

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)

автореферат диссертации
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Благовещенск – 2024

Работа выполнена в Хабаровском филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства

Научные консультанты:

Козлов Владимир Кириллович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории комплексных методов исследования 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, г. Хабаровск.

Лебедько Ольга Антоновна, доктор медицинских наук, директор Хабаровского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательского института охраны материнства и детства, г. Хабаровск.

Официальные оппоненты:

Черешнев Валерий Александрович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург.

Шолохов Леонид Федорович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии и патологии эндокринной системы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», г. Иркутск.

Трофименко Ирина Николаевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой клинической аллергологии и пульмонологии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиала Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иркутск.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь.

Защита состоится «23» апреля 2025 г. в 9 часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.0.062.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», <https://cfpd.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета



Приходько Анна Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

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 (GINA, 2022). Россия в целом (Клинические рекомендации «Бронхиальная астма» МЗ РФ) и Хабаровский край (О состоянии службы охраны здоровья женщин и детей в Хабаровском крае (статистические материалы) 2020), в частности, не составляют исключения из этой тенденции, отмечен двукратный рост распространённости 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 распространённости 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 (Батожаргалова Б.Ц. и др., 2016). 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 (Lee L.K. et al., 2020; NHWS – National Health and Wellness Survey, 2020) В России имеют место сходные соотношения степеней контроля заболевания (Леонтьева Н.М. и др., 2020; Айсанов З.Р. и др., 2021).

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 (Виткина Т.И., 2019). 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) (Ганковская Л.В. и др., 2019; Bart N. et al., 2019; Sun S. et al., 2022). 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 (Денисенко Ю.К., 2018). 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 (Супрун С.В., 2009), также показана ее применимость при БА (Глазова Т.Г. и др., 2012). Как и для любого атопического заболевания важнейшим фактором в патогенезе БА является ксенобиотическая нагрузка, особенно важно для БА, по-

сколькx 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 (Шуматова Т.А., Коваленко Д.В., 2021). Достаточно выраженное влияние на atopическое воспаление имеют пневмотропные персистирующие возбудители и индивидуальный спектр сенсибилизации 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 atopического воспаления у детей, страдающих БА, и воздействие на контролируемость заболевания.

5. Выявить модифицирующее воздействие региональных экзогенных факторов: экологических, спектра сенсибилизации и активизации персистирующих вирусов группы герпеса (ВЭБ и герпес человека 6 типа) на механизмы atopического 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 кон-

троля 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, IgA, 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 – IL 5 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 объем 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 донозологический. 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 курбельности 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 персонафицировать 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 лекции и практические занятия на кафедре госпитальной и факультетской педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней ДВГМУ для студентов педиатрического факультета, факультета фармации и биомедицины, института непрерывного профессионального образования и аккредитации.

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.

ми. 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.

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 atopического 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 Д, 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 atopическое 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.

Личный вклад автора в исследование

Автором осуществлялась разработка идеи, определение цели и задач на основе проведенного комплексного обзора отечественной и зарубежной литературы, создание концептуальной схемы оценки формирования неконтролируемого течения БА у детей, составление дизайна и плана исследования. Автором лично разработана тематическая карта больного для настоящего исследования, проведен отбор пациентов, включенных в исследование, уточнение данных анамнеза и контроль за выполнением дополнительных клинико-лабораторных обследований. Все пациенты находились под динамическим наблюдением Автора, не только как старшего научного сотрудника, выполняющего работу, но и как практикующего аллерголога-иммунолога.

Автором лично проводилось заполнение первичных и специализированных баз данных, систематизация и статистическая обработка полученных результатов. Работа с нейросетью и создание программ прогноза для ЭВМ осуществлялась при содействии научного сотрудника ХФ ДНЦ ФПД – НИИ ОМиД, специалиста по информационным технологиям, Алексея Владимировича Королева.

Автором осуществлялось написание глав диссертации, формирование выводов и практических рекомендаций, подготовка публикаций и докладов, личный вклад автора согласно системе антиплагиат – 80%.

Внедрение результатов исследования

Материалы диссертации используются в работе клиники ХФ ДНЦ ФПД – НИИ ОМиД г. Хабаровска и включены в лекции и практические занятия на кафедре госпитальной и факультетской педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней ДВГМУ для студентов педиатрического факультета, факультета фармации и биомедицины, института непрерывного профессионального образования и аккредитации.

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.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 256 страницах и состоит из введения, обзора литературы, характеристики методов исследования, 8 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы, включающего 277 источников, из них 65 работ отечественных и 212 зарубежных авторов; иллюстрирована 59 таблицами и 67 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Работа проведена на базе клиники Хабаровского филиала «ДНЦ ФПД» – НИИ ОМиД в период с 2013 по 2022 годы. На основе многолетней научной и практической деятельности в качестве врача аллерголога-иммунолога клиники и старшего научного сотрудника была разработана концептуальная схема развития неконтролируемого течения БА у детей (Рисунок 1), ставшая базой для проведения данной работы.



Рисунок 1 – Концептуальная схема оценки формирования неконтролируемого течения БА у детей (разработана автором).

Для оценки частоты встречаемости астмоподобных симптомов в Хабаровском крае было опрошено 696 школьников в возрасте 13-14 лет, проживающих в условиях города Хабаровска (556 подростка) и Хабаровского сельского района (140 школьников), из них 345 мальчиков и 351 девочка. Опрос проводился по стандартизированной методике ISAAC для этой возрастной группы.

В исследованиях патогенетических механизмов атопического воспаления и их реализации при контролируемом и неконтролируемом течении БА участвовали 232 человека: 142 пациента с БА, проживающих в Хабаровском крае и Еврейской автономной области в возрасте от 5 до 17 лет, группу сравнения составили 90 детей, группы рандомизированы по полу и возрасту.

Исходя из этой концепции был разработан, утвержден и принят к исполнению дизайн исследования, включающий следующие основные этапы (Таблица 1):

Таблица 1 – Дизайн исследования: основные этапы

	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	538
		число случаев	4431
	Исследование взаимосвязи частоты обострений БА и температурных характеристик климата в 2013-2014 гг.	число пациентов	136
		число случаев	1112
число обострений		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 Основные группы:		167
		контролируемая БА	70
		частично контролируемая и неконтролируемая БА	97
		Группа сравнения (условно здоровые дети, рандомизированные 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

При исследовании генетических паттернов БА определялись следующие мутации с заменой нуклеотидов, кодирующих распознающие молекулы иммунной системы (Toll-подобные рецепторы: TLR2-Arg753Glu, TLR4-Asp299Gly, TLR4-Ghr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G; интерлейкины: IL4-C589T, IL6-C174G, IL10-G1082A, IL10-C592A, IL10-C819T, IL12B-A1188C, TNF α G308A), генов системы детоксикации (GSTM+T, GSTP1 (Ile105Val), GSTP1 (Ala114Val)). 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, а для некоторых полиморфизмов – методом реал-тайм.

Исследование лимфоидных популяций осуществляли на цитометре FACS Calibur «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), CD3+/HLA-DR+ (активированные Т- и В- лимфоциты).

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

Для определения уровней IgA, M, G, E и интерлейкинов 6, 7 и 9 в сыворотке крови применяли иммуноферментный метод с использованием тест-систем «Вектор-Бест» для IgA, M, G, интерлейкинов 6, 7, 9 и «Хема-Медика» для IgE, определение проводилось посредством автоматического спектрофотометра Lazurite «Вектор-Бест».

Процентное содержание клеток со сниженным мембранным потенциалом митохондрий (МПМ) в общей популяции лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов периферической крови проводили 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' тетраэтилбензимидазолкарбоцианин иодид/хлорид) (Vector Dickenson, США). JC-1 является катионным красителем, поглощение которого митохондриями напрямую связано с величиной митохондриального мембранного потенциала.

Проводилась количественная оценка клеточных мембран эритроцитов методом спонтанной и стимулированной трансформации. Способ регистрации трансформации эритроцитов в нативном мазке позволил использовать обычную световую микроскопию и при минимуме применяемых реактивов получать максимум информации морфологического спектра. Для общей оценки состояния клеточных мембран вычисляли индекс трансформации (ИТ) и показатель

компенсаторной трансформации (ПКТ), а также использовали усовершенствованный метод (патент 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 к основному токсиканту (Pb).

Определение ДНК Вируса Эпштейна-Барр и вируса герпеса человека 6 типа проводилось методом ПЦР с использованием для его выделения и амплификации наборов НПФ Литех (г. Москва), учет продуктов амплификации проводился методом электрофореза в агарозном геле.

Оценка степени тяжести БА и уровня ее контроля проводилась согласно критериям Клинических рекомендаций, Минздрав РФ, от 2019 года. В целях дальнейшей статистической обработки степень тяжести оценивалась в баллах: легкая интермиттирующая астма – 1 балл, легкая персистирующая – 2 балла, персистирующая средней тяжести – 3 балла, персистирующая тяжелая астма – 4 балла.

Оценка требуемой для обеспечения контроля дозы топического глюкокортикоидостероида проводилась по флутиказону, с пересчетом иных препаратов по уровню биоэквивалентности.

При оценке влияния климата использованы 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. За тот же период учитывалось количество случаев утраты контроля над БА в конкретный день, их общее количество посещений за этот период времени составило 310 случаев. Эти ежедневные данные были усреднены для каждого месяца двух лет отдельно, и был получен Индекс сезонности (IS) для посещений как: $IS = (Mi/Mm) * 100$, где Mi – среднее количество посещений за данный месяц, а Mm – среднее количество посещений за месяц в текущем году. Рассчитывались суточные изменения среднесуточных температур dT_{mean} ; оценивалась частота дней в каждом месяце со средними изменениями температуры более 95-го перцентиля (F_{mean}). Чтобы оценить, зависят ли визиты астмы от изменений погоды, был исследован коэффициент корреляции (r) между dT_{mean} и F_{mean} , а также IS.

На третьем этапе, исходя из выявленных факторов риска неконтролируемого течения БА, было проведено пилотное исследование (2020-2021 гг.) по дополнительному применению у детей с БА, получающих стандартную базисную терапию, функционального продукта питания на основе дальневосточных

бурых водорослей.

При статистическом анализе результатов исследования использовались стандартные методы вариантной статистики с применением пакета статистических программ: «STATISTICA 10.0» для «Windows» (версия 10.0). Достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Программы для ЭВМ включили в себя модели прогноза контролируемости БА на основе обучающейся нейронной сети. 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). Алгоритм обучения выбран BFGS, как наиболее адекватный задаче классификации. Функция ошибок выбрана традиционно в виде суммы квадратов отклонений. Функция активации выходных нейронов – софтмакс (экспоненциальная функция). Функция активации промежуточного слоя – гиперболическая.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Частота встречаемости астмоподобных и неастмоподобных симптомов среди детей Хабаровского края

Распространенность БА в текущем столетии неуклонно возрастала, и к настоящему времени ее регистрация достигла 15% среди детской популяции населения Земли. За последние 15 лет наблюдается неуклонный рост распространенности БА по обращаемости у детей и подростков и в Хабаровском крае: в возрасте до 14 лет рост от 1,2% до 2,0%, у подростков с 1,2% до 2,5%, то есть в два раза. Подобная ситуация подвела к необходимости оценить частоту встречаемости астмоподобных симптомов и неастмоподобных признаков атопии у детей Хабаровского края с использованием опросника международной программы ISAAC.

При анализе полученных результатов по опросу школьников 13-14 лет в целом обнаружено, что встречаемость астмоподобных симптомов в Хабаровском крае одна из самых высоких (17,9%) в российских регионах, в которых проводилось исследование по этой методике, и превышает показатели заболеваемости БА у подростков Хабаровского края по обращаемости (2,4%) в 7,5 раз (Рисунок 1).

Близкие показатели по обращаемости, опросу и сходная разница между ними отмечаются в Томске, Иркутске, Якутии. В ближайших регионах (Владивосток, Благовещенск) имеет место значительно более низкая частота астмопо-

добных симптомов. Такие значимые различия в географически близких регионах ставят перед нами задачу более глубокого изучения биогеохимических, социально-экономических, и популяционно-генетических факторов, влияющих на встречаемость астмоподобных симптомов в различных местах проживания в ходе дальнейших исследований.

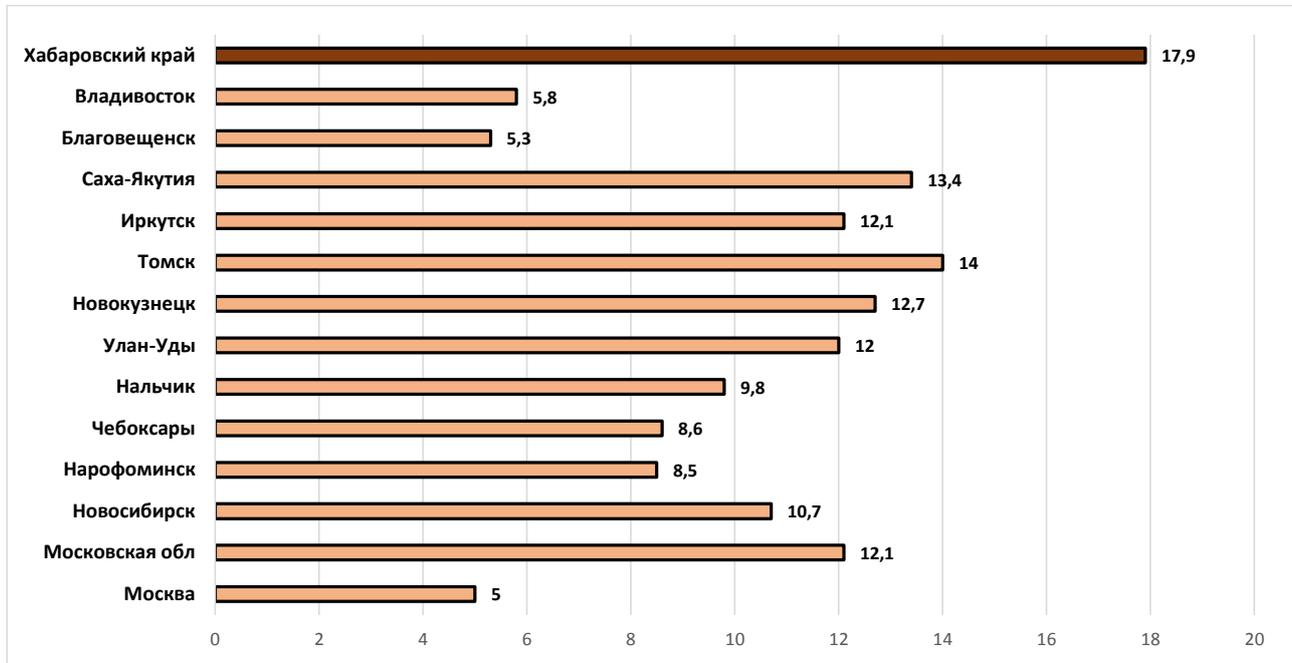


Рисунок 2 – Частота встречаемости астмоподобных симптомов у подростков по результатам ISAAC (%) (Хабаровский край, собственные данные, иные регионы по данным литературы).

При анализе структуры астмоподобных симптомов использовались показатели частоты любых астмоподобных проявлений, частоты ночных эпизодов обструкции, характеризующих более тяжелое течение процесса, влияние астмоподобных симптомов на качество жизни – переносимость физических нагрузок, речь.

При интегральной оценке этих показателей выявлено, что у детей, имевших астмоподобные симптомы, в 72,6% случаях они соответствуют легкой степени тяжести БА, 19,7% – средней и 7,7% – тяжелой, что совпадает с общими показателями по результатам стандартизированного опроса. Однако они резко отличаются от структуры заболеваемости по обращаемости (по данным нашей клиники в период с 2002 по 2020 годы, из 8389 случаев: 41,5% – легкая степень БА, у 46,5% – средняя и у 12% имело место тяжелое течение).

Исходя из значимых различий результатов опроса в зависимости от места проживания большой интерес представляет разница встречаемости астмоподобных симптомов в городской и сельской местности. Из рисунка 1 следует, что в большинстве случаев в России опрос проводился в городах, исключения

составляли лишь Московская область и Республика Саха-Якутия. При чем только для Московской области есть географически близкий город – Москва, дающий информацию для сравнения, и вопреки общераспространённому мнению об отрицательном влиянии урбанистической среды в данной области астмоподобные симптомы встречались более, чем в 2 раза чаще относительно прилегающего города. В ходе анализа наших данных были получены следующие результаты (Рисунок 3).

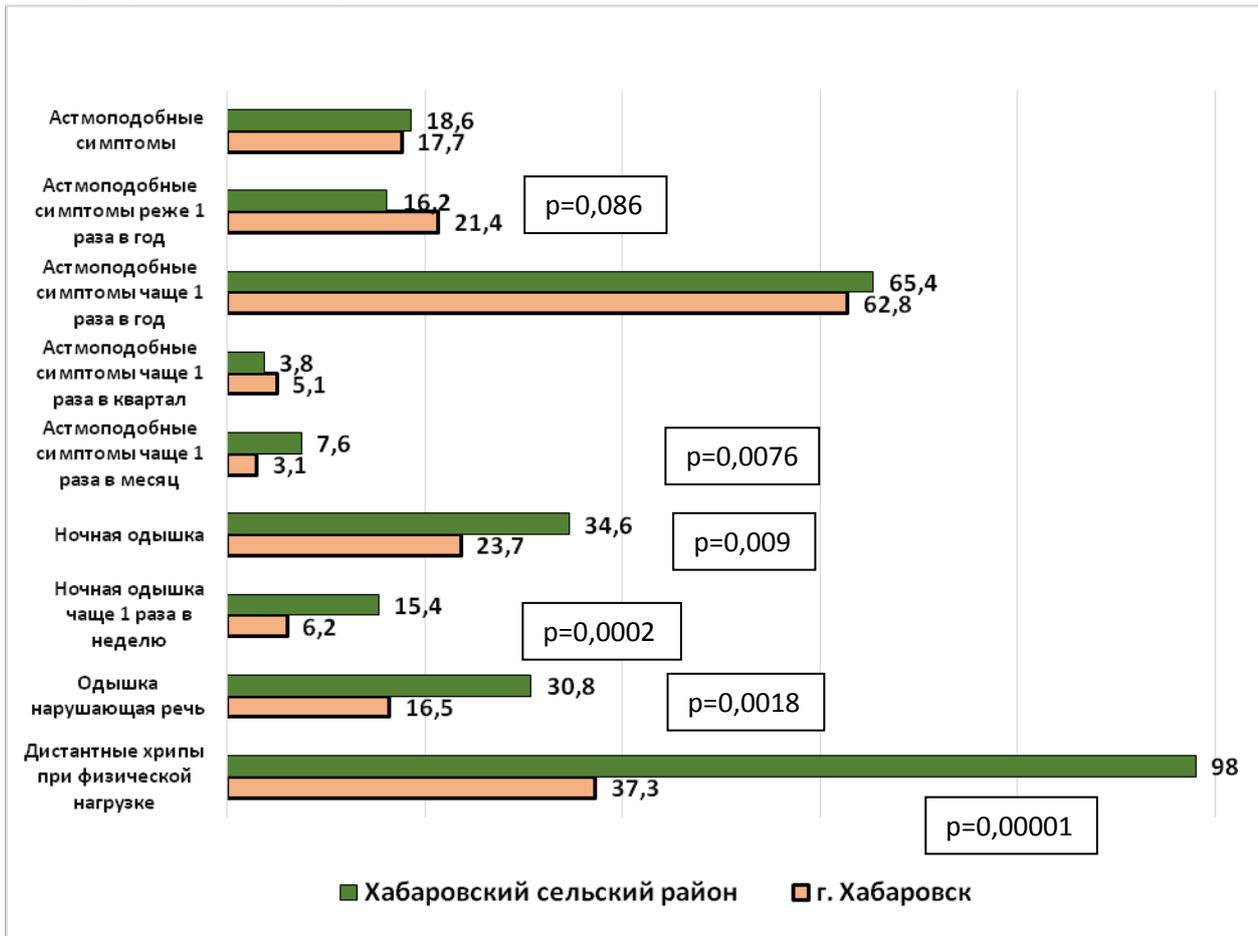


Рисунок 3 – Частота встречаемости астмоподобных симптомов по результатам ISAAC у подростков г. Хабаровска и Хабаровского сельского района (%).

При сравнении частоты астмоподобных симптомов в Хабаровске и Хабаровском сельском районе отмечается достоверно более частая их встречаемость в последнем, однако разницам много меньше, чем между Москвой и Московской областью. Обращает на себя внимание тот факт, что в Хабаровском сельском районе астмоподобные симптомы чаще протекают с более высокой частотой для конкретного пациента: отсутствуют в течении года и более – на треть реже; присутствуют более 1 раза в месяц – чаще в 2 раза, чем в городе Хабаровске.

Для сельского района характерно и более тяжелое их течение: на 1/3 чаще встречается ночная одышка и практически в 3 раза чаще – ночная еженедельная

одышка, являющаяся признаком тяжёлого течения заболевания. В два раза чаще у жителей сельского района отмечена одышка, затрудняющая речь, и в три раза чаще – дистантные хрипы при физической нагрузке.

Полученные нами данные, 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, можно предположить, что социально-экономические факторы, доступность медицинской помощи, особенно специализированной, кардинально различающиеся в городе и сельской местности, оказывают большее влияние на частоту встречаемости астмоподобных симптомов.

В стандартном опроснике ISAAC кроме блока, позволяющего выявить астмоподобные симптомы есть и блоки, направленные на обнаружение неастмоподобных признаков 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. Кроме того, при коморбидном течении они с высокой вероятностью ведут к более тяжёлой БА и нарушают контроль над ней, поэтому представляют интерес и с точки зрения выявления групп риска по тяжелой и/или неконтролируемой БА.

Распространённость симптомов аллергического ринита среди подростков Хабаровского края при изучении методом стандартного сплошного опроса ISAAC выше, чем в других российских регионах и странах, где проводилось данное исследование. Встречаемость симптомов атопического дерматита так же достаточно высока, но остаётся в пределах, характерных для европейских стран. Следует отметить, что распространённость 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 социо-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 приведенном объеме позволят улучшить качество и своевременность диагностики, профилактики БА и других atopических заболеваний в Хабаровске и Хабаровском районе, уменьшить время от обнаружения первых симптомов до установки диагноза и своевременного лечения.

Генетические паттерны у детей с БА, их взаимосвязь со степенью контроля и тяжестью заболевания

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.

Генетические полиморфизмы сигнальных молекул иммунной системы, как рецепторов первичного распознавания – Toll-подобных рецепторов, так и основных коммуникативных молекул иммунитета – цитокинов, представляют большой интерес с точки зрения изучения эндогенных факторов, модифицирующих патогенез заболевания. В ходе проведенных исследований нами выявлен ряд значимых клинико-патогенетических проявлений мутаций Толл-подобных рецепторов, интерлейкинов (Таблица 2).

Таблица 2 – Частота неконтролируемой БА (%) и ее степень тяжести (в баллах) при некоторых мутациях генов сигнальных молекул иммунной системы

	Неконтролируемая БА			Тяжесть БА		
	Норм. генотип	Мут. генотип	Дост. (p)	Норм. генотип	Мут. генотип	Дост. (p)
TLR2 - Arg753Glu	56,2	60	0,4	2,8	3,1	0,042
TLR4 - Asp299Gly	92,2	56	0,0007	3,0	2,6	0,02
TLR4 - Ghr399Ile	58,8	52	0,27	2,75	3,16	0,01
TLR9 - T1237C	76,1	46,7	0,008	2,96	2,47	0,02
TLR9 - A2848G	80,0	49,3	0,001	2,91	2,76	0,27
IL4 - C589T	61,0	52,0	0,16	2,9	2,74	0,22
IL6 - C174G	53,8	59,8	0,25	2,70	3,02	0,022
IL10 - G1082A	61,5	54,4	0,23	2,68	2,93	0,11
IL10 - C592A	60,7	46,3	0,047	2,88	2,79	0,53
IL10 - C819T	56,0	56,9	0,53	2,95	2,90	0,76
IL12B - A1188C	55,8	57,1	0,61	2,92	2,88	0,77
TNF α - G308A	64,1	33,3	0,002	2,88	2,70	0,28

Достоверно определено, что при мутациях в генах TLR4-Asp299Gly, TLR9-T1237C характерно более легкое течение БА и более полный контроль над ней; мутантные полиморфизмы генов TLR9-A2848G, IL10-C592A, TNF α -G308A способствуют лучшему контролю и с тенденцией к более легкому течению, дети с мутациями в генах TLR2-Arg753Glu, TLR4-Ghr399Ile, IL6-C174G переносят заболевание тяжелее с тенденцией к снижению контроля.

Кроме того, мононуклеотидные замены в генах сигнальных молекул иммунной системы TLR4-Asp299Gly, TNF α -G308A и TLR2-Arg753Glu модифицируют atopическое воспаление, ослабляя или усиливая его, что приводит к уменьшению либо увеличению дозы ТГКС соответственно.

Наиболее характерными 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 В-лимфоцитов отмечаются разнонаправленные изменения при разных мутациях, облегчающих течение БА и/или контроль над ней. В гуморальном звене у таких пациентов обнаружен более высокий уровень Ig A, G и низкий E, в фагоцитарном – изменения разнонаправлены, но чаще встречаются более высокие показатели. Ни один из рассматриваемых генотипов не приводит ко всем перечисленным изменениям сразу, для каждого конкретного отмечалось уникальное сочетание изменений интерлейкинового профиля и показателей иммунного статуса, приводящих к одному из вариантов контроля, разными патогенетическими путями. Поэтому особый интерес представляют сочетания этих мононуклеотидных замен, приводящие к интерференции и взаимному усилению или ослаблению их воздействия. Они формируют генетические паттерны, отличающие пациентов с БА по контролю над заболеванием и тяжестью течения. Для всех обследованных детей с БА характерна высокая вероятность сочетаний мутаций TLR 4 и 9, IL 6, 12b и TNF α . Эти мутации связаны тесной сетью корреляций не только между собой, но и с уровнем интерлейкинов и IgE в сыворотке крови, со степенью тяжести и уровнем контроля БА, поэтому полученные нами данные позволяют предположить наличие генетических паттернов, характеризующих различные по течению и степени контроля группы пациентов с БА.

В частности, обнаружены достоверные зависимости (Рисунок 4): сильная прямая ($r=0,79$) мутаций генов белка рецептора Toll 4 (TRL4-Asp299Gly) и (TRL4-Ghr399Ile), средней силы ($r=0,46$) мутаций генов Toll 4 (TRL4-Asp299Gly) и Toll 9 (TLR9-A2848G), между мутациями генов белка рецептора

Toll 4 (TRL4-Asp299Gly, TRL4-Ghr399Ile) и гена интерлейкина 12В (IL12B-A1188C) $r=0,48$ и $r=0,47$ соответственно.

Активация конкретного набора Толл-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 мутации генов Толл-подобных рецепторов изменяют взаимодействия в интерлейкиновой цепи.

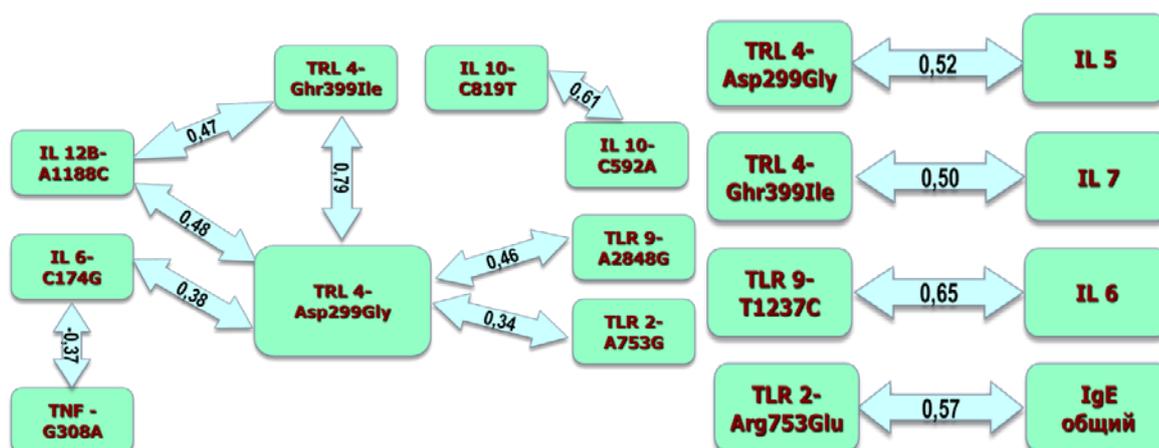


Рисунок 4 – Взаимосвязи мутантных аллелей генов Толл-подобных рецепторов, интерлейкинов и продукции сывороточных интерлейкинов.

В наших исследованиях выявлены: достоверная сильная прямая связь между полиморфизмом TRL4-Asp299Gly и уровнем IL 5 ($r=0,52$), TRL4-Ghr399Ile и IL 7 ($r=0,50$), TLR9-T1237C и IL 6 ($r=0,65$), TLR2-Arg753Glu и Ig E ($r=0,65$).

Выявленные генетические паттерны манифестируют и в клинических проявлениях заболевания (Рисунок 5).

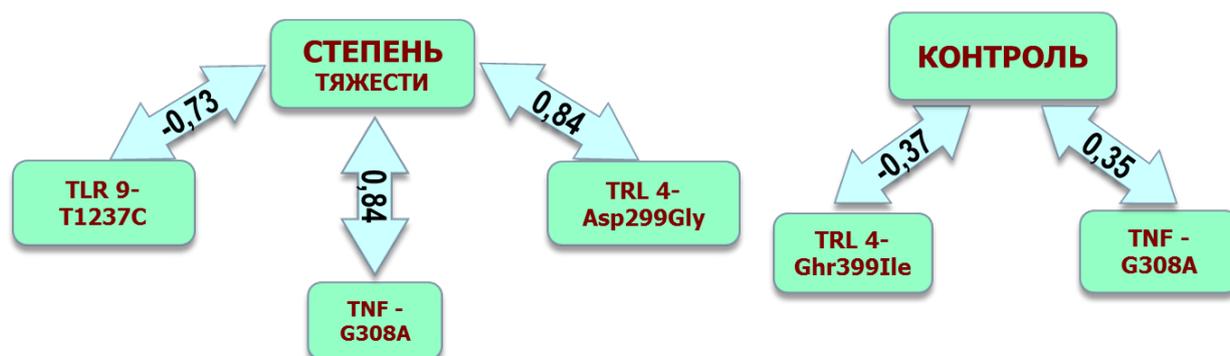


Рисунок 5 – Взаимосвязи мутантных аллелей генов Толл-подобных рецепторов и интерлейкинов с клиническими проявлениями БА

Обнаружена достоверная сильная обратная связь мутации TLR9-T1237C ($r=-0,73$), TRL4-Asp299Gly ($r=-0,84$), TNF α G308A ($r=-0,84$) и степени тяжести заболевания, прямые связи средней силы между контролем над БА и мутациями TRL4-Ghr399Ile ($r=0,37$), TNF α G308A G308A ($r=0,35$).

С точки зрения контроля над уже текущим заболеванием интересными представляются и гены системы 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 мер.

В ходе данной работы определялись полиморфизмы генов детоксикации: GSTM, GSTT, GSTM/GSTT, GSTP 1 Ile105Val, GSTP 1 Ala114Val, связанные с вероятностью неконтролируемого течения БА, но что при всех мутантных генотипах вероятность сохранения контроля над БА выше. При этом ответ на базисную терапию достоверно различается при разных мутациях (Рисунок 6).

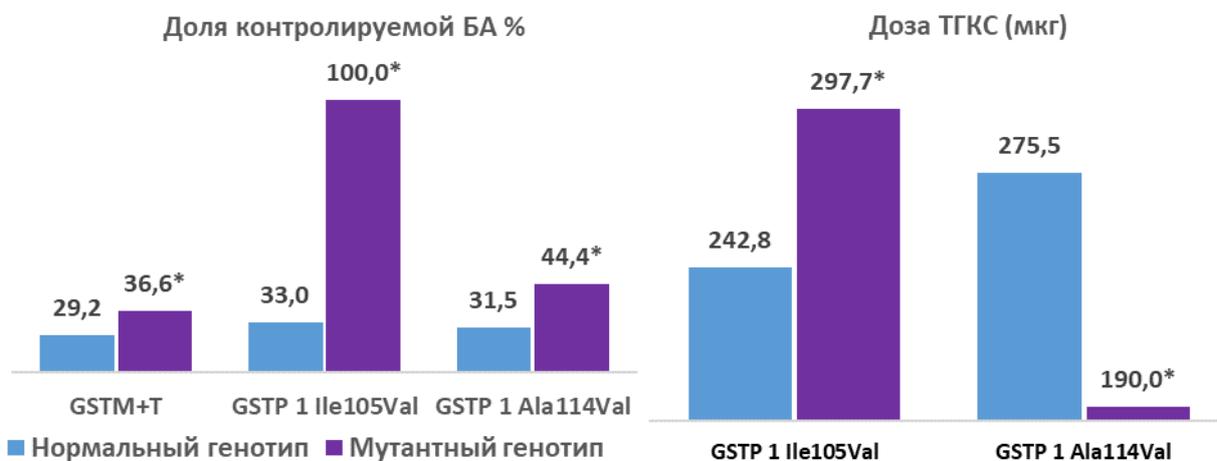


Рисунок 6 – Влияние полиморфизмов генов детоксикации на течение БА.

При делециях GSTM+T достоверной разницы в дозе необходимой терапии нет, при одной из мононуклеотидных замен GSTP1 (Ile105Val) требуется на треть меньшая дозировка ТГКС, чем в группе сравнения. При другой мутации в этом гене (Ala114Val), напротив требуется большая, чем в группе сравнения, доза, но при этом показано, что увеличение объема терапии, необходимое для контроля над БА, не всегда влечет за собой повышение доли пациентов с неконтролируемым течением заболевания.

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 выявлением иных генов-предикторов, влияющих на контроль заболевания, описанных выше, могут быть выявлены генетические паттерны неконтролируемого и/или устойчивого к стандартной терапии БА, которые станут основой индивидуальной и предиктивной диагностики, профилактики и терапии заболевания.

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, в которых отмечается достоверная разница по иным показателям. Очевидно, патогенетические пути, диктуемые различными мутациями при интерференции, частично нивелируют друг друга, а в некоторых случаях, напротив, усиливают. В группе с неконтролируемой астмой, отмечалось снижение уровней IL 7, 9 и рост IL 8, более высокий уровень В-лимфоцитов, Ig E, M и более низкий – Ig A. Из этого можно заключить, что влияние мутаций, при которых чаще наблюдается более легкое и/или контролируемое течение БА не сводится к изменениям конкретных показателей цитокинового и иммунного статуса, но изменяет в них соотношения регуляторных сетей.

Большой интерес для оценки особенностей иммунного реагирования при контролируемой и неконтролируемой БА представляют не только количественные, но и функциональные показатели состояния иммунокомпетентных клеток. Одним из способов оценки такого состояния является анализ мембранного потенциала митохондрий. Выявлено, что потенциал снижен в группе детей с БА в сравнении со здоровыми во всех пулах иммунокомпетентных клеток – 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 говорит об особой роли местного воспаления в неконтролируемом течении БА (Рисунок 7).

Использование этого метода позволяет на более ранней стадии выявлять нарушения функционирования иммунокомпетентных клеток 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 диссертации клинические при-

меры.

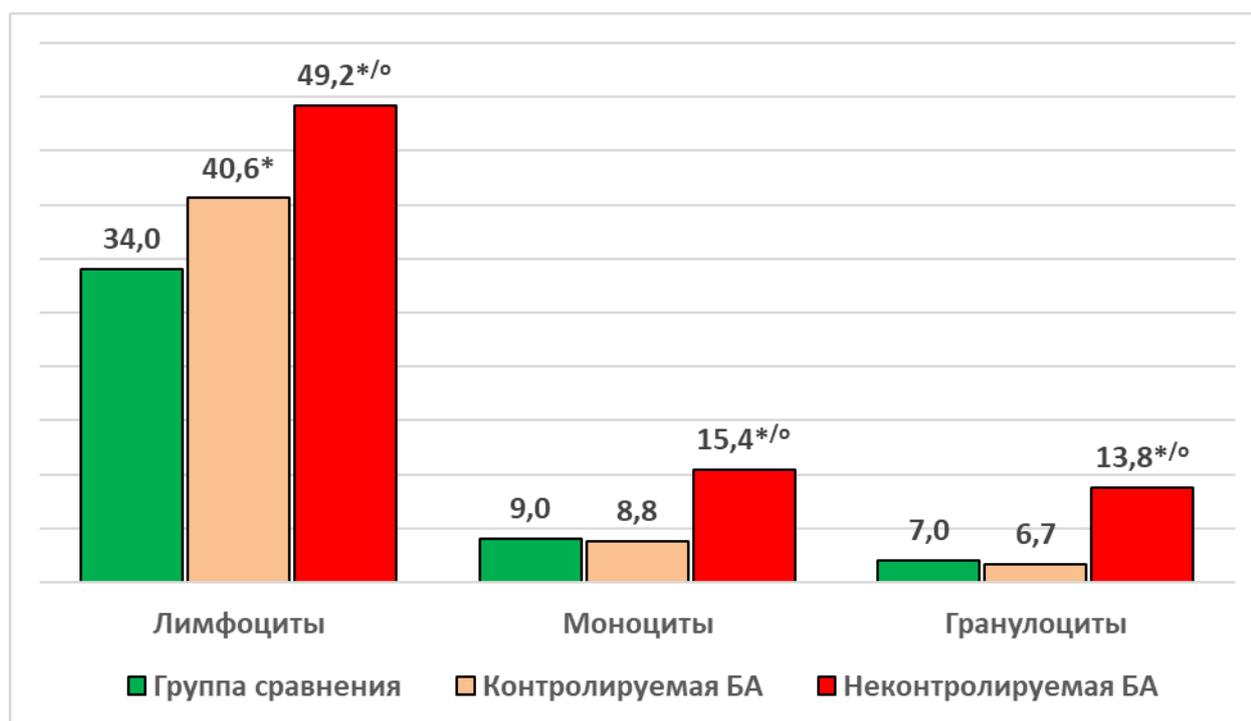


Рисунок 7 – Доля ИКК со сниженным МПМ в группе сравнения и у детей с контролируемой и неконтролируемой БА.

Факторы, модифицирующие течение БА

Классическим экзогенным фактором является климат, и в частности, температурный режим окружающей среды пациента. Интересно, что исследования в этой области, проводимые в разных регионах мира, и соответственно, различных климатических зонах дают сходные по направленности факторов, но разноречивые по их значимости, результаты. В ходе работы нами проанализирована зависимость между температурой воздуха и частотой обострений БА у детей Приамурья (Рисунок 8).

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, которая 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, влияющих на патологические процессы в организме, является сочетание микроэлементов в гидро-, лито- и биосфере, уникальное для каждого конкретного регио-

на. Эссенциальные 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.

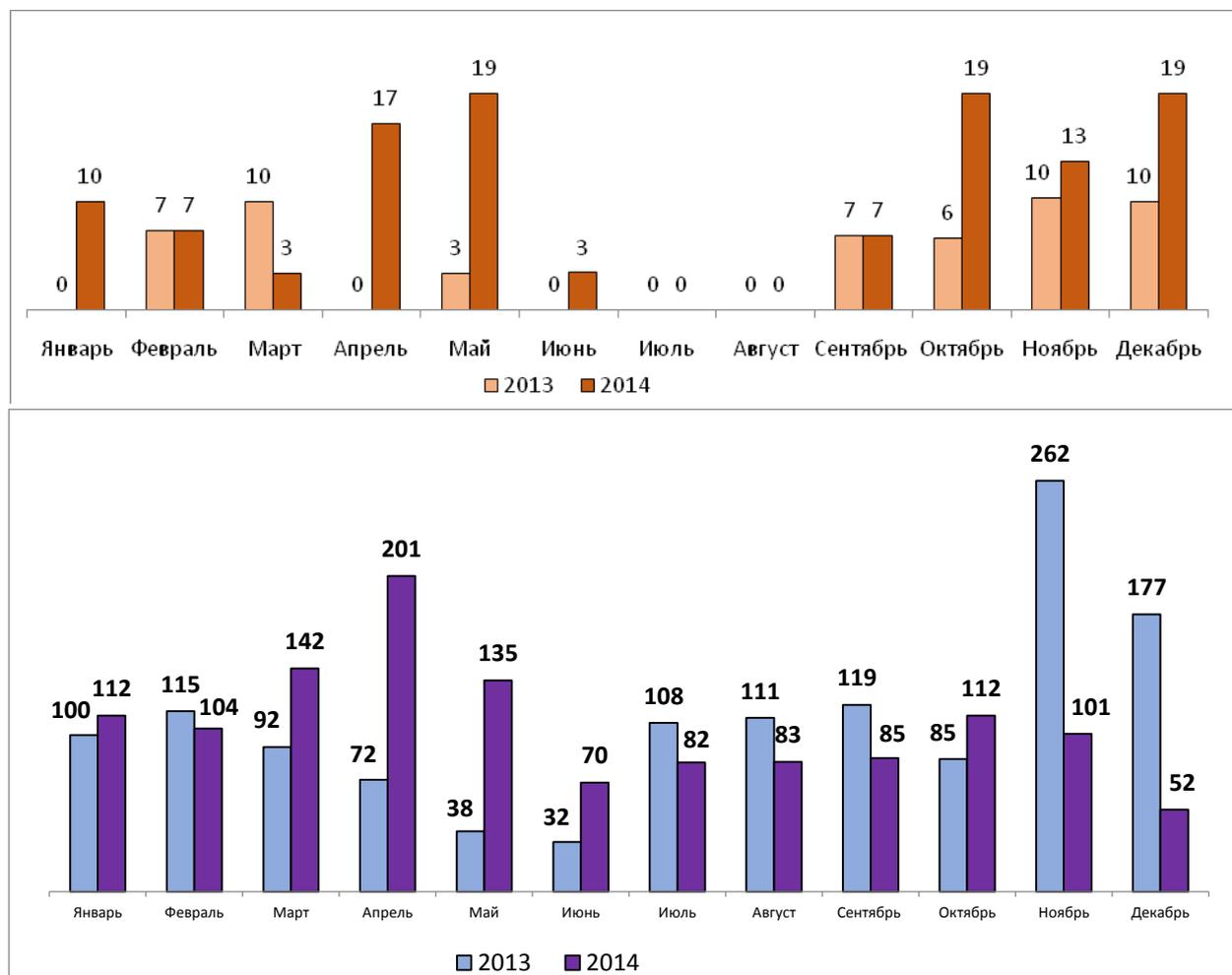


Рисунок 8 – Частота дней (%) с изменением t° и IS обострений в Хабаровске

В ходе 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 таких элементов как Cu, Se, Zn и повышение Pb, Ni, Co расценено, как эндогенный фактор, влияющий на atopическое воспаление. Определена связь между изменениями микроэлементного статуса и степенью тяжести заболевания. По мере нарастания тяжести БА отмечено снижение Se, Cu и нарастание Pb, Mn, Li (Таблица 3).

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 (Рисунок 9).

Таблица 3 – Содержание микроэлементов в сыворотке, форменных элементах крови (мкмоль/л) в зависимости от тяжести БА

	БА легкая	БА средней тяжести	БА тяжелая
Cu, эл.	6,57±0,61	6,77±0,38	4,96±0,49 ^{*/0}
Li, эл.	1,41±0,09	1,47±0,08	1,82±0,16 ^{*/0}
Mn, эл.	1,32±0,13	1,63±0,13	2,03±0,26 [*]
Se, сыв.	1,57±0,26	1,05±0,07	0,70±0,11 ^{**/0}
Se, эл.	1,55±0,36	1,22±0,14	0,84±0,07 ^{*/0}
Pb, сыв.	0,01±0,01	0,0±0,01	0,05±0,01 [*]

Примечание: достоверность показателей групп легкой и тяжелой степени БА: *– $p \leq 0,05$; **– $p \leq 0,01$; групп средней и тяжелой степени БА: – $p \leq 0,05$.

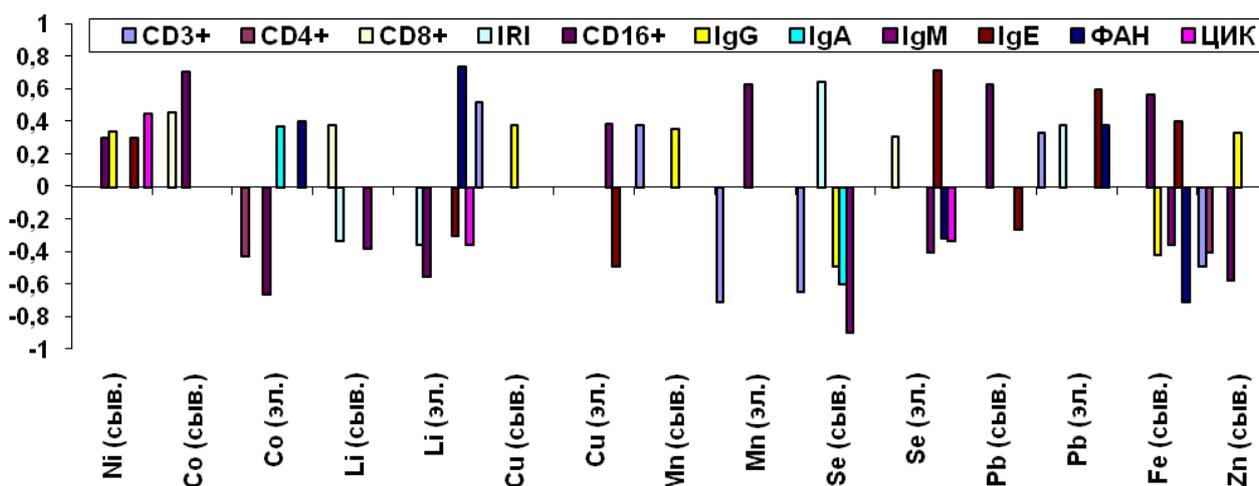


Рисунок 9 – Взаимосвязи содержания микроэлементов в сыворотке и форменных элементах крови с показателями иммунного статуса.

Исследование эритроцитарных мембран, как модельных, позволяет оценить состояние мембран организма в целом и имеющих особое значения для БА мембран слизистой оболочки бронхов, в частности. Из полученных результатов очевидна нестабильность клеточных мембран у детей, переносящих БА, которая усиливается по мере нарастания степени тяжести и является одной из причин утраты контроля над заболеванием (Таблица 4). Выявленный специфический (стоматоцитарный) путь этого ослабления исключает его вторичный характер на фоне гипоксии. Токсиканты, в частности Рb, в большей степени повреждают клеточные мембраны у больных с более тяжелым течением БА, что выражается в более выраженном снижении количества нормальных форм эрит-

роцитов – дискоцитов и, соответственно, повышении количества переходных и дегенеративных (необратимых) форм и сопровождается снижением коэффициента компенсации трансформации.

Таблица 4 – Показатели трансформации эритроцитов (%) спонтанной и стимулированной свинцом у детей с БА в зависимости от степени тяжести

	Течение	Спонтанная	Стимулир. Pb	Достоверность
Дискоциты, %	Легкое	72,4	68,6	0,046
	Среднее	66,7	63,4	0,049
	Тяжелое	60,1	58,3	0,07
Переходные формы, %	Легкое	24,2	27,2	0,048
	Среднее	28,9	30,1	0,08
	Тяжелое	34,6	36,2	0,08
Дегенеративные формы, %	Легкое	2,8	3,5	0,047
	Среднее	3,6	4,9	0,03
	Тяжелое	4,5	5,5	0,04
ПКТ	Легкое	8,5	7,7	0,04
	Среднее	8,0	6,5	0,03
	Тяжелое	7,7	6,17	0,05

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 и 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 D. Хабаровск – это один из самых инсолируемых городов России, число солнечных дней в году превосходит 300, но иные климатические и социокультурные особенности не позволяют проживающим здесь детям в полной мере использовать это преимущество, дефицит витамина D регистрируется практически у половины из них. В ходе исследований выявлено что у детей с контролируемой БА уровень витамина D 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).

Выявлены некоторые механизмы влияния дефицита Витамина D на патогенез и течение БА (Таблица 5).

Таблица 5 – Клинико-иммунологические показатели пациентов с БА в зависимости от уровня витамина D

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

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 D. На этом фоне требуется значительно большая доза ТГКС для достижения контроля над БА. Пациенты, страдающие БА, в сочетании со снижением уровня витамина D в половине случаев выделяют ДНК ВЭБ, в то время как дети с БА и нормальным содержанием витамина D – менее, чем в одной пятой части случаев.

Исходя из этого, определение уровня Витамина D у детей с БА позволяет выделить группу риска по неконтролируемому течению заболевания и персонализировать для таких детей терапию.

При оценке влияния спектра сенсibilизации на контролируемость течения БА показано особое значения пыльцы сорных трав и спор *Aspergillus niger* для нашего региона (Таблица 6).

Таблица 6 – Частота встречаемости (%) сенсibilизации к респираторным аллергенам у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

	Контролируемая	Неконтролируемая	p
Микст клещ дом.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

Подтопление жилых районов, т.е, повышение влажности в окружающей среде, оказывает значимое влияние на частоту сенсibilизации к плесневым грибам у детей, страдающих БА, что в свою очередь, ведет к более тяжелому

течению заболевания и утрате контроля над ним.

Полученные нами данные показывают влияние персистенции 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 детей, выделяющих вирусы, более высокий (для ВЭБ – в 9 раз, для герпеса 6 типа – в 3 раза) уровень IL 5, так же 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, но активизация ВЭБ имеет более выраженное влияние на течение заболевания (Таблица 7).

Таблица 7 – Клинико-иммунологические показатели у детей с БА в зависимости от выделения ДНК ВЭБ и вируса герпеса человека 6 типа

	Вирус (-)	ВЭБ	Герпес 6 типа	ВЭБ+гер.6
IL5, пг/мл	0,11±0,07	0,91±0,8*	0,29±0,19	0,25±0,23
CD19, абс.	398,7±23,7	506,7±54,0*	489,7±60,2*	426,0±64,4
CD19, %	15,1±0,53	19,0±2,26**	16,4±1,44	16,5±2,17
IgE, ME	95,2±8,3	184,5±21,1* ^o	113,1±18,7 [^]	371,7±31,8* ^{^/o}
ОФВ1, %	109,8±2,5	96,6±6,9*	98,8±5,45*	106,2±3,23
Доза ТГКС мкг/сут.	198,6±25,9	325,0±68,2*	186,4±27,9 [^]	328,1±78,1* ^o
Доля комбинированной терапии, %	66,1	100*	83,4* [^]	88,8* [^]

Примечание: достоверность показателей ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$); * – разница с группой вирус (-), [^] – разница с группой ВЭБ, ^o – разница с группой герпеса 6 типа

Прогнозирование неконтролируемого течения БА у детей

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 с использованием статистического метода обучающихся нейронных сетей, архитектуры многослойного перцептрона MLP с алгоритмом обучения BFGS. Это связано со сложными нечеткими связями параметров, с нелинейным характером распределения, взаимодействия генетических и эпигенетических факторов. Своевременный анализ полиморфизмов генов сигнальной системы иммунитета, детоксикации позволили осуществлять наиболее ранний прогноз возникновения БА и развития его неконтролируемого течения, начиная с раннего постнатального периода.

Первый этап комплексных программ прогнозирования контролируемости БА включает генотипирование TRL 2, 4, 9, IL 4, 6, 10, 12B, TNF, GSTM+T,

GSTP, 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 различного 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.

Применение функционального продукта питания на основе бурых водорослей у детей с БА

С целью компенсации некоторых из выявленных, негативно влияющих на течение БА факторов, дополнительно был использован функциональный продукт питания «Доромарин», произведенный на основе дальневосточных бурых водорослей. На фоне приема этого продукта отмечается изменение интерлейкинового профиля, характерное для снижения интенсивности воспалительных процессов (IL 6, IL 10, IL 18) (Таблица 8).

Таблица 8 – Показатели цитокинового статуса крови у детей с БА при дополнительном применении функционального продукта питания

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

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, доля пациентов с полным контролем заболевания увеличилась в два раза с 42,1% до 84,6%.

Обобщая все вышесказанное нами была создана концептуальная модель патогенеза БА и ее неконтролируемого течения, представленная в данной работе (Рисунок 10).

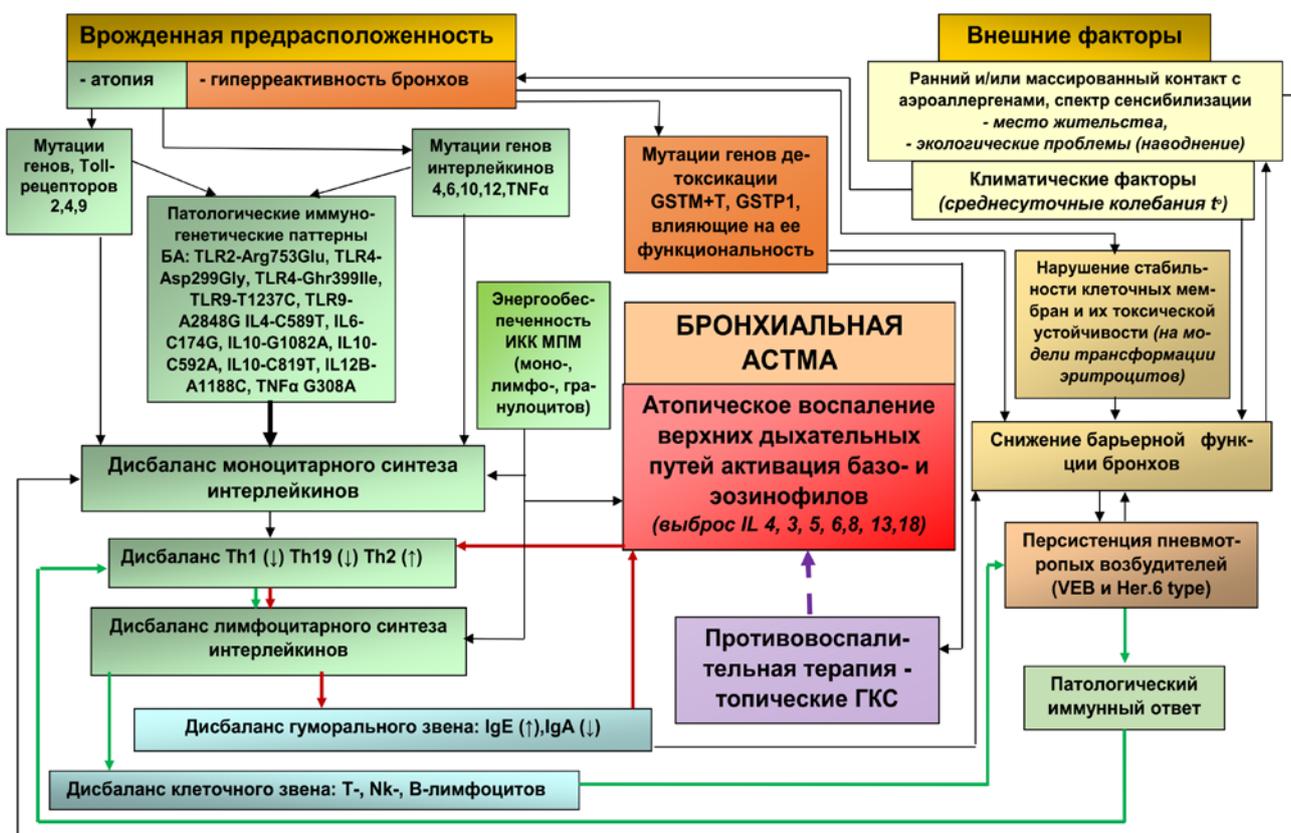


Рисунок 10 – Концептуальная модель иммунопатогенеза БА и ее неконтролируемого течения (по данным литературы и собственных исследований).

В данной модели врожденная предрасположенность представлена атопией и гиперреактивностью бронхов. Атопия, в свою очередь находит выражение в патологических иммуногенетических паттернах, объединяющих мутации генов сигнальных молекул иммунной системы, ведущих к дисбалансу моноцитарного синтеза интерлейкинов, что нарушает дифференцировку Т-хелперов различных типов и меняет их соотношение и изменяет синтез лимфоцитарных цитокинов. В свою очередь, дисрегуляция цитокиновой сети приводит к патологическому функционированию эффекторного звена иммунитета. С одной стороны, повы-

шается 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. 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.

Гиперреактивность бронхов, связанная 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.

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 неастмоподоб-

ных 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 атопическое 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 воз-

действие, 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 атопического 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в ведущих научных рецензируемых журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, а также индексируемых в международных реферативных базах данных и системах цитирования Scopus и WoS:

1. Ефименко М.В., Супрун Е.Н., Самсонова М.И., Бурцева Т.Е., Николаева Е.Л., Козлов В.К. Показатели иммунитета у детей с бронхиальной астмой в условиях Приамурья и Якутии // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 383-387.

2. Ефименко М.В., Матухно А.В., Супрун Е.Н. Евсеева Г.П., Половова Е.Б. Содержание двойных позитивных Т-лимфоцитов у пациентов с бронхолегочной патологией // Российский иммунологический журнал 2015. – Т. 9(18). – № 3-1. – С. 77-79.

3. Ефименко М.В., Супрун Е.Н., Холодок Г.Н., Козлов В.К. Некоторые иммунопатогенетические факторы современного течения бронхолегочной патологии детей // Медицинская иммунология. – 2015. Т. 17. – Специальный выпуск. – С. 161.

4. Супрун Е.Н., Ефименко М.В., Нестерова А.В. Факторы риска атопического дерматита у детей в районе имени Лазо Хабаровского края // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – С. 76-77.

5. Супрун Е.Н., Ефименко М.В., Пивкина Т.В., Азовцева Ю.Г., Евстегнеева А.В. Влияние наводнения 2013 г. в ДВФО на частоту сенсибилизации к плесне-

вым грибам у детей, страдающих бронхиальной астмой // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – № 4. – С. 146-147.

6. Евсеева Г. П., Холодок Г.Н., Морозова Н.В., Козлов В.К., Лазарь К.Г., Супрун Е.Н. Эпидемиология бронхолегочных заболеваний детей и подростков Хабаровского края // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – Вып. 61. – С. 31-35.

7. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Гусева О.Е., Пивкина Т.В. Чувствительность клеточных мембран к воздействию свинца у детей, страдающих бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2017. – Спецвыпуск. – С. 100.

8. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Гусева О.Е., Лощенко М.А., Пивкина Т.В. Особенности трансформации эритроцитов у детей, страдающих бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2017. – № 6. – С. 797-802.

9. Супрун Е.Н., Гусева О.Е., Козлов В.К., Супрун С.В. Анамнестические факторы, способствующие персистенции цитомегаловируса (ЦМВ) у детей с бронхиальной астмой (БА) // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – Т. 62, № 4. – С. 211.

10. Супрун Е.Н., Наговицина Е.Б., Лебедько О.А. Ассоциация полиморфизмов генов некоторых сигнальных молекул иммунного ответа у детей Приамурья с бронхиальной астмой // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 162.

11. Супрун Е.Н., Евсеева Г. П., Супрун С.В., Лебедько О.А. Роль микроэлементов у детей с бронхиальной астмой Приамурского региона // Trace Elements and Electrolytes. – 2018. – Vol.35, №.4. – P.250.

12. Evseeva G., Lebed'ko O., Suprun S., Suprun E., Knizhnikova E. The availability of vitamin d to the amur region children and adolescents with pathology of the lungs // Respiriology. – 2018. – Vol.23 (Suppl. 2). – P.298.

13. Супрун С.В., Кудерова Н.И., Морозова О.Н., Супрун Е.Н., Лебедько О.А., Галянт О.И. Оценка сезонных изменений энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови у беременных женщин в различных районах Приамурья // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2018. – № 70. – С. 55-60.

14. Suprun E., Nagovitsina E., Lebedko O., Suprun S. Genes Polymorphisms of Signalling Molecules of the Immune System as a Factor of Uncontrolled Bronchial Asthma // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2020. – Vol.201:A3054.

15. Suprun E., Vlasova M., Anuriev S. Influence of the Epstein-Barr Virus (EBV) Persistence of the Epstein-Barr Virus (EBV) and Herpesvirus Type 6 (Her. 6) on the Course of Bronchial Asthma (BA) at Children // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2020. – Vol.201: A6492.

16. Супрун Е.Н., Евсеева Г.П., Супрун С.В., Лебедько О.А., Пивкина Т.В.

Микроэлементный статус при бронхиальной астме у детей // Якутский медицинский журнал. 2020. – № 3 (71). – С. 32-34.

17. Супрун Е.Н., Наговицина Е.Б., Кудерова Н.И., Супрун С.В., Лебедько О.А. Некоторые ассоциации полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов и их клиничко-патогенетические проявления при бронхиальной астме у детей // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22, № 5. – С. 915-924.

18. Suprun E., Suprun S., Shkunova M., Yakovlev E.I., Evseeva G.P., Lebedko O.A. Incidence of asthma-like symptoms in adolescents of khabarovsk and the khabarovsk rural area, russian federation // International Journal of Pediatrics. – 2020. – Т. 8, № 12. – P. 12697-12704.

19. Evseeva G.P., Suprun S.V., Kozlov V.K., Suprun E.N. Influence of imbalance of trace elements on the function of the immune system // Trace Elements and Electrolytes. 2021. – Т. 38, № 3. – P. 138.

20. Suprun E., Galyant O., Kuderova N., Suprun S., Vlasova M., Lebed'ko O. Clinical & Immunological Aspects of Interconnection of the Level of Bronchial Asthma Control & Vitamin D Content in Children // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2021. – Vol.203: A3230.

21. Suprun E., Nagovicina E., Suprun S., Lebed'ko O., Evseeva G. Polymorphism of Detoxification Genes as a Factor of Bronchial Asthma Control in Children // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2021. – Vol.203:A3214.

22. Evseeva G., Knizhnikova E., Telepneva R., Kuderova N., Suprun S., Suprun E., Kozlov V., Lebed'ko O. Mitochondrial Dysfunction in Chronic Diseases of the Respiratory Organs // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2021. – Vol.203:A3453.

23. Евсеева Г.П., Супрун С.В., Супрун Е.Н., Ракицкая Е.В., Козлов В.К., Лебедько О.А. Влияние дисбаланса микроэлементов на иммунитет // Микроэлементы в медицине. – 2021. – № S1. – С. 27.

24. Евсеева Г.П., Книжникова Е.В., Супрун Е.Н., Супрун С.В., Кудерова Н.И., Пичугина С.В., Полубарцева В.В., Евдокимова Т.С., Лебедько О.А. Особенности мембранного потенциала митохондрий иммунокомпетентных клеток крови у детей с хроническими неспецифическими заболеваниями легких, сопровождаемыми явлениями пневмофиброза // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24, № 1. – С. 1307-1314.

25. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Власова М.А., Кудерова Н.И., Евсеева Г.П., Лебедько О.А. Влияние активации вируса эпштейна-барр и вируса герпеса человека 6 типа на течение и контроль бронхиальной астмы у детей Приамурья // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, № 6. – С. 1175-1180.

26. Супрун Е.Н. Прогнозирование неконтролируемого течения бронхиальной

астмы у детей на основе полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы и генов детоксикации // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2022. – № 86. – С. 56-61.

27. Супрун Е.Н. Оценка мембранного потенциала митохондрий иммунокомпетентных клеток крови при бронхиальной астме у детей в зависимости от контролируемости течения заболевания // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2022. – № 86. – С. 50-55.

28. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Власова М.А., Кудерова Н.И., Евсеева Г.П., Лебедько О.А. Влияние активации вируса Эпштейна-Барр и вируса герпеса человека 6 типа на течение и контроль бронхиальной астмы у детей Приамурья. // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, № 6. – С. 1175-1180.

29. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Кудерова Н.И. Оценка уровня витамина Д как фактора контролируемости бронхиальной астмы у детей Приамурья. // Якутский медицинский журнал. – 2023. – № 1(81). – С. 14-16.

30. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Шкунова М.С., Яковлев Е.И., Телепнев Р.С., Лебедько О.А., Евсеева Г.П. Частота встречаемости неастмоподобных симптомов аллергических заболеваний по результатам ISAAC у подростков Хабаровского региона России // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2023. – № 3(74). – С. 23-33

Зарегистрированные объекты интеллектуальной собственности:

31. Способ комплексной оценки энергообеспеченности иммунокомпетентных клеток крови. Патент на изобретение №2766747 от 15.04.2022. Супрун С.В., Кудерова Н.И., Супрун Е. Н., Евсеева Г.П., Лебедько О.А., Телепнева Р.С., Книжникова Е.В.

32. Генотипирование сигнальных молекул иммунной системы при бронхиальной астме у детей и подростков Приамурья. Электронная база данных. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2020621855 от 10.12.2020. Супрун Е. Н., Наговицына Е.Б. Кудерова Н.И., Супрун С.В., Лебедько О.А.

33. Показатели сенсibilизации к различным аллергенам при бронхиальной астме у детей и подростков Приамурья. Электронная база данных. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2020622054 от 27.10.2020. Супрун Е.Н., Наговицына Е.Б., Кудерова Н.И., Супрун С.В., Лебедько О.А., Галянт О.И.

34. Оценка показателей фагоцитарного звена иммунитета у детей с бронхиальной астмой и обменными нарушениями почек. Электронная база данных. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2021622370 от 01.11.2021. Супрун С.В., Супрун Е.Н., Галянт О.И., Кудерова Н.И., Пивкина Т.В., Книжникова Е.В., Евсеева Г.П., Лебедько О.А.

35. Оценка показателей функций внешнего дыхания у детей с бронхиальной

астмой. Электронная база данных. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2021622333 от 29.10.2021. Супрун С.В., Супрун Е.Н., Кузнецова М.С., Ануреев С.В., Евсеева Г.П., Лебедько О.А.

36. Прогнозирование неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей по показателям нейтрофильного фагоцитоза. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Королев А.В., Кудерова Н.И., Телепнева Р.С., Лебедько О.А.. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2022682892, 29.11.2022. Заявка № 2022682584 от 25.11.2022.

37. Прогнозирование неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей на основе полиморфизмов генов сигнальных молекул иммунной системы и детоксикации. Супрун Е.Н. Супрун С.В., Королев А.В., Наговицына Е.Б., Лебедько О.А. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2022683922, 08.12.2022. Заявка № 2022682596 от 25.11.2022.

38. Прогнозирование неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей по показателям стандартной иммунограммы (популяции лимфоцитов и уровень сывороточного иммуноглобулина). Супрун Е.Н., Супрун С.В., Королев А.В., Евсеева Г.П., Лебедько О.А., Телепнева Р.С. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2023610132, 10.01.2023. Заявка № 2022684933 от 16.12.2022.

39. Способ иммуномодуляции у детей при бронхиальной астме или обменных нарушениях при заболеваниях почек. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Лебедько О.А.. Патент № 2790970 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/03, А61Р 37/02. опубл. 28.02.2023.

Публикации в прочих изданиях:

40. Супрун Е.Н. Островская О.В., Наговицына Е.Б., Власова М.А Особенности патогенеза и течения бронхиальной астмы с персистенцией цитомегаловируса у детей // Сб. матер. научно-практической конференции «Актуальные вопросы охраны материнства и детства» – Хабаровск: Изд-во АРНО, 2016. – С. 142-150.

41. Супрун Е.Н. Козлов В.К., Савицкая Е.А., Лощенко М.А., Анурьев С.В. Частота сенсibilизации плесневыми аллергенами и особенности течения бронхиальной астмы у детей нижнего Приамурья после наводнения 2013 года // матер. VII съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (с международным участием). – 2017.– С. 79-82.

42. Climate and children with bronchial asthma: case study for the Russian Far East (тезисы на английском языке) печатная Workshop AASSAA– FEB RAS International Workshop on «Climate change adaptation and mitigation: sustainable agriculture and health security». Birobidzhan, Russian Federation 01-05 October

2018.

43. Grigorieva E.A., Suprun E.N. Climate and children with bronchial asthma: a case study for the Russian Far East // *Regional Problems*. – 2018. –Т. 21. – № 3-1. – С. 26-29.

44. Супрун Е.Н., Наговицина Е.Б., Лебедько О.А. Полиморфизмы генов сигнальных молекул иммунной системы как фактор неконтролируемого течения Бронхиальной астмы // *Материалы «VIII Съезд врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока» 29-30 мая 2019. г. Благовещенск.* – С.179-183.

45. Телепнева Р.С., Евсеева Г.П., Супрун Е.Н. Оценка некоторых антропометрических показателей у детей с бронхиальной астмой // *Материалы «VIII Съезд врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока» 29-30 мая 2019 г. Благовещенск.* – С.183-186.

46. Шкунова М.С. Супрун Е.Н. Частота встречаемости астмоподобных симптомов у подростков г. Хабаровска и хабаровского района // *Актуальные вопросы современной медицины / Материалы III Дальневосточного медицинского молодежного форума.* – 2019. – С. 423-425.

47. Яковлев Е.И. Супрун Е.Н. Оценка эффективности небулайзерной терапии с регулируемым объемом частиц респираторной фракции при различных заболеваниях дыхательной системы // *Материалы IV Дальневосточный медицинский молодежный форум.* – Хабаровск. – 2020.

48. Супрун Е.Н., Нестерова А.В. Особенности течения и факторы риска атопического дерматита у детей в районе имени Лазо Хабаровского края // *Научно-практической конференции «Актуальные вопросы охраны материнства и детства»* – Хабаровск: Изд-во АРНО, 2014. – С. 69-70.

49. Евсеева Г.П., Супрун Е.Н., Козлов В.К. Оценка микроэлементного статуса у детей с бронхиальной астмой // *Матер. XIII Российского конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии».* Раздел: Педиатрия. Москва, 21-23 октября 2014 г.– С.129.

50. Супрун Е.Н., Наговицина Е.Б., Супрун С.В., Лебедько О.А. Клинико-иммунологические проявления полиморфизмов генов цитокинов при неконтролируемой бронхиальной астме // *Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии. Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 50-летию института. Научное электронное издание. Национальная академия наук Беларуси; институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.* – 2023. – С. 58.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БА – бронхиальная астма
ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр
ИКК – иммунокомпетентные клетки крови
ИТ – индекс трансформации
Кчм – коэффициента чувствительности мембран эритроцитов
МПМ – мембранный потенциал митохондрий
НСТ – нитросиний тетразолий
ПКТ – показатель компенсаторной трансформации
Псм – показателя стабильности мембран эритроцитов
ТГКС – топические глюкокортикостероиды
ФАН – фагоцитарная активность нейтрофилов
ФЧ – фагоцитарное число
CD – кластеры дифференцировки
Ig – иммуноглобулины
IL – интерлейкины
ISAAC – International Study of Asthma and Allergies in Childhood
Th – Т-хелперы
TLR – Toll-подобные рецепторы
TNF – фактор некроза опухолей