 12-15.

124. Exposure to Human Herpes Virus Type 6 Protects Against Allergic Asthma in Mice / A. Svensson, N. Almqvist, A.G. Chandy et al. // *J Aller Ther.* – 2010. - № 1. – P. 101.

125. Fungi and pollen exposure in the first months of life and risk of early childhood wheezing / K.G. Harley, J.M. Macher, M. Lipsett et al. // *Thorax.* – 2009. – Vol. 64. – P. 353-358.

126. Gene polymorphisms of IL-6–174 G/C and IL-1Ra VNTR in asthmatic

children. / A. Settin, M. Zedan, M. Farag et al. // *Indian J Pediatr.* - 2008. - № 75. - P. 1019–1023.

127. Gene polymorphisms of tumor necrosis factor alpha-308 and interleukin-10-1082 among asthmatic Egyptian children / M. Zedan, A. Settin, M. K. Farag et al. // *Allergy Asthma Proc.* – 2008. – Vol. 29, № 3. – P. 268-273.

128. Genetic polymorphisms of the TNF- α -308G/A are associated with metabolic syndrome in asthmatic patients from Hebei province, China. / Y.H. Yang, Y.Q. Liu, L. Zhang et al. // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015 - Vol. 1, № 8 (10). - P. 13739-13746.

129. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / R. Lozano M. Naghavi, K. Foreman et al. // *Lancet.* – 2012. - № 380 (9859). - P. 2095–2128.

130. Global initiative for Asthma. Global strategy for Asthma Management and Prevention 2020. - URL: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_-final-_wms.pdf. (Дата обращения: 05.04.2020).

131. Glushkova, A.V. Revalence and Correlates of Asthma Among Children in Central St. Petersburg, Russia: Cross-sectional Study / A.V. Glushkova, A.M. Grjibovski // *Croat Med Journal* – 2008 – Vol. 49 – P. 741-750.

132. Glutathione S-transferase polymorphisms, asthma susceptibility and confounding variables: a meta-analysis / S. Piacentini, R. Polimanti, I. Simonelli et al. // *Mol. Biol. Rep.* – 2013. - № 40 (4). - P. 3299-3313.

133. Glutathione S-transferases and their implications in the lung diseases asthma and chronic obstructive pulmonary disease: Early life susceptibility? / C. van de Wetering, E. Elko, M. Berg et al. // *Redox Biology.* – 2021. – Vol. 43. - P. 2213-2317.

134. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data / C. Minelli, R. Granell, R. Newson et al. // *Int. J. Epidemiol.* – 2010. - № 39 (2). – P. 539-562.

135. Grigorieva, E.A. Cardiorespiratory morbidity caused by seasonal weather changes and measures for its prevention / E.A. Grigorieva, L.P. Kityantseva // *Health*

Nation Life Environ. – 2006. - № 2 (275). – P. 7–10.

136. Grigorieva, E.A. Temporal dynamics of precipitation in an extreme mid-latitude monsoonal climate / E.A. Grigorieva, C.R. de Freitas // *Theor Appl Climatol.* – 2014. - № 116 (1). – P. 1–9.

137. Hall, S.C. Vitamin D and Bronchial Asthma: An Overview of Data From the Past 5 Years / S.C. Hall, D.K. Agrawal // *Clin Ther.* – 2017. - № 39 (5). - P. 917-929.

138. Hameed, R.M. Specific IL-5 snp is associated with high serum IL-5 levels and higher eosinophil counts among iraqi asthmatic children / R.M. Hameed, M.M. Ahmed, H.A. Abood // *Biomed Biotechnol Res J.* – 2019. - № 3. – P. 156-161.

139. High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age / T. Reponen, S. Vesper, L. Levin et al. // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2011. - № 107. – P. 120-126.

140. Huber, M. Change of paradigm: CD8+ T cells as important helper for CD4+ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis / M. Huber, M. Lohoff // *Allergo J Int.* – 2015. - № 24 (1). – P. 8-15.

141. Humphries. Interleukin-6 –174G>C Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease in West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) / F. Basso, D.O. Gordon Lowe, A. Rumley et al. // *Arter Thromb Vasc Biol.* – 2002. - № 22. – P. 599–604.

142. IL10 rs1800872 Is Associated with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Exacerbated Respiratory Disease in Mexican-Mestizo Patients. / G.F. Pavón-Romero, G. Pérez-Rubio, F. Ramírez-Jiménez et al. // *Biomolecules.* – 2020. - № 10 (1). - P. 104.

143. IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma / I. Meyts, P.W. Hellings, G. Hens // *J Immunol.* – 2006. - № 177 (9). – P. 6460-6470.

144. IL-7 plays a critical role for the homeostasis of allergen-specific memory CD4 T cells in the lung and airways / Sm. Yeon, L. Halim, A. Chandele et al. // *Sci Rep.* – 2017. - № 7. – P. 11155.

145. IL-8 Gene Variants and Expression in Childhood Asthma / R. Charrad, W.

Kaabachi, A. Rafrafi et al. // *Lung*. – 2017. - № 195 (6). – P. 749-757.

146. Inal, A. Serum Interleukin-7 Levels In Patients With Allergic Asthma Keskin Goksal / A. Inal, U. Musabak, A Sengul // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2006 - Vol. 117, № 2 - P. 567-569.

147. Inflammatory cytokines (TNF(alpha) and IL1) polymorphisms in asthma. / T. Dhaouadi, I. Sfar, H. Aouadi et al. // *Revue Francaise d'Allergologie*. – 2011. - № 51. – P. 659–663.

148. Influence of Polymorphisms in the Interleukin-18 Gene on Allergic Rhinitis: A Meta-Analysis / P. Tharabenjasin, N. Pabalan, H. Jarjanazi, O. Poachanukoon // *Int Arch Allergy Immunol*. - 2020. - № 181. – P. 375-384.

149. Influence of the programmed cell death of lymphocytes on the immunity of patients with atopic bronchial asthma / Vodounon, Cyrille & Chabi, Christophe & Yulia et al. // *Allergy Asthma and Clinical Immunology*. - 2014. - № 10. doi:10.1186/1710-1492-10-14.

150. Inspiratory airflow limitation after exercise challenge in cold air in asthmatic children / J.M. Driessen, J. van der Palen, W.M. van Aalderen et al. // *Respir Med*. – 2012. - № 106. – P. 1362–1368.

151. Interleukin 10 -1082 G/A Gene Polymorphism and Susceptibility to Bronchial Asthma in Children: A Single-Center Study / M. Hanaa, E.I. Maghraby, A. Nagwan Ismail et al. // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2021. - Vol. 41 (10). – P. 385-390.

152. Interleukin 4 gene polymorphism (-589C/T) and the risk of asthma: a meta-analysis and met-regression based on 55 studies / A. Kousha, A. Mahdavi Gorabi, M. Forouzesht et al. // *BMC Immunol*. – 2020. - № 21. – P. 55.

153. Interleukin-10 gene -627 allele variants, not interleukin-I beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms, are associated with atopic bronchial asthma. / L.W. Hang, T.C. Hsia, W.C. Chen et al. // *J Clin Lab Anal*. – 2003. - № 17 (5). – P. 168-173.

154. Interleukin-10 promoter polymorphisms and asthma risk: A meta-analysis / W. Nie, Z. Fang, B. Li et al. // *Cytokine*. – 2012. - Vol. 60, № 3. – P. 849-855.

155. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and

asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines / P. Bradding, J.A. Roberts, K.M. Britten et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 1994. - № 10. – P. 471–480.

156. Interleukin-6 -174 G/C promoter gene polymorphism in nasal polyposis and asthma. / E.M. Kosugi, C.M. de Camargo-Kosugi, E.R. Hirai et al. // *Rhinology.* – 2013 - №51(1). – P. 70-76.

157. Interleukin-6 gene -174G/C polymorphism and bronchial asthma risk: a meta-analysis. / F. Li, X. Xie, S. Li et al. // *Int J Clin Exp Med.* – 2015. – Vol. 15. - № 8 (8). – P. 12601-12608.

158. Interleukin-7 gene polymorphism rs766736182 associates with the risk of asthma in children / J. Cao, L. Tian, Z. Li et al. // *J Clin Lab Anal.* – 2019. - № 33. – P. e22675.

159. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods / M. Asher, U. Keil, H. Anderson et al. // *European respiratory journal.* – 1995. – Vol. 8 (3). – P. 483-491.

160. Interventions for autumn exacerbations of asthma in children: a systematic review / M. Akhbari, D. Kneale, K.M. Harris, K.C. Pike // *Arch Dis Child.* – 2018. – Vol.103, № 1. - P. 188.

161. Is allergic sensitization relevant in severe asthma? Which allergens may be culprit? / C. Lombardi, E. Savi, E. Ridolo et al. // *World Allergy Organ J.* – 2017. - № 10 (1). – P. 2.

162. Jaakkola, M.S. Are atopy and specific IgE to mites and molds important for adult asthma? / M.S. Jaakkola, A. Ieromnimon, J.J. Jaakkola // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. - № 117. – P. 642-648.

163. Kabir, M.L. Asthma, atopic eczema and allergic rhino-conjunctivitis in school children / M.L. Kabir, F. Rahman, M.Q. Hassan // *Mymensingh Med J.* – 2005. - № 14(1). – P. 41-45.

164. Kadhim Yousif M., Impact of weather conditions on childhood admission for wheezy chest and bronchial asthma // M. Kadhim Yousif, AA. Al Muhyi // *Med J Islam Repub Iran.* – 2019. - № 33. – P. a89.

165. Kilpatric, D.C. Immunological aspects of the potential role of dietary carbohydrates and lectins in human health / D.C. Kilpatric // *Eur. J. Nutr.* - 1999. - Vol. 38. - P. 107-117.

166. Kim, J.H. Role of Natural Killer Cells in Airway Inflammation / J.H. Kim, Y.J. Jang // *Allergy Asthma Immunol Res.* – 2018. - № 10 (5). – P. 448-456.

167. Konishcheva, A. Immunological features of active herpesviral infection in bronchial asthma / A Konishcheva, V. Gervazieva // *European Respiratory Journal Sep.* – 2018. – Vol. 52 (62). – P. PA4470.

168. Kuti, B.P. Factors associated with childhood asthma control in a resource-poor center / B.P. Kuti, K.O. Omole, D.K. Kuti // *J Family Med Prim Care.* – 2017. - № 6 (2). – P. 222-230.

169. Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor alpha-308 polymorphism gene. / R. Louis, E. Leyder, M. Malaise et al. // *Eur Respir J.* – 2000. - № 16 (4). - P. 604-608.

170. Lack of association between atopic asthma and the tumor necrosis factor (alpha)-308 gene polymorphism in a Czech population. / D. Buckova, L. Izakovicova Holla, A. Vasku et al. // *J Investig Allergol Clin Immunol.* – 2002. - № 12. - P. 192–197.

171. Lack of association between toll like receptor-2 and toll like receptor-4 gene polymorphisms and other feature in Iranian asthmatics patients. / H. Bahrami, S. Daneshmandi, H. Heidarnazhad et al. // *Iran J Allergy Asthma Immunol.* - 2015. - № 14. – P. 48–54.

172. Lack of association of HLA class I genes and TNF alpha-308 polymorphism in toluene diisocyanate-induced asthma. / B. Beghé, M. Padoan, C.T. Moss et al. // *Allergy.* – 2004. - № 59 (1). - P. 61-64.

173. Lee, B.L. Trafficking of endosomal toll-like receptors / B.L. Lee, G.M. Barton // *Trends Cell Biol.* – 2014. - № 24. – P. 360–369.

174. Li, Fangwei Interleukin-12B gene polymorphisms and bronchial asthma risk: A meta-analysis / Li Fangwei, Zhu Yanting, Xie Xinming // *Journal of Asthma.* – 2017. - № 54 (8). – P. 777-783.

175. Lin, T.J. Interactions Between Bisphenol A Exposure and GSTP1 Polymorphisms in Childhood Asthma / T.J. Lin, W.J. Karmaus, M.L. Chen // *Allergy Asthma Immunol Res.* – 2018. - № 10 (2). – P. 172-179.

176. Lourenço, O. Human CD8⁺ T Cells in Asthma: Possible Pathways and Roles for NK-Like Subtypes. / O. Lourenço, A.M. Fonseca, L. Taborda-Barata // *Front. Immunol.* – 2016. - № 7. – P. 638.

177. Lung virome: New potential biomarkers for asthma severity and exacerbation / S. Choi, K.H. Sohn, J.W. Jung et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* - 2021. - № 148 (4). – P. 1007-1015.

178. Lytvynets, L.Y. Gene polymorphism of xenobiotic detoxification in children with bronchial asthma / L.Y. Lytvynets // *Wiad Lek.* – 2017. - № 70 (3 pt 2). – P. 558-560.

179. Mahdaviani, S.A. Interleukin 9 serum level and single nucleotide polymorphism in patients with asthma / S.A. Mahdaviani, M. Eskian, M. Khorasanizadeh // *Acta Biomed.* – 2021. - № 92 (3). – P. e2021206.

180. Mandić, Z. Low levels of immunoglobulin A in children with intrinsic asthma: a possible protection against atopy / Z. Mandić, M. Marusić, M. Boranić // *Med Hypotheses.* – 2004. - № 62 (4). – P. 600-604.

181. Martín Fernández-Mayoralas, D. Asociación entre dermatitis atópica, rinitis alérgica y asma en escolares de 13 y 14 años [Association between atopic dermatitis, allergic rhinitis and asthma in schoolchildren aged 13-14 years old] / D. Martín Fernández-Mayoralas, J.M. Martín Caballero, L. García-Marcos Alvarez // *An Pediatr (Barc).* – 2004. - № 60 (3). – P. 236-242.

182. Meta-analysis of vitamin D and lung function in patients with asthma / J. Liu, Y.Q. Dong, J. Yin et al. // *Respir Res.* – 2019. - № 20. – P. 161.

183. Mold burden in house dust and its relationship with asthma control / M.P. Segura, M. H. Vargas, José M. R. Aguilar et al. // *Respiratory Medicine.* – 2019. - № 150. – P. 74–80.

184. Molecular Regulation of Toll-like Receptors in Asthma and COPD / Li Zuo, Kurt Lucas, A. Fortuna Christopher et al. // *Frontiers in Physiology.* – 2015. - Vol. 6. -

P. 312.

185. Moraes, T.J. Epidemiology of Asthma and Influence of Ethnicity / T.J. Moraes, M.R. Sears, P. Subbarao // *Semin Respir Crit Care Med.* – 2018. – Vol. 39 (1). – P. 3-11.

186. Nasser M.Z. Association of -308G/A Polymorphism and Serum Level of TNF- α with Bronchial asthma in Children. / M.Z. Nasser, D.A. Ezzat // *Egypt J Immunol.* – 2018. - № 25 (2). - P. 117-124.

187. Nguyen-Thi-Dieu, T. The profile of leucocytes, CD3+, CD4+, and CD8+ T cells, and cytokine concentrations in peripheral blood of children with acute asthma exacerbation / T. Nguyen-Thi-Dieu, H. Le-Thi-Thu, S. Duong-Quy // *J Int Med Res.* – 2017 - № 45 (6). – P. 1658-1669.

188. NHWS-National Health and Wellness Survey. - URL: <https://www.kantarhealth.com/docs/datasheets/kh-national-health-and-wellness-survey.pdf>. (Дата обращения: 15.04.2019).

189. Norback, D. Endotoxin, ergosterol, fungal DNA and allergens in dust from schools in Johor Bahru, Malaysia- associations with asthma and respiratory infections in pupils / D. Norback, P. Markowicz, G.H. Cai // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (2). – P. e88303.

190. Ohiolei, J. A. A review of soil transmitted helminthiasis in Nigeria / J.A. Ohiolei, C. Isaac, O. A. Omorodion // *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* – 2017. - № 7 (12). – P. 841-848.

191. Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods / S.K. Weiland, B. Björkstén, B. Brunekreef et al. // *Eur Respir J.* – 2004. - № 24. – P. 406–412.

192. Piras, V. Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling / V. Piras, K. Selvarajoo // *Frontiers in Immunology.* - 2014. - № 5. – P. 70.

193. Polymorphism RS2227306 In The Interleukin 8 Gene and Its Relation to Bronchial Asthma: Review Article / S.F. Mohamed Hafez, O.T. Amer, O.A. Elaziz Mostafa, W. Mohamed Samy // *The Egyptian Journal of Hospital Medicine.* – 2022. - Vol. 86. – P. 50-53.

194. Polymorphisms in the toll-like receptor 2 subfamily and risk of asthma: a case-control analysis in a Chinese population / F.H. Qian, Q. Zhang, L.F. Zhou et al. // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* - 2010. - № 20. – P. 340–346.

195. Polymorphisms in toll-like receptor 4 gene are associated with asthma severity but not susceptibility in a Chinese Han population / Q. Zhang, F. H. Qian, L.F. Zhou et al. // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2011. - № 21. – P. 370–377.

196. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. / A. Carvalho, A. Pasqualotto, L. Pitzurra et al. // *J Infect Dis.* - 2008. - №197. – P. 618–621.

197. Prescott, S.L. Allergy takes its toll: the role of Toll-like receptors in allergy pathogenesis / S.L. Prescott // *World Allergy Organ J.* – 2008. - Vol. 1, № 1. - P. 4-8.

198. Prevalence and potential risk factors of rhinitis and atopic eczema among schoolchildren in Vientiane capital, Lao PDR: ISAAC questionnaire / O. Phathamavong, M. Ali, A. Phengsavanh et al. // *Biosci Trends.* – 2008. – № 2 (5). – P. 193-199.

199. Prevalence and risk factors of asthma and allergic diseases in primary schoolchildren living in Bushehr, Iran: phase I, III ISAAC protocol / S. Farrokhi, M. K. Gheybi, A. Movahhed et al. // *Iran J Allergy Asthma Immunol.* – 2014. - № 13 (5). – P. 348-355.

200. Prevalence and severity of symptoms of asthma, allergic rhino-conjunctivitis and atopic eczema in secondary school children in Ibadan, Nigeria / A.G. Falade, F. Olawuyi, K. Osinusi, B.O. Onadeko // *East Afr Med J.* – 1998. - № 75 (12). – P. 695-698. PMID: 10065208.

201. Prevalence of asthma and allergic rhinitis among school children of Karachi, Pakistan, 2007 / S. M. Hasnain, M. Khan, A. Saleem, M. A. Waqar // *J Asthma.* – 2009. - № 46 (1). – P. 86-90.

202. Prevalence of asthma and other allergic disorders among schoolchildren in Diyarbakir, Turkey / A. Ece, A. Ceylan, Y. Saraçlar et al. // *Turk J Pediatr.* – 2001. - № 43 (4). – P. 286-292.

203. Prevalence of asthma in children and adolescents in a city in the Brazilian Amazon region / A.M. Rosa, E. Ignotti, S.S. Hacon, Castro // *Journal Brasil*

Pneumology. - 2009 – Vol. 35 (1) – P. 7-13.

204. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema symptoms in rural and urban school-aged children from Oropeza Province - Bolivia: a cross-sectional study / M.T. Solis Soto, A. Patiño, D. Nowak, K. Radon // BMC Pulm Med. – 2014. - № 10 (14). – P. 40.

205. Prevalence of childhood asthma and allergies in Serbia and Montenegro / Z. Zivković, Z. Vukašinović, S. Cerović et al. // World J Pediatr. – 2010. - № 6 (4). – P. 331-336.

206. Prevalence of childhood asthma, allergic rhinitis and eczema in Urumqi and Beijing / T. Zhao, H. J. Wang, Y. Chen et al. // J Paediatr Child Health. – 2000. - № 36 (2). – P. 128-133.

207. Prevalence of child-hood atopic diseases in the Western Province of Sri Lanka / N.D. Amarasekera, N.K. Gunawardena, N.R. de Silva, A. Weerasinghe // Ceylon Med J. – 2010. - № 55 (1). – P. 5-8.

208. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among adolescents living in urban and rural areas in different regions of Brazil / D. Solé, V.E. Cassol, A.R. Silva et al. // Allergol Immuno-pathol (Madr). – 2007. - № 35 (6). – P. 248-253.

209. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Iranian patients with asthma. / Mahdavian SA, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Amirzargar AA. // J Clin Immunol. – 2009. - № 29. - P. 57–62.

210. Quah, B.S. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema among schoolchildren in Kelantan, Malaysia / B.S. Quah, A.R. Razak, M.H. Hassan // Acta Paediatr Jpn. – 1997. - № 39 (3). – P. 329-335.

211. Rahimi Rad, M.H. Asthma and other allergic diseases in 13-14-year-old schoolchildren in Urmia, Iran [corrected] / M.H. Rahimi Rad, M.E. Hejazi, R. Behrouzian // East Mediterr Health J. – 2007. - № 13 (5). – P. 1005-1016.

212. Relation between Interleukin 8 and Bronchial Asthma in Children / S.F. Mohamed, F. Mohamed Abd-Elwahab, D. Mohamed Shokry, W. Mohamed-Samy // The Egyptian Journal of Hospital Medicine. – 2021. - Vol. 85 (2). – P. 3621-3623.

213. Relationship between biometeorological factors and the number of

hospitalizations due to asthma // A. Romaszko-Wojtowicz, I. Cymes, E. Dragańska et al. // *Sci Rep.* – 2020. - № 10 (1). – P. 9593.

214. Relationship between serum IgA level and allergy/asthma / Kim, Woo-Jin & Choi, Inseon & Kim et al. // *The Korean journal of internal medicine.* – 2017. - Vol. 32, № 1. – P. 137-145.

215. Relationship between toll-like receptor 2 Arg677Trp and Arg753Gln and toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphisms and cytomegalovirus infection / A. Jabłońska, E. Paradowska, M. Studzińska et al. // *International Journal of Infectious Diseases.* - 2014. - Vol. 25. - P. 11-15.

216. Role of interleukins 12B and 17A genetic variation in house dust mites allergy / A.M. Ammar, E.L. Zayyat, E.A. Khayyal et al. // *Egypt J Med Hum Genet.* – 2020. - № 21. – P. 60.

217. Role of TLR4 C>1196T (Thr399Ile) and TLR4 A>896G (Asp299Gly) polymorphisms in a North Indian population with asthma: a case-control study. / S. Sinha, J. Singh, S.K. Jindal et al. // *Int J Immunogenet.* – 2014. – № 41. - P. 463–471.

218. Role of viruses in asthma / T. Jartti, K. Bønnelykke, V. Elenius, W. Feleszko // *Semin Immunopathol.* – 2020. - № 42 (1). – P. 61-74.

219. Role of Vitamin D in Bronchial Asthma in Eastern India: A Case Control Study / Manjit Kumar Dhrubprasad, Rakhi Sanyal, Sagnik Dutta Sarma et al. // *J Res Med Dent Sci.* – 2020. - № 8 (7). – P. 318-321.

220. Selective IgA deficiency and the risk of asthma / C. Celani, A. M. Zicari, V. Lollobrigida et al. // *European Respiratory Journal.* – 2013. - № 42. – P. 3146.

221. Serum interleukin-18 expression in children with bronchial asthma / E.M. Hossny, S.S. El-Sayed, E.S. El-Hadidi, S.R. Moussa // *World Allergy Organ J.* – 2009. - № 2 (5). – P. 63-68.

222. Serum level of immunoglobulins in patients with respiratory allergic diseases. / R. Badrossadat, H. Bitar, G.S. Hamed et al. // *Frontiers in Immunology.* – 2013. - Vol. 4. – P. 3389.

223. Serum Levels of Trace Elements, Vitamin D and Oxidant Status in Children with Asthma / E. Akyüz Özkan, A.Y. Göçmen, Y. Küçükbağrıaçık, M. Akyüz // *J Basic*

Clin Health Sci. – 2019. - № 3. – P. 63-68.

224. Serum Vitamin D Levels and Vitamin D Supplement in Adult Patients with Asthma Exacerbation / T. Boonpiyathad, T. Chantveerawong, P. Pradubpongsa, A. Sangasapaviliya // *Journal of Allergy*. – 2016. - Vol.2016 — P. a4070635

225. Shaker, O.G. Impact of single nucleotide polymorphism in tumor necrosis factor- α gene 308G/A in Egyptian asthmatic children and wheezing infants. / O.G. Shaker, N.A. Sadik, N.A. El-Hamid // *Hum Immunol*. - 2013. - № 74 (6). - P. 796-802.

226. Shamssain, M.H. Prevalence and severity of asthma, rhinitis, and atopic eczema in 13- to 14-year-old schoolchildren from the northeast of England / M.H. Shamssain, N. Shamsian // *Ann Allergy Asthma Immunol*. – 2001. - № 86 (4). – P. 428-432.

227. Sharif, A. Association of 25-hydroxy vitamin D with asthma and its severity in children: a case–control study / A. Sharif, Haddad H. Kashani, M.R. Sharif // *Clin Mol Allergy*. – 2020. - № 18. – P. 7.

228. Short-term exposure to pollen and the risk of allergic and asthmatic manifestations: a systematic review and meta-analysis / M.A. Kitinoja, T.T. Hugg, N. Siddika et al. // *BMJ Open*. – 2020. - № 10. – e. 029069.

229. Song, Mao Association between trace elements levels and asthma susceptibility / Mao Song, Wu Liangxia, Shi. Wenjing // *Respiratory Medicine*. – 2018. - № 145. – P. 110–119.

230. Sun, S. Association of toll-like receptors polymorphisms with COPD risk in Chinese population. / S. Sun, Y. Shen, J. Feng // *Front. Genet*. – 2022 - № 1. – P. 955810.

231. Surveying the prevalence of asthma, allergic rhinitis and eczema in schoolchildren in Khon Kaen, Northeastern Thai-land using the ISAAC questionnaire: phase III / J. Teeratakulpisarn, S. Wiangnon, P. Kosalaraksa, S. Heng // *Asian Pac J Allergy Immunol*. – 2004. - № 22 (4). – P. 175-181.

232. Synergistic activation of pro-inflammatory type-2 CD8+ T lymphocytes by lipid mediators in severe eosinophilic asthma // B. Hilvering, T.S.C. Hinks, L. Stöger et al. // *Mucosal Immunol*. – 2018. – № 11. – P. 1408–1419.

233. TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation / S. Sehra, W. Yao, E. Nguyen et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2015. - № 136. – P. 433–440.

234. The –174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing / R. Giacconi, C. Cipriano, F. Albanese et al. // *Exp Gerontol.* – 2004. - № 39 (4). – P. 621–628.

235. The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation / Keqiang Chen, Yi Xiang, Xiaohong Yao et al. // *International Immunopharmacology.* – 2011. - Vol. 11, № 10. – P. 1391-1398.

236. The association between ambient temperature and childhood asthma: a systematic review / Xu, Zhiwei & Crooks, James & Davies et al. // *International Journal of Biometeorology.* - 2017. – Vol. 62 (3). – P. 471-481.

237. The challenges of replicating the methodology between Phases I and III of the ISAAC programmer and the ISAAC Phase III Time Trends Study Group / P. Ellwood, M.I. Asher, A.W. Stewart et al. // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2012. –Vol. 16, № 5. – P. 687–693.

238. The content of mediators of allergic inflammation in the blood serum of patients with atopic asthma, depending on the polymorphism 2258G/A gene TLR-2. / N.V. Lyakhovskaya, O.A. Shlykova, N.A. Bobrova et al. // *Астма та алергія.* – 2013. - № 3. – P. 24-29.

239. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on asthma phenotypes in adult Turkish asthma patients: a genetic study. / F. Sahin, P. Yildiz, A. Kuskucu et al. // *BMC Pulm Med.* – 2014. - № 14. – P. 20.

240. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on the occurrence of atopic and non-atopic asthma. / T. Zaborowski, K. Wojas-Krawczyk, P. Krawczyk et al. // *Adv Clin Exp Med.* – 2011. - № 4. – P. 13–21.

241. The functional status of neutrophils in patients with bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease, bronchial asthma with chronic obstructive pulmonary disease, and community-acquired pneumonia / G.B. Fedoseev, V.I. Trofimov, K.V. Negrutsa et al. // *J Lung Pulm Respir Res.* – 2018. - № 5 (2). – P. 51–63.

242. The interleukin-6 -147 G/C polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in young South African Indian men / A. Phulukdaree, S. Khan, P. Ramkaran et al. // *Metab Syndr Relat Disord.* – 2013. - № 11 (3). – P. 205–209.

243. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) // *EurRespir J.* – 1998. - № 12. - P. 315–335.

244. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): phase three rationale and methods / P. Ellwood, M.I. Asher, R. Beasley et al. // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2005. –Vol. 9, № 1. – P. 10–16.

245. The ISAAC Phase Two Study Group Dampness and moulds in relation to respiratory and allergic symptoms in children: re-sults from Phase Two of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC Phase Two) / G. Weinmayr, U. Gehring, J. Genuneit et al. // *Clinical & Experimental Allergy.* – 2013 - Vol 1. - P. 762-774.

246. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence / D. W. Denning, B. R. O'Driscoll, C. M. Hogaboam et al. // *European Respiratory Journal.* – 2006. - № 27 (3). - P. 615-626.

247. The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma / K.M. Beeh, F. Kannies, F. Wagner et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. - № 131. – P. 866–874.

248. The Prevalence of Asthma Symptoms in Elementary and Middle School Students in Kurdi-stan Province, the West of Iran / R. Nasiri Kalmarzi, A. Shekari, M. Tajik et al. // *International Jjournal of Pediatrics.* – 2016. – Vol. 4, № 2. - P. 1323-1330.

249. The Relation between Ambient Temperature and Asthma Exacerbation in Children: A Systematic Review / H.R. Shoraka, M. Taheri Soodejani, O. Abobakri, N. Khanjani // *J Lung Health Dis.* – 2019. - № 3 (1). - P. 1-9.

250. The Viral Protein A238L Inhibits TNF- α Expression through a CBP/p300 Transcriptional Coactivators Pathway1 / A.G. Granja, M.L. Nogal, C. Hurtado et al. // *The Journal of Immunology.* – 2006. - № 176. – P. 451-462.

251. Thomas, P.S. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma / P.S. Thomas, G. Heywood // *Thorax*. – 2002. - № 57. – P. 774–778.

252. Tiwary, M. Initiation and Pathogenesis of Severe Asthma with Fungal Sensitization / M. Tiwary, A.E. Samarasinghe // *Cells*. – 2021. - № 10 (4). – P. 9-13.

253. TLR2 Arg753Gln Gene Polymorphism Associated with Tuberculosis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis / Hu Lelin, Tao Huihui, Tao Xinrong et al. // *Bio-Med Research International*. – 2019. -Vol. 2019. – P. 1-9.

254. TLR2 Arg753Gln gene polymorphism associated with tuberculosis susceptibility: an updated meta-analysis / L. Hu, H. Tao, X. Tao et al. // *BioMed Res. Int.* – 2019. - Vol. 2019. – P. 1-9.

255. TLR4 +896A>G (Asp299Gly) polymorphism is not associated with asthma: a update metaanalysis / Y. Yingshui, R. Xiaohua, H. Lianping et al. // *Int J Clin Exp Med*. – 2014. – Vol. 7, №. 12. – P. 5358-5361.

256. TLR4 Asp299Gly (rs4986790) polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis / R. Chen, N. Gu, Y. Gao et al. // *PeerJ*. – 2015. - №3. – P.1412.

257. TLR-9 promoter polymorphisms (T-1237C and T-1486C) are not associated with systemic lupus erythematosus: a case control study and meta-analysis / A.K. Panda, S.S. Pattanaik, R. Tripathy, B.K. Das // *Hum Immunol*. – 2013. - Vol. 74, № 12. – P. 1672-1678.

258. TNF-alpha (-308 G/A) and CD14 (-159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma. / S.J. Hong, H.B. Kim, M.J. Kang et al. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2007. - № 119 (2). - P.398-404.

259. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: a case-control analysis. / Hussein Y, Awad H, Shalaby S. et al. // *Cell Immunol*. – 2012. - № 274. – P. 34–38.

260. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection / Y. Hussein, H. Awad, S. Shalaby et al. // *European Cytokine Network*. – 2006. - № 17 (1). – P. 29-34.

261. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. / I. Yang, S. Barton, S. Rorke et al. // *Genes Immun*. - 2004. - № 5. – P. 41–45.

262. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. / J. Lachheb, I. Dhifallah, H. Chelbi et al. // *Tissue Antigens*. – 2008. - № 71. – P. 417–425.

263. Toutouzas, K. The -174 G>C Interleukin-6 Gene Polymorphism is Associated with Angiographic Progression of Coronary Artery Disease over a 4-Year Period / K. Toutouzas, D. Klettas, N. Anousakis-Vlachochristou // *Hellenic J Cardiol*. – 2017. - № 58 (1). – P. 80-86.

264. Trace element and magnesium in patients with bronchial asthma / A.A. Ali, R.A. El-Wahsh, H.F. Afia, G.A. Abdelaal // *Egypt J Chest Dis Tuberc*. – 2022. - № 71. – P. 44-50.

265. Trace Elements Status in Sera of Patients with Allergic Asthma / N. Ariaee, R. Farid, F. Shabestari et al. // *Rep Biochem Mol Biol*. – 2016. - № 5 (1). - P. 20-25.

266. Tumor necrosis factor–alpha and transforming growth factor-beta1 polymorphisms in bronchial asthma. / A. Kumar, V. Gupta, H. Changotra et al. // *Indian J Med Sci*. – 2002. - № 62. - P. 323–330.

267. Tumour necrosis factor gene polymorphisms and childhood wheezing. / H. Bilolikar, A.R. Nam, M. Rosentha et al. // *Eur Respir J*. – 2005. - № 26 (4). – P. 637-646.

268. Umetsu, D. T. Interleukin-10 The Missing Link in Asthma Regulation? / D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. – 1999. - Vol. 21. - P. 562–563.

269. Vitamin D supplementation to prevent asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis of individual participant data *Lancet* / D.A. Jolliffe, L. Greenberg, L.R. Hooper et al. // *Respir Med*. – 2017. - № 5. – P. 881–890.

270. Waked, M Asthma, allergic rhinitis and eczema in 13-14-year-old schoolchildren across Lebanon / M. Waked, P. Salameh // *J Med Liban*. – 2006. - № 54 (4). – P. 181-190.

271. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys / M.I. Asher, S. Montefort, B. Bjorksten et al. //

Lancet. – 2006. - Vol. 368. – P. 733–743.

272. Yalçın, S.S. Evaluation of blood and tooth element status in asthma cases: a preliminary case–control study / S.S. Yalçın, N. Emiralioğlu, S. Yalçın // BMC Pulm Med. – 2021. - № 21. – P. 201.

273. Yasuda, K. Interleukin-18 in Health and Disease / K. Yasuda, K. Nakanishi, H. Tsutsui // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. - № 20 (3). – P. 649.

274. Zajac, D. Mineral Micronutrients in Asthma / D. Zajac // Nutrients. – 2021. - № 13. – P. 4001.

275. Zakeri, A. Dual role of Toll-like receptors in human and experimental asthma models / A. Zakeri, M. Russo // Front. Immunol. – 2018. - Vol. 9. – P. 1027.

276. Zhang, Y. The -308 G/A polymorphism in TNF- α gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis / Y. Zhang, J. Zhang, C. Tian // J. Clin. Immunol. – 2011. – Vol. 31, № 2. – P. 174-185.