

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ФИЗИОЛОГИИ И
ПАТОЛОГИИ ДЫХАНИЯ»

На правах рукописи

Гассан Дина Анатольевна

**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЯЖЕЛОЙ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

14.01.25 – пульмонология (медицинские науки)

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Колосов Виктор Павлович

Благовещенск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)	13
1.1 Понятие о тяжелой бронхиальной астме	13
1.2 Фенотипы и патогенетические механизмы тяжелой бронхиальной астмы	17
1.3 Генетические особенности тяжелой бронхиальной астмы	21
1.4 Термочувствительные катионные каналы <i>TRPM8</i> и тяжелая астма	24
1.5 Роль курения в формировании тяжелой бронхиальной астмы	28
1.6 Современные принципы терапии тяжелой бронхиальной астмы	29
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ	32
2.1. Основные клинико-функциональные методы исследования	33
2.1.1. Общеклинические методы исследования	33
2.1.2. Исследование вентиляционной функции легких	34
2.1.3. Исследование холодовой гиперреактивности дыхательных путей	36
2.1.4. Исследование клеточного состава индуцированной мокроты	38
2.1.5. Генетические методы исследования	40
2.1.6. Методы статистического анализа	45
2.2. Клиническая характеристика обследованных пациентов	46
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ У БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ	62
3.1. Роль клеточного воспаления бронхов в формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных тяжелой бронхиальной	

астмой	62
3.1.1. Взаимосвязь клинических особенностей течения болезни, профиля клеточного воспаления бронхов и холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных тяжелой бронхиальной астмой	62
3.1.2. Роль деструкции эпителия, гранулоцитов воспалительного инфильтрата бронхов в достижении контроля над заболеванием и формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных тяжёлой бронхиальной астмой	68
3.2. Эффективность применения различных режимов противовоспалительной терапии в достижении контроля у больных тяжелой бронхиальной астмой наличием холодовой гиперреактивности бронхов и разным профилем бронхиального воспаления	72
ГЛАВА 4. ЭФФЕКТЫ ПОЛИМОРФИЗМА <i>C.750G>C</i> ГЕНА <i>TRPM8</i> НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ	85
4.1. Влияние полиморфизма <i>c.750G> C</i> гена холодового рецептора <i>TRPM8</i> на снижение функции легких у больных бронхиальной астмой	87
4.2. Влияние полиморфизма <i>c.750G> C</i> гена холодового рецептора <i>TRPM8</i> и курения на формирование тяжелой бронхиальной обструкции	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	107
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	108
ЛИТЕРАТУРА	109

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСТ	- тест по контролю над астмой
БА	- бронхиальная астма
ТБА	- тяжелая бронхиальная астма
ДДБА	- длительнодействующие β_2 -агонисты
ГКС	- глюкокортикостероиды
ИГКС	- ингаляционные глюкокортикостероиды
ИГХВ	- изокапническая гипервентиляция холодным воздухом
ДП	- дыхательные пути
ЖЕЛ	- жизненная емкость легких
ИТ	- индекс Вотчала-Тиффно
КДБА	- короткодействующие β_2 -агонисты
МОС ₂₅	- мгновенная объемная скорость на уровне 25% ФЖЕЛ
МОС ₅₀	- мгновенная объемная скорость на уровне 50% ФЖЕЛ
МОС ₇₅	- мгновенная объемная скорость на уровне 75% ФЖЕЛ
ОФВ ₁	- объем форсированного выдоха за 1-ю секунду
ПСВ	- пиковая скорость выдоха
ФЖЕЛ	- форсированная жизненная ёмкость легких
ФВД	- функция внешнего дыхания
ХГДП	- холодовая гиперреактивность дыхательных путей
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ	- интерлейкин
TRP	- transient receptor potential
ПЦР	- полимеразно-цепная реакция
ПДРФ	- полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ОНП	- однонуклеотидный полиморфизм
ХОБЛ	- хроническая обструктивная болезнь легких

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Бронхиальная астма (БА) является распространенным, разнородным по клиническим и фенотипическим проявлениям заболеванием, от которого в настоящее время страдает около 235 млн человек [218].

Являясь широко распространённым гетерогенным заболеванием, тяжелая бронхиальная астма (ТБА) составляет 5-20 % от всех случаев бронхиальной астмы в мире [44,50,93,94]. На лечение ТБА отводиться около 80% всех экономических затрат, предназначенных на это заболевание в целом [78].

Доля больных с контролируемым течением БА в клинической практике не превышает 50%, несмотря на терапию современными базисными противовоспалительными средствами [4,7,23,].

Низкая обратимость воспалительного процесса в слизистой оболочке бронхов, активность оксидативного стресса и флюктуирующая бронхиальная обструкция, являются основными причинами, негативно влияющими на достижение и эффективность, а также поддержание контроля заболевания [46]. У больных БА, страдающих холодовой гиперреактивностью дыхательных путей (ХГДП) на фоне стандартной базисной терапии именно персистирующее воспаление и недостаточное снижение продуктов свободно радикального окисления усложняют достижение контролируемого течения и также сопровождаются высоким риском обострений [15].

ХГДП в условиях низких температур диагностируется у более 60% больных БА жителей Сибири и Дальнего Востока любой степени тяжести, при систематическом контакте с провоцирующим фактором [43]. Она характеризуется снижением чувствительности к стероидам, трудно контролируется терапией современными

комбинированными противоастматическими препаратами в отличие от больных БА с отсутствием холодового бронхоспазма [43].

Известно, что патогенетическим механизмом круглогодичной и сезонной ХГДП при БА является сочетание генетической детерминированности с генерацией свободных радикалов, способствующих нестабильности фенотипа воспаления в слизистой оболочке бронхов у больных БА с повышенной реакцией дыхательных путей под действием таких этиологических факторов, как низкие температуры воздуха, оказывающих существенное влияние на сезонную утрату контроля и ухудшение качества жизни больных в зимний период [40].

В настоящее время имеющиеся сведения позволяют говорить о гетерогенности причин и механизмов формирования ХГДП. Согласно им, ХГДП можно объяснить экспрессией в эпителии бронхов и сенсорных нейронах ионного канала *TRPM8* в качестве терморцептора, активируемого под действием холодного воздуха [14,31,45,48,203]. Существуют доказательства вовлеченности этих рецепторов в развитие воспаления, гиперреактивности и обструкции бронхов, а также данные что у больных БА повышена концентрация *TRPM8* в клетках бронхиального эпителия [14].

Вместе с тем требует дальнейшего изучения вопрос о вкладе однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *TRPM8* у больных на формирование тяжелых форм БА.

Весьма актуальным является изучение клинико-функциональных параметров, особенностей хронического воспалительного процесса в дыхательных путях, изменений в системе биомаркеров воспаления бронхов (соотношение клеточных популяций), функционально-метаболической ферментативной активности у больных тяжелой бронхиальной астмой с ХГДП.

Степень разработанности темы исследования

В ходе изучения темы исследования были проанализированы и изучены более 300 научных работ отечественных и зарубежных авторов. Особое внимание

уделялось изучению патофизиологии, фенотипированию, терапии и генетике тяжелой бронхиальной астмы.

Цель исследования

Изучить особенности клинической картины, паттерна бронхиального воспаления, холодовой гиперреактивности дыхательных путей, а также эффект ОНП rs11562975 гена холодового рецептора *TRPM8* у больных тяжелой бронхиальной астмой в достижении контроля заболевания.

Задачи исследования

1. Изучить взаимосвязь клинических особенностей течения болезни и профиля воспаления у больных тяжелой бронхиальной астмой с ХГДП.
2. Оценить возможности различных вариантов базисной терапии в достижении контролируемого течения тяжелой БА с ХГДП в зависимости от профиля воспаления.
3. Установить вклад ОНП rs11562975 гена холодового рецептора *TRPM8* в прогрессировании бронхиальной обструкции у больных бронхиальной астмой.
4. Оценить роль взаимосвязи ОНП *TRPM8* и курения в прогрессировании бронхиальной обструкции у больных бронхиальной астмой.

Научная новизна

Установлены особенности клинического течения болезни, уровень нарушений лёгочной функции у больных тяжелой формой БА и сопутствующей ХГДП.

Установлена взаимосвязь между тяжестью, степенью контроля заболевания, вентиляционной функцией легких, паттерном бронхиального воспаления и холодовой гиперреактивностью дыхательных путей у больных тяжелой бронхиальной астмой.

Впервые доказано участие ОНП rs11562975 гена холодового рецептора TRPM8 в снижении лёгочной функции с появлением необратимого компонента обструкции у больных БА.

Установлено, что злоупотребление курением у больных бронхиальной астмой носителей аллеля С в генотипе по ОНП rs11562975 гена TRPM8 связано с риском развития тяжелых обструктивных нарушений у больных БА.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что отсутствие достижения контроля и неэффективность стандартной противовоспалительной терапии у больных тяжелой формой БА связано с характером бронхиального воспаления и наличием холодовой гиперреактивности дыхательных путей.

Варианты воспалительных паттернов бронхов могут быть использованы в клинической практике для подбора оптимальных противовоспалительных режимов комбинированной терапии. Больным тяжелой БА, смешанным паттерном бронхиального воспаления и наличием холодовой гиперреактивности дыхательных путей предпочтительна терапия ИГКС/ДДБА в сочетании с длительно действующим антихолинергическим препаратом.

Носительство аллеля С в генотипе по ОНП rs11562975 гена холодового рецептора *TRPM8* у больных бронхиальной астмой с ХГДП связано с ухудшением проходимости ДП и появлением необратимой бронхиальной обструкции.

Все больные бронхиальной астмой - носители аллеля С в генотипе, злоупотребляющие курением, нуждаются в проведении антисмокинговых программ для профилактики возникновения тяжелых форм заболевания.

Методология и методы диссертационного исследования

Представленное диссертационное исследование выполнено в рамках государственного задания НИР: «Нейрогуморальные и клеточно-молекулярные механизмы нарушений функции дыхательных путей при хронических воспалительных болезнях органов дыхания» (№ гос. регистрации 01201465957). Предметом исследования являются больные различной формы и степени тяжести бронхиальной астмы, получавшие лечение в ДНЦ ФПД (2015-2018 гг.). В основу работы положены принципы доказательной медицины, в соответствии с современными представлениями о диагностике и лечении бронхиальной астмы. Выполненная работа расширяет представление о клиническом течении тяжелой бронхиальной астмы с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей, возможностях диагностики и способах эффективной терапии больных с целью поддержания хорошего уровня контроля. Диагностический комплекс предусматривал применение клиничко-функциональных, биохимических, цитологических, генетических методов исследования у 109 больных тяжелой бронхиальной астмой и 314 больных БА лёгкой и средней степени тяжести и определялся поставленными задачами. Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ДНЦ ФПД (протокол № 81Т от 29.07.14).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Отсутствие контроля заболевания у больных тяжелой бронхиальной астмой ассоциировано с особенностями клинического течения болезни, воспалительным паттерном бронхов, снижением функции легких и наличием холодовой гиперреактивности дыхательных путей.
2. Определение типа бронхиального воспаления следует использовать для выбора оптимальных схем противовоспалительной терапии у больных тяжелой БА и наличием ХГДП.
3. Полиморфизм rs11562975 гена холодового рецептора *TRPM8* у больных БА влияет на течение заболевания и снижение функции лёгких.

4. Полиморфизм rs11562975 гена *TRPM8* в сочетании со злоупотреблением курением приводит к появлению тяжелых обструктивных нарушений у больных БА носителей аллеля С.

Степень достоверности полученных результатов

Степень достоверности полученных в работе результатов определяется контингентом исследования, достаточным объёмом набранного материала, репрезентативностью выборки, применением современных методов исследования и использованием статистической программы обработки полученных данных Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2011) параметрическими и непараметрическими методами с соблюдением закона о нормальном распределении, уровне публикаций.

Публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 7 – в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней.

Личный вклад соискателя

Автором диссертационного исследования разработан протокол исследования, составлена тематическая карта больного, проведены консультации, клинический осмотр и лечение обследованного контингента; выполнены генетические методы исследования. Самостоятельно проводилась статистическая обработка полученного материала. Доля участия автора в сборе материала – 90%, в анализе и систематизации полученных данных – 90 %.

Апробация работы

Материалы работы представлены и обсуждены на заседании Учёного совета ФГБНУ «ДНЦ ФПД» (2018), научных конференциях «Молодые учёные – науке» (Благовещенск, 2016, 2017, 2018, 2019), VII - VIII Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока с международным участием (Благовещенск, 2017,2019), XXVII International Congress of European Respiratory Society (Milan, Italy, 2017).

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста, содержит 36 таблиц и 20 рисунков. Диссертация состоит из введения, 4 глав, включая обзор литературы, материалы и методы исследования, главы результатов собственного исследования, а также заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка, содержащего 223 работы отечественных и зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Понятие о тяжелой бронхиальной астме

Под понятием бронхиальной астмы (БА) подразумевают хроническое персистирующее воспалительное заболевание дыхательных путей, имеющее генетическую предрасположенность, при котором воспалительный процесс в бронхах приводит к гиперреактивности бронхов, обструкции и появлению характерных симптомов [59].

По результатам многочисленных эпидемиологических исследований за последние несколько лет подтверждена высокая распространённость БА, от которой в мире страдает 235-300 миллионов человек [44,128,210,217]. Распространенность данного заболевания в Российской Федерации составляет 5-7% [3,6,44,49,87]. Таким образом, БА относится к числу глобальных проблем здравоохранения [218]. По сообщениям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), БА обуславливает ежегодно более 26 миллионов DALY (Disability Adjusted Life Years – показатель число лет жизни, потерянных в связи с нетрудоспособностью [129].

Контроль над БА является главной целью терапии данного заболевания и является показателем качества оказанной медицинской помощи [128]. Большинству больных БА удастся контролировать заболевание и длительно поддерживать контроль [210]. Эти больные достаточно хорошо отвечают на терапию ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) или в комбинации с длительно действующими β 2-агонистами (ДДБА)/антилейкотриеновыми препаратами, но только при условии правильной техники ингаляции и при приверженности терапии [210].

Тем не менее, 5-10 % больных БА остаются рефрактерными к стандартной терапии и только при применении высоких доз ИГКС в сочетании с пероральными

глюкокортикостероидами (ГКС) или другими противовоспалительными препаратами достигают контроля [44,128]. Данную группу пациентов можно отнести к категории страдающих тяжелой бронхиальной астмой (ТБА).

Таким образом, ТБА можно определить, как БА, при которой требуется лечение, соответствующее 4-5 ступеням противовоспалительной терапии по классификации GINA (Global Initiative for Asthma - Глобальная инициатива по бронхиальной астме): высокие дозы ИГКС/ДДБА, применение тиотропия бромидом, приём пероральных ГКС, для достижения и сохранения контроля, или БА, которая остаётся неконтролируемой при применении данной терапии [36,37]. Для этих пациентов характерно большое количество обострений, увеличение частоты госпитализаций и высокий риск летального исхода [37].

Для постановки диагноза ТБА необходимо исключение альтернативных диагнозов, наличия у пациента низкой приверженности к терапии, неправильной техники ингаляции [44].

Однако не все пациенты с неконтролируемой БА характеризуются тяжёлым течением заболевания [3,36,44]. Под неконтролируемой БА подразумевается отсутствие критериев контроля над заболеванием у больных, получающих базисную терапию [35,44,128]. Основой для постановки диагноза неконтролируемой БА служит наличие 3-4 признаков (Рисунок 1) в течении 4 недель [44,51]. В 2014 году была опубликована статья в которой приведены различия между неконтролируемой (трудной для лечения БА) БА и ТБА [141]. В группу неконтролируемой БА относят пациентов с нелечеными сопутствующими заболеваниями, курением, неправильным или недостаточным использованием лекарственных препаратов, сохраняющимся контактом с аллергенами (аллергическая БА) [142,210]. Резистентная к терапии БА характеризуется:

1. Невозможностью достижения контроля над заболеванием во время терапии высокими дозами ИГКС в сочетании с дополнительным препаратом (ДДБА, антагонисты лейкотриеновых рецепторов, теофиллины) и/или приёмом пероральных ГКС более 6 месяцев в году [141];
2. Наличие одного и более критерия во время терапии: плохого контроля за

симптомами по вопросам: АСТ (Asthma Control Test) менее 20 баллов или ASQ (Asthma Control Questionnaire) более 1,5 баллов, частых обострений БА (минимум 2 обострения за год), серьёзных обострений БА (минимум 1 госпитализация или нахождение на искусственной вентиляции легких за год, ОФВ₁ менее 80% от должного (если ОФВ₁/ФЖЕЛ ниже нормы) [141].

За последние 4 недели у пациента отмечались		Уровень контроля		
		Хорошо контролируемая	Частично контролируемая	Неконтролируемая
Дневные симптомы чаще 2-х раз в неделю	ДА <input type="checkbox"/> НЕТ <input type="checkbox"/>	Ничего из перечисленного	1-2 из перечисленного	3-4 из перечисленного
Ночные пробуждения из-за БА	ДА <input type="checkbox"/> НЕТ <input type="checkbox"/>			
Потребность в препарате для купирования симптомов чаще 2-х раз в неделю	ДА <input type="checkbox"/> НЕТ <input type="checkbox"/>			
Любое ограничение активности из-за БА	ДА <input type="checkbox"/> НЕТ <input type="checkbox"/>			

Рисунок 1 – Уровни контроля над бронхиальной астмой согласно Федеральным клиническим рекомендациям по бронхиальной астме 2018 [51]

Резистентная к терапии ТБА характеризуется невозможностью достижения контроля даже при использовании максимальных доз препаратов стандартной терапии (рефрактерная БА) или возможностью его достижения при применении максимальных доз препаратов при дополнительном приёме пероральных ГКС (ГКС-зависимая БА) [3,44]. Рефрактерная ТБА характеризуется развитием в дыхатель-

ных путях необратимых структурных изменений (ремоделирование бронхов), которые включают в себя бокаловидную гиперплазию желез бронхов, гиперваскуляризацию бронхов, гиперплазию и гипертрофию гладкой мускулатуры бронхов и субэпителиальный фиброз [30,44,204]. На долю рефрактерной ТБА приходится 10,4 случая на 10 тысяч населения [194].

По мировым данным распространенность ТБА среди взрослого населения составляет 5-20% случаев [4,19,56], среди подростков - до 30% случаев [19], у детей – 10% [24]. В 2014 году в РФ было зарегистрировано 41,75% случаев персистирующей ТБА [17].

На лечение пациентов с неконтролируемой ТБА приходится более 80% от затраченных на лечение БА средств здравоохранения [50,78].

За последние время проблема ТБА рассматривалась в нескольких исследованиях (TENOR, SARP I, II, III, ENFUMOSA) в которых выявлена неоднородность данного заболевания [16,80,100,187]. По их результатам, большая часть больных ТБА были женского пола с повышенной массой тела, у которых чаще наблюдалась малообратимая обструкция дыхательных путей, а также гиперчувствительность к салицилатам и сопутствующие заболевания (риносинуситы, гастроэзофагеальный рефлюкс) [16,44].

В России проблема тяжелой астмы впервые раскрыта в национальном исследовании НАБАТ, в котором участвовало 7 городов РФ и более чем 500 больных БА [204]. В результате было установлено, что у всех пациентов, включенных в исследование отсутствовал контроль над БА в начале и более чем 80% пациентов достигли его после проведения терапии ИГКС/ДДБА [204]. Однако опубликованные в данном исследовании показатели контроля над ТБА значительно отличаются от таковых в странах Европы и США [44]. В ходе 3 крупных исследований было выявлено, что примерно 50% больных БА не достигают контроля над заболеванием, а у 23% контроль отсутствует [77,120,171].

В ходе исследования проведенного Г.Р. Сергеевой и соавт. (2015) у 82% пациентов с ТБА наблюдалось неконтролируемое течение заболевания, у 10% был

частичный контроль, и только у 8% наблюдался полный контроль над заболеванием [50].

1.2. Фенотипы и патогенетические механизмы тяжелой бронхиальной астмы

ТБА по своей сути является гетерогенным заболеванием [34]. Эта гетерогенность проявляется различными фенотипами заболевания. Фенотипы БА - это узнаваемые кластеры клинических, патофизиологических и демографических характеристик [214]. По данным GINA (2018) выделяют 5 фенотипов:

1. Аллергический: фенотип, чаще возникает в детском возрасте, связан с наличием атопии у пациента или его ближайших родственников. Для данного фенотипа характерен эозинофильный паттерн бронхиального воспаления дыхательных путей. Пациенты с данным фенотипом обычно хорошо отвечают на ингаляционную терапию глюкокортикостероидами (ИГКС) [44,51];

2. Неаллергический: чаще развивается у взрослых, не связан с атопией. Характеризуется эозинофильным, нейтрофильным, смешанным или малогранулоцитарным паттерном воспаления [44]. В зависимости от которого пациенты могут не отвечать на терапию ИГКС [44,51];

3. С поздним дебютом: чаще у женщин, манифестирует во взрослом возрасте (старше 40 лет). Пациенты с данным фенотипом требуют более высоких доз ИГКС [44,51];

4. С фиксированной обструкцией дыхательных путей: пациенты с длительным стажем БА, имеющие фиксированную обструкцию дыхательных путей, вследствие ремоделирования дыхательной стенки. Для фиксированной бронхиальной обструкции характерно соотношение $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ менее 0,7 после применения β_2 агониста короткого действия, но только при отсутствии или исключении диагноза ХОБЛ [44,51];

5. У больных с ожирением [44,218].

Целью фенотипирования является облегчение выбора оптимальной терапии, особенно у пациентов с неконтролируемым течением БА, при этом оно не включает патофизиологические механизмы развития БА [9,53]. Несколько фенотипов могут лежать в основе эндотипа, так как последний является их молекулярной основой [44].

Эндотип заболевания – тип болезни, с определенным отличительным патофизиологическим или функциональным признаком [56].

Различают Т2 и неТ2-эндотип БА, в зависимости от иммунологического типа воспаления. Большинство пациентов с ТБА относят к Т2- эндотипу [57].

Т2-эндотип характеризуется доминированием Th2-лимфоцитов и высокой активностью ILC2-клеток, участвующих в развитии аллергической или неаллергической БА [68]. Эти клетки продуцируют интерлейкин (IL) 5, который обуславливает формирование эозинофильного воспаления. IL5 и ряд других цитокинов (IL-4, IL-13), вырабатываемые Th2-лимфоцитами, участвуют в запуске иммуноглобулин (Ig) E-опосредованных реакций в нижних дыхательных путях, активируют и поддерживают воспалительный процесс в слизистой оболочке, а также ремоделирование бронхиальной стенки [35].

Th2- эндотип включает в себя различные варианты сочетания бронхиальной астмы и эозинофильного воспаления [62,63]. Th2 – эндотипу относят аллергическую астму, аспириновую БА, саму по себе и сопровождающуюся атопией [62], синдром перекреста (атопическая БА в сочетании с ХОБЛ) [62].

Не Т2-эндотип БА остаётся менее изученным и ассоциирован с нейтрофильным или малогранулоцитарным типом воспаления, который реализуется через Th-1 и Th-17 лимфоциты [30]. Не Th2-эндотип характерен для астмы с поздним дебютом, астмы с ожирением, астмы у курильщиков или нейтрофильной астмы у некурящих людей [211,215].

Патофизиологические фенотипы ТБА [3]:

1. Эозинофильный – при количестве эозинофилов в мокроте $\geq 3\%$ [132];
2. Нейтрофильный – при нейтрофилах в мокроте $>61\%$ [60], $\geq 76\%$ [25];

3. Смешанный – при количестве эозинофилов в мокроте $\geq 3\%$ [132] и нейтрофилах $>61\%$ [138], $\geq 76\%$ [25];
4. Малогранулоцитарный – при нормальном содержании эозинофилов и нейтрофилов [25,138].

Но, не только количество и соотношение клеточных элементов может служить критерием воспалительной реакции, но и их функциональная ферментативная активность [43]. Миелопероксидаза (МПО) является одной из самых известных пероксидаз, которая содержится в азурофильных гранулах нейтрофильных лейкоцитов, моноцитах и макрофагах (тканевых) [169].

Являясь ферментом так называемого «дыхательного взрыва» МПО путем катализирования продукции окислителей и свободных радикалов [105,162,169], играет важную роль в перекисном окислении липидов и нитрировании белков [96,105]. МПО участвует в процессах десквамации, утрате функции бронхиального эпителия при БА [12,98], что приводит к утрате фактора релаксации эозинофилов и стимуляции гиперреактивности дыхательных путей [84].

МПО также служит биомаркером хронического воспаления бронхов при БА в сочетании с ХГДП [2]. Это установлено в исследованиях, где было показано что внутриклеточная концентрация МПО в гранулоцитах из образцов мокроты, соответствует интенсивности воспаления в межклеточном пространстве и повышается в цитоплазме по мере достижения контроля [2].

Персистирующее воспаление дыхательных путей при БА, является одним из главных факторов, влияющих на тяжесть заболевания, достижение контроля, на высокий риск развития обострений болезни на фоне постоянного воздействия таких триггеров, как низкие температуры атмосферного воздуха, приводя к развитию ХГДП [43].

Феномен ХГДП играет важную роль в развитии симптомов и воспалительной реакции в слизистой бронхов разного калибра у больных БА любой степени тяжести [42].

Она диагностируется у более чем 50% больных БА, при любой степени тяжести, а также установлено что наличие БА ассоциировано с увеличением частоты

развития холодовых симптомов на 50%, по сравнению со здоровыми [200]. Он характеризуется снижением чувствительности к ИГКС, трудно контролируется терапией современными комбинированными препаратами в отличие от больных БА с отсутствием холодового бронхоспазма [200].

Известно, что риск появления холодовых симптомов, таких как одышка, свистящие хрипы, наличие мокроты, возрастает у лиц, имеющих в анамнезе аллергический риносинусит, что говорит о общих патогенетических механизмах этих патологий [74]. Вдыхание холодного воздуха снижает функцию внешнего дыхания и диффузионную способность легких [114]. В ходе исследования, проведенного в Шанхае была доказана зависимость обострений БА от низкой температуры окружающей среды (2005-2012гг.). За все время исследования фиксировалась среднесуточная температура и количество случаев обострения БА (госпитализаций). В результате была выявлена достоверная обратная взаимосвязь между частотой обострений БА и температурой окружающей среды, а именно снижение среднесуточной температуры воздуха ниже $18,7^{\circ}\text{C}$ оказывало существенное влияние на частоту госпитализаций в течение последующего месяца [105]. Этот факт также подтвердило исследование выполненное в Гонконге [1]. Несомненный интерес вызывает исследование, которое было проведено в Нью-Йорке [118]. Данное исследование проводилось в зимние месяцы года, то есть при более низкой температуре, чем в Китае. Было зафиксировано снижение числа госпитализаций с декабря по март, но похолодания в межсезонье увеличивали риск госпитализаций [118]. Это объясняется тем, что в холодный период больные БА старались ограничить или минимизировать контакт с холодным воздухом, а в период потепления больные становились менее осторожными и подвергались действию холода в большей степени [118].

Вдыхание холодного воздуха не только провоцирует симптомы среди больных БА, но и у здоровых людей. Так, у лиц, работающих на открытом воздухе, увеличивается риск развития хронического бронхита и появления одышки [167]. У жителей Крайнего Севера и Чукотки, которые постоянно испытывают воздействие жестких климатических условий отмечаются более выраженные респираторные

нарушения [27]. Как показали ранее выполненные работы, серьёзные морфофункциональные нарушения затрагивают слизистую оболочку бронхов, в которой происходит истончение эпителия, лейкоцитарная инфильтрация, гиперплазия гладкомышечных клеток, а также нарушение трофики бронхиальной стенки [27].

Вызывает интерес тот факт, что не все больные БА в равной степени реагируют на снижение температуры вдыхаемого воздуха [167]. Так ранее, в лабораторных условиях было показано, что в ответ на ингаляцию холодного воздуха (-20°C) реакция со стороны дыхательных путей в виде бронхоспазма наблюдалась у значительной части, но далеко не у всех пациентов БА [167], что могло быть обусловлено определёнными генетическими особенностями заболевания.

1.3. Генетические особенности тяжелой бронхиальной астмы

К настоящему времени обнаружено более 100 генов, связанных с развитием астмы и формами её течения [73,135,188]. Изучая полиморфизмы восприимчивых генов, можно объяснить гетерогенность и определить степень тяжести астмы [188], что поможет подобрать лечение, соответствующее фенотипу БА.

С развитием секвенирования и генотипирования, а также совершенствования возможностей компьютерной обработки данных, способность распознавать генетические изменения при астме существенно возросла. Существует три основных генетических подхода к идентификации генов, связанных с астмой, а именно: исследования ассоциаций генов-кандидатов, исследования позиционного клонирования и исследования ассоциаций всего генома (GWAS). В большинстве генетических исследований астмы используются подходы, связанные с генами-кандидатами, которые выявили более 50 генов в ряде исследований [75]. Метод основан на выявлении полиморфизмов известных функциональных генов, которые влияют на астму. Метод ограничен с точки зрения понимания патофизиологических механизмов астмы и не может обнаружить новые восприимчивые гены [163]. Позиционное клонирование основано на анализе сцепления для распознавания хромосомных областей, которые связаны с заболеванием, и чувствительный к заболеванию ген

идентифицируется с помощью точного картирования. Используя этот метод, были идентифицированы шесть новых генов, тесно связанных с астмой, а именно: *ADAM33*, *VDR*, *DPP10*, *PHF11*, *HLA-G* и *GPR15* [213]. Этот метод может также найти восприимчивые к астме гены в случаях неизвестной функции гена, но трудно выяснить сложные механизмы заболевания, так как метод ограничен определённой хромосомной областью. Благодаря совершенствованию технологии высокопроизводительной платформы для генотипирования и завершению проекта по геному человека широко используются GWAS с более высокой точностью. С помощью GWAS было идентифицировано около 100 связанных с астмой генов, таких как *IL33* в хромосомной области 9p24, *HLA-DR / DQ* в 6p21, *IL1RL1 / IL18R1* в 2q12 и *IL13* в 5q31 [213,216].

Обычно считается, что восприимчивые к астме гены в основном расположены в 5q31-33, 6p21, 12q13-q24 и других хромосомных областях [164], что было показано в многочисленных экспериментах в разных популяциях.

Антиген лейкоцитов человека (*HLA*) играет роль в регуляции воспаления в Т-хелперных клетках [70]. Цитокины, которые секретируются воспалительными клетками, включая интерлейкины, хемокины и фактор некроза опухолей, участвуют в развитии астмы и способствуют хроническому воспалению дыхательных путей [131]. Этот ген кодирует цитокины, и его полиморфизм влияет на тяжесть астмы. Полиморфизмы генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR9* и *TLR10* в значительной степени связаны с риском развития астмы [71].

ADAM33 является геном восприимчивости к астме, который был идентифицирован в исследованиях позиционного клонирования, который экспрессируется в стромальных клетках дыхательных путей; он участвует в появлении гиперреактивности дыхательных путей и связан со снижением функции легких [133]. *ORMDL3* ген в 17q21 локусе связан с ремоделированием дыхательных путей [184].

Ген *CCL5* связан с неаллергической астмой у японской популяции [62], а кластерное исследование показало, что полиморфизм гена *SRP9* (rs4653433) связан с неаллергической астмой [62]. Полиморфизмы генов *IL1RL1*, *SMAD3*, *RORA*,

ORMAL3, *DPP10*, *TSLP*, *IL13*, *HLA-DQ*, *IL12RB* и *HRH1* также связаны с фенотипом аллергической астмы [124].

В недавнем полногеномном исследовании было установлено что несколько генов (*GATA3*, *KIAA1109*) регулирующих выработку муцина связаны с риском формирования ТБА [159].

Поиск восприимчивых к астме генов является ключевым шагом к раскрытию патогенеза астмы, но более важно знать, как генетические вариации и лекарственная терапия работают вместе [111].

Исследования показали, что белок, который кодируется геном *STIP1*, является важным компонентом комплекса, который активирует глюкокортикоидный рецептор. Полиморфизм гена *STIP1* влияет на терапевтический эффект стероидов [189].

CRHR1 кодирует рецептор, связанный с G-белком, который взаимодействует с нейропептидами, связанными с высвобождением кортикотропина, участвует в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового пути, что улучшает ответ со стороны дыхательных путей на глюкокортикоиды [125]. *FCER2* кодирует низкоаффинный IgE-рецептор [117].

ADRB2 является геном β 2-адренергического рецептора, полиморфизм в этом локусе влияет на эффективность терапии астмы. Мутация в Arg16 гомозиготе гена *ADRB2* ослабляет фармакологический ответ на β -агонисты короткого действия [125].

Исследования также показали, что ген *D641V* глутатионредуктазы (GR) связан со стероид резистентной БА в китайской популяции Хань [72].

ALOX5 является основной мишенью для лейкотриенов, исследования показали, что его мутации в промоторной области влияют на терапевтический эффект лейкотриенов [166].

Согласно современным литературным данным, существенную роль в рецепции низких температур играют неселективные кальциевые каналы с транзитным рецепторным потенциалом TRPM8 [64,65,111,211]. Они экспрессируются на нервных окончаниях респираторного тракта [130], в бронхиальном эпителии [179], где

могут индуцировать бронхоконстрикцию (нервно-рефлекторную) и воспалительные реакции в ответ на холодное воздействие.

В ранее проведенных исследованиях было обнаружено повышение концентрации этих рецепторов в эпителии дыхательных путей у больных БА, а также доказано участие этого ионного канала в стимуляции воспалительной реакции, обструкции и гиперреактивности бронхов [43].

1.4. Термочувствительные катионные каналы *TRPM8*, их влияние на респираторный тракт

TRP (transient receptor potential) - представляют собой группу ионных каналов, служащих рецепторами для большого числа физических и химических стимулов [91, 92, 168, 174, 183, 221].

Первый TRP-канал идентифицировали у мутантной особи *Drosophila melanogaster* [165], у которой особенности мутантного типа объяснялись различиями в скорости и времени изменения мембранного потенциала фоторецепторов в ответ на стимуляцию светом [151, 172]. У этого типа наблюдались транзиторные изменения потенциала которые быстро возвращались к исходному уровню после воздействия света, в отличие от реакции обычных мух той же особи [172].

После данного открытия были обнаружены и изучены другие TRP-каналы (Рисунок 2) [152] и были сгруппированы в несколько подсемейств: *TRPM* (меластатиновые), *TRPV* (ваниллоидные), *TRPC* (канонические), *TRPA* (анкириновые), *TRPML* (муколиптиновые) и *TRPP* (полицистиновые) [91, 92, 151].

Члены подсемейства *TRPC* наиболее тесно связаны с каналами *TRP* *Drosophila* [130]. Существует семь субъединиц *TRPC*. Человеческий *TRPC2*, по-видимому, является псевдогеном, хотя у других млекопитающих *TRPC2* является функциональным [175, 180]. Остальные субъединицы *TRPC* можно разделить на две группы: *TRPC1-TRPC4-TRPC5* и *TRPC3-TRPC6-TRPC7*. *TRPC*-субъединицы могут собираться в гомомерные каналы и гетеромерные каналы

[119,130,175,180,205]. Общей особенностью каналов *TRPC* является то, что все они активируются сигнальным путем фосфолипазы C (PLC) [222].

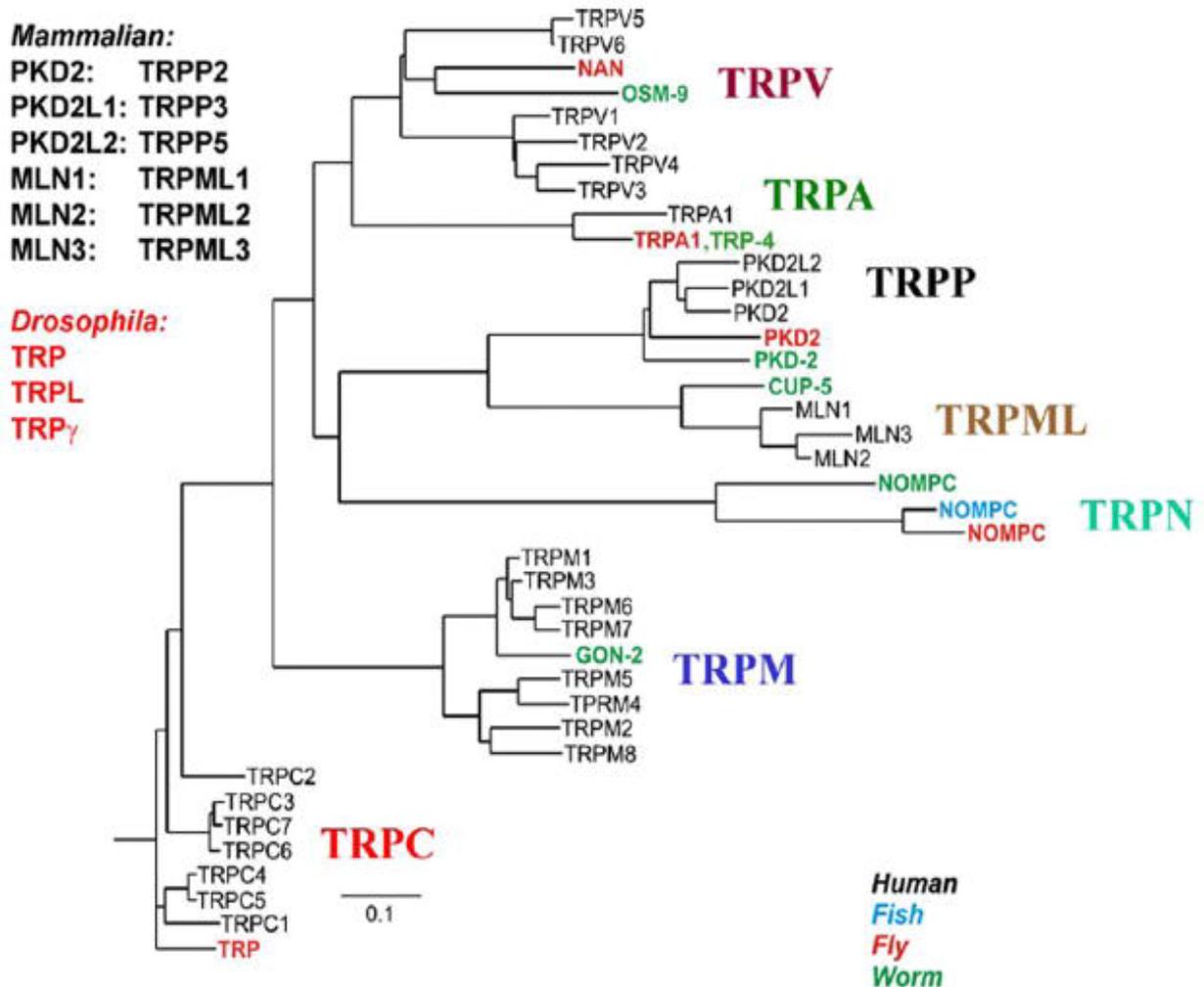


Рисунок 2 – Филогенетическое древо TRP-каналов [152]

Подсемейство *TRPM* млекопитающих содержит восемь представителей TRPM 1-8. Они делятся на три подгруппы: *TRPM1-TRPM3*, *TRPM4-TRPM5*, *TRPM6*

-*TRPM7*, причем *TRPM2* и *TRPM8* являются отдельными от остальной части подсемейства.

TRPM4 и *TRPM5* являются уникальными среди каналов *TRP*, поскольку они являются единственными двумя одновалентными катионселективными ионными каналами [144]. Кроме того, *TRPM2*, *TRPM6* и *TRPM7* являются особенными тем, что они содержат ферментативный домен на С-конце [102,144].

Подсемейство *TRPV* имеет шесть представителей *TRPV1-6*, которые можно разделить на две группы: *TRPV1-4* и *TRPV5-TRPV6*. Гомомерные каналы *TRPV1-4* представляют собой слабые Ca^{2+} -селективные катионные каналы. Они также активируются с помощью тепла [113, 198, 221].

Единственный член подсемейства *TRPA*, *TRPA1*, получил свое название из своего очень большого домена ARD, который содержит не менее 14 повторов. Подсемейство *TRPML* имеет три члена, *TRPML1-3*. Это прежде всего внутриклеточные белки в цитозольных компартментах [65,221].

Подсемейство *TRPP* имеет три представителя: *TRPP2* (также известный как *PKD2*), *TRPP3* (или *PKD2L1*) и *TRPP5* (или *PKD2L2*) [221]. Их нельзя путать с другими поликистинами - членами подсемейства *PKD1*.

В ходе изучения установлено, что некоторые *TRP*-каналы являются термочувствительными [199]. *TRPV1* и *TRPV2* способны активироваться от воздействия высоких температур [190]. *TRPV3* и *TRPV4* активируются в пределах нормальной температуры тела [64,212]. *TRPV1*, *TRPV3*, *TRPM5*, *TRPM8*, *TRPA1* – являются вкусовыми рецепторами. *TRPM5* и *TRPC2*- обонятельными. *TRPV1-4*, *TRPM8*, *TRPA1* – тактильных ощущений [99].

TRPM8 был впервые клонирован из клеток простаты, затем в других органах и тканях [183,220]. Он является проницаемым для ионов кальция [64,220].

Ген *TRPM8* был впервые выделен из мышечных нейронов дорсального корешкового ганглия посредством геномного поиска последовательностей белка, содержащих *TRP*-рецепторы [64].

Ген *TRPM8* расположен на хромосоме человека 2q37 [97,179]. Преимущественно экспрессируется в субпопуляции первичных афферентных чувствительных нейронов с холодовой чувствительностью в дорсальном корешковом и тройничном ганглиях, и в значительной степени отличается от нейронов, экспрессирующих *TRPV1* или *TRPA1* [64,69,91].

TRPM8 является термодатчиком, и активируется температурами в диапазоне 15-28 °C [64]. *TRPM8* также активируют химические соединения, которые вызывают ощущение охлаждения, например, ментол, ицилин и эвкалиптол [64,176]. Помимо их влияния на *TRPM8*, как ментол, так и ицилин активируют *TRPA1* при высоких концентрациях [82,121].

На сегодняшний день установлено, что канал экспрессируется в респираторном тракте. Ранее уже была доказана экспрессия *TRPM8* в бронхиальном эпителии человека [79,113, 134,136,209].

Даже снижение температуры от 20,5°C в проксимальных отделах трахеи до 31,6°C в дистальных дыхательных путях, при непродолжительном контакте с холодным воздухом (-20°C) может приводить к открытию канала [197]. В ответ развиваются симптомы, включающие в себя спазм бронхов, гиперсекрецию слизи и воспаление [147,150]. Есть некоторые опубликованные данные, которые предполагают, что запуск канала *TRPM8* может привести к выработке медиаторов воспаления [136]. Например, активация *TRPM8* в бронхиальных эпителиальных клетках человека путем холода или ментола может вызывать усиленную экспрессию ряда провоспалительных цитокинов [134,136]. Кроме того, активированные каналы *TRPM8* в производстве индуцируемой холодом слизи в эпителии легких [95,208].

Также было установлено, что неполная изоформа *TRPM8* служит рецептором при локальном охлаждении [134,136].

Предполагается, что каналы *TRPM8* также участвуют в приступах кашля, связанных с вдыханием холодного воздуха [64,66,85,157,195,207].

В недавнем исследовании показано, что *TRPM8* экспрессируется на уровне мРНК и белка в бронхиальном эпителии у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [95,122].

Ранее уже было установлено непосредственное участие полиморфизма с.750G> C (rs11562975) гена *TRPM8* в формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных БА [202,47], но его влияние на формирование тяжелых форм заболевания не изучалось.

1.5. Роль курения в формировании тяжелой бронхиальной астмы

На основании данных ВОЗ курят приблизительно 1,25 млрд. человек в мире. В России распространённость курения среди женщин составила 24%, среди мужчин 60%, а среди подростков— более 30% [219]. Во многих развитых странах курильщиком является каждый четвертый взрослый человек.

Как известно одним из патогенетических механизмов формирования БА является воспаление [7], которое активируется при воздействии различных факторов окружающей среды, в том числе и табачного дыма [32]. Воспаление на фоне курения сопровождается развитием необратимых морфологических изменений в дыхательных путях, с формированием воздушных подушек и нарушением функции легких [22,145].

В состав табачного дыма входят газообразная и корпускулярная фракции, содержащие формальдегид, нитрогеноксидазу, уретан, винилхлорид, бензопирен, никотин, нитрозоникотин, никель, кадмий, полоний [32].

Многие частицы табачного дыма настолько малы, что могут достигать не только крупные и средние бронхи, но и мелкие [163].

У курящих больных БА риск развития неконтролируемой БА и обострений повышен в 2 раза [32].

Курение у больных БА сопровождается более выраженными клиническими симптомами БА [90,106,158,170], ускоренными темпами снижения функции легких [61,104,177,182], повышенной частотой обострений [177] и сниженным ответом на терапию ИГКС [183] и пероральными глюкокортикостероидами [90].

Пассивное курение также связано со снижением функции легких, увеличением частоты обострений, госпитализаций и бронхиальной гиперреактивности у

больных БА [32,101]. При пассивном курении основной поток табачного дыма, выдыхаемого курильщиком, составляет 15% от общей экспозиции, а боковая струя дыма составляет 85% экспозиции табачного дыма [32]. Частицы боковой струи (1/10 размера частиц, выдыхаемых курящим человеком) могут достигать дистальные дыхательные пути пассивного курильщика [22,32].

Кроме курения, на тяжесть заболевания могут оказывать влияние климатические факторы и аэрополлютанты [206]. Ионные каналы *TRPM8* кроме того являются рецепторами низких температур но и продуктов сгорания угля [101,206]. В недавнем исследовании была обнаружена прямая взаимосвязь между курением и экспрессией *TRPM8* [191]. Также установлено, что при ХОБЛ экспрессия *TRPM8* выше, чем у здоровых лиц [95].

Тем самым, установленная на данный момент связь ионных каналов *TRPM8* с холодной гиперреактивностью дыхательных путей и ХОБЛ [81,206], позволяет рассматривать полиморфизмы гена *TRPM8* как возможные факторы формирования тяжелой бронхиальной обструкции у больных БА, в особенности у курящих лиц.

1.6. Современные принципы терапии тяжелой бронхиальной астмы

Бронхиальная астма являясь сложным, гетерогенным и распространенным заболеванием. Большинство больных БА при применении традиционной терапии препаратами ИГКС в качестве монотерапии или в комбинации с ДДБА/тиотропием и/или антагонистами лейкотриеновых рецепторов достигают и поддерживают контроль над заболеванием. Но пациенты с тяжелой формой заболевания нередко, бывают рефрактерны к традиционной базисной терапии и склонны к развитию тяжелых обострений БА [51].

Основными современными принципами противоастматической терапии являются достижение и поддержание хорошего контроля над симптомами БА в течение длительного времени, сокращение рисков будущих обострений БА, фиксированной обструкции дыхательных путей и побочных эффектов применяемой терапии [36,128].

Для лечения ТБА применяются средние или высокие дозы иГКС вместе с ДДБА [34]. Предпочтительной является комбинация низких доз ИГКС/формотерол в качестве поддерживающей терапии и для купирования симптомов или комбинация средних доз иГКС / ДДБА + коротко - действующие β 2-агонисты (КДБА) по потребности [36].

По данным недавнего исследования - 75 % больных ТБА получали высокие дозы иГКС из них 55,6 % – в комбинации с ДДБА, при этом у 82 % из них наблюдалось неконтролируемое течение заболевания, у 76 % – не полностью обратимая обструкция бронхов, а маркеры эозинофильного воспаления выявлялись у 63 % больных ТБА [50].

Лечение ТБА предполагает проведение терапии, соответствующей ступеням 4–5 (Рисунок 3).

Ступень 1	Ступень 2	Ступень 3	Ступень 4	Ступень 5
Предпочтительная терапия				
	Низкие дозы иГКС	Низкие дозы иГКС / ДДБА**	Средние / высокие дозы иГКС / ДДБА	Рассмотреть дополнительную терапию:
				• тиотропий [#]
				• анти-IgE-антитела
				• анти-IL-5 антитела [†]
Другие варианты				
Низкие дозы иГКС	Низкие дозы АЛР	Средние / высокие дозы иГКС	Тиотропий [#] + средние / высокие дозы иГКС + АЛР (или + теofilлин [†])	Добавить низкие дозы оГКС
	Низкие дозы теofilлина [†]	Низкие дозы иГКС + АЛР (или + теofilлин [†])		
Купирование приступов				
КДБА по потребности	КДБА по потребности или низкие дозы иГКС / формотерол***			
Необходимо помнить:				
• Предоставить возможность контролируемого обучения самопомощи (самоконтроль + письменный план действий + регулярный обзор)				
• Лечить модифицируемые факторы риска и сопутствующие заболевания, такие как курение, ожирение, тревожность				
• Предложить стратегии и методы нелекарственной терапии БА, например, физическая активность, снижение массы тела, избегание контакта с аллергенами (если возможно)				
• Рассмотреть возможность перехода на более высокую ступень терапии, если наблюдаются неконтролируемые симптомы, обострения или риски, однако сначала следует убедиться в правильности диагностики, техники применения ингалятора и приверженности терапии				
• Подумать о добавлении иммунотерапии (подъязычно) взрослым КДП-чувствительным пациентам с аллергическим ринитом, у которых развиваются обострения, несмотря на применение иГКС, при условии, что ожидаемый ОФВ ₁ составит > 70 %				
• Подумать о снижении ступени терапии, если симптомы контролируются в течение 3 мес. + низкий риск обострений. Прекращение применения иГКС не рекомендуется				

Рисунок 3 – Ступенчатая терапия БА согласно GINA 2018 [128]

На ступени 4 для лечения ТБА показано применение высоких и средних доз иГКС в комбинации с ДДБА или тиотропием и комбинаций высоких доз иГКС с антагонистами лейкотриеновых рецепторов или теофиллином.

На 5 ступени лечения к средним и высоким дозам иГКС / ДДБА дополнительно могут быть добавлены анти-IgE препараты (омализумаб), препараты анти-IL-5, тиотропий и пероральные ГКС [6].

Однако не у всех больных (38–74%) удается получить контроль на ТБА, даже на фоне постоянной поддерживающей терапии [83]. Вероятной причиной этого, может быть низкий комплаенс терапии. В зависимости от тяжести течения БА, у 40 - 50 % пациентов имеет место плохая приверженность проводимой терапии, при этом доля некомплаентных пациентов среди получающих высокие дозы иГКС составляет 20–40 % [20].

Помимо низкой комплаентности пациентов, еще одной значимой причиной плохого контроля над БА является применение терапии без учета патофизиологических механизмов воспаления, которые влияют на особенности клинического течения БА [44]. Поэтому необходимо подходить к выбору проводимой терапии с учетом фенотипа БА [44,50,35].

Фенотипически обусловленная терапия ТБА предполагает использование анти-IgE-терапии – при атопической ТБА (с подтвержденной клинически значимой аллергии), ИГКС – при эозинофильной БА, комбинации иГКС с ДДБА – при не-эозинофильной БА [35], анти-IL-5 терапии – при ТБА с эозинофильным фенотипом без клинически значимой аллергии, ассоциированной с развитием симптомов / обострений БА без повышения IgE (<400–500 МЕ / мл) [3].

Несмотря на видимое развитие подходов и принципов терапии ТБА, данные о возможности достижения контроля над заболеванием и воспалительным паттерном бронхов ТБА с сочетанием с ХГДП при применении различных режимом базисной терапии в современных источниках не приводятся.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА

Наблюдение пациентов проводилось на базе клинико-диагностического и пульмонологического отделений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (ДНЦ ФПД) в периоды 2015-2018 гг. Исследование проводилось в соответствии с «Этическими принципами проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками от 2013 года и нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом №200 от 01.04.2016 МЗ РФ. Перед включением в исследование все больные были информированы и давали своё согласие в письменной форме на участие в предстоящей работе в соответствии с протоколом № 81Т от 29.07.14, одобренным этическим комитетом ДНЦ ФПД.

В соответствии с поставленными задачами, обследование пациентов проводилось общеклиническими, функциональными, рентгенологическими, аллергологическими, лабораторными, генетическими методами.

Все больные, принимавшие участие в исследовании, были консультированы профильными специалистами по показаниям. Всем пациентам выполнялся клинический анализ крови, биохимический анализ крови, иммунологическое обследование крови. Рентгенологические методы включали проведение рентгенографии и компьютерной томографии органов грудной клетки по показаниям.

2.1. Основные клинико-функциональные методы исследования

2.1.1. Общеклинические методы исследования

При поступлении в стационар у пациентов производился сбор жалоб, анамнеза заболевания и жизни, а также объективный осмотр. Помимо истории болезни на каждого больного заводилась тематическая карта, в которой помимо основных данных вносились данные анкетного опроса, генетического исследования. Дополнительно пациентам была предложена анкета, которая включала в себя информацию об антропометрических параметрах больного, данные о трудовой деятельности и профессиональных вредностях. Далее следовал раздел «Жалобы», в котором больному нужно было указать симптомы, которые его беспокоили в течение последней недели до момента госпитализации. Данный раздел включал в себя информацию о приступах удушья (ночные и дневные), слышимых хрипах при дыхании (ночные и дневные), кашле (ночной, дневной), с описанием характера отделяемой мокроты, характере одышки с градациями интенсивности от 0 (нет одышки) до 4 (одышка при минимальной нагрузке или в покое) согласно шкале mMRC (Modified Medical Research Council), другие жалобы (дыхательный дискомфорт, заложенность в груди, чувство нехватки воздуха, симптомы со стороны ЛОР-органов).

Данные о анамнезе заболевания также заносились в анкету, а именно: дата появления первых симптомов заболевания, постановки диагноза, количество обострений в среднем, длительность и причины настоящего обострения (контакт с аллергенами, химическими раздражителями, воздействие климатических факторов, присоединение инфекции верхних дыхательных путей, стресс, эмоциональное напряжение, нарушение режима терапии).

Также собирался подробный анамнез курения, в котором пациент указывал статус курения, стаж курения, количество выкуренных сигарет в день.

Кроме того, в анкету заносился наследственный анамнез: наличие респираторных болезней, особое место уделялось БА, ХОБЛ, пневмонии, туберкулезу, сердечно-сосудистых, онкологических, наследственных заболеваний и т.д. у ближайших кровных родственников.

Для оценки тяжести течения болезни и степени контроля над заболеванием пациентами заполнялся тест по контролю над астмой - Asthma Control Test (Quality Metric Inc., 2002). Тесте включает пять вопросов, на основании которых можно было выявить неконтролируемое течение БА. Данный тест прост и удобен в использовании, трудностей в его заполнении ни у кого из пациентов не возникало. По сумме полученных баллов теста АСТ оценивался контроль БА: 25 баллов – полный контроль, 20-24 балла – частичный контроль, ≤ 19 баллов – неконтролируемое течение БА.

Проводился сбор данных о получаемой лекарственной терапии: вид, длительность приема, дозы препаратов базисной терапии (в том числе, ИГКС и ДДБА) и частота использования различных бронхолитиков короткого действия.

Объективный осмотр включал в себя: оценку общего состояния, осмотр кожных покровов и слизистых оболочек, лимфатических узлов, визуальную оценку формы грудной клетки, оценку участия вспомогательной мускулатуры в акте дыхания в покое. Диагностика изменений со стороны органов дыхания и сердечно-сосудистой системы осуществлялась методами перкуссии и аускультации. Подсчитывалась частота дыхательных движений и сердечных сокращений, определялись границы легких и сердца, выслушивались дыхательные шумы, тоны сердца.

2.1.2. Исследование вентиляционной функции легких

Оценка функции внешнего дыхания проводилась методом спирометрии на аппарате «FlowScreen» (Erich-Jaeger, Германия) исходно, а также в динамике. Перед спирометрией была отменена вся бронхолитическая терапия: β_2 -агонисты короткого действия за 6-10 часов до процедуры, β_2 -агонисты длительного действия –

за 12 часов до предполагаемого исследования. Перед процедурой пациентам запрещалось курение, приём алкогольных, кофе содержащих напитков, интенсивная физическая нагрузка, любой контакт с холодом. Исследование выполнялось в положении пациента сидя, носовое дыхание исключалось наложением клипсы.

Регистрировали показатели вентиляционной функции лёгких (форсированная жизненная ёмкость лёгких (ФЖЕЛ), объём форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁), пиковая объёмная скорость выдоха (ПОСв_д), мгновенные объёмные скорости выдоха на уровне 25% (МОС25), 50% (МОС50) и 75% (МОС75) ФЖЕЛ, отношение ОФВ₁ к ФЖЕЛ), после чего оценивали изменение скоростных показателей по кривой «поток-объём» форсированного выдоха на ингаляцию 200 мкг сальбутамола, с целью оценки показателей на обратимость обструкции дыхательных путей. По данным спирометрического исследования и полученным при этом результатам, выделяли 3 типа вентиляционных нарушений: обструктивные, рестриктивные, смешанные. Их выраженность оценивалась как: умеренные (I степени), значительные (II степени) и резко выраженные (III степени) [41].

Также для оценки степени тяжести БА применялся метод пикфлоуметрии (измерение пиковой скорости выдоха (ПСВ). Для этого использовали пикфлоуметр «Пульмотест» (ЗАО «Пульмомед», Россия). Пациенты измеряли ПСВ 3 раза подряд с небольшим перерывом и выбирали наибольшее измеренное значение и записывали в «дневник пикфлоуметрии». Данные измерения проводили утром и вечером, сразу после и перед сном. Далее рассчитывались суточные колебания между утренними и вечерними значениями ПСВ. Нормальным значением считалось ПСВ выше 90 % от должного, при легкой степени БА- более 80%, при средней -60-80%, при тяжелой -менее 60% [51]. Суточная вариабельность ПСВ рассчитывалась путем деления разницы между максимальным (вечером, перед сном) и минимальным (утром, перед ингаляцией бронходилататоров) значениями. При правильном лечении суточные колебания ПСВ не должны превышать 20%.

2.1.3. Исследование холодовой гиперреактивности дыхательных путей

Вследствие того, что больным тяжелой формой бронхиальной астмы противопоказано проведение острой 3-минутной бронхопровокационной пробы изокапнической гипервентиляции холодным воздухом (ИГХВ), поскольку у этих больных фактическое значение $ОФВ_1$ менее 70% должной величины, всеми пациентами заполнялась специальная анкета по выявлению и оценке клинических симптомов холодовой гиперреактивности дыхательных путей, которая включала вопросы о возможности появления и характере реакции со стороны дыхательных путей и кожных покровов при воздействии холода в осенне-зимний период времени, а также летом при воздействии кондиционеров, высокой влажности и понижения температуры (Рисунок 4) [43]. Анкета заполнялась совместно с лечащим врачом и при необходимости, пациент всегда мог уточнить непонятный для него вопрос. Больной обязан был ответить на все задаваемые в скрининг-анкете вопросы. Затем проводилась оценка полученных результатов. При выявлении в процессе анкетирования основных симптомов пункта 1 (а, б, г): приступа удушья, эпизода затруднённого дыхания, в сочетании с кашлем, различным интенсивности и характеру или без него, по клиническим данным больным выставлялся диагноз холодовой гиперреактивности дыхательных путей. Специфичность и предсказательная ценность вышеуказанных симптомов составляет 94%-62,5% и может использоваться для выявления реакции на холод [43]. В случае положительного ответа на вопросы пунктов 1 (в, д), 4, 5, 6 для подтверждения наличия ХГДП рекомендовалось проведение бронхопровокационной пробы ИГХВ [43].

У пациентов БА, отобранных для генетического исследования (лёгкой и средней степени тяжести) для подтверждения наличия ХГДП выполнялась проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом. Острая бронхопровокационная проба холодным воздухом проводится в режиме гипервентиляции, охлаждённым до -20°C воздухом, содержащим 5% CO_2 , в течение 3 минут, с уровнем вентиляции не менее 60% должной минутной вентиляции лёгких. Реакцию со стороны дыхательных путей оценивали по данным спирометрического исследования

на аппарате Easy on-PC, nddMedizintechnik AG, Швейцария. Основным критерием для постановки диагноза служил $ОФВ_1$, изменение данного параметра перед и после проведения пробы ИГХВ более чем на 10% от базового значения [43].

СКРИНИНГ-АНКЕТА

1. Отмечаете ли Вы в зимнее время года при выходе из теплого помещения на улицу или наоборот (нужное подчеркнуть):

- а) приступ удушья;
- б) затруднение дыхания (время наступления реакции: сразу, через некоторое время, при выполнении незначительной либо значительной физической нагрузке);
- в) одышку (при тяжелой физической нагрузке зимой на улице, при незначительной физической нагрузке зимой на улице);
- г) кашель (сухой, с мокротой, приступообразный);
- д) скованность и боль в грудной клетке (за грудиной);
- е) головную боль;
- ж) слезотечение;
- з) ничего из перечисленного.

При какой температуре воздуха появляются вышеперечисленные симптомы (____)?

2. Сколько лет беспокоит (____)?

3. На холоде легче дышать носом, ртом? Если ртом, то на протяжении (____) лет.

4. При дыхании носом на холоде появляется:

- а) заложенность;
- б) слизистые выделения;
- в) чихание;
- г) ничего из перечисленного.

При какой температуре воздуха появляются вышеперечисленные симптомы (____)?

5. Появление реакции со стороны дыхательных путей (затруднение дыхания, кашель, дискомфорт за грудиной) при смене погоды:

- а) усилении ветра;
- б) увеличении влажности (дождь, снег);
- в) ни при одном из перечисленных условий.

6. Появление реакции со стороны дыхательных путей (затруднение дыхания, кашель, дискомфорт за грудиной, заложенность носа) при контакте:

- а) купании в холодной воде;
- б) умывании холодной водой;
- в) нахождении рядом с работающим кондиционером;
- г) употреблении холодной пищи (мороженого, воды и т.д.);
- д) ни при одном из перечисленных условий.

7. Реакция открытых участков тела (руки, лицо) на холодный воздух, холодную воду, при соприкосновении с холодными предметами:

- а) резкое покраснение;
- б) отечность, чувство распирания;
- в) зуд, жжение;
- г) высыпания;
- д) покалывание, боль, онемение дистальных концов пальцев;
- е) ничего из перечисленного.

Рисунок 4 – Скрининг-анкета для выявления ХГДП [43]

2.1.4. Исследование клеточного состава мокроты

Исследование мокроты является одним из наиболее важных основных методов, используемых в диагностике хронических легочных заболеваний. Главным достоинством метода является относительная простота забора материала для исследования, отсутствие потребности в инвазивных вмешательствах.

Методика сбора мокроты:

Сбор мокроты осуществлялся в 8 часов утра, натощак, до приёма лекарственных препаратов и чистки зубов. Пациент откашливал мокроту и собирал в специальный стерильный контейнер размером 50 мл. Удовлетворительным считался образец мокроты не менее 2 мл, без примесей слюны. Затем образец мокроты доставлялся в лабораторию и исследовался незамедлительно. Из полученного удовлетворительного образца мокроты готовились мазки для цитологического исследования на чистых предметных стёклах. Для этого образец полученной мокроты смешивали в равных порциях с 0,1% раствором трипсина, суспендировали в течение 10 минут. Затем отмывали в солевом растворе Хенкса, фильтровали, центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин.

С помощью камеры Горяева подсчитывали количество клеточных элементов (нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов, лимфоцитов). Для уточнения клеточного состава около 50 мкл препарата наносили на предметные стекла, нагретые до 37°C. Далее, мазки в один слой размещались в вентилируемом термостате ТМ-2 и оставались для просушивания в воздушной среде 5-10 минут при температуре 37°C. После сушки, мазки выдерживались 10 минут в парах 40% раствора формалина после чего окрашивались водным красителем Романовского-Гимза (4-5%, рН 6,8). Полученные препараты изучали при помощи светооптической иммерсионной микроскопии, с подсчётом не менее 400 клеток в 100 полях зрения. Подсчитанное количество отображали в процентах от общего числа найденных клеток [13]

Цитохимическое исследование активности МПО нейтрофилов и эозинофилов в цитологических мазках мокроты проводилось по методу Грэхема-Кнолля [57] с докраской мазков после обработки бензидином и перекисью водорода водным

раствором азура-2 [18]. Принцип этого метода заключается в том, что, в присутствии миелопероксидазы бензидин окисляется перекисью водорода в коричневый оксибензидин. Полученные изображения клеток проходили обработку при помощи компьютерной программы Image Tool и Optika Vision Pro (Италия), Mac Biophotonics Image S (США). Далее оценивали оптическую плотность фермента в клетке и выводился средний цитохимический коэффициент (СЦК) миелопероксидазы (в пикселях).

Также определялась степень и интенсивность процессов деструкции и цитолиза нейтрофилов и эозинофилов мокроты. Оценивали степень повреждения клеток бронхиального эпителия, бокаловидных эпителиальных клеток, эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов по методу Л.А. Матвеевой [29] с определением V классов, от нормальной структуры клетки, без повреждения, до полного разрушения с распадом ядра и цитоплазмы (Таблица 1).

Таблица 1 – Классы деструкции по степени повреждения клетки [191]

0 класс	1 класс	2 класс	3 класс	4 класс
Нормальная структура	Частичное деструктивное повреждение цитоплазмы, нормальная структура ядра	Значительная, но неполная деструкция цитоплазмы, частичное повреждение ядра	Полная деструкция цитоплазмы, значительная деструкция ядра	Полная деструкция с распадом цитоплазмы и ядра

Из полученных значений - количества найденных клеток и класса их повреждения, рассчитывались два индекса: деструкции клеток (ИД) и интенсивности цитолиза клеток (ИЦ) по формулам (1 и 2, соответственно):

$$\text{ИД} = \frac{n_1+n_2+n_3+n_4}{100}, \quad (1)$$

$$\text{ИЦ} = \frac{n_4}{n_0+n_1+n_2+n_3+n_4}, \quad (2)$$

где, 0,1,2,3,4—класс деструкции клетки; n—количество найденных клеток в классе.

2.1.5. Генетические методы исследования

Кровь из локтевой для забиралась утром, натощак в пробирку типа Vacutainer 5 мл, содержащую ЭДТА. После забора, образцы крови замораживались и хранились при -20°C .

Выделение ДНК из образцов периферической крови проводилось коммерческим набором для экстракции ДНК «ДНК-Экстран-1» (ЗАО «Синтол», Россия).

Однонуклеотидный полиморфизм гена TRPM8 с. 750G> C (rs11562975) (Таблица 2) был генотипирован методом LATE-ПЦР [153] (Рисунок 5) с анализом плавления зондов типа «molecular beacon» (молекулярные маяки). Главное отличие LATE-ПЦР от асимметричной ПЦР – эффективная амплификация одноцепочечного ДНК-продукта для последующей гибридизации с зондами «molecular beacon». Данный метод значительно отличается от метода ПДРФ, который имеет ряд существенных недостатков: повышенный расход пластика, высокая цена доставки рестриктаз (на льду), ферментов; ограниченный срок годности рестриктаз (≤ 1 год); уменьшение активности рестриктаз по мере хранения, вследствие, необходимость оптимизации количества единиц действия и времени инкубации, активность и специфичность рестриктаз относительна и зависит от многих факторов (концентрация,

время, tC, буфер, ингибирующие примеси), вследствие возможны ошибки генотипирования, повышенный риск контаминации в связи с необходимостью открывать пробирки после ПЦР, ограниченная емкость форезной камеры – 40 образцов за раз. И самый главный недостаток этого метода продолжительность- около 8 часов.

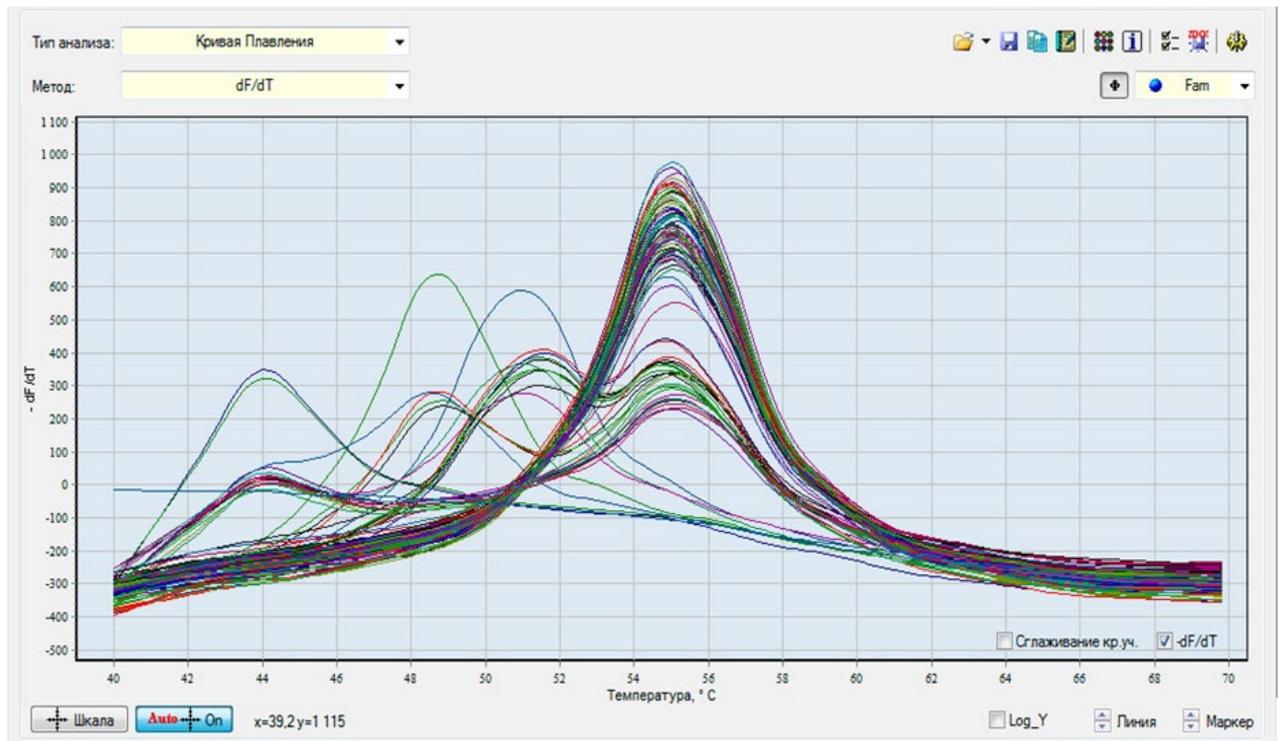


Рисунок 5 – Одновременное генотипирование трех полиморфизмов rs11562975, rs17868387 и rs28901637 на анализе плавления

Преимущества LATE-ПЦР:

1. Возможность длительного хранения праймеров и зондов (в течении нескольких лет) без потери качества – возможность генотипировать любой полиморфизм в любое время;
2. Минимальное количество праймеров и зондов – достаточно для генотипирования 600-700 образцов;
3. Стоимость генотипирования одного образца ниже, чем у ПДРФ;

4. Высокая производительность – 96 образцов за 3 часа;
5. Высокая точность анализа кривых плавления;
6. Возможность мультиплексирования;
7. Низкий риск кросс-контаминации.

Таблица 2 – Характеристика с. 750G> C (rs11562975) гена *TRPM8*

Идентификатор в базе данных NCBI dbSNP	Позиция кодирующей последовательности	Регион и описание
rs11562975	с.750G>C	экзон 7 – однонуклеотидная замена, синонимичный вариант (p.Leu250Leu)

Аmplification производилась на аппарате ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия).

Для постановки LATE-ПЦР использовалась смесь, которая включала в себя: ДНК-матрицу 100 нг, 1x ПЦР-буфер, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,25 mM, праймеры (Таблица 3) – прямой 0,5 мкМ, обратный 0,02 мкМ, зонд 0,5 мкМ, Taq-полимеразу HotStart, ингибированную антителами – 1 ЕД, воду – до 25 мкл. Образцы амплифицировались по протоколу: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., первый блок ПЦР: 25 циклов – денатурация 92°C/1 сек., отжиг/элонгация при 62°C/15 сек., второй блок ПЦР: 45 циклов – денатурация 92°C/1 сек., отжиг/элонгация при температуре 58°C/15 сек., финальная элонгация 72°C/1 мин. Анализ плавления продук-

тов амплификации с зондами проходил в несколько этапов: предварительная денатурации при 95°C/1 мин., гибридизации - 40°C/1 мин., и градиентное повышение температуры от 40°C до 70°C с шагом 0,5°C/0,2 мин. Кривые плавления регистрировались на графиках, отражающих зависимость $-dF/dT$ (изменение уровня флуоресценции) от температуры. Пики кривых, соответствующие температурам плавления 54,5°C, 44°C, либо их комбинациям, отражали наличие определенных аллельных вариантов гена. В нескольких образцах отмечалось дополнительные варианты кривых плавления, что было обусловлено наличием дополнительных вариаций гена в регионе отжига зонда. В этих случаях генотип по полиморфизму rs11562975 также был дополнительно генотипирован методом ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Таблица 3 – Последовательности и концентрации праймеров и зондов необходимых для постановки LATE-ПЦР

Праймеры и зонды	Концентрация
Прямой 5'-CCAGTACCTTATGGATGACTT-3'	0,5 мкМ
Обратный 5'-GGAGCTTTGCTTCGACAGTGGGAT-3'	0,02 мкМ
Зонд 5'-FAM-CGGCCAGGATATACAGTGGAGCCG-BHQ1-3'	0,5 мкМ

ПЦР-смесь для ПДРФ анализа включала в себя: ДНК-матрицу 100 нг, 1x ПЦР-буфер, MgCl₂ 2,5 мМ, dNTP 0,25 мМ, прямой и обратный праймеры – 5'-

TGGATGACTTCACAAGAGATCGACT-3' и 5'- AGCAGCAAATGTGTGTGGTT-GTTGT-3' по 0,2 мкМ каждого, Taq-полимераза HotStart, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 12,5 мкл. Амплификация состояла из следующих стадий: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., 40 циклов – денатурация при 92°C/10 сек., отжиг при 62°C/15 сек., элонгация при 72°C/15 сек., финальная элонгация 72°C/1 мин. Полученный продукт ПЦР длиной 61 п.н. инкубировали с 10ЕД эндонуклеазы рестрикции *Hinf*I (ООО «СибЭнзим», Россия) в течение 16 ч. при 37°C. Гидролиз продукта проходил при наличии С аллеля с образованием фрагментов.

Разделение фрагментов определяли методом электрофореза в 4% полиакриламидном геле (Рисунок 6). Электрофорез проводили в 1x TBE буфере (0,089M Tris-HCl, 0,089 M борная кислота, 0,002 M EDTA, pH 8,0) в течение 30-40 мин. Перед нанесением на гель пробы смешивали в соотношении 5:1 с красящим буфером (0,25% бромфенолового синего и ксиленцианола). После электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия и фотографировали на трансиллюминаторе при ультрафиолетовом освещении длиной 22 пар нуклеотидов и 36 пар нуклеотидов с «липкими» концами по 3 нуклеотида.

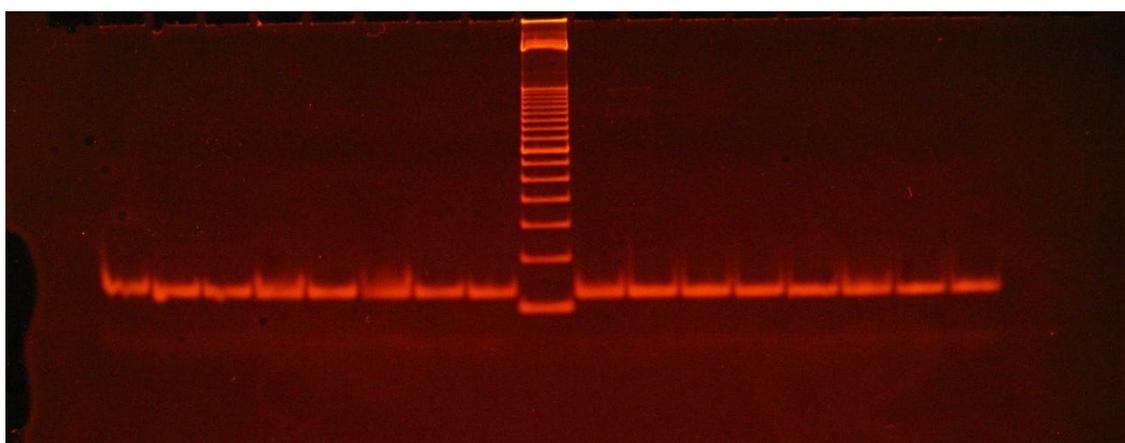


Рисунок 6 – Снимок продуктов ПЦР после электрофореза в полиакриламидном геле 4%

В случае генотипа GG визуализировался фрагмент 61 пары нуклеотидов в случае генотипа CC – фрагменты 22 и 36 пар нуклеотидов, в случае гетерозиготного генотипа – все три указанных фрагмента.

2.1.6. Статистический анализ полученных результатов

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью пакета программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2011). За критический уровень значимости принималось значение 0,05.

Данные были представлены в виде $M \pm m$ для нормально распределенных величин (где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего). Для величин, которые не подчинялись нормальному закону использовалась Me (q_1 ; q_3) (где Me – медиана, q_1 и q_3 – нижний и верхний квартили).

Частоты генотипов, соответствующие равновесию Харди-Вайнберга рассчитывались с использованием критерия χ^2 Пирсона. Для ассоциаций между качественными признаками использовался критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность.

Дисперсионный анализ с критерием Ньюмана-Кеулса использовался для множественных сравнений в выборках при нормальном распределении переменной.

Для проведения парных сравнений в независимых выборках использовался t-критерий Стьюдента, в зависимых – парный t-критерий.

Для проведения парных сравнений использовались методы непараметрической статистики – дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса в случае множественных и тест Манна-Уитни в случае несоответствия распределения переменных нормальному закону.

При сравнении переменных в двух зависимых выборках использовался T-критерий Уилкоксона. Для оценки корреляционной связи между двумя переменными проводился анализ Спирмена.

2.2. Клиническая характеристика обследованных групп

В работе приняли участие 109 пациентов с подтверждённым диагнозом тяжелой БА, проживающие на территории Амурской области и проходившие комплексное клиничко-функциональное обследование и лечение в Дальневосточном научном центре физиологии и патологии дыхания (ДНЦ ФПД) с 2015 по 2018 гг., включительно.

Диагноз тяжелой БА выставлялся согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) в соответствии с критериями Глобальной инициативы по бронхиальной астме (GINA, 2018) и Федеральными клиническими рекомендациями по бронхиальной астме 2018 года [51].

Основными критериями для включения больного в проводимое исследование служили: установленный диагноз тяжелой бронхиальной астмы, параметр спирометрии - объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁) менее 60% от должной величины, противовоспалительная терапия не менее 12 недель комбинированным препаратом ИГКС/ДДБА до момента включения в исследование, доказанная обратимость бронхиальной обструкции по ОФВ₁ 12% и более, после применения β_2 адреномиметика короткого действия, отсутствие обострения заболевания на момент включения в исследование, отсутствие соматической патологии в стадии декомпенсации, уровень контроля над БА согласно вопроснику Asthma Control Test (ACT, Quality Metric Inc., 2002) ≤ 20 баллов.

При распределении больных по половому признаку различий не обнаружено, в общей группе из 109 человек, присутствовало 58 женщин (57%) и 51 мужчин (43%), европеоидной расы, в возрасте от 20 до 74 лет (средний возраст $52,2 \pm 1,4$ лет).

В дальнейшем все больные были распределены в две группы по признаку наличия или отсутствия клинических признаков холодовой гиперреактивности дыхательных путей. По результатам скрининг-анкеты для подтверждения ХГДП в группу I включены больные с клиническими признаками холодовой гиперреактивности дыхательных путей, во II группе – не реагирующие на холодовой стимул.

В результате I группу составили 48 больных БА (44%) с ХГДП, а II группу – 61 человека (56%).

Характеристика обследуемых лиц по половому признаку представлена в Таблице 4. В ходе анализа половой характеристики групп было выявлено, что встречаемость женщин в I группе значительно превосходит их число в группе II ($\chi^2=5,87$, $p<0,05$). Это находит подтверждение в ряде исследований, где также было найдено преобладание гиперреактивности у женского пола [123,155].

Таблица 4 – Характеристика исследуемых групп по половому признаку (n (%))

Пол	Группа I	Группа II	Значимость
Мужчины	17 (35 %)	37 (61%)	$\chi^2=5,87$, $p<0,05$
Женщины	31 (65 %)	24 (39%)	

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Распределение пациентов по возрасту представлено в Таблице 5. Распределение больных проводилось согласно возрастным периодам жизни человека принятым Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. В большинстве своём в группах преобладали больные молодого и среднего трудоспособного возраста в возрасте от 18 до 60 лет.

Средний возраст для обследуемых групп составил $52,3\pm 1,6$ лет для I группы и $51,5\pm 1,7$ лет для II группы. Статистически значимого различия между группами выявлено не было ($p>0,05$).

**Таблица 5 – Распределение по возрасту в исследуемых группах согласно ВОЗ
(n (%))**

Возраст, лет	Группа I	Группа II
Молодой (18-44)		
мужчины	4 (8%)	8 (13%)
женщины	12 (25%)	5 (8%)
Средний (44-60)		
мужчины	8 (17%)	21 (34%)
женщины	14 (29%)	16 (26%)
Пожилой (60-75)		
мужчины	4 (8%)	7 (12 %)
женщины	6 (13%)	4 (7 %)

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Оценивая продолжительность заболевания, обращает на себя внимание большое число лиц с длительностью 5 и более лет, составившее в обеих группах порядка 58%-67% (Таблица 6). Средний стаж заболевания для I группы составил $10,2 \pm 1,6$ лет, для второй $12,77 \pm 1,44$ лет. В обеих группах преобладали пациенты со стажем заболевания более 5 лет. При межгрупповом сравнении статистически значимого различия выявлено не было ($p > 0,05$).

Таблица 6 – Сравнение групп по стажу заболевания (n (%))

Стаж	Группа I n (%)	Группа II n (%)	Значимость
До 3 лет	10(21%)	12 (20%)	p>0,05
От 3 до 5 лет	11 (23%)	9 (15%)	
5 лет и более	27 (56%)	40 (65%)	

Примечание: p - достоверность различий показателя между группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

При изучении наследственного анамнеза больных у 34 (32%) ближайшие родственники страдали бронхиальной астмой, онкологическими заболеваниями 26 человек (24%), сердечно-сосудистыми заболеваниями 43 (35%). Туберкулёз и наследственные заболевания у ближайших родственников не отмечались.

При сборе аллергологического анамнеза у 22 (20%) больных ранее отмечались аллергические реакции на приём лекарственных препаратов в виде крапивницы (в основном антибиотики и витамины группы B), у 12 (11%) аллергологом выявлена сенсibilизация к бытовым, пыльцевым, эпидермальным аллергенам, у 3 (3%) к продуктам питания.

Проведя анализ данных, полученных при изучении анамнеза курения у пациентов исследуемых групп было обнаружено, что значительная часть пациентов курила на момент проведения исследования, либо курила ранее (Таблица 7). Количество экскурильщиков и настоящих курильщиков в группе с ХГДП превалировало над никогда не курившими пациентами, что находит своё объяснение в отягощающем действии табака на гиперреактивность дыхательных путей [86]. Однако, количество бывших и настоящих курильщиков в двух группах статистически не отличалось. Оценивая средние значения по стажу курения в группах (пачка/лет), обра-

щает на себя внимание более высокий стаж курения у больных 1 группы по отношению ко 2 группе (Таблица 8).

Таблица 7 – Анамнез курения у обследованных лиц (n (%))

Курение	Группа I	Группа II	Значимость
В настоящее время	10 (21%)	7 (11%)	p>0,05
В прошлом	18 (37%)	24 (39%)	p>0,05
Не имели опыт курения	20 (42%)	30 (50%)	p>0,05

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Таблица 8 – Стаж курения в группах (M±m)

Стаж курения	Группа I	Группа II	Значимость
Пачка/лет	18,1±3,4	12,8±2,6	p>0,05

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами.

Наиболее часто встречающаяся сопутствующая патология со стороны других органов и систем в исследуемых группах представлена болезнями верхних и нижних дыхательных путей, сердечно-сосудистой системы (Таблица 9). Преобладающей сопутствующей патологией в обеих группах были хронические аллергические и неаллергические заболевания верхних дыхательных путей. Диагноз хронического легочного сердца был установлен в 44% случаев у больных 1 группы и в 38%

- у больных второй группы ($\chi^2=0,43$, $p>0,05$). Со стороны сердечно-сосудистой системы, превалировала гипертоническая болезнь, которая встречалась более чем в 50% случаев. Все больные с диагнозом гипертоническая болезнь получали антигипертензивную терапию соответствующую стадии заболевания на постоянной основе. При сравнении числа больных в группах с сопутствующей патологией значимых различий не выявлено ($p>0,05$).

Таблица 9 – Характеристика сопутствующей патологии (n (%))

Заболевания	Группа I	Группа II	p
Хронический аллергический ринит	23 (46%)	31 (51%)	$p>0,05$
Хронический синусит	6 (12%)	9 (15%)	$p>0,05$
Хронический фарингит	25 (52%)	30 (49%)	$p>0,05$
Гипертоническая болезнь II-III стадии	25 (52%)	38 (62%)	$p>0,05$
ХЛС (компенсация)	20 (42%)	22 (36%)	$p>0,05$
ХЛС (декомпенсация)	2 (4%)	1 (2%)	$p>0,05$
Артериальная гипертензия	25 (52%)	38 (62%)	$p>0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Диагноз формы тяжелой бронхиальной астмы выставлялся в соответствие с кодированием по МКБ10. Смешанная форма БА (J45.8) была диагностирована у большинства астматиков обеих групп у 91 (84%) больного ТБА, аллергическая форма (J45.0) встречалась гораздо реже у 28 (26%) больных. Как показано в Таблице 10, смешанная и аллергическая формы астмы одинаково встречались у пациентов I и II группы.

Таблица 10 – Распределение в группах по форме БА (n (%))

Форма	Группа I	Группа II	p
Смешанная (J45.8)	39 (81%)	44 (72%)	$\chi^2=0,78$; $p>0,05$
БА с преобладанием аллергического компонента (J45.0)	9 (19%)	17 (28%)	

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

При анализе средних значений концентраций общего IgE (Таблица 11) в сыворотке крови у больных ТБА было выявлено, что в обеих группах значение общего IgE превышало нормальный диапазон, что согласуется с преобладанием смешанной формы БА у этих пациентов. Статистически значимого различия между группами выявлено не было ($p>0,05$).

Таблица 11 – Содержание общего IgE в сыворотке крови у больных ТБА (M±m)

Показатель	I группа	II группа	Значимость
IgE (МЕ/мл)	108±32,1	165±38,3	$p>0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группой.

По данным анкетирования Asthma Control Test (ACT, Quality Metric Inc., 2002), все больные исследуемой выборки имели неконтролируемое течение БА – 109 (100%). Средний балл по уровню контроля среди больных БА составил $8,27 \pm 0,21$ баллов, согласно опроснику ACT. Уровень контроля для I группы $7,92 \pm 0,26$ балла, для второй группы $8,73 \pm 0,31$ баллов ($p < 0,05$).

Оценивая подробно клиническую картину заболевания, за последнюю неделю перед включением больного в исследование, по наличию основных симптомов, таких как появление приступа удушья, кратность и число приступов в день, в дневное время и ночные часы, а также характер кашля, его интенсивность, выраженность в дневное и ночное время, продуктивность были найдены значимые межгрупповые различия по некоторым параметрам (Таблицы 12 и 13). Сравнительная характеристика количества симптомов удушья у пациентов I и II представлена в Таблице 12.

Таблица 12 – Количество симптомов удушья в различное время суток (n (%))

Симптомы		Группа I	Группа II	p
Приступы удушья дневные	1-2 эпизода	6 (51%)	12 (32%)	$\chi^2=0,54$; $p>0,05$
	3-4 эпизода	16 (35%)	34 (54%)	$\chi^2=4,6$; $p<0,05$
	более 4 эпизодов	26 (5%)	15 (17%)	$\chi^2=8,7$; $p<0,01$
Приступы удушья ночные	1-2 эпизода	24 (42%)	12 (33%)	$\chi^2=9,8$; $p<0,01$
	3-4 эпизода	11 (26%)	8 (44%)	$\chi^2=1,17$; $p>0,05$
	более 4 эпизодов	7 (2%)	3 (11%)	$\chi^2=1,96$; $p>0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных.

При анализе количества приступов затруднённого дыхания выявлено, что приступы удушья беспокоили больных тяжелой астмой ежедневно, причём как дневные, так и ночные приступы у больных I группы были чаще, чем у II группы ($\chi^2=8,7$; $p < 0,01$; $\chi^2=9,8$; $p < 0,01$). По частоте появления удушья, за последнюю неделю, обращает на себя внимание большее число больных I группы с эпизодами удушья более 4 раз в день и до 2 –х раз в ночные часы, по сравнению со второй группой.

При оценке кашля (Таблица 13) было выявлено, что практически все больные испытывали различный по характеру и интенсивности кашель. У больных 2 группы кашель больше беспокоил в дневное время, чем в ночные часы. Более чем у половины больных (56 %) 2 группы кашель беспокоил реже 1 эпизода в час. У пациентов 1 группы чаще встречался кашель с 1 и более эпизодами в час. В ночное время больные в равной степени испытывали приступообразный кашель, постоянный характер кашля в ночное время наблюдался лишь у 4% больных 1 группы и 5 % - второй. Следует сказать, что в большинстве своём больные II группы мало продуцировали мокроты, кашель был сухой, малопродуктивный, тогда как у больных с клиническими признаками холодовой гиперреактивности дыхательных путей кашель носил продуктивный характер. У пациентов I группы число лиц с продуктивным кашлем было значимо выше, чем во II.

Таблица 13 – Характеристика кашля у больных ТБА (n (%))

Кашель		Группа I	Группа II	Значимость
Дневной	Нет	1 (2%)	3 (5%)	$\chi^2=0,07$; $p>0,05$
	Единичный приступ	3 (6%)	6 (10%)	$\chi^2=0,10$; $p>0,05$
	Менее 1 приступа в час	17 (35%)	34 (56%)	$\chi^2=3,67$; $p>0,05$
	1 и более приступа	20 (42%)	10 (16%)	$\chi^2=7,38$; $p<0,01$
	Постоянный	7 (15%)	8 (13%)	$\chi^2=0,003$; $p>0,05$
Ночной	Нет	4 (8%)	8 (13%)	$\chi^2=0,23$; $p>0,05$
	Единичный приступ	13 (27%)	15 (25%)	$\chi^2=0,005$; $p>0,05$
	Менее 1 приступа в час	21 (44%)	25 (51%)	$\chi^2=0,009$; $p>0,05$
	1 и более приступов	8(17%)	10 (16%)	$\chi^2=0,04$; $p>0,05$
	Постоянный	2(4%)	3 (5%)	$\chi^2=0,07$ $p>0,05$
Характер	Сухой	5 (10%)	17 (29%)	$\chi^2=4,05$; $p<0,05$
	Малопродуктивный	24 (50%)	38 (62%)	$\chi^2=1,19$; $p>0,05$
	Продуктивный	19 (40%)	6 (9%)	$\chi^2=11,8$; $p<0,001$

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Одышку различной степени тяжести испытывали все обследуемые больные, в большей степени она носила тяжёлый характер (III степень) и появлялась при незначительной физической нагрузке (Таблица 14). Оценка степени тяжести одышки при помощи количественной шкалы одышки MRC (Medical Research Council Dyspnea Scale) выявила тяжёлую степень одышки у 75% больных 1 и 2 группы (Таблица 15). У 4% больных 1 группы и 7% второй группы одышка носила крайне тяжёлый характер, не позволяла выполнить простейшие движения, связанные с раздеванием и одеванием.

Таблица 14 – Характеристика одышки по степени тяжести (n (%))

Одышка	Группа I	Группа II	Значимость
0	0 (0%)	0 (0%)	-
I степень	0 (0%)	0 (0%)	-
II степень	10 (21%)	11 (18%)	$\chi^2=0,01$; $p>0,05$
III степень	26 (54%)	36(59%)	$\chi^2=0,09$; $p>0,05$
IV степень	12 (25%)	14(23%)	$\chi^2=0,005$; $p>0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Таблица 15 – Степень тяжести одышки по шкале MRC (n (%))

Степень тяжести одышки	Группа I	Группа II	Значимость
0 (нет)	0 (0%)	0 (0%)	-
1 (легкая)	0 (0%)	0 (0%)	-
2 (средняя)	10 (21%)	11 (18%)	$\chi^2=0,01$; $p>0,05$
3 (тяжелая)	36 (75%)	46 (75%)	$\chi^2=0,03$; $p>0,05$
4 (очень тяжелая)	2 (4%)	4(7%)	$\chi^2=0,01$; $p>0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Для оценки степени тяжести дыхательной недостаточности (ДН) у больных тяжелой астмой использовалась классификация по сатурации крови (SaO_2) [1]. Из Таблицы 16 видно, что у 70% больных в обеих группах преобладала ДН 1 степени,

с уровнем сатурации 94-90%, остальные больные имели насыщение периферической крови кислородом ниже 89%, что соответствовало степени тяжести II.

Таблица 16 – Степень дыхательной недостаточности у больных ТБА (n (%))

ДН (степень)	Группа I	Группа II	Значимость
Норма (SaO ₂ >95%)	0 (0%)	0 (0%)	$\chi^2=0,09$; $p>0,05$
I степень (SaO ₂ 90-94%)	36 (75%)	43 (70%)	
II степень (SaO ₂ 75-89 %)	12 (25%)	18 (30%)	
III степень (SaO ₂ <75%)	0 (0%)	0(0%)	

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами, n – количество больных; % - отношение к общему числу больных в группе.

Жалобы на дыхательный дискомфорт и заложенность в груди присутствовали у всех пациентов исследуемой выборки. Пациентов двух групп чаще беспокоили периодические хрипы. По количеству дистанционных хрипов статистически значимого различия между группами выявлено не было ($p>0,05$) (Таблица 17).

Таблица 17 – Характеристика дистанционных хрипов (n (%))

Дистанционные хрипы		Группа I	Группа II	Значимость
Днем	Нет	1 (2%)	4 (6%)	$\chi^2=0,41$; $p>0,05$
	Периодические	27 (56%)	39 (64%)	$\chi^2=0,38$; $p>0,05$
	Постоянные	20 (42%)	18 (30%)	$\chi^2=1,25$; $p>0,05$
Ночью	Нет	4 (8%)	9 (15%)	$\chi^2=0,53$; $p>0,05$
	Периодические	30 (62%)	38 (62%)	$\chi^2=0,03$; $p>0,05$
	Постоянные	14(30%)	14 (23%)	$\chi^2=0,26$; $p>0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

При оценке объективного статуса дыхательной системы в большинстве случаев при перкуссии определялся лёгочный звук, лишь у одной трети больных лёгочный звук с коробочным оттенком (Таблица 18). В обеих группах, аускультативная картина представлена в 50% случаев везикулярным дыханием, в остальных случаях выслушивалось жёсткое либо ослабленное дыхание. У большинства больных (75%) на фоне везикулярного дыхания присутствовали сухие хрипы, различные по интенсивности, в 25% случаях определялись влажные хрипы. При характеристике сердечно-сосудистой системы границы сердца преимущественно были расширены, тоны сердца приглушены. У пациентов II группы в более чем половине случаев было повышено артериальное давление. Однако, статистически значимого различия между группами выявлено не было.

Таблица 18 – Объективный статус пациентов (n (%))

Симптом		Группа I	Группа II	Значимость
Перкуторный звук	легочный	33 (69%)	46 (75%)	p>0,05
	коробочный	15 (31%)	15 (25%)	
Дыхание	везикулярное	25 (52%)	33 (51%)	
	жесткое	6 (13%)	8 (15%)	
	ослабленное	17(35%)	20 (34%)	
Хрипы	нет	0(0%)	0 (0%)	
	сухие	37 (75%)	45 (74%)	
	влажные	11(25%)	16 (26%)	
Границы сердца	норма	12(25%)	18 (29%)	
	расширены	36(75%)	43(70%)	
Тоны сердца	громкие	10 (21%)	15 (26%)	
	приглушены	38(79%)	46 (75%)	
АД	норма	23 (48%)	23 (38%)	
	гипертензия	25 (52%)	38 (62%)	
ЧСС (M±m)	В минуту	76,4±2,71	80,1±1,45	p>0,05

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

На основании скрининг-анкеты у пациентов с ХГДП были распространены такие жалобы как приступы удушья, затруднение дыхания, кашель, скованность в грудной клетке, слезотечение, слизистые выделения из носа при выходе на холод. Их количество статистически значимо превышало таковые в группе II (Таблица 19).

Таблица 19 – Данные скрининг-анкеты для выявления ХГДП (n (%))

Реакция		Группа I	Группа II	Значимость
При выходе на холод из теплого помещения	Приступ удушья	29 (60%)	16 (26%)	$\chi^2=11,6$; $p<0,001$
	Затруднённое дыхание	32 (66%)	19 (31%)	$\chi^2=12,2$; $p<0,001$
	Одышка	23 (48%)	26 (43%)	$\chi^2=0,12$; $p>0,05$
	Кашель	41 (85%)	33 (49%)	$\chi^2=10,6$ $p<0,01$
	Скованность в грудной клетке	16 (33%)	7 (11%)	$\chi^2=6,45$; $p<0,05$
	Головная боль	9 (19%)	6 (10%)	$\chi^2=1,12$; $p>0,05$
	Слезотечение	38 (79%)	25 (41%)	$\chi^2=14,5$; $p<0,001$
При носовом дыхании	Заложенность	19 (40%)	15 (25%)	$\chi^2=2,15$; $p>0,05$
	Слизистые выделения	37 (77%)	26 (47%)	$\chi^2=11,7$; $p<0,001$
	Чихание	9 (19%)	5 (8%)	$\chi^2=1,81$; $p>0,05$
Реакция открытых участков тела на холод	Покраснение	26 (54%)	32 (52%)	$\chi^2=0,0002$; $p>0,05$
	Отечность	7 (15%)	9 (15%)	$\chi^2=0,06$; $p>0,05$
	Зуд, жжение	10 (21%)	17 (28%)	$\chi^2=0,39$; $p>0,05$
	Высыпания	7 (15%)	4 (6%)	$\chi^2=1,12$; $p>0,05$
	Покалывание, боль, онемение	19 (40%)	15 (25%)	$\chi^2=2,15$; $p>0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами, n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

При оценке показателей функции внешнего дыхания, измеренных при спирометрическом исследовании и пиковой скорости выдыхаемого воздуха (ПСВ) были получены более низкие значения скоростных параметров у больных первой

группы, по отношению ко второй группе (Таблица 20). В обеих группах был выявлен смешанный вариант нарушений вентиляционной функции лёгких, с преобладанием обструкции на уровне мелких дыхательных путей.

Таблица 20 – Показатели функции внешнего дыхания ($M \pm m$)

Показатель	Группа I	Группа II	Значимость
ОФВ ₁ , % долж.	38,1±1,6	42,4±1,4	p<0,05
ФЖЕЛ, % долж.	68,3±2,4	68,3±2,7	p>0,05
МОС ₅₀ , % долж.	17,7±1,2	18,2±1,3	
ПОСвыд, % долж.	47,2±1,5	45,37±2,2	
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %	56,4±1,2	61,75±1,5	
ПСВ, %	42,1 ± 1,7	44,7 ± 1,2	p>0,05

Примечание: p - достоверность различий показателя между I и II группами.

Таким образом, учитывая клиническое течение болезни, функцию внешнего дыхания и ответы на вопросы АСТ, больные первой группы имели более тяжёлое течение болезни по отношению ко второй группе.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ У БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

3.1. Роль бронхиального клеточного воспаления в формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных тяжелой бронхиальной астмой

3.1.1. Взаимосвязь клинических особенностей течения болезни, профиля клеточного воспаления бронхов и холодовой гиперреактивностью дыхательных путей у больных тяжелой бронхиальной астмой

Тяжелая трудноконтролируемая БА [67] является гетерогенным заболеванием с различными клиническими и патогенетическими вариантами течения [52]. Согласно согласительным документам Американского торакального и Европейского респираторного сообществ, основными составляющими тяжелого течения БА являются низкий уровень контроля болезни и высокий риск его потери, несмотря на применение противовоспалительной терапии 4–5 ступени (GINA, 2018). Таким больным свойственна низкая обратимость бронхиальной обструкции при применении бронхолитических средств, высокая степень гиперреактивности бронхов, что может быть связано с полиморфизмом клеточного паттерна воспаления дыхательных путей [141].

Для выделения фенотипов бронхиального воспаления с целью подбора индивидуальной терапии тяжёлых форм БА используется оценка параметров клеточных элементов мокроты [9,52]. В качестве маркеров воспаления используется подсчёт количества эозинофилов мокроты, повышение их числа более 3% является критерием эозинофильного воспаления [128] и служит важным фактором развития обострения.

С целью изучения особенностей форм клеточного воспаления у больных тяжелой неконтролируемой астмой и их взаимосвязи с клиническим течением заболевания и признаками холодовой гиперреактивности дыхательных путей было проведено обследование 48 больных (средний возраст – $51,4 \pm 2,3$ года) в осенне-зимний период времени с ноября по март, включительно. Всем больным оценивали симптомы астмы за последнюю неделю перед предстоящим исследованием (GINA, 2018), уровень контроля над заболеванием за последние 4 недели, получаемую базисную противовоспалительную терапию и число обострений за предшествующие 12 месяцев.

Опираясь на клинические рекомендации по диагностике и лечению БА Российского респираторного общества (2018) [51], больные были разделены в группы характеру клеточного бронхиального воспаления: в I группу ($n = 22$) вошли лица с ведущим эозинофильным вариантом воспаления, при количестве эозинофилов более 2%, в II группу ($n = 26$) у которых был выявлен в мокроте смешанный паттерн воспаления, повышенный уровень эозинофилов, более 2% и уровень нейтрофилов более 61% (Таблица 21).

**Таблица 21 – Клеточный состав индуцированной мокроты больных ТБА, %
($M \pm m$)**

	Эозинофилы	Нейтрофилы	Макрофаги	Лимфоциты	Эпителий
Группа I	$31 \pm 3,1$	$22,0 \pm 2,2$	$46,2 \pm 4,1$	$3,0 \pm 0,70$	$7,5 \pm 0,9$
Группа II	$7,2 \pm 1,4$ $p < 0,001$	$71,8 \pm 2,7$ $p < 0,001$	$10,2 \pm 1,7$ $p < 0,001$	$4,1 \pm 0,97$	$4,2 \pm 0,9$ $p < 0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами.

Проведя статистический анализ полученных клинических данных, обращает на себя внимание более низкий уровень контроля у больных второй группы со смешанным паттерном воспаления, по отношению к первой группе (Таблица 22). Эти больные имели достоверно более длительное течение заболевания и объем получаемой противовоспалительной базисной терапии. Кроме того, в последние 7 дней до предстоящего исследования, больные II группы по сравнению с группой I чаще испытывали затруднение дыхания в дневные часы и потребность в дополнительном приёме лекарств неотложной помощи - бронхолитиков короткого действия. Они также имели большее число случаев обострения болезни за последний год и более низкий контроль над заболеванием за последние 4 недели.

Таблица 22 – Сравнительная характеристика обследованных групп пациентов (M±m)

Показатель	I Группа	II Группа	p
Возраст, лет	50,5±2,6	46,3±1,9	p>0,05
Количество дневных симптомов за последнюю неделю	12,7±2,01	16,3±1,79	p>0,05
Стаж заболевания, лет	4,7±0,1	5,6±0,2	p<0,001
Количество ночных симптомов за последнюю неделю	2,5±0,26	3,1±0,32	p>0,05
Количество эпизодов использования короткодействующих β_2 агонистов в сутки за последнюю неделю	5,1±0,42	6,8±0,51	p<0,05
Количество обострений за год	3,1±0,1	4,2±0,4	p<0,05
АСТ, баллы	17,6±0,2	11,9±0,6	p<0,001
Доза иГКС (сальметерол/флутиказон) (мкг в сутки)	650,7±14,8	705,3±19,7	p<0,05

Оценивая базовую функцию внешнего дыхания по данным спирометрического исследования, больные со смешанным паттерном бронхиального воспаления характеризовались более низкими значениями показателей, отражающих проходимость мелких дыхательных путей и меньшей лабильностью бронхов в ответ на введение бронхолитика (Таблица 23).

Клинические признаки наличия холодовой гиперреактивности дыхательных путей по данным анкетного опроса больных, по частоте встречаемости данного феномена в обеих исследуемых группах, были получены достоверные межгрупповые различия. Так, клиническая реакция на холодовое воздействие присутствовала у 79% больных II группы и только у 19% больных I группы ($\chi^2=14,18$; $p<0,001$). Оценивая шанс появления ХГДП у пациентов II группы, было найдено его превышение в три раза по отношению к больным I группы [отношение шансов (ОШ) при 95% доверительном интервале (ДИ) составляло от 0,43 до 5,68].

Таблица 23 – Показатели функции внешнего дыхания больных ТБА, (M±m)

Показатель	I группа	II группа	p
ФЖЕЛ, % долж.	60,3±4,2	55,6±3,2	p>0,05
ОФВ ₁ , % долж.	48,7±2,3	43,4±1,7	p>0,05
МОС ₂₅₋₇₅ , % долж.	17,2±1,4	12,2±1,4	p<0,05
ΔОФВ ₁ , %	12,3±1,2	8,6±0,8	p<0,05

Примечание: p - достоверность различий показателей между I и II группой; ΔОФВ₁ - прирост ОФВ₁ на введение β₂ агониста короткого действия.

Проведя сравнительный анализ клеточного состава мокроты у больных ТБА было обнаружено более высокое содержание количества эозинофилов у лиц I

группы по отношению ко второй (табл.20). Как и следовало ожидать, у лиц со смешанным паттерном воспаления число нейтрофилов превалировало, тогда как количество макрофагов было более высоким в первой группе. Кроме того, у последних была обнаружена более высокая степень десквамации эпителия, скорее всего связанная с цитотоксическим действием эозинофилов. Как следует из работы L. Wood (2012), эозинофилы способствуют выработке катионного протеина, который в свою очередь, приводит к повреждению и слущиванию клеток респираторного тракта [191]

Была исследована цитохимическим методом ферментативная функция гранулярных лейкоцитов мокроты по изменению активности миелопероксидазы (МПО). Более высокие значения внутриклеточной миелопероксидазы (синтез и накопление её в клетках) получены у больных II группы, так средний цитохимический коэффициент подсчитанный в пикселях (СЦК) МПО нейтрофилов у них оказался достоверно выше, чем в I группе ($158,3 \pm 12,3$; $110,6 \pm 8,4$; $p < 0,01$, соответственно), это же касалось и СЦК МПО эозинофилов ($117,6 \pm 5,9$; $97,8 \pm 5,4$; $p < 0,05$ соответственно) (Рисунок 7). Вероятно, при смешанном паттерне воспаления и при более высоких значениях МПО, происходит больший синтез предшественников свободных радикалов, что способствует деструкции клеток [191].

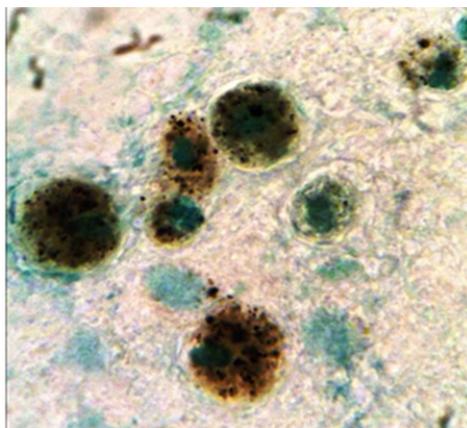


Рисунок 7 – Мазок мокроты пациента II группы. На препарате представлен нейтрофильный лейкоцит с высокой активностью миелопероксидазы. Окраска бензидином. Увеличение 1250

По литературным данным известно, что нейтрофильный паттерн воспаления бронхов у астматиков тесно коррелирует с воспалением на системном уровне [191]. Результаты лечения таких больных значительно хуже, чем при других фенотипах БА [191]. Кроме того, было показано, что у лиц, при обострении БА, в бронхах повышается уровень нейтрофилов [53]. Ранее А.Б. Пирогов и соавт. (2016) установили, что повышенный уровень нейтрофилов в мокроте больных лёгкой и среднетяжёлой БА с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей связан с риском неконтролируемого течения БА заболевания [15]. Согласно современным представлениям о фенотипе БА [51,54], рост числа эозинофилов и нейтрофилов в мокроте позволяет прогнозировать более тяжёлое течение болезни и ухудшение вентиляционной функции лёгких [54]. Как показало текущее исследование, у больных тяжелой формой БА и ХГДП ассоциировано со смешанным типом воспаления, характеризовалось более низкими значениями показателей бронхиальной проходимости и более низким контролем БА. Возможным механизмом увеличения нейтрофилов является повышенная активность провоспалительного цитокина IL8 [191]. Так было найдено, что у лиц с ХРГД его уровень в конденсате выдыхаемого воздуха в 1,5–2 раза выше, чем у больных БА с другими видами гиперреактивности бронхов [54]. Предположительно, у больных тяжелой БА в нейтрофилах происходит накопление МПО и других медиаторов воспаления, они инициируют клеточное возбуждение, повышенную чувствительность к раздражающему фактору, приводят к усилению оксидативного стресса и воспаления [15].

Таким образом, для больных тяжелой формой бронхиальной астмы с ХГДП в большей степени характерен смешанный вариант клеточного воспаления бронхов и связан с увеличением тяжести течения заболевания, более значимыми нарушениями вентиляционной функции лёгких и снижением уровня контроля.

3.1.2. Роль деструкции эпителия и гранулоцитов воспалительного инфильтрата бронхов в достижение контроля над заболеванием и формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных тяжёлой бронхиальной астмой

Морфологическую основу бронхиальной гиперреактивности и ремоделирования [21] составляет воспаление дыхательных путей. Обсуждению подлежит вопрос о связи функциональной активности ведущих клеточных эффекторов воспаления с изменениями бронхиального эпителия, принимающего активное участие в ремоделировании бронхов при бронхиальной астме.

В данном контексте интересна оценка эпителиальной деструкции как маркера инертности достижения контроля клинических проявлений болезни у больных тяжелой БА с ХГДП.

С этой целью были рассчитаны индексы деструкции основных клеточных элементов мокроты, отвечающих за воспаление и степень деструкции эпителиальных клеток (Таблица 24). В зависимости от структурной целостности ядра и цитоплазмы с дальнейшим подсчётом повреждённых клеточных элементов в соответствующем классе, данные суммируются и соотносятся к 100 с получением определённого индекса (ИД).

Таблица 24 – Средние значения индекса деструкции клеток мокроты больных ТБА ($M \pm m$)

Группа	ИД нейтрофилов	ИД эозинофилов	ИД эпителия	p
I	0,59±0,04	0,72±0,05	0,51±0,02	p<0,05
II	0,70±0,03	0,56±0,04	0,69±0,05	p<0,05

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами.

При изучении паттерна клеточного воспаления у больных с тяжелой формой астмы, оказалось, что у лиц со смешанным вариантом бронхиального воспаления (II группе) найдены более высокие значения ИД по всем вычисляемым параметрам, относительно больных с эозинофильным типом воспаления (группа I). Кроме того, в этой группе прослеживалась более выраженная деструкция нейтрофилов и менее выраженная деструкция эозинофилов, по отношению к пациентам I группы (Рисунок 8).

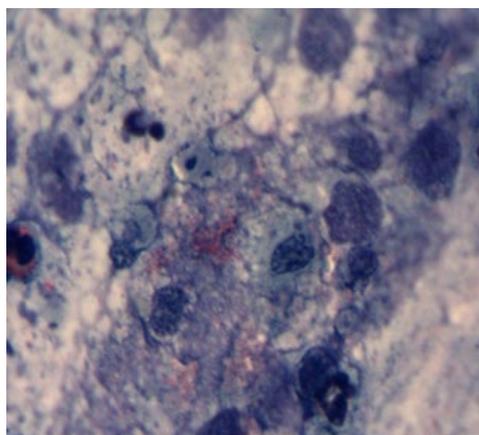


Рисунок 8 – Представлен фрагмент клеточной деструкции с голыми ядрами разрушенных нейтрофилов и эозинофилов. Мазок мокроты больного II группы. Фиксация в парах формалина. Окраска по методу Романовского-Гимза. Увеличение $\times 1250$

Таким образом, при эозинофильном типе воспаления происходил процесс усиленной десквамации покровных клеток, что свидетельствовало о их наибольшем содержании в мокроте и при этом степень деструкции эпителия была менее выражена. При смешанном паттерне воспаления наоборот, процесс деструкции эпителия был активнее, по отношению к эозинофильному паттерну, и количество эпителиальных клеток в мазках мокроты было гораздо меньше. У пациентов со смешанным паттерном воспаления ИД эпителия тесно коррелировал с ИД нейтрофилов ($r=0,61$; $p<0,01$) и ИД эозинофилов ($r=0,48$; $p<0,05$). Также было выявлено,

что контроль астмы у II группы пациентов также зависел от степени выраженности процессов деструкции в гранулярных лейкоцитах мокроты, что объяснялось обратной корреляцией между АСТ и ИДК нейтрофилов ($r=-0,71$; $p<0,01$); АСТ и ИДК эозинофилов ($r=-0,53$; $p<0,05$). Кроме того, на общей группе нами была обнаружена тесная связь между числом баллов при тестировании больных по вопроснику АСТ и количеством эпителиальных клеток ($r=-0,35$; $p=0,046$).

Из полученных данных следует, что у больных тяжелой формой БА степень деструкции эпителия слизистой оболочки бронхов ассоциирована с воспалительным паттерном бронхов и степенью деструкции гранулярных лейкоцитов воспалительного инфильтрата. Более выраженная деструкция клеточных элементов наблюдается у больных со смешанным паттерном воспаления, у которых в большинстве случаев выявлены клинические признаки холодовой гиперреактивности дыхательных путей (79%). Скорее всего, деструкция эпителия слизистой оболочки бронхов негативным образом влияет на клиническое течение ТБА, достижение контроля над заболеванием, сопровождаясь ухудшением функции дыхания и формированием ХГДП.

В отличие от эозинофильного паттерна, у больных тяжелой трудноконтролируемой астмой со смешанным паттерном наблюдаются более высокие параметры окислительной ферментативной активности гранулярных лейкоцитов, а именно уровень синтеза и депонирования МПО в цитоплазматических гранулах, а также степень деструкции клеточных мембран и интенсивность цитолиза клеток [39].

Деструкция бронхиального эпителия, сопряжённая с воспалительными деструктивными изменениями гранулоцитов, оказывает непосредственное влияние на развитие бронхоспазма. Медиаторы воспалительных клеток при нарушении структуры эпителия стимулируют С-волокна (суб- и интраэпителиально расположенные нервные окончания) которые связаны с неадренэргическими ганглиями "третьей" сигнальной нервной системы (NANC)[21]. В результате этого высвобождаются нейрокинины А и В и субстанция Р, активирующие тучные клетки, лимфоциты макрофаги, а также усиливают сосудистую адгезию и становятся хемоаттрактантами для эозинофилов и нейтрофилов. Возникшая в результате воспалительная

реакция сопровождается нарушением работы синтезируемого нейросекреторными клетками иммуномодулирующего VIP-нейропептида, ингибирующего выработку $IFN\gamma$, IL-12, IL-2 и индуцибельной NO-синтазы, что ведёт к усилению бронхоспазма [21].

У больных ТБА главную роль в патогенезе бронхообструкции играет уплотнение и фиброз собственной пластинки слизистой оболочки бронхов [58]. Повреждённые эпителиоциты вырабатывают фиброгенные и провоспалительные факторы роста – тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов, инсулиноподобные факторы роста, эндотелин 1, а также трансформирующий фактор роста β (TGF β), уровень экспрессии которого в наибольшей степени выражен у больных тяжёлой БА [21,109,148]. TGF β участвует в формировании главного механизма ремоделирования бронхов – трансформации фибробластов в миофибробласты, индуцирует синтез коллагенов и рост бронхиальных лейомиоцитов [109].

Синтетическая активность фибробластов и миофибробластов слизистой оболочки бронхов зависит от характера и выраженности бронхиального воспаления [21,58]. В случае нейтрофильного типа воспаления у больных тяжелой астмой происходит увеличение объема соединительной ткани и утолщение базальной мембраны, в следствие этого эпителий атрофируется и его плотность достигает минимального значения [28,58]. Данный процесс происходит за счет стимуляции нейтрофилами продуцирования металлопротеаз и факторов роста, которые регулируют превращение фибробластов в миофибробласты и лейомиоциты [58].

У больных ТБА со смешанным паттерном воспаления и интенсивной деструкцией нейтрофилов наблюдалось повышенное разрушение эпителиоцитов, в том время как у носителей эозинофильного паттерна содержание эпителиоцитов было максимальным, что соответствует данным литературы о процессе стимуляции эозинофилами десквамации эпителия.

Возможно, клинические проявления смешанного паттерна воспаления обусловлены не только процессом активной деструкции и цитолиза нейтрофилов, но усиленным разрушением эпителиоцитов воспалительного инфильтрата.

Апоптоз и некроз эпителия в данном случае осуществляется по пути, опосредованному свободнорадикальным повреждением крист митохондрий, разрушением эндоплазматического ретикулума и деэнергизацией клеток [148]. Гибель эпителия у больных со смешанным паттерном воспаления зависит от активации нейтрофильных лизосомальных ферментов и выброса активных форм кислорода и галогенов. О зависимости деструкции эпителия от деструктивных изменений нейтрофилов свидетельствует найденная связь между ИД эпителия и ИД нейтрофилов и эозинофилов.

Вслед за гибелью эпителиоцитов запускаются процессы ремоделирования бронхов, а именно пролиферация фибробластов эпителиоцитов с их дальнейшей трансформацией в миофибробласты и гладкомышечные клетки, усиленная продукция цитокинов, неоангиогенез, реэпителизация и фиброз [109,110]. А в случае ТБА происходит депонирование не только матричных белков, но и трансцеллюлярных компонентов (фибронектина, тенасцина) соединительной ткани [58]. Деструкция гранулоцитов у больных ТБА ухудшает проходимость дыхательных путей, влияет на тяжесть заболевания и способствует формированию ХГДП. О чем говорит выявленная связь между уровнем контроля астмы и степенью выраженности деструкции в гранулоцитах мокроты.

3.2. Эффективность применения различных режимов противовоспалительной терапии в достижении контроля у больных тяжелой бронхиальной астмой наличием холодовой гиперреактивности бронхов и разным профилем бронхиального воспаления

В настоящее время вызывает трудность выбор оптимального фармакотерапевтического режима у больных тяжелой формой БА с ХГДП, которая плохо контролируется приёмом высоких доз ИГКС и/или ИГКС/ДДБА. Ранее было показано, что доминирование нейтрофилов над эозинофилами в инфильтрате бронхов один

из основных факторов, способствующий увеличению резистентности на ингаляционные ГКС у больных астмой и приводящий к росту числа больных с бронхоспазмом на холодной триггер [54].

Известно, что больные тяжелой формой БА нуждаются в дополнительном назначении фармакологических средств, которые способствуют уменьшению воспаления дыхательных путей [173]. Именно поэтому представляет интерес сообщения ряда авторов об эффективном использовании ИГКС в сочетании с антилейкотриеновым препаратом - монтелукастом натрия [160]. Данный препарат ограничивает активность гранулоцитов, повышая внутриклеточную концентрацию цАМФ в нейтрофилах, и тем самым ослабляет приток Ca^{2+} , ингибируя фосфодиэстеразу, активирует β_2 -адренорецепторы, экспрессированные на лейкоцитах [160, 161]. Данное свойство является важным для больных БА с ХГДП, у которых высокая степень дисфункции β_2 -адренорецепторного аппарата и генетически детерминированное снижение способности клеток дыхательных путей к синтезу цАМФ [11].

Сведений об эффективности применения комбинированного режима терапии ИГКС/ДДБА в сочетании с антилейкотриеновыми препаратами у больных ТБА с ХГДП, имеющими смешанный воспалительный паттерн бронхов нет, также не достаточно информации о влиянии противовоспалительной терапии ИГКС/ДДБА на эозинофильный вариант воспаления.

С целью оценки эффективности влияния противовоспалительной терапии ИГКС/ДДБА отдельно и в сочетании с антилейкотриеновым препаратом на клиническое течение заболевания, уровень бронхиального воспаления и в плане оптимизации лечения, больным I и II групп была назначена терапия с динамическим наблюдением в течение 24 недель.

В I группе, больным с эозинофильным типом воспаления назначен комбинированный препарат ИГКС/ДДБА - флутиказона пропионат/сальметерол (Серетид®, ГласкоСмитКляйн, Великобритания), в дозе соответствующей тяжести заболевания ($772,73 \pm 52,81$ мкг/сут по флутиказону пропионату). Пациентам II группы дополнительно к комбинации высоких доз флутиказона пропионата/сальметерола

(910,71±33,22 мкг/сут по флутиказону пропионату) в вечернее время был добавлен монтелукаст натрия (10 мг). Для купирования остро возникшего приступа больные могли использовать сальбутамол, как средство неотложной помощи.

Эффективность назначенной терапии оценивали по числу больных, которые достигли критериев хорошего контроля астмы более 20 баллов при ответе на вопросы по Asthma Control Test через 24 недели. Учитывали динамику выраженности симптомов болезни с учётом клинических рекомендаций РРО принятых в практике [51] кашель и/или затруднённое дыхание, приступы удушья днём и/или ночью, потребность в короткодействующих β₂-агонистах для купирования симптомов оцениваемых суммарно по шкале опросника АСТ и наличие ассоциаций между уровнем «адекватной» реакции на предложенную терапию клинико-функциональных параметров и воспалительных маркеров бронхов. Результаты количественной оценки исходных клинико-функциональных параметров и воспалительного профиля бронхов представлены в таблице 25.

Как было показано выше в таблице 21, на момент начала исследования пациенты сформированных групп статистически значимо не отличались по основным антропометрическим данным и длительности течения заболевания. Вместе с тем имели неоднозначную картину исходных клинико-функциональных параметров и имели значимые различия по частоте встречаемости синдрома ХГДП (19 и 79%; $\chi^2=14,18$; $p<0,001$). Так у пациентов I группы с ведущим эозинофильным паттерном бронхиального воспаления, по сравнению с пациентами II группы, был выявлен достоверно ($p<0,05$) более высокий контроль над БА, меньшая частота встречаемости клинически значимых симптомов ХГДП (удушье и затруднение дыхания). Обращало внимание, что у пациентов I группы по сравнению с пациентами II группы имелась меньшая потребность в применении бронхолитиков короткого действия.

По окончании 24-недельного курса терапии у пациентов исследованных групп обнаружены определенные различия адекватности ответа на предложенную фармакотерапевтическую тактику применения противовоспалительных средств. Установлено, что в I группе с ведущим эозинофильным типом воспаления в режиме

использования увеличенного объёма (в рамках 4 ступени) комбинированного препарата флутиказон пропионат/сальметерол при длительном стабильном дозировании зарегистрирована субоптимальная положительная динамика проявлений клинических симптомов, показателей вентиляционной функции легких (ОФВ₁, МОС₅₀, МОС₂₅₋₇₅) по сравнению с данными показателями на момент включения пациентов в исследование (Таблица 25).

Таблица 25 – Клиническая и функциональная характеристика больных в конце 24-недельного наблюдения (M±m)

Показатели	I группа	II группа
Количество дневных симптомов БА за неделю	2,81±0,1***	4,1±0,5**; p<0,05
Количество ночных симптомов БА за неделю	2,2±0,3	2,7±0,4; p>0,05
Частота использования короткодействующего β ₂ -агониста за сутки	3,2±0,2**	5,3±0,2*; p<0,001
Количество обострений за 24 недели терапии	1,8±0,5**	3,6±0,3; p<0,01
АСТ, баллы	19,6±1,3***	15,9±1,2***; p<0,05
ОФВ ₁ , %долж	79,2±2,2***	72,3±2,5***; p<0,05
МОС ₅₀ , %долж	57,3±3,1***	47,8±2,7***; p<0,05
МОС ₂₅₋₇₅ , %долж	50,1±2,42***	34,1±2,3***; p<0,001

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами.
Звездочка * - достоверность различий показателя в сравнении с исходными данными (*- p <0,05, **- p <0,01, ***- p <0,001)

Наиболее подверженными снижению оказались параметры использования короткодействующих β 2-агонистов, число эпизодов дневных симптомов и количество случаев обострения болезни. Отмечено выраженное улучшение бронхиальной проходимости на всех уровнях бронхов. По результатам АСТ критериев частично-контролируемого течения БА достигли 7 (63%) пациентов.

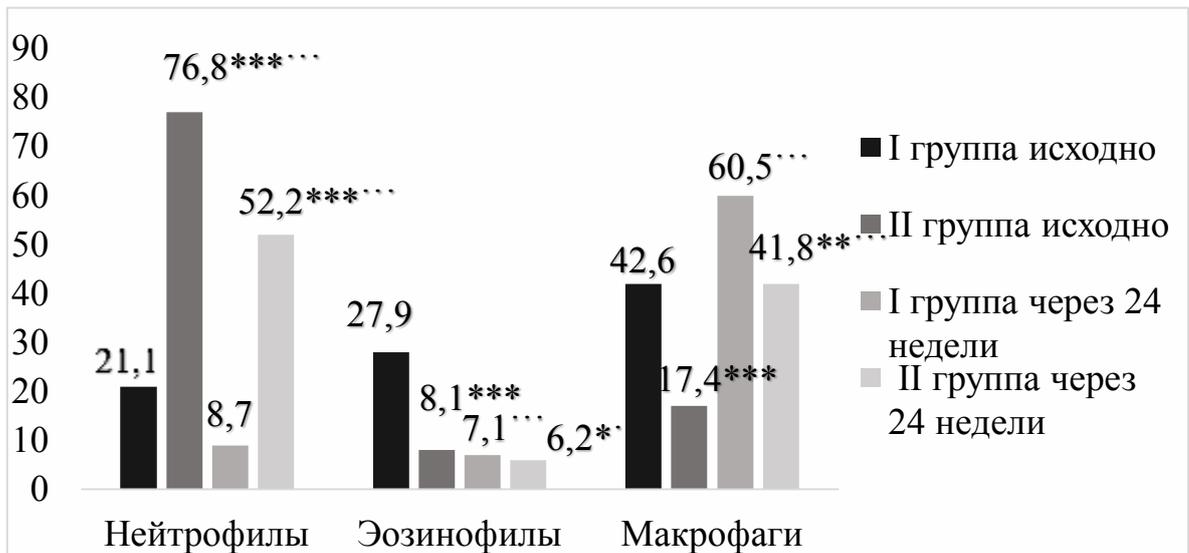
Для больных II группы со смешанным паттерном воспаления, получавших максимально высокие дозы препарата флутиказон пропионат-сальметерол в сочетании с монтелукастом натрия также была характерна положительная, но менее выраженная динамика клинических проявлений астмы, показателей функции внешнего дыхания и более низкий уровень достижения критериев контроля БА. Так же достоверно уменьшилась частота дневных симптомов затруднённого дыхания, сократилась потребность в β 2-агонистах короткого действия, увеличились параметры проходимости бронхов на всех уровнях.

В то же время, не прослеживалось положительного влияния применения высоких доз комбинированного препарата флутиказон пропионат-сальметерол + монтелукаст натрия на минимизацию наличия частых эпизодов обострений заболевания. Последние регистрировались у пациентов II группы значительно чаще – у 12 (86%) больных, нежели в I группе – у 4 (36%). У всех пациентов II группы с внеплановыми визитами за медицинской помощью оказалось неконтролируемое течение БА. Лишь у 4 (14%) согласно результатам АСТ определялся частичный контроль болезни. У пациентов рассматриваемой группы на этапе 24-недельного курса терапии преобладали и наиболее специфичные симптомы (удушье и/или затруднённое дыхание) при контакте с холодным воздухом по сравнению с I группой ($\chi^2 = 5,69$; $p < 0,05$). Оценивая шансы появления ХГДП, в 17,8 раз увеличена вероятность, по отношению к группе I (отношение шансов (8,0) при 95% доверительном интервале от 1,75 до 200,0).

Динамика маркеров воспаления в дыхательных путях у больных, вошедших в I и II группы, отражена на Рисунке 9. Исходно в I группе пациентов с ведущим эозинофильным паттерном бронхиального воспаления уровень эозинофилов мок-

роты достоверно превышая таковой пациентов II и контрольных групп при меньшем количестве нейтрофилов.

К окончанию 24 недели на фоне положительной динамики клинико-функциональных параметров и контроля над астмой зарегистрировано значимое снижение в мокроте эозинофильных лейкоцитов на 72%, нейтрофильных гранулоцитов на 41%. Исходно у пациентов II группы со смешанным типом воспаления в клеточном составе мокроты прослеживался высокий уровень как нейтрофилов, так и эозинофилов, число нейтрофилов, достоверно превышало ($p < 0,001$) содержание нейтрофилов у больных I группы. К окончанию периода наблюдения количество нейтрофилов сократилось в меньшей степени (42%) по сравнению с эозинофилами в I группе при менее выраженной положительной динамике клинических симптомов и невысоким уровнем контроля болезни.



Примечание: *- $p > 0,05$, ***- $p < 0,001$ для 1-й группы по сравнению с 2-й исходно и на этапе 24-недель; ·- $p < 0,05$, ··- $p < 0,01$, ···- $p < 0,001$ в группах между исходными показателями и на этапе 24 недель.

Рисунок 9 – Клеточный состав мокроты у больных ТБА исходно и спустя 24-недели

Таким образом, установлено, что комбинированная терапия высокими дозами флутиказона пропионат/сальметерол +монтелукаст натрия у больных II группы, со смешанным вариантом бронхиального воспаления, вопреки ожиданиям, не имела преимуществ в отношении противовоспалительного эффекта по сравнению с терапией препаратом флутиказон пропионат/сальметерол больных тяжелой формой БА с ХГДП с ведущим эозинофильным типом воспаления.

Данный факт, может объясняться генетической вариабельностью ответа на применение противоастматической терапии. По литературным данным для ряда препаратов установлено, что 20–95% доли межиндивидуальной изменчивости по эффективности их метаболизма объясняется генетической вариабельностью [110]. что генетическая изменчивость может быть ответственна за 60–80% вариабельности ответа на ряд противоастматических препаратов [110].

По существующим стандартам лечения БА, применение ИГКС в комбинации с β_2 -агонистами длительного действия, антилейкотриеновыми препаратами, препаратами теофиллинового ряда, в повседневной клинической практике является приоритетным и достигающим цели – снижения кортикостероид-нечувствительности. К средствам, потенцирующим эффекты ГКС, имеющим клиническую значимость и доказательную базу, относится М-холинолитик длительного действия - тиотропия бромид.

Ввиду неэффективности режима сочетанной терапии высокими дозами флутиказона пропионат/сальметерол + монтелукаст натрия у больных тяжелой формой БА с ХГДП и смешанным профилем бронхиального воспаления, было решено к терапии комбинированным препаратом флутиказон пропионат/сальметерол добавить М-холинолитик длительного действия- тиотропий бромид.

Эффективность включения антихолинергического препарата в схему лечения пациентов с неконтролируемым течением тяжелой БА, на фоне применения высоких доз ингаляционных ГКС (ИГКС) в комбинации с ДДБА, была обоснована рядом рандомизированных исследований [63,200,201]. Было показано, что добавление тиотропия бромида к стандартной комбинированной терапии ИГКС/ДДБА со-

проводится улучшением лёгочной функции, снижением выраженности симптомов астмы у взрослых и подростков с разной степенью тяжести заболевания [156].

Исследование эффективности тиотропия бромиды как средства, дополняющего базисную комбинированную противовоспалительную терапию у больных БА представляется весьма важным. Последовательное изучение воспалительного профиля дыхательных путей, с анализом преобразований в структуре клеточных эффекторов, необходимо для расширения представлений о патогенетически обоснованном, манифестируемом полиморфизмом морфологических фенотипов, подходе фармакотерапии астмы.

Больные I группы продолжили получать противовоспалительную терапию комбинированным препаратом – флутиказона пропионат/салметерол в режиме увеличения объёма, в качестве дополнительного терапевтического средства больные II группы, помимо флутиказон пропионата/салметерола получали один раз в день препарат тиотропия бромид, доставляемый с помощью ингалятора нового поколения Респимат® (5 мкг/сут (2 дозы; 2,5 мкг/доза). В случае неотложной помощи все больные применять бронхолитики короткого действия в. Эффективность терапии оценивали по увеличению числа баллов АСТ и числа больных, которые к 24-неделе достигли критериев хорошего контроля.

К концу лечения, 24 недели наблюдения у больных I группы значимого улучшения со стороны клинических симптомов болезни и существенной динамики функциональных параметров не было выявлено. Тогда как у больных II группы, по отношению к исходным данным, на фоне дополнительного применения тиотропия бромиды в сочетании с базисной противовоспалительной терапией отмечалась положительная динамика заболевания (Таблица 26), с угасанием клинических симптомов болезни, достоверным улучшением проходимости мелких дыхательных путей. Дополнительное использование М-холинолитика приводило к эффективному снижению дневных и ночных симптомов астмы, потребности в препаратах симптоматической терапии. Обращает на себя внимание снижение частоты обострений болезни. Так, число обострений во II группе снизилось до 6 (43%) случаев, между тем как в I группе пациентов не изменилось 4 (36%) случаев ($\chi^2=0,006$; $p>0,05$).

Таблица 26 – Клиническая и функциональная характеристика больных БА через 24 недели терапии (M±m)

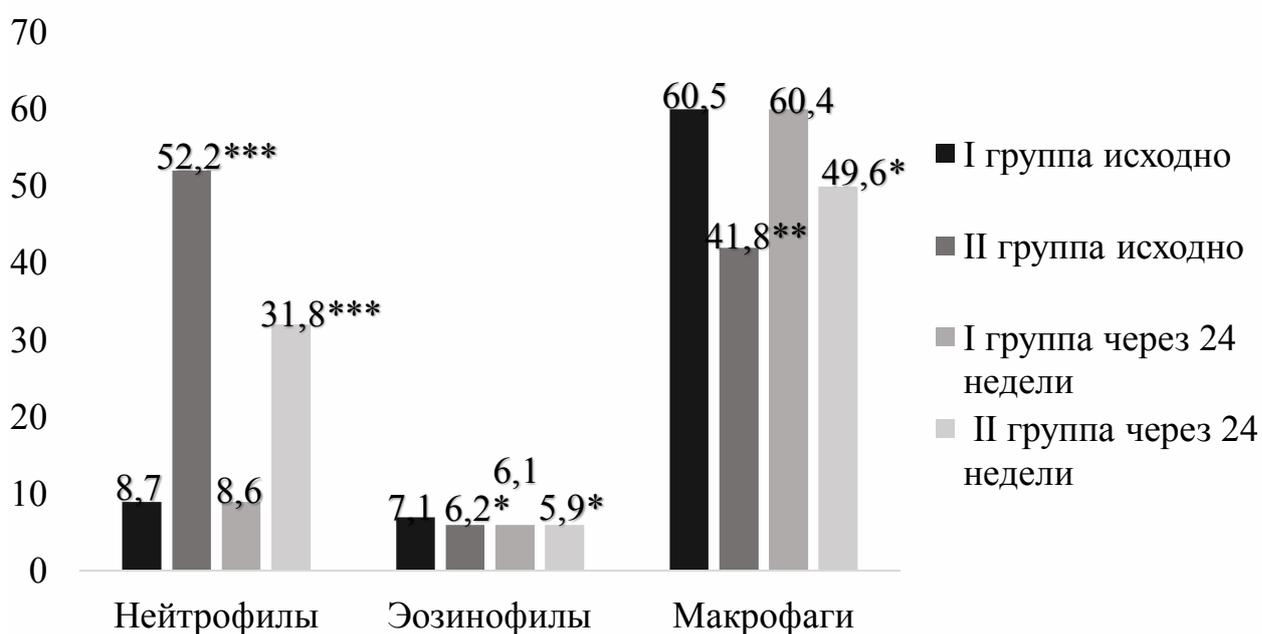
Показатели	I группа	II группа
Число дневных симптомов БА (за неделю)	2,1±0,3	2,6±0,3* p>0,05
Число ночных симптомов БА (за неделю)	2,3±0,4	1,5±0,2*** p>0,05
Использование короткодействующего β ₂ -агониста (за неделю) (кол-во/сутки)	3,2±0,4	4,2±0,2** p<0,05
Число обострений за 24 недели терапии	1,6±0,2	2,0±0,1 p>0,05
АСТ, баллы	19,9±1,2	18,8±0,6* p>0,05
ОФВ ₁ , % должной	86,1±2,9	80,3±3,2 p>0,05
МОС ₂₅₋₇₅ , % должной	56,4±4,2	43,7±2,2** p<0,05

Примечание: p - достоверность различий показателей между группами. * - достоверность различий в сравнении с исходными данными (*- p < 0,05, **- p < 0,01, ***- p < 0,001).

Оценивая уровень контроля над заболеванием в конце проведённого лечения, в обеих группах не было обнаружено значимых межгрупповых различий в средних значениях баллов. При сравнении средних значений показателей по АСТ по отношению к предшествующим 24 неделям, у больных I группы результаты оставались на прежнем уровне и составляли 19,6±1,3 и 19,9±1,2 баллов, соответственно. У

больных II группы происходила регрессия клинических симптомов, что безусловно отражалось на количестве зарегистрированных баллов АСТ, так подключение к противовоспалительной терапии тиотропия бромидом позволило увеличить контроль над заболеванием с $15,9 \pm 1,2$ до $18,8 \pm 0,6$ ($p < 0,05$).

Дополнительное применение тиотропия бромидом в комплексе с противовоспалительной терапией в большей степени оптимизировало лечение больных II группы, имеющих смешанный тип бронхиального воспаления (Рисунок 10)



*Примечание: *- $p > 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ для 1-й группы по сравнению с 2-й исходно и на этапе 24-недель.*

Рисунок 10– Динамика показателей клеточного состава мокроты исходно и через 24 недели терапии

В процессе проводимой терапии, фенотип воспаления больных II группы претерпевал значимые изменения, проявляющие себя в существенном снижении числа

нейтрофилов мокроты, приводя к переходу смешанного типа воспаления в эозинофильный. Оценивая межгрупповые различия в отношении количества нейтрофилов: на всех этапах проводимого исследования нейтрофилов насчитывалось больше в воспалительном профиле пациентов II группы, чем в паттерне воспаления I группы, у которых число нейтрофилов на протяжении 24 недельной базисной терапии оставалось постоянным.

Вызывает интерес отсутствие какой-либо динамики со стороны количества эозинофилов, которое после лечения оставалось повышенным, не отличалось от показателя I группы, что свидетельствовало об инертности реакции эозинофильного сегмента воспаления дыхательных путей у этих пациентов на воздействие тiotропия бромида по сравнению с реакцией нейтрофильного компонента.

Что касается содержания макрофагов в мокроте, то, в соответствии с исходным превалированием нейтрофилов во II группе, количество макрофагов у них было более низким, чем в I группе и не имело достоверных межгрупповых различий по завершении 24 недель терапии.

На общей группе больных проведён корреляционный анализ между первичными и полученными показателями после длительной противовоспалительной терапии. Он показал, что высокое базовое содержание нейтрофилов в профиле мокроты напрямую было связано с числом эпизодов ночного удушья ($r=0,39$; $p=0,01$). Исследуя зависимость между основными параметрами после 24 недельного курса терапии обнаружено, что снижение уровня нейтрофилов в мокроте приводило к улучшению бронхиальной проходимости ОФВ₁ ($r=-0,44$; $p=0,0002$), увеличению контроля над болезнью АСТ ($r=-0,61$; $p=0,001$), а также к уменьшению потребности в приёме β_2 -агонистов короткого действия ($r=0,52$; $p=0,02$). Кроме того, была выявлена прямая связь между содержанием макрофагов в мокроте после проведённого лечения ОФВ₁ ($r=0,31$; $p=0,011$) и АСТ ($r=0,29$; $p=0,035$), а также обратная между числом эозинофилов мокроты, ОФВ₁ ($r=-0,40$; $p=0,001$) и АСТ ($r=-0,49$; $p=0,012$) (Рисунок 11).

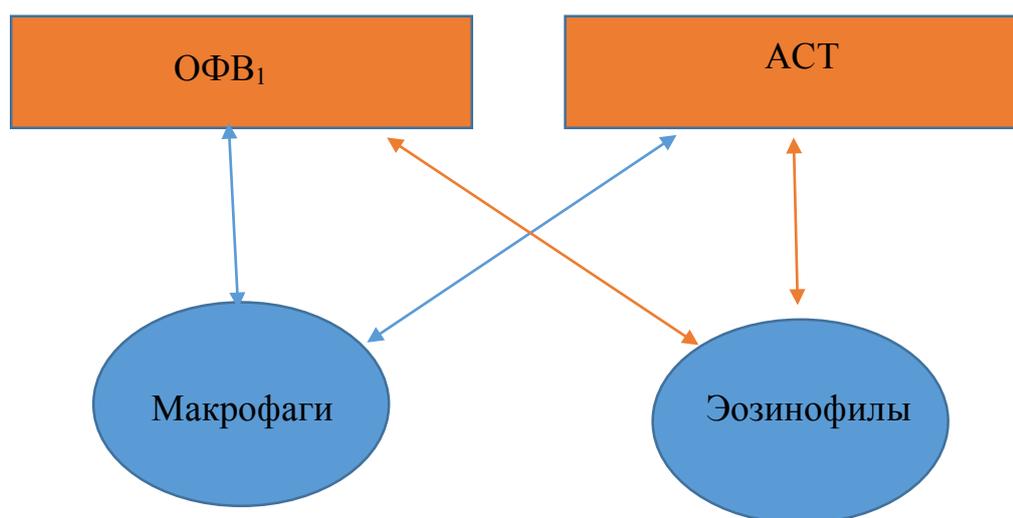


Рисунок 11 – Схема корреляционной связи между числом макрофагов и эозинофилов и ОФВ1 и АСТ после проведенной терапии

Воспалительные и иммунные клетки – макрофаги, моноциты, лимфоциты, тучные клетки и нейтрофилы – являются носителями функционально активных мускариновых рецепторов связываемых тиотропием бромида [192]. То же можно сказать и про эозинофилы, которые помимо экспрессии М-рецепторов, участвуют в стимулирующем раздражении холинергической нервной системы в условиях деструкции респираторного эпителия под воздействием эозинофильных протеинов, способствуя тем самым активации блуждающего нерва и развитию бронхиальной гиперреактивности [192]. Тиотропий бромид участвует в подавлении воспаления, тем самым способствует угнетению процессов ремоделирования бронхов при БА. Блокирование тиотропием бромида холинергических сигналов, модулирующих воспаление, ассоциирована со снижением продукции цитокинов, накоплением эозинофилов и нейтрофилов в дыхательных путях [33].

Предполагается что тиотропий бромид будет высокоэффективным в лечении больных с ХГДП за счет воздействия М-холинолитика на воспалительный паттерн бронхов. Известно, что у больных неконтролируемой БА и лиц с ХГДП бронхиаль-

ное воспаление подразделяется на эозинофильный и смешанный, с присущим последнему значительным нейтрофильным компонентом в популяции гранулоцитов [39]. Оксидативный стресс, являющийся важным элементом воздействия нейтрофилов, характеризуется генерацией множества свободных радикалов, обладающих мощным повреждающим действием, и оказывающим прямое токсическое влияние на ключевые структуры лёгких, ускоряя снижение лёгочной функции, способствуя процессам ремоделирования [33]. Известно, что нейтрофилия бронхиального инфильтрата у больных БА служит фактором, инициирующим формирование резистентности к ГКС, усугубляя клиническое течение астмы, сопровождаясь потерей контроля над болезнью, ухудшением проходимости бронхов, увеличением частоты встречаемости ХГДП [39]. ХГДП чётко ассоциируется с низким уровнем контролируемого течения астмы и трудностями купирования холодового бронхоспазма [10].

Длительное применение тиотропия бромида в дозе 5 мкг/сутки, в дополнение к основной противовоспалительной терапии, у больных ТБА с ХГДП приводило не только к улучшению клинической картины заболевания, но и к изменению фенотипа воспаления. Это наглядно свидетельствует об эффективности воздействия тиотропия бромида на нейтрофильное звено воспаления, что подтверждается данными ряда других исследователей [143].

Тиотропий бромид у больных тяжелой неконтролируемой формой БА с ХГДП и смешанным типом воспаления бронхов, воздействовал на нейтрофильный компонент, что сопровождалось структурной реорганизацией воспалительно-клеточного профиля, переводя его в эозинофильный.

Таким образом, добавление тиотропия бромида в дозе 5 мкг/сутки к терапии ИГКС/ДДБА у больных тяжелой неконтролируемой БА с ХГДП, приводит к улучшению клинической картины заболевания, лёгочной функции и снижению числа обострений БА.

ГЛАВА 4. ЭФФЕКТЫ ПОЛИМОРФИЗМА C.750G> С ГЕНА TRPM8 НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ.

Учитывая то, что число больных тяжелой БА оказалось недостаточным для проведения генетического исследования, дополнительно в работу были включены 314 пациентов из базы данных ДНЦ ФПД, проходивших обследование в период 2007-2017 годы с диагнозом бронхиальная астма легкой и средней степени тяжести. Из этих больных у 19 человек (6%) была легкая интермиттирующая БА, у 119 (38%) - легкая, у 176 человек (56%) – БА средней степени тяжести с доказанной холодовой гиперреактивностью дыхательных путей или отсутствием таковой при проведении острой бронхопровокационной пробы изокапнической гипервентиляции холодным воздухом (-20°C).

Средний возраст обследованных составил $38,5 \pm 0,62$ лет, 41% больных были представлены мужчинами, 59% - женщинами ($\chi^2=20,7$, $p<0,001$). Характеристика обследованных больных представлена в Таблицах 27-28. Больные не различались по половому признаку, все больные были трудоспособного возраста согласно возрастной периодизации жизненного цикла человека, принятой Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. Больные имели разный по длительности стаж заболевания, который в среднем составлял $8,6 \pm 0,42$ года. Большинство обследуемых больных (75%) имели поздний дебют заболевания в возрасте $35,2 \pm 0,46$ лет. Интересен тот факт, что одна треть больных астмой курила (30,1%), из которых 15,4% более 10 пачка/лет.

Оценивая функцию внешнего дыхания по данным спирометрического исследования в среднем по группе основной показатель, отражающий проходимость дыхательных путей ОФВ_1 был высоким и превышал 80%, а его отношение к ЖЕЛ составляло больше 0,7.

Таблица 27 – Основные антропометрические и анамнестические данные больных бронхиальной астмой

Основные параметры		БА (n =314)
Пол	Мужской	128(41%)
	Женский	186 (59%)
Возраст, лет		38,5±0,62
Стаж заболевания, лет (M±m)		8,6±0,42
Индекс массы тела (ИМТ), кг/м ² (M±m)		27,2±0,70
Возраст дебюта заболевания	Ранний	72(25%)
	Поздний	213 (75%)
Индекс курильщика, пачка/лет	Не курили	199(68,9%)
	Менее 10п/лет	42(14,7%)
	Более 10 п/лет	44(15,4%)

Примечание: n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Таблица 28 – Характеристика вентиляционной функции лёгких

Показатель	M±m
ОФВ ₁ , % должной	90,6±1,03
ФЖЕЛ, % должной	102,0±0,96
ОФВ ₁ /ЖЕЛ, %	71,4±0,52

При проверке реакции дыхательных путей на обратимость бронхиальной обструкции после проведения бронходилатационной пробы с β_2 -агонистом короткого действия (Таблица 29) по данным спирометрического исследования прирост основного показателя Δ ОФВ₁, варьировал в пределах $11,9 \pm 0,80$ %.

При проведении в условия лаборатории острой бронхопровокационной пробы 3 минутной изокапнической гипервентиляции холодным воздухом падение ОФВ₁ в среднем по всей группе составляло $-8,2 \pm 0,45$ %.

Таблица 29 – Динамика показателей функции внешнего дыхания после бронходилатационной пробы с β_2 агонистом

Показатель	M\pmm
Δ ОФВ ₁ , %	11,9 \pm 0,80
Δ ФЖЕЛ, %	5,3 \pm 0,51
Δ ОФВ ₁ /ЖЕЛ, %	8,0 \pm 0,52

4.1. Влияние полиморфизма с.750G> C (rs11562975) гена холодового рецептора TRPM8 на снижение функции легких у больных бронхиальной астмой

Согласно многочисленным исследованиям, для больных тяжелой БА характерно прогрессирующее снижение лёгочной функции, так же как и для больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). В одном из исследований, проведённых Lange P.A. et al. (1998) было обнаружено, что у лиц, страдающих БА, падение ОФВ₁ за год составляет порядка 38 мл в год, для здоровых пациентов снижение, связанное с естественной убылью показателя по возрасту, составляло 22 мл [149]. К достижению пожилого возраста разница в ОФВ₁ между больными БА и здоровыми составляла около 1 л [149]. На данный процесс не влияли такие факторы

как рост, пол, профессиональные вредности, эффект курения. Исходя из этого, заболевание БА может являться независимым фактором риска формирования бронхиальной обструкции, и с течением времени в независимости от других причин, способных влиять на течение заболевания, у больных БА нарастает необратимое снижение функции лёгких (снижение постбронходилатационного ОФВ₁/ЖЕЛ менее 0,7), как было показано в длительном популяционном эпидемиологическом исследовании, выполненном S.Guerra et al. (2008) [185]. В основе необратимого ограничения воздушного потока у астматиков могут лежать разные причины, это закономерное снижение показателей вследствие увеличения возраста, вследствие профессиональных вредностей, воспаления, флюктуирующей гиперреактивности бронхов, отсутствии терапии ИГКС [115, 154].

В недавних исследованиях также были обнаружены гены, полиморфизмы которых ассоциированы с более низкими значениями ОФВ₁ и тяжестью БА такие как *IL12A*, *IL12RB1*, *STAT4*, *IRF2* [126].

Именно поэтому, вызывает интерес исследование влияния ОНП с.750G> C (rs11562975) гена холодового рецептора *TRPM8* на снижение функции легких у больных бронхиальной астмой.

С целью определения влияние полиморфизма с.750G> C (rs11562975) гена холодового рецептора *TRPM8* на снижение функции легких у больных бронхиальной астмой в исследовании приняли участие 285 больных легким и среднетяжелым персистирующим течением БА (106 с легкой степенью тяжести и 179 со средней степенью тяжести БА). Больные тяжелой формой бронхиальной астмой целенаправленно не включались в анализ, поскольку у данных пациентов имелись выраженные нарушения вентиляционной функции легких (ОФВ₁ < 60% должн. ОФВ₁/ЖЕЛ <0,7), на фоне которых эффект ОНП с.750G> C (rs11562975) гена холодового рецептора *TRPM8* плохо прослеживался.

При распределении больных по половому признаку среди пациентов с легкой и средней степенью тяжести заболевания превалировали женщины (61%), против 39% мужчин ($\chi^2 = 26,9$, $p < 0,001$) (Таблица 30).

Таблица 30 – Распределение больных бронхиальной астмой по половому признаку

Основные параметры (n/(%))		БА (n =285)
Пол	Мужской	111(39%)
	Женский	174(61%)

Примечание: n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Характеристика базовой лёгочной функции и после ингаляции бронхолитика короткого действия отражены в Таблице 31. В среднем по группе основные параметры, отражающие проходимость дыхательных путей находились в диапазоне нормальных значений, установленных для здоровых лиц, однако, в ответ на введение β_2 симпатомиметика в среднем по группе отмечался значимый прирост ОФВ₁ более 12%, что свидетельствовало об имеющимся у них бронхоспазме.

Таблица 31– Базовая вентиляционная функция легких и изменение параметров (Δ , %) в динамике после бронходилатационной пробы с β_2 агонистом

Показатель	M\pmm
ОФВ ₁ , %	91,6 \pm 1,05
ФЖЕЛ, %	104,0 \pm 0,98
Δ ОФВ ₁ /ЖЕЛ, %	72,4 \pm 0,54
Δ ОФВ ₁ , %	12,9 \pm 0,80
Δ ФЖЕЛ, %	5,8 \pm 0,53
Δ ОФВ ₁ /ЖЕЛ, %	8,2 \pm 0,56

В общей группе частоты генотипов находились в равновесии Харди-Вайнберга (Таблица 32). Наиболее встречаемый оказался генотип GG, который был выявлен у 239 (83,8%) больных лёгкой и среднетяжёлой БА.

Таблица 32 – Частота встречаемости генотипов в группе больных БА

Генотип	Количество больных (%)
GG	83,8%
GC	14,4%
CC	1,8%

При анализе показателей функции внешнего дыхания у носителей разных генотипов по полиморфизму rs11562975, оказалось, что у носителей аллеля С (гомозиготы и гетерозиготы) показатели вентиляционной функции лёгких были достоверно более низкими, по сравнению с носителями генотипа GG (Рисунок 12). Это снижение было значимо при сравнении гетерозигот GC с гомозиготами. Носители генотипа CC не анализировались ввиду редкой встречаемости (n=5), хотя имели наиболее низкие значения показателей легочной функции.

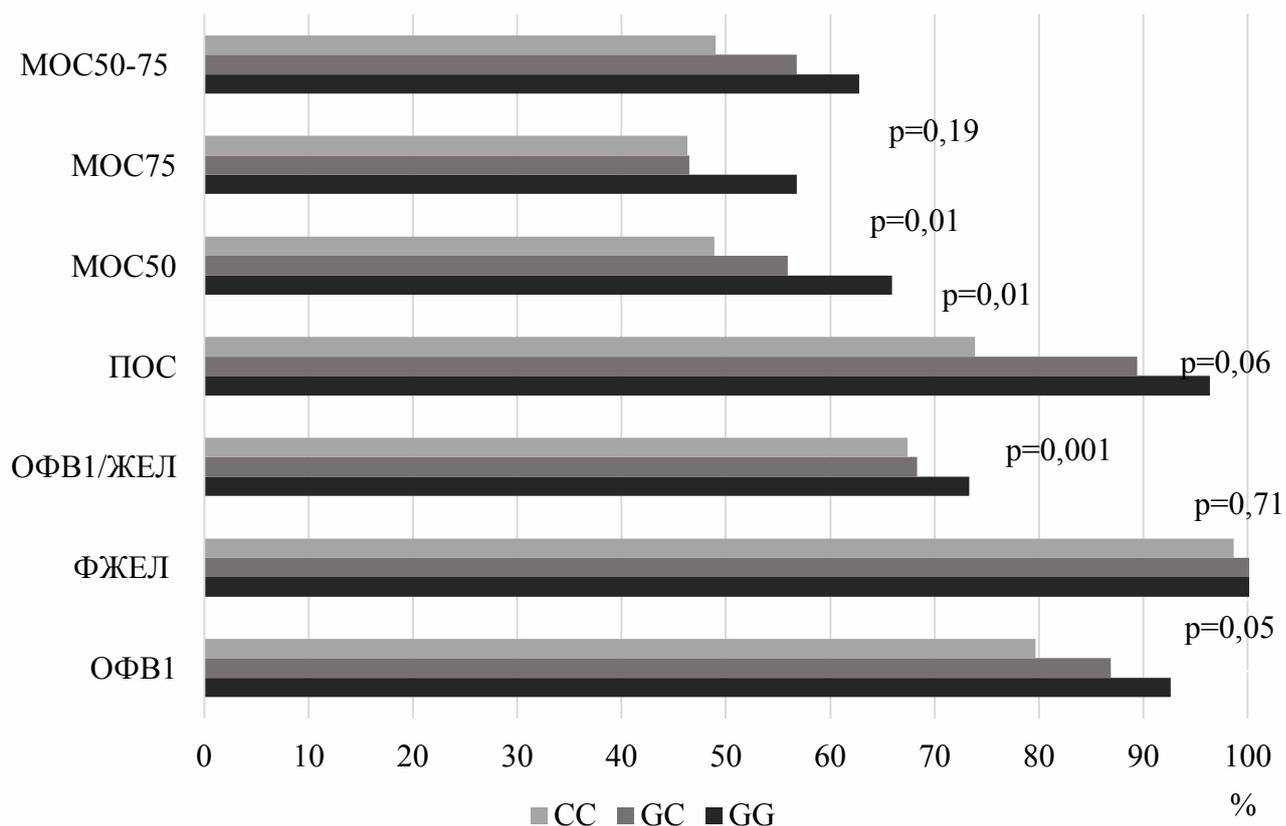


Рисунок 12 – Показатели функции внешнего дыхания исходно у носителей разных генотипов по полиморфизму rs11562975

GC и CC генотипы чаще встречались среди больных БА с ИТ менее 70% (при GC-21,1% и CC-2,8%), чем у больных с ИТ \geq 70% (GC-10,2% и CC-0,6%). Эти различия были значимы для общей ($p=0,01$), аддитивной ($p=0,002$) и доминантной моделей ($p=0,003$) (Рисунок 13). Отношение шансов при наличии С аллеля в генотипе (GC+CC) составило 2,6 (1,35-4,95). Эта ассоциация также была значима для аллелей (Рисунок 14) – аллель С встречался в 13,3% случаев среди больных с ИТ <70% и лишь в 5,7% случаев в группе с ИТ \geq 70% ($p=0,002$).

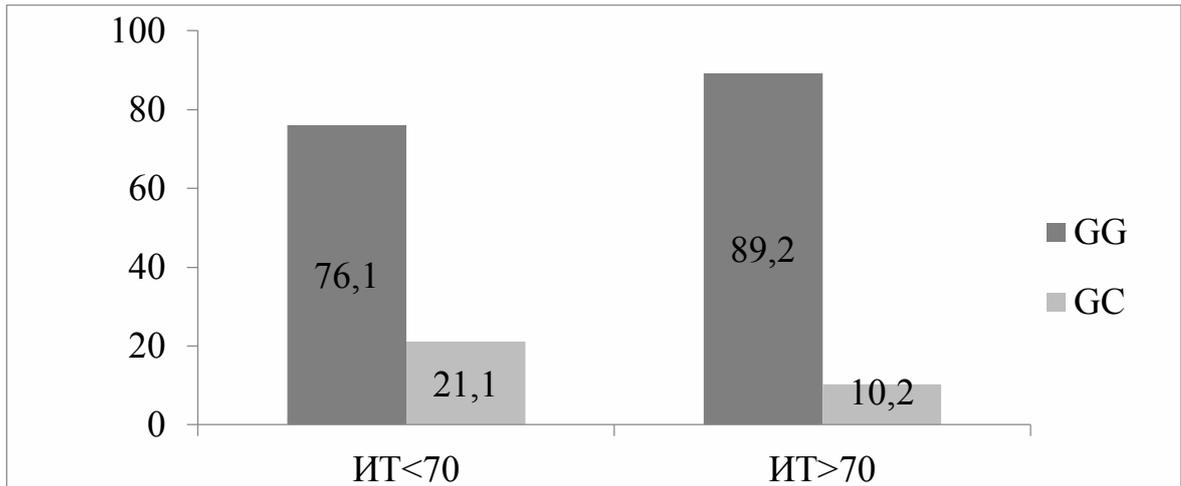


Рисунок 13– Ассоциация полиморфизма rs11562975 с исходным ИТ <70 (доминантная модель и аддитивная модель)

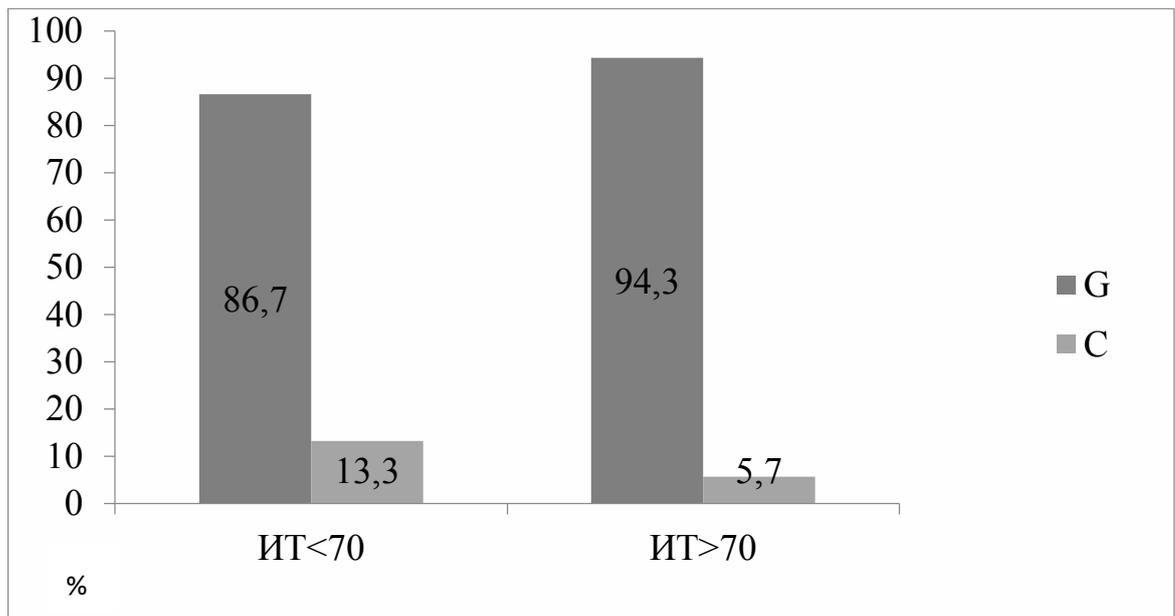


Рисунок 14 – Ассоциация полиморфизма rs11562975 с исходным ИТ<70 для аллелей

Полиморфизм rs11562975 не оказывал значимого влияния на степень выраженности реакции в ответ на ингаляцию короткодействующего β_2 -агониста при

проведении бронходилатационной пробы (Рисунок 15). Так, изменение показателя $ОФВ_1$ составило $13,1 \pm 0,9\%$ для носителей GG, $11,8 \pm 1,78\%$, носителей CC- $14 \pm 3,31\%$ генотипа ($p > 0,05$). При проведении корреляционного анализа прямой взаимосвязи между генотипом и изменением $ОФВ_1$ как качественным признаком ($\Delta ОФВ_1$ 12% и более) после введения бронхолитика обнаружено не было. Для ИТ соответствующие значения составляли $8,2 \pm 0,63$, $7,9 \pm 1,31$ и $8,7 \pm 3,24\%$ ($p > 0,05$).

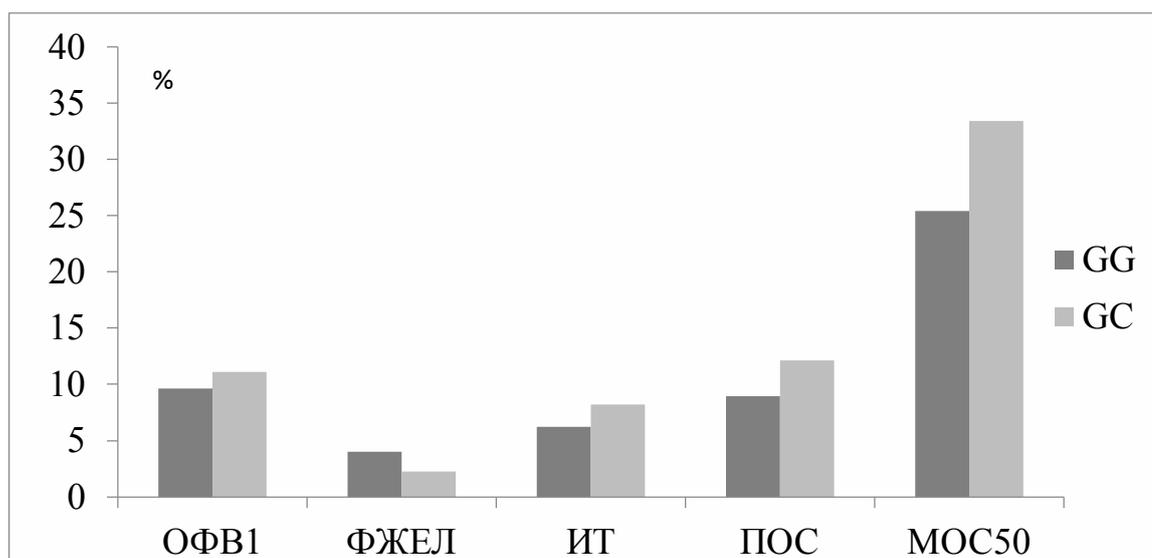


Рисунок 15 – Значимость различий между генотипами GG и GC после ингаляции бронхолитика

Было обнаружено, что гетерозиготный генотип GC в среднем ассоциирован с 5% снижением постбронходилатационного ИТ, по сравнению с генотипом GG ($73,7 \pm 1,89\%$ и $78,9 \pm 0,62\%$, $p = 0,002$, соответственно) (Рисунок 16). Носительство генотипа CC не сопровождалось достоверным изменением постбронходилатационного ИТ по сравнению с гетерозиготным ($73,0 \pm 3,73\%$). Ассоциация генотипов с ИТ $< 70\%$ как качественным признаком теряла значимость, несмотря на то, что генотип GC, по-прежнему, чаще встречался у больных БА с ИТ $< 70\%$ ($21,1\%$ против $12,7\%$, $p = 0,1$).

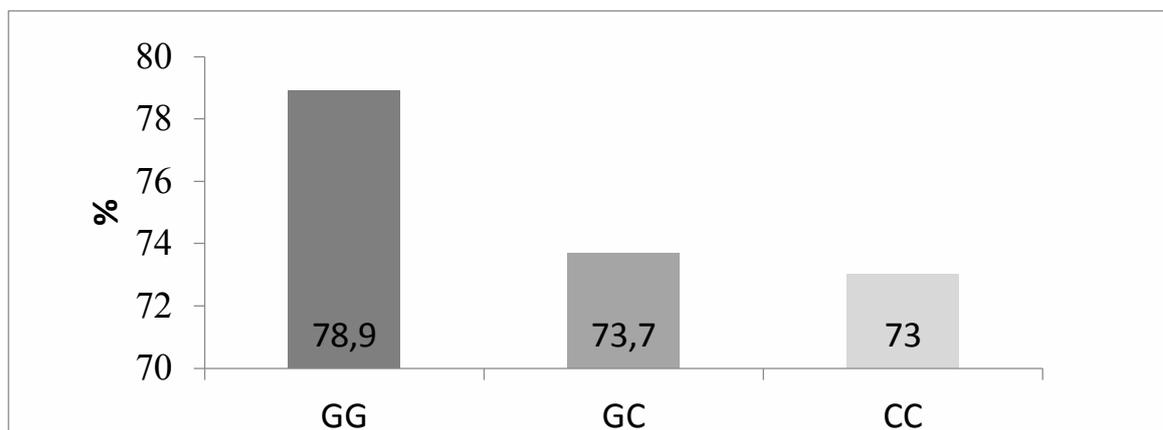


Рисунок 16 – Значимость различий ИТ между генотипами после применения β_2 агониста короткого действия

Значимая ассоциация полиморфизма обнаруживалась только с ИТ <80%. При этом, носители генотипа GC и CC составляли 18,1% и 1,8% больных БА с ИТ <80%, но в два раза реже встречались у больных с ИТ \geq 80% (9,2% и 0,8%, соответственно). Полученные различия были значимы при сравнении в доминантной (ОШ 2,2 (1,09-4,49), $p=0,03$) и аддитивной модели ($p=0,03$), а также при анализе частот аллелей ($p=0,02$) (Рисунок 17).

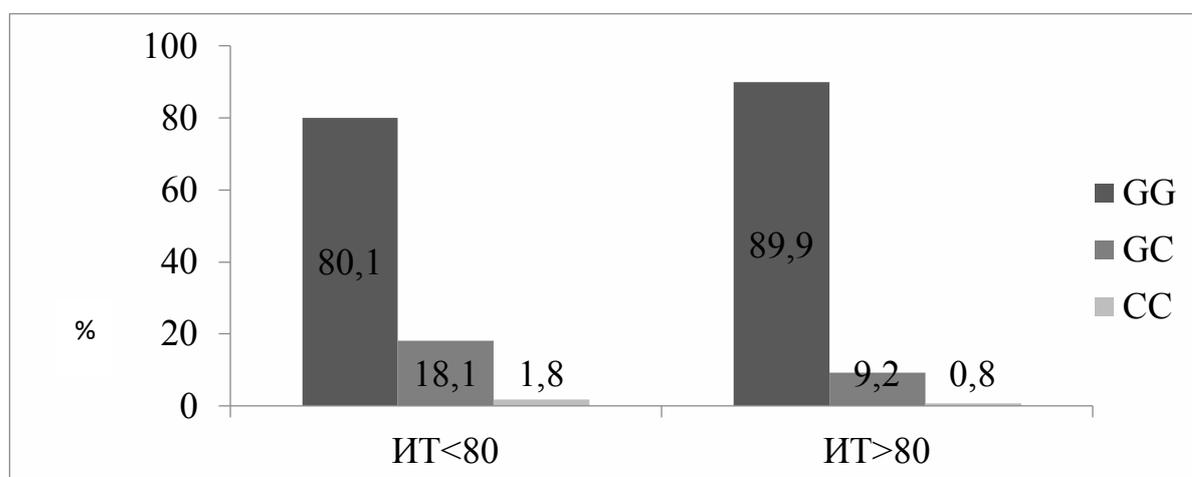


Рисунок 17 – Ассоциация rs11562975 с постбронходилатационным ИТ <80% (доминантная и аддитивная модели)

Полученные ассоциации полиморфизма с исходным ИТ<70% и постбронходилатационным ИТ<80% оставались значимыми после проведения коррекции на влияние пола, возраста, индекса массы тела, длительности заболевания, возраста начала заболевания и индекса курильщика с помощью логистической регрессионной модели. Значимость ассоциации генотипов GC+CC с ИТ<70% составила 0,004, а с ИТ<80% - 0,03. Также эффект полиморфизма на функцию легких не зависел от наличия холодовой гиперреактивности дыхательных путей, но была найдена связь с пре- и постбронходилатационным ИТ ($p=0,009$ и $p=0,04$; соответственно).

Таким образом, полиморфизм rs11562975 влияет на легочную функцию и оказывает независимый эффект на ИТ. Носительство С аллеля ассоциировано с более выраженной бронхиальной обструкцией. То, что полиморфизм оказался ассоциирован со сниженными значениями ИТ на фоне применения бронхолитика свидетельствует о том, что *TRPM8* вовлечен в формирование необратимого компонента бронхиальной обструкции.

Возможно, это может быть связано с участием *TRPM8* в процессах ремоделирования дыхательных путей. На мышинной модели БА, нокдаун *TRPM8* сопровождался снижением воспалительно-клеточной инфильтрации дыхательных путей, а также существенным уменьшением продукции IgE, цитокинов IL-4, IL-5, и матриксных металлопротеаз MMP-2 и MMP-9 [140]. Вероятно, это было обусловлено ингибированием сигнальных путей с участием MAPK и NFκB. Нарушение экспрессии *TRPM8* ослабляло секрецию вышеперечисленных медиаторов на фоне действия холода до уровня, который был ниже, чем у сенсibilизированных мышей, не подвергавшихся воздействию каких-либо факторов. Нокдаун *TRPM8* не только блокировал холод-индуцированный воспалительный ответ, но также влиял на начальный уровень воспаления. Данное исследование согласуется с полученными данными и позволяет выдвинуть гипотезу о наличии *TRPM8*-зависимого элемента патогенеза БА, не связанного с воздействием холода или сигаретного дыма – известными стимулами, активирующими *TRPM8*.

Причина увеличения экспрессии *TRPM8* при БА до сих пор остается неизвестной, как и возможные эндогенные факторы, активирующие канал в отсутствие

известных триггеров. Также остаются неизученными механизмы регуляции и функции *TRPM8*, это объясняется чрезвычайной мультимодальностью условий активации и производимых эффектов.

Принимая во внимание полученные результаты, дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление возможных причин повышенной экспрессии *TRPM8* при БА, а также поиск эндогенных факторов, активирующих канал при данном заболевании в отсутствие внешних стимулов. *TRPM8* может представлять собой новую мишень для фармакотерапии хронических обструктивных заболеваний легких.

4.2. Влияние полиморфизма с.750G> C (rs11562975) гена холодового рецептора TRPM8 и курения на формирование тяжелой бронхиальной обструкции

Оценивая влияние полиморфизма с.750G> C (rs11562975) гена холодового рецептора TRPM8 и курения на формирование тяжелой бронхиальной обструкции исследование было продолжено и для решения поставленных задач было проведено генетическое обследование 416 больных различной степенью тяжести БА. В исследовании приняли участие 3,8% больных БА, которым был установлен диагноз легкой интермиттирующей БА, 28,4% больных – легкой персистирующей формой БА, 47,1% со средней степенью тяжести и 20,7% - тяжелой формой БА (Таблица 33).

Таблица 33 – Клинический диагноз исследуемой группы пациентов

Диагноз	n (%)
Легкая интермиттирующая БА	16(3,8%)
Легкая персистирующая БА	118(28,4%)
БА средней степени тяжести	196(47,1)
Ба тяжелой степени тяжести	86(20,7)

Примечание: n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Согласно возрастной периодизации ВОЗ, лица, проходящие обследование, были трудоспособного возраста. Средний возраст пациентов составил $37,5 \pm 0,72$ лет. Из обследованных 41% составили мужчины, 59% - женщины ($\chi^2 = 27,04$, $p < 0,001$) (Таблица 34).

Таблица 34 – Характеристика обследованных пациентов по полу и возрасту

Критерий		n (%)
Средний возраст, лет (M±m)		$37,5 \pm 0,72$
Пол	Мужской	170 (41%)
	Женский	246 (59%)

Статус курения оценивался согласно рекомендациям, принятым ВОЗ в 2011 по борьбе против курения [83].

Согласно собранному анамнезу (Таблица 35) курили 141 (34%) больной БА. 82 человека (58%) являлись бывшими курильщиками, а 59 (42 %) являлись активными курильщиками. Среди пациентов, имевших опыт курения, 87(61%) больных имели стаж курения ≥ 10 пачка/лет, а 54 (39%) пациентов ≥ 20 пачка/лет.

Таблица 35 – Анамнез курения у обследованных пациентов

Курение		Количество n (%)
В настоящее время		141 (34%)
В прошлом		82 (19%)
Не имели опыт курения		275 (66%)
Стаж курения	10 п/лет и более	87 (61%)
	20 п/лет и более	54 (39%)

Примечание: n – количество больных; % - процентное отношение к общему числу больных в группе.

Влияние курения на снижение функции легких было значимо во всех моделях статистики. Так, средние показатели вентиляционной функции легких среди куривших более 10 пачка/лет, были гораздо ниже, чем у пациентов, куривших менее 10 пачка/лет или не куривших совсем ($p < 0,001$). Например, у больных в категории ≥ 10 пачка/лет фиксировались наиболее низкие значения показателя ОФВ₁ ($67,6 \pm 2,58\%$, $p < 0,001$), в то время как значения ОФВ₁ у пациентов со стажем менее 10 пачка/лет и теми, кто никогда не курил, практически не отличались ($88,8 \pm 3,35\%$ и $85,3 \pm 1,44\%$, $p > 0,05$). Аналогично, стаж курения менее 10 пачка/лет не оказывал

влияния на другие показатели функции легких. Проведя корреляционный анализ среди куривших больных БА была получена достоверная обратная зависимость между высоким стажем курения и низкими показателями функции внешнего дыхания (ОФВ₁: R=-0,44, p <0,001; ФЖЕЛ: R=-0,30, p=0,002; ИТ: R=-0,39, p<0,001).

Кроме этого, фактор длительного курения был связан с тяжестью заболевания - процент лиц, со стажем 10 пачка/лет и более был существенно выше у больных со средней и тяжелой формой БА. Курильщиков со стажем курения более 10 пачка/лет среди больных БА легкой степени тяжести было существенно ниже и составляло 13,2% больных при интермиттирующей и 7,4% - при легкой персистирующей БА (p<0,001).

Частоты генотипов для исследуемого полиморфизма гена *TRPM8* находились в равновесии Харди-Вайнберга и соответствовали данным литературы для европейского населения (Таблица 36).

Таблица 36 – Частота встречаемости генотипов в группе больных БА

Генотип	Количество, (%)
GG	83,1%
GC	15,4%
CC	1,5%

При оценке функции внешнего дыхания в среднем по группам значимых различий не было обнаружено, хотя имелись тенденции к снижению показателей у CC генотипа. Это было связано с редкой встречаемостью гомозиготного CC генотипа. Несмотря на отсутствие достоверных различий, спирометрические показатели у CC гомозигот и гетерозигот были ниже, чем у гомозигот GG (Рисунок 18).

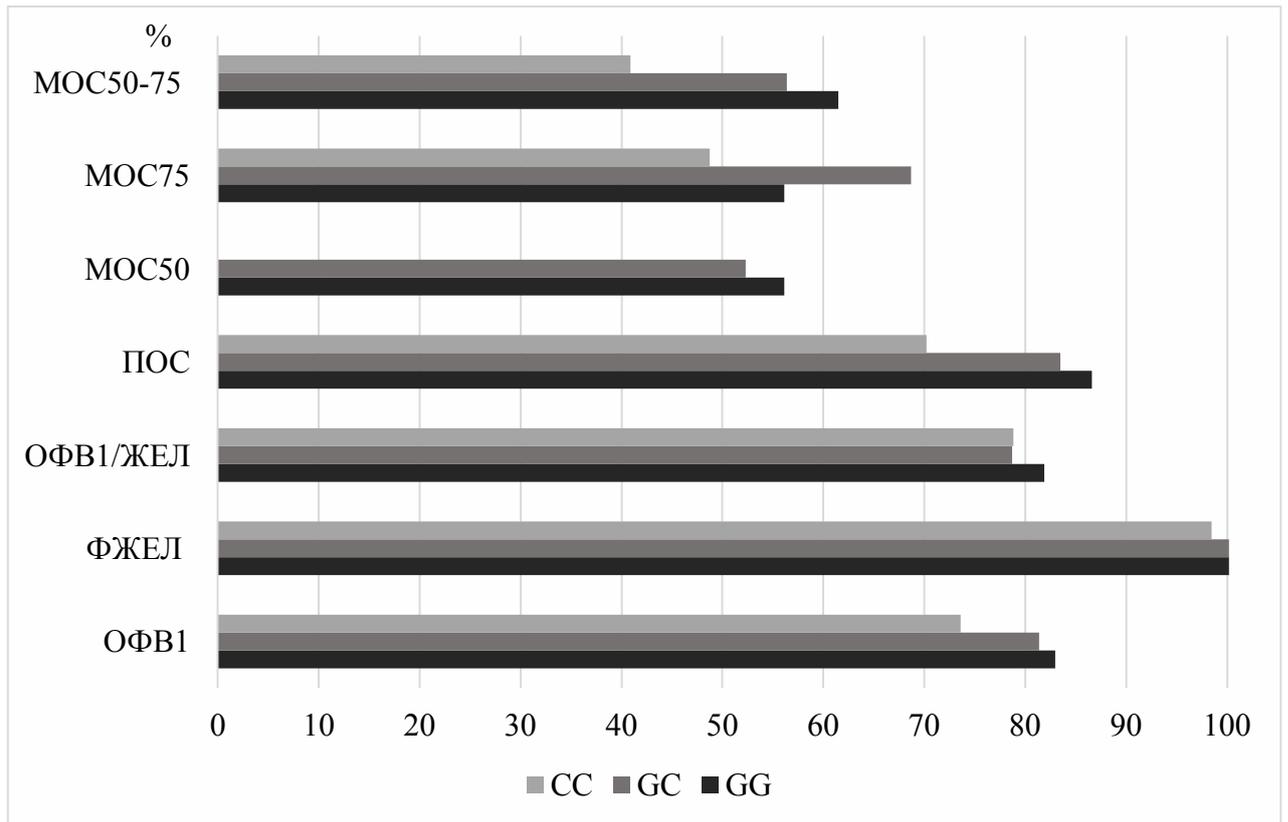


Рисунок 18 – Показатели функции внешнего дыхания у больных БА, носителей разных генотипов по полиморфизму rs11562975

Описанная ранее корреляционная взаимосвязь между стажем курения и показателями функции внешнего дыхания была менее выражена у носителей GG генотипа, чем у общей группы ($R=-36,0$, $p<0,001$). Но в случае носительства гетерозиготного генотипа ее сила заметно росла ($R=-66,0$, $p<0,001$). У больных БА с анамнезом курения 10 п/лет и более, GC генотип был ассоциирован с сниженными значениями показателей спирометрии, по сравнению с GG генотипом. У не куривших пациентов или со стажем курения менее 10 п/лет, влияния генотипа на показатели спирометрии также не было.

У 42% курильщиков со стажем курения более 10 п/лет с GG генотипом сформировалась тяжелая бронхиальная обструкция, у носителей GC генотипа – 58%. При этом относительный риск развития тяжелой бронхиальной обструкции при стаже курения более 10 п/лет у носителей GG генотипа по полиморфизму

rs11562975 составлял 2,6 95% доверительного интервала (1,61-4,2) ($p < 0,001$), в случае GC генотипа относительный риск был в 1,8 раза выше - 4,7 95% доверительного интервала (1,76-12,52), $p = 0,002$ (Рисунок 19).

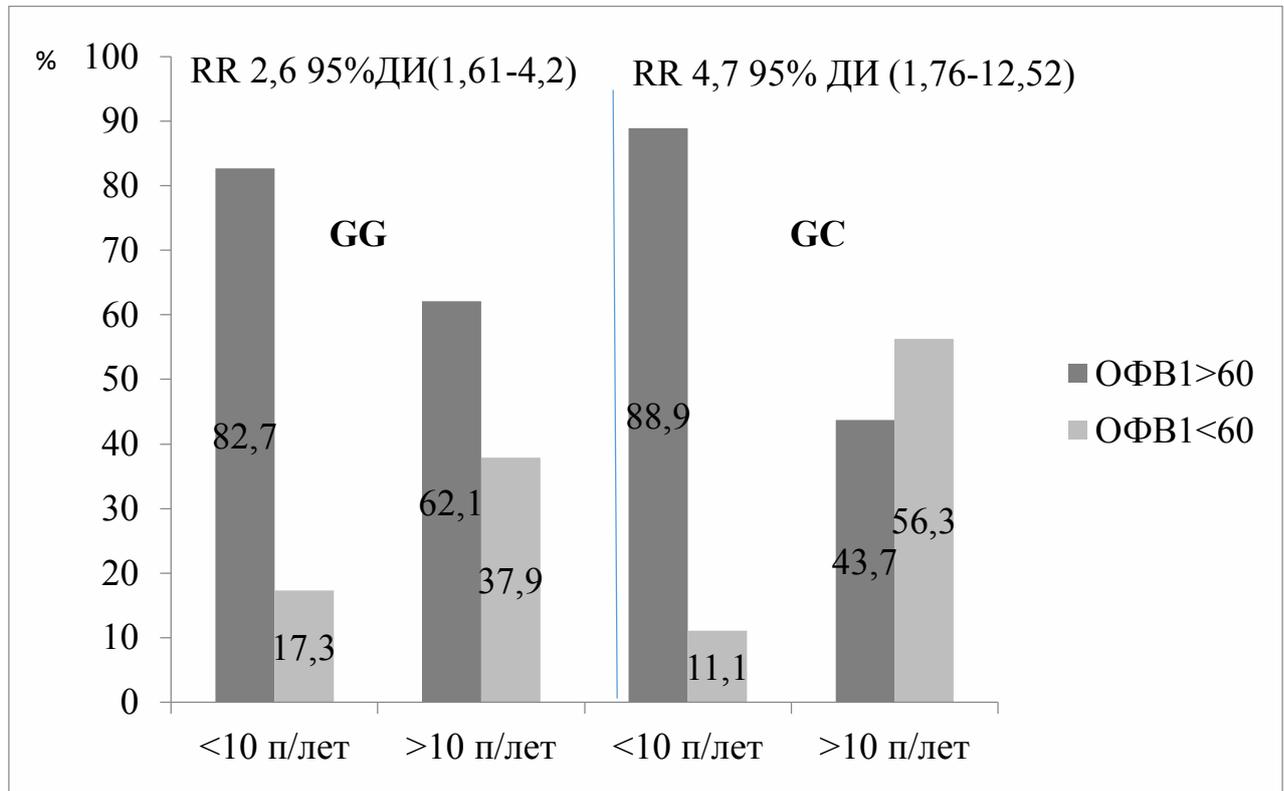


Рисунок 19 – Риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции у курящих пациентов 10 пачка/ лет и более

Ещё более выраженный эффект GC генотип оказывал на злостных курильщиков, при этом относительный риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции составлял 1,8 95% доверительного интервала (1,02-3,13) $p = 0,04$, по сравнению с гомозиготным генотипом (Рисунок 20).

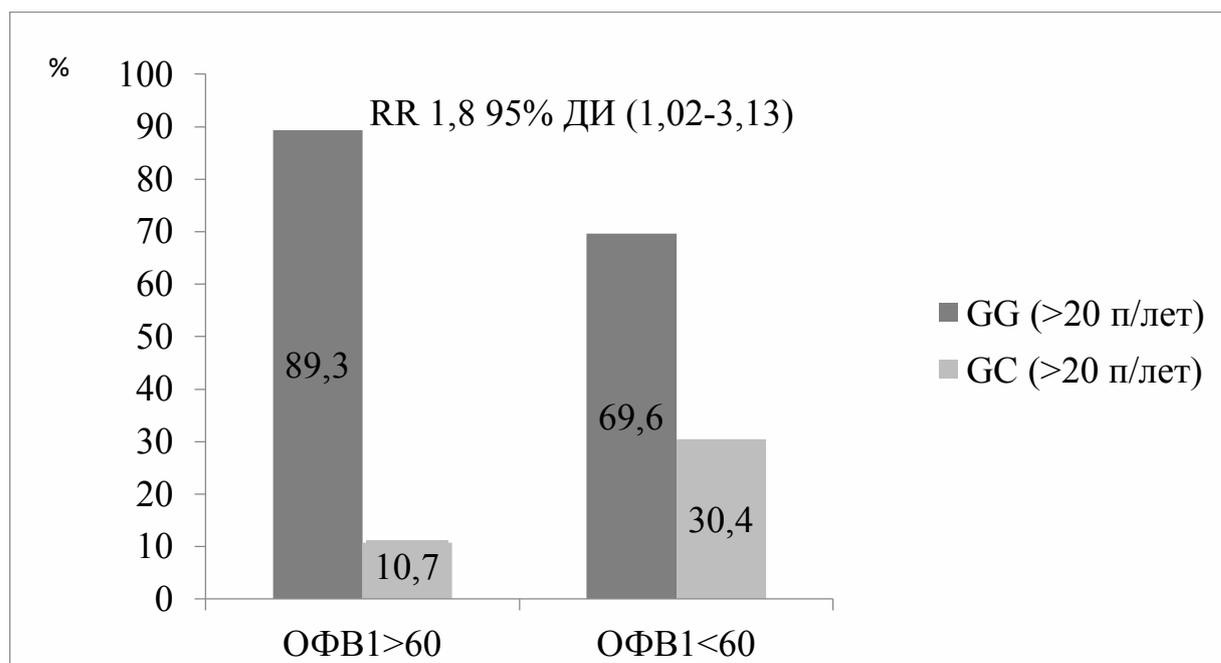


Рисунок 20 –Риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции у курящих пациентов более 20 пачка/ лет

На основании изученных современных литературных источников можно сформулировать две версии данного феномена. В недавнем исследовании, проведенном на мышиной модели, было показано что под влиянием сигаретного дыма экспрессия *TRPM8* в дыхательных путях увеличивается [151]. Исходя из этого, можно предположить, что регуляция *TRPM8* при воздействии сигаретного дыма у гетерозигот (GC), является дополнительным фактором, увеличивающим чувствительность дыхательных путей к воздействию холода [203].

По другой версии, в большинстве сигарет содержится один из известных агонистов *TRPM8* – ментол, и его содержание является достаточным, чтобы активировать *TRPM8* [66]. Пары ментола также усугубляют воспаление в бронхах [137].

Показано, что и действие ментола, и эффекты активных форм кислорода реализуются именно через *TRPM8* [137]. Кроме чувствительности к холоду носительство GC генотипа является причиной более выраженного ответа на ментол или на возникающий оксидативный стресс [137].

Данное предположение возможно не согласуется с ранее проведёнными исследованиями, в которых гетерозиготный генотип ассоциировался с большей чувствительностью *TRPM8* к воздействию холода, а не с ментолом [178]. При этом в данной работе эффект ментола на чувствительность к *TRPM8* оценивался косвенно, через ментол-опосредованную десенсibilизацию [178]. Носители гетерозиготного генотипа GC гораздо медленнее реагировали на ментол, и в результате эффект его действия у них был более выраженным, чем у носителей гетерозиготного GG генотипа [178].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фенотипирование ТБА является важнейшим правилом для постановки диагноза, понимания патофизиологических механизмов данного заболевания, подбора адекватной терапии.

Холодовая гиперреактивность дыхательных путей – важный фактор, оказывающий значимое влияние на течение заболевания в неблагоприятных климатических условиях - при воздействии низкой температуры атмосферного воздуха на дыхательные пути. Описание фенотипа ТБА с присоединением ХГДП позволит использовать терапевтические подходы, имеющие более высокую эффективность у данной категории лиц, по сравнению с больными ТБА, для которых ХГДП не характерна.

В данной работе был впервые описан тип воспаления у больных ТБА с ХГДП. Установлено, что особенности клинической картины, функция внешнего дыхания и частота развития бронхоспазма на холодовой триггер у больных ТБА ассоциирована с персистенцией воспаления, клеточный паттерн которого характеризуется динамическим соотношением структуры и функции эозинофилов и нейтрофилов. У больных с ХГДП это смешанный паттерн бронхиального воспаления с увеличением нейтрофильных лейкоцитов и высокими параметрами окислительной ферментативной активности, а также степени деструкции и интенсивности цитолиза клеток.

Также в ходе исследования было установлено, что паттерн бронхиального воспаления у больных ТБА с неконтролируемым течением ассоциирован со степенью деструкции эпителия слизистой оболочки бронхов и степенью деструкции нейтрофильных гранулоцитов. Наиболее выраженная деструкция эпителия наблюдается у больных ТБА со смешанным паттерном воспаления. Деструкция эпителия

слизистой оболочки бронхов негативно влияет на клиническую картину БА, достижение контроля и формирование ХГДП. Степень деструкции эпителия и гранулоцитов обладает диагностической значимостью для оценки тяжести заболевания, клинических проявлений, реакции ХГДП у больных тяжелой неконтролируемой БА.

С учетом паттерна бронхиального воспаления в результате длительного наблюдения было выявлено, что использование тиотропия бромида в сочетании с базисной комбинированной терапией ИГКС/ДДБА у больных тяжелой неконтролируемой БА с ХГДП со смешанным паттерном воспаления, оказывает положительный эффект, который заключается в структурной реорганизации воспалительного профиля, преобразовании нейтрофильного сегмента воспаления в эозинофильный вариант.

В результате генетического исследования было установлено влияние полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8* на функцию лёгких с независимым предиктором обструкции - ИТ, как одним из основных определяющих ее показателей, у больных БА. Носительство аллеля С в гетерозиготном или гомозиготном состоянии ассоциировано с более выраженной бронхиальной обструкцией. Полиморфизм оказался ассоциирован со сниженными значениями ИТ на фоне бронхолитика и это может судить о том, что *TRPM8* каким-либо образом вовлечен в формирование необратимого компонента бронхиальной обструкции. Вероятно, это может быть связано с участием рецептора в процессах ремоделирования дыхательных путей. Данный факт подтверждает наличие *TRPM8*-зависимого элемента патогенеза БА, не связанного с холодовым воздействием или эффектом сигаретного дыма – известными стимулами, активирующими *TRPM8*.

В данной работе также впервые показано возможное действие полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8* как фактора, модулирующего эффект сигаретного дыма на дыхательную систему. У носителей гетерозиготного генотипа GC и, возможно гомозиготного генотипа CC, при злостном либо продолжительном курении может прогрессировать снижение функции легких и будет формироваться более выраженная бронхиальная обструкция, по сравнению с гомозиготами GG.

Дальнейшие генетические исследования должны быть направлены на выявление возможных причин повышенной экспрессии *TRPM8* при ТБА, а также поиск эндогенных факторов, активирующих канал при данном заболевании в отсутствие внешних стимулов. Также будет продолжен дальнейший поиск ОНП гена *TRPM8* связанных с предрасположенностью к формированию тяжелой бронхиальной астмы.

ВЫВОДЫ

1. Для больных тяжелой бронхиальной астмой низкий уровень контроля над заболеванием связан с наличием холодовой гиперреактивности дыхательных путей, смешанным паттерном бронхиального воспаления.
2. Смешанный паттерн воспаления у больных тяжелой бронхиальной астмой и неконтролируемым течением болезни ассоциирован с увеличением степени деструкции нейтрофильных гранулоцитов и эпителия слизистой оболочки бронхов.
3. Для больных тяжелой БА с ХГДП и смешанным типом воспаления наиболее предпочтительна комбинация комбинированного препарата ИГКС/ДДБА в сочетании с длительно действующим антихолинергическим препаратом.
4. Однонуклеотидный полиморфизм rs11562975 гена холодового рецептора TRPM8 у больных бронхиальной астмой различной степени тяжести ассоциирован с появлением необратимой бронхиальной обструкции.
5. Злоупотребление курением у больных бронхиальной астмой носителей аллеля С в генотипе по ОНП rs11562975 гена TRPM8 связано с риском развития тяжелых обструктивных нарушений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Варианты воспалительных паттернов бронхов могут быть использованы в клинической практике для подбора оптимальных противовоспалительных режимов комбинированной терапии. У больных ТБА с ХГДП и смешанным типом воспаления наиболее предпочтительна терапия комбинированным ИГКС/ДДБА в сочетании с длительно действующим антихолинергическим препаратом.
2. Больным бронхиальной астмой и холодовой гиперреактивностью дыхательных путей рекомендовано проведение генетического исследования с изучением ОНП rs11562975 гена холодового рецептора TRPM8 с целью выявления лиц подверженных формированию бронхиальной обструкции.
3. Все больные бронхиальной астмой - носители аллеля С в генотипе, злоупотребляющие курением, нуждаются в проведении антисмокинговых программ для профилактики возникновения тяжелых форм заболевания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеев, С.Н. Хроническая дыхательная недостаточность / С.Н. Авдеев // Cons. Med. – 2004. – № 4. – С. 16-32.
2. Активность миелопероксидазы нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой с холодовой бронхиальной гиперреактивностью / А.Б. Пирогов, С.В. Зиновьев, Ю.М. Перельман [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 53. – Р. 50-56.
3. Алгоритм биофенотипирования и выбор таргетной терапии тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмы с эозинофильным типом воспаления дыхательных путей / Н.И. Ильина, Н.М. Ненашева, С.Н. Авдеев [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2017. – № 14. – С. 5-18.
4. 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.
5. Базисная терапия тяжелой бронхиальной астмы у взрослых. Данные национального исследования НАБАТ / А.Г. Чучалин, Л.М. Огородова, Ф.И. Петровский [и др.] // Пульмонология. 2004, 6: 68-77.
6. Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика / А.Г. Чучалин, В.В. Архипов, Н.Г. Астафьева // Национальная программа. Москва. ОАО «Первая Образцовая типография». – 2012. – 109с.
7. Бронхиальная астма: от Гиппократов до наших дней / О.М. Урясьев, Л.В. Коршунова, С.А. Куликов [и др.] // Земский врач. – 2017. – № 1. – С. 17-20.
8. В поисках истины: что такое бронхиальная астма? / Г.Б. Федосеев, В.И. Трофимов, Н.Л. Шапорова // Пульмонология. – 2015. – № 25. – С. 5-18.

9. В поисках истины: что такое бронхиальная астма? / Г.Б. Федосеев, В.И. Трофимов, Н.Л. Шапорова [и др.] // Пульмонология. – 2015. – № 1. – С.5-18.
10. Возможности применения антилейкотриенового препарата монтелукаста в комплексной терапии больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью бронхов / В.П. Колосов, А.Б. Пирогов, Ю.М. Перельман [и др.] // Клиническая медицина. – 2015. – № 9. – С.30-35.
11. Возможность достижения и поддержания контроля над бронхиальной астмой у больных с холодовой гиперреактивностью бронхов / В.П. Колосов, А.Б. Пирогов, Ю.М. Перельман [и др.] // Терапевтический архив. – 2014. – № 3. – С.40-44.
12. Воронина, Л.Б. Метаболические и структурно-функциональные свойства лейкоцитов при бронхиальной астме у детей, сравнительная эффективность различных вариантов базисной терапии в коррекции выявленных отклонений / Л.Б. Воронина // Автореферат диссертации кандидата медицинских наук. – Иваново. – 2007. – С.21.
13. Воспалительно-клеточный состав индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой с разными типами реакции дыхательных путей на гиперосмолярный стимул / А.Б. Пирогов, А.Г. Приходько, Ю.М. Перельман [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – № 59. – С.8-15.
14. Генетический полиморфизм термочувствительных катионных каналов TRPM8 как фактор предрасположенности к холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких / Д. Е. Наумов, Ю. М. Перельман, В. П. Колосов [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2012. – № 45. – С. 8-14.
15. Динамика воспалительно-клеточного профиля индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей при базисной противовоспалительной терапии / А.Б. Пирогов, А.Г. Приходько, Перельман Ю.М. [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – № 60. – С. 15-22.

16. Емельянов, А.В. Тяжелая бронхиальная астма / А.В. Емельянов // Астма и аллергия. – 2013. – № 3. – С.16-18.
17. Ильина, Н.И. Бронхиальная астма: современные возможности контроля. / Н.И. Ильина // Эффективная фармакотерапия. – 2014. – № 33. – С. 28-29.
18. Клеточный профиль индуцированной мокроты, уровень миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы крови у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул / А.Б. Пирогов, А.Г. Приходько, Ю.М. Перельман [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2015. – № 57. – С.8-14.
19. Клинические фенотипы бронхиальной астмы у подростков: трудности диагностики и терапии / Астафьева Н.Г., Гамова И.В., Удовиченко Е.Н. [и др.] // Лечащий врач. – 2015. – № 4. – С. 12-16.
20. Колбин, А.С. Фармакоэкономический анализ лечения больных тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой в России / А.С. Колбин, М.Ю. Фролов, Т.Л. Галанкин // Практическая пульмонология. – 2015. – № 4. – С.10-17.
21. Конищева, А.Ю. Особенности структуры и функции респираторного эпителия при бронхиальной астме / А.Ю. Конищева, В.Б. Гервазиева, Е.Е. Лаврентьева // Пульмонология. – 2012. – № 5. – С. 85-91.
22. Краснова, Ю.Н. Влияние табачного дыма на органы дыхания / Ю.Н. Краснова // Сиб. Мед. журн. – 2015. – № 6. – Р. 11-16.
23. Куликов, А.Ю. Фармакоэкономические аспекты эффективного лечения бронхиальной астмы при использовании устройства Изихейлер / А.Ю. Куликов, Е.И. Макарова, А.С. Белевский // Практическая пульмонология. – 2015. – № 2. – С. 67-72.
24. Куличенко, Т.В. Омализумаб у детей с бронхиальной астмой: показания к применению / Т.В. Куличенко // Педиатрическая фармакология. – 2007. – № 4. – С.51-55.
25. Курбачева, О.М. Фенотипы и эндотипы бронхиальной астмы: от патогенеза и клинической картины к выбору терапии / О.М. Курбачева, К.С. Павлова // Российский аллергологический журнал. – 2013. – № 1. – С. 15-24.

26. Курение: механизмы патологического воздействия и эффекты отказа (обзор) / О.С. Кобякова, И.А. Деев, Е.С. Куликов [и др.] // Социальные аспекты здоровья населения. – 2015. – № 1. – Р. 15.
27. Луценко, М.Т. Действие жестких климатических условий Северо-Востока России на состояние бронхиальных путей жителей Чукотки / М.Т. Луценко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2017. – № 63. – Р. 53–60.
28. Луценко, М.Т. Морфофункциональная характеристика слизистой оболочки бронхов при бронхиальной астме / М.Т. Луценко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 53. – Р. 57-62.
29. Матвеева, Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей / Л.А. Матвеева // Томск: Издательство Томского университета. – 1993. – 276 с.
30. Морфологические маркеры ремоделирования слизистой оболочки бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко [и др.] // Пульмонология. – 2009. – № 4. – С. 64-68.
31. Наумов, Д.Е. Термочувствительные ионные каналы *trpm8* (обзор литературы) / Д.Е. Наумов // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – № 42. – С. 89-96.
32. Ненашева, Н.М. Курение и бронхиальная астма / Н.М. Ненашева // Астма и аллергия. – 2013. – № 1. – Р. 28-36.
33. Ненашева, Н.М. Новые возможности достижения контроля астмы с помощью тиотропия бромида / Н.М. Ненашева // Эффективная фармакотерапия. – 2014. – № 29. – С. 4-13.
34. Ненашева, Н.М. Омализумаб в терапии тяжелой бронхиальной астмы / Н.М. Ненашева // Эффективная фармакотерапия. – 2014. – № 29. – С. 24-35.
35. Ненашева, Н.М. Фенотипы бронхиальной астмы и выбор терапии / Н.М. Ненашева // Практическая пульмонология. – 2014. – № 2. – С. 2-10.
36. Ненашева, Н.М. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и терапии бронхиальной астмы 2016: что нового? / Н.М. Ненашева // Практическая пульмонология. – 2016. – № 3. – С. 3-10.

37. Ненашева Н.М, Биологическая терапия бронхиальной астмы: настоящее и будущее / Н.М. Ненашева // *Consilium medicum*. – 2016. – № 18. – С. 30-38.
38. Особенности бронхиального воспаления у больных астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и осмотические триггеры / А.Б. Пирогов, А.Г. Приходько, С.В. Зиновьев [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2017. – № 2. – С. 159-169.
39. Особенности воспалительных паттернов бронхов, и клинико-функциональная характеристика тяжелой неконтролируемой астмы у больных с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей / А.Б. Пирогов, В.П. Колосов, Ю.М. Перельман [и др.] // *Пульмонология*. – 2016. – № 6. – С.701-707.
40. Перельман, Н.Л. Сезонные особенности качества жизни у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей / Н.Л. Перельман // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. – 2009. – № 31. – С. 29-33.
41. Перельман, Ю.М. Спирографическая диагностика нарушений вентиляционной функции лёгких: пособие для врачей / Ю.М. Перельман, А.Г. Приходько // *Пособие для врачей*. Благовещенск, – 2013. – 44с.
42. Перельман, Ю.М. Механизмы и проявления осмотической гиперреактивности дыхательных путей / Ю.М. Перельман, Д.Е. Наумов, В.П. Колосов // *Монография*. Владивосток. Дальнаука. – 2016. – 240 с.
43. Приходько, А.Г. Гиперреактивность дыхательных путей / А.Г. Приходько, Ю.М. Перельман, В.П. Колосов // *Монография*. Владивосток. Дальнаука. – 2011.– 204с.
44. Распространенность, заболеваемость, фенотипы и другие характеристики тяжелой бронхиальной астмы в Российской Федерации / С.Н., Авдеев, Н.М. Ненашева, К.В. Жуденков, В.А. Петраковская, Г.В. Изюмова // *Пульмонология*. – 2018. – № 3. – С. 341-358.

45. Реакция респираторной системы на локальное охлаждение у людей с однонуклеотидным полиморфизмом rs11562975 гена термочувствительного ионного канала TRPM8 / Т.В. Козырева, Е.Я. Ткаченко, Т.А. Потапова [и др.] // Физиология человека. – 2014. – № 40. – С. 94-98.
46. Роль оксидативного стресса в реакции дыхательных путей на гипоосмолярный стимул у больных бронхиальной астмой / Ю. М. Перельман, А. Г. Приходько, Е. А. Бородин [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 54. – С. 17-22.
47. Роль полиморфизмов гена TRPM8 в формировании фенотипа бронхиальной астмы с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей / Наумов Д.Е., Котова О.О., Гассан Д.А. [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2017. – № 65. – Р. 16-23.
48. Связь однонуклеотидного полиморфизма rs11562975 гена термочувствительного ионного канала TRPM8 с чувствительностью человека к холоду и ментолу / Т.В. Козырева, Е.Я. Ткаченко, Т.А. Потапова [и др.] // Физиология человека. – 2011. – № 37. – С. 71-76.
49. Социально-экономическое бремя бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких в Российской Федерации / М.В. Авксентьева, Н.И. Ильина, Н. Б. Лазарева [и др.] // Отчет по исследованию за 2008-2009 годы. Москва. Региональный благотворительный общественный фонд содействия деятельности в сфере пропаганды здорового образа жизни «Качество жизни». – 2010.– 63с.
50. Тяжелая бронхиальная астма: характеристика пациентов в клинической практике / Г. Р. Сергеева, А. В. Емельянов, О. В. Коровина [и др.] // Терапевтический архив. – 2015. – № 12. – С. 26-31.
51. Федеральные клинические рекомендации по бронхиальной астме 2018. [Электронный ресурс] / МОО Российское респираторное общество, Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических иммунологов // Доступно на: <http://spulmo.ru/obrazovatelnye-resursy/federalnye-klinicheskie-rekomendatsii/>.
Дата обращения 21.04.2019

52. Федосеев, Г. Б. Многоликая бронхиальная астма, диагностика, лечение и профилактика / Г. Б. Федосеев, В.И. Трофимов, М. А. Петрова // Санкт-Петербург. Нордмедиздат. – 2011. – 343 с.
53. Фенотипическая гетерогенность тяжелой бронхиальной астмы и анализ ее лечения в Курской области / С.А. Прибылов, Н.Н. Прибылова, О.Ю. Махова [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2016. – № 3. – С. 33-38.
54. Фенотипические особенности воспаления бронхов у больных бронхиальной астмой с различными типами реакции дыхательных путей на гипоосмолярный и холодовой стимулы / А.Б. Пирогов, А.Г. Приходько, Ю.М. Перельман [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2015. – № 58. – С. 8–14.
55. Фенотипические различия и особенности воспаления у больных бронхиальной астмой с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на холодный воздух и дистиллированную воду / А.Г. Приходько, Ю.М. Перельман, А.Б. Пирогов [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 54. – С. 8–16.
56. Харитонс, М.А. Современные представления о лечении бронхиальной астмы // М.А. Харитонс, К.А. Рамазанова // Терра Медика Нова. – 2001. – № 1. Доступно на: <https://medi.ru/info/6513>. Дата обращения 23.02.18
57. Хейхоу, Ф.Г. Гематологическая цитохимия: Пер. с англ. / Ф.Г. Хейхоу – Москва: Медицина. – 1983. – 319 с.
58. Цитоморфологический анализ ремоделирования бронхиальной стенки при различных типах бронхиальной астмы / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко [и др.] // Клиническая медицина. – 2012. – № 2. – С.24-27.
59. Шапорова, Н.Л. Бронхиальная астма тяжелого течения / Н.Л. Шапорова, В. И. Трофимов, В. Н. Марченко // Практическая пульмонология. – 2013. – № 4. – С. 3-7.

60. Шилов, В.В. Влияние условий труда и курения на функцию внешнего дыхания работников никелевой промышленности / В.В. Шилов, С.А. Сюрин // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – № 4. – P. 20-22.
61. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma / P. Lange, J. Parner, J. Vestbo [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1998. – № 339. – P.1194–1200.
62. A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma / N. Hizawa, E. Yamaguchi, S. Konno [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2002. – № 166. – P.686–690.
63. A proof of concept study to evaluate stepping down the dose of fluticasone in combination with salmeterol and tiotropium in severe persistent asthma / T. Fardon, K. Haggart, D.K. Lee [et al.] // Respir. Med. – 2007. – № 6. – P.1218-1228.
64. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol / A.M. Peier, A. Moqrich, A.C. Hergarden [et al.] // Cell. – 2002. – № 5. – P. 705-715.
65. Abe, K. Role of TRP channels in the regulation of the endosomal pathway / K. Abe, R. Puertollano // Physiology (Bethesda). – 2011. – № 26. – P.14–22.
66. Activation of the cold-receptor TRPM8 by low levels of menthol in tobacco products / M. Paschke, A. Tkachenko, K. Ackermann [et al.] // Toxicol. Lett. – 2017. – № 271. – P. 50-57.
67. An official American Thoracic Society / European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice / H.K. Reddel, D.R. Taylor, E.D. Bateman [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2009. – № 1. – P. 59–99.
68. Anderson, G.P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease / G.P. Anderson // Lancet. – 2008. – № 372. – P. 1107-1019.
69. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons is activated by cold temperatures / G.M. Story, A.M. Peier, A.J. Reeve [et al.] // Cell. – 2003. – № 112. – P. 819–829.

70. Association of HLA-DRB1 gene polymorphism with risk of asthma: A meta-analysis / Y. Yao, L. Zhu, J. Li [et al.] // *Med. Sci. Monit. Basic Res.* – 2016. – № 22. – P. 80–86.
71. Association of single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes with asthma risk: A systematic review and meta-analysis / K. Tizaoui, W. Kaabachi, K. Hamzaoui [et al.] // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2015. – № 7. – P. 130–140.
72. Association of the glucocorticoid receptor D641V variant with steroid-resistant asthma: A case-control study / F. Zhao, G. Zhou, H. Ouyang [et al.] // *Pharmacogenet. Genom.* – 2015. – № 25. – P.289–295.
73. Asthma / A. Papi, C. Brightling, S.E. Pedersen [et al.] // *Lancet.* – 2018. – № 391. – P. 783–800.
74. Asthma and allergic rhinitis increase respiratory symptoms in cold weather among young adults / H. Hyrkäs, M.S. Jaakkola, T.M. Ikäheimo [et al.] // *Respir. Med.* – 2014. – № 108. – P.63–70.
75. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: Common genes, common environments? / D.S. Postma, M. Kerkhof, H.M. Boezen [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – № 183. – P.1588–1594.
76. Asthma control and cold weather-related respiratory symptoms / H. Hyrkäs, T.M. Ikäheimo, J.J. Jaakkola [et al.] // *Respir Med.* – 2016. – № 113. – P. 1-7.
77. Asthma control in Australia: a cross-sectional web-based survey in a nationally representative population / H.K. Reddel, S.M. Sawyer, P.W. Everett [et al.] // *Med. J. Aust.* – 2015. – № 202. – P. 492-497.
78. Asthma control in severe asthmatics under treatment with omalizumab: A cross-sectional observational study in Italy / F. Novelli, M. Latorre, L. Vergura [et al.] // *Pulmon. Pharmacol. Ther.* – 2015. – № 31. – P. 123-129.
79. Banner, K.H. TRP channels: emerging targets for respiratory disease / K.H. Banner, F. Igney, C. Poll [et al.] // *Pharmacol Ther.* – 2011. – № 130. – P.371–384.
80. Baseline Features of the Severe Asthma Research Program (SARP III) Cohort: Differences with Age / W.G. Teague, B.R. Phillips, J.V. Fahy [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* – 2017. – № 6 – P. 545–554.e4.

81. Belvisi, M.G. The emerging role of transient receptor potential channels in chronic lung disease / M.G. Belvisi, M.A. Birrell // *Eur Respir J.* – 2017. – № 2. – e. 1601357.
82. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1 / Y. Karashima, N. Damann, J. Prenen [et al.] // *J. Neurosci.* – 2007. – № 27. – P. 9874-9884.
83. Bobolea, I.D. Current and future asthma treatments: phenotypical approach on the path to personalized medicine in asthma. In: Pereira C., ed. *Asthma. From CHILDHOOD ASTHMA to ACOS Phenotypes* / I.D. Bobolea, C. Melero, J. Jurado-Palomo // London: Intech Open. – 2016. – № 1. – P. 115-135.
84. Bochner, B.S. Novel Therapies for Eosinophilic Disorders // *Immunology and allergy clinics of North America.* – 2015. – № 35. – P. 577-598.
85. Bonvini, S.J. Cough and airway disease: The role of ion channels / S.J. Bonvini, M.G. Belvisi // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2017. – № 47. – P. 21-28.
86. Changes in airway hyperresponsiveness following smoking cessation: comparisons between Mch and AMP / G. Piccillo, P. Caponnetto, S. Barton [et al.] // *Respir Med.* – 2008. – № 2. – P. 256-265.
87. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation / A.G. Chuchalin, N. Khaltayev, N.S. Antonov [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2014. – № 9 – P. 963-974.
88. Chung, K.F. Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new-targeted therapies / K.F. Chung // *J. Intern. Med.* – 2016. – № 279. – P. 192-204.
89. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics / M. Althuis, M. Sexton, D. Prybylski [et al.] // *J. Asthma.* – 2009. – № 36. – P. 257-264.
90. Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma / R. Chaudhuri, E. Livingston, A. McMahon [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2003. – № 168. – P. 1308-1311.
91. Clapham, D.E. The TRP ion channel family / D.E. Clapham, L.W. Runnels, C. Strubing // *Nat Rev Neurosci.* – 2001. – № 2. – P. 387-396.

92. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors / D.E. Clapham // *Nature*. – 2003. – № 6966. – P.517-524.
93. Clinical Heterogeneity in the Severe Asthma Research Program / W.C. Moore, A.M. Fitzpatrick, X. Li [et al.] // *Ann. Am. Thoracic Society*. – 2013. – S. 10, P. 118-124.
94. Cluster Analysis and Clinical Asthma Phenotypes / P. Haldar, I. Pavord, D. Shaw [et al.] // *Am. J. Respir. Critical Care Med*. – 2008. – Vol. 178, № 3. – P. 218-224.
95. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism / M. Li, Q. Li, G. Yang [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011. – № 128. – P.626–634.
96. Cold-related respiratory symptoms in the general population / T. Harju, T. Mäkinen, S. Näyhä [et al.] // *Clin. Respir. J.* – 2010. – № 4. – P. 176–185.
97. Cold-sensing TRPM8 channel participates in circadian control of the brown adipose tissue / M.N. Moraes, L.V.M. de Assis, F.D.S. Henriques [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* – 2017. – № 1864. – P. 2415-2427.
98. Control of mild to moderate asthma over 1-year with the combination of salmeterol and fluticasone propionate / B. Lundbäck, E. Rönmark, A. Lindberg [et al.] // *Respir. Med.* – 2016. – № 1. – P.2-10.
99. Damann, N. TRPs in our senses / N. Damann, T. Voets, B. Nilius [et al.] // *Curr. Biol.* – 2008. – № 18. – P. 880-889.
100. Design and baseline characteristics of epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma / C.M. Dolan, K.E. Fraher, E.R. Bleecker [et al.] // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2004. – № 92 – P. 32-39.
101. Detrimental effects of environmental tobacco smoke in relation to asthma severity / S. Comhair, B. Gaston, K. Ricci [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – № 5. – e.18574.
102. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia / V. Chubanov, S.

- Waldegger, Y. Mederos [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – № 101. – P.2894–2899.
103. Does living in a cold climate or recreational skiing increase the risk for obstructive respiratory diseases or symptoms? / J.T. Kotaniemi, J. Latvala., B. Lundbäck [et al.] // Int. J. Circumpolar Health. – 2003. – № 62. – P. 142–157.
104. Early life factors contribute to the decrease in lung function between ages 18 and 40 / G. Apostol, Jr. Jacobs, A. Tsai [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2002. – № 166. – P.166–172.
105. Effects of meteorological factors on daily hospital admissions for asthma in adults: a time-series analysis / Y. Zhang, L. Peng, H. Kan // PLoS One. – 2014. – № 9. – e102475.
106. Effects of secondhand smoke exposure on asthma morbidity and health care utilization in children: a systematic review and meta-analysis / Z. Wang, S.M. May, S. Charoenlap [et al.] // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2015. – № 5. – P. 396-401.e2.
107. Efficacy of low and high dose inhaled corticosteroid in smokers versus non-smokers with mild asthma / J.E.M. Tomlinson, A. McMahon, R. Chaudhuri [et al.] // Thorax. – 2015. – № 60. – P. 282– 287.
108. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration / S. Baldus, J.P. Eiserich, A. Mani [et al.] J. Clin. Invest. – 2010. – № 12. – P.1759-1770.
109. Enhanced upregulation of smooth muscle related transcripts by TGFβ2 in asthmatic (myo) fibroblasts / J. Wicks, H.M. Haitchi, S.T. Holgate [et al.] // Thorax. – 2006. – № 4. – P.313-319.
110. Evans, W.E. Pharmacogenomics — drug disposition, drug targets, and side effects / W.E. Evans, H.L. McLeod // N. Engl. J. Med. – 2003. – № 6. – P.538-549.
111. Evolutionary and genetic features of drug targets / Y. Quan, Z.Y. Wang, X.Y. Chu [et al.] // Med. Res. Rev. – 2018. – № 38. – P. 1536-1549.

112. Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs / C. Nassenstein, K. Kwong, T. Taylor-Clark [et al.] // *J. Physiol.* – 2016. – № 586. – P. 1595–1604.
113. Expression of trpv channels during *Xenopus laevis* embryogenesis / C. Dong, S. Paudel., N.Y. Amoh // *Gene Expr. Patterns.* – 2018. – № 30. – P.64-70.
114. Extreme temperatures and lung function in the Framingham study / M.B. Rice, W. Li, E.H. Wilker // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2017. – P. 195.
115. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma / A. Brinke, A.H. Zwinderman, P.J. Sterk [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – № 5. – P. 744-748.
116. Fahy, J.V. Type 2 inflammation in asthma - present in most, absent in many / J.V. Fahy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – № 15. – P. 57-65.
117. FCER2: A pharmacogenetic basis for severe exacerbations in children with asthma / K.G. Tantisira, E.S. Silverman, T.J. Mariani [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – № 120. – P.1285–1291.
118. Fitzgerald, E.F. Cold spells and the risk of hospitalization for asthma: New York, USA 1991-2006 / E.F. Fitzgerald, C. Pantea, S. Lin [et al.] // *Lung.* – 2014. – № 192. – P. 947–954.
119. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain / C. Strubing, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – № 278. – P. 39014–39019.
120. Fuhlbrigge, A. The status of asthma control in the U.S. adult population / A. Fuhlbrigge, M.L. Reed, D.A. Stempel // *Allergy Asthma Proc.* – 2009. – № 30. – P.529-533.
121. Functional expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts / M. Tsumura, U. Sobhan, M. Sato [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 8. – P.e82233.
122. Functional multimerization of mucolipin channel proteins / C. Curcio-Morelli, P. Zhang, B. Venugopal [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2010. – № 222. – P. 328-335.

123. Gender differences in bronchial responsiveness: A population-based cohort / J. Pirkash, D. Courbon, C. Raheerisson [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2012. – № 40. – P. 1375.
124. Genetic heterogeneity of asthma phenotypes identified by a clustering approach / V. Siroux, J.R. Gonzalez, E. Bouzigon [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2014. – № 43. – P. 439–452.
125. Genetics of asthma susceptibility and severity / R.E. Slager, G.A. Hawkins, X. Li [et al.] // *Clin. Chest Med.* – 2012. – № 33. – P.431–443.
126. Genome-wide association study identifies TH1 pathway genes associated with lung function in asthmatic patients / X. Li, G.A. Hawkins, E.J. Ampleford [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2013. – № 2. – P.313-320.
127. GfK. Изучение поведения врачей при лечении пациентов с бронхиальной астмой (БА) и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) 2018. [Электронный ресурс] Доступно на: https://www.gfk.com/fileadmin/user_upload/dyna_content/RU/Documents/News/2015/Out-patient-treatment-of-bronchial-asthma-current-clinical-practice-review.doc . Дата обращения 22.02.18
128. Global Initiative for Asthma. 2018 GINA Report, global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available from <http://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention>. Дата обращения 21.04.2019
129. Global, regional and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 / J.B. Soriano, A.A. Abajobir, K.H. Abate [et al.] *Lancet Respir. Med.* – 2014. – № 5 – P. 691-706.
130. Goel, M. Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes / M. Goel, W.G. Sinkins, W.P. Schilling // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 277. – P. 48303–48310.

131. Hansbro, P.M. Cytokine/anti-cytokine therapy—novel treatments for asthma? / P.M. Hansbro, G.E. Kaiko, P.S. Foster [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – № 163. – P.81–95.
132. Heterogeneity of phenotypes in severe asthmatics / F. Schleich, G. Brusselle, R. Louis [et al.] // *The Belgian Severe Asthma Registry (BSAR). Respir. Med.* – 2014. – № 108. – P.1723-1732.
133. Holgate, S.T. Pathogenesis of asthma / S.T. Holgate // *Clin. Exp. Allergy.* – 2008. – № 38. – P.872–897.
134. Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant / A.S. Sabnis, M. Shadid, G.S. Yost [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2018. – № 39. – P. 466–474.
135. Huo, Y. Genetic Mechanisms of Asthma and the Implications for Drug Repositioning / Y. Huo, H. Y. Zhang // *Genes.* – 2018. – № 9. – P. 237.
136. Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures / A.S. Sabnis, C.A. Reilly, J.M. Veranth [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2008. – № 295. – P. 194-200.
137. Inflammatory Effects of Menthol vs. Non-menthol Cigarette Smoke Extract on Human Lung Epithelial Cells: A Double-Hit on TRPM8 by Reactive Oxygen Species and Menthol / A.H. Lin., M.H. Liu, H.B. Ko [et al.] // *Front. Physiol.* – 2017. – № 8. – P.263.
138. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum / J.L. Simpson, R. Scott, M.J. Boyle // *Respirology.* – 2006. – № 11. – P. 54-61.
139. Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma / G. Chalmers, K. Macleod, S. Little [et al.] // *Thorax.* – 2002. – № 57. – P.226-230.
140. Inhibition of transient receptor potential melastatin 8 alleviates airway inflammation and remodeling in a murine model of asthma with cold air stimulus / H. Liu,

- Q. Liu, L. Hua [et al.] // *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. – 2018. – № 5. P. 499-506.
141. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma / K.F. Chung, S.E. Wenzel, J.L. Brozek [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2014. – № 43 – P. 343-373.
142. Israel, E. Severe and Difficult-to-Treat Asthma in Adults / E. Israel, H.K. Reddel // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – № 377 – P. 965-976.
143. Iwamoto, H. Tiotropium bromide is effective for severe asthma with noneosinophilic phenotype / H. Iwamoto, A. Yokoyama, N. Shiota // *Eur. Respir. J.* – 2008. – № 6. – P. 1379-1380.
144. Jiang, L.H. Subunit interaction in channel assembly and functional regulation of transient receptor potential melastatin (TRPM) channels / L.H. Jiang // *Biochem Soc. Trans.* – 2007. – № 35. – P. 86–88.
145. Jindal, S.K. The relationship between tobacco smoke & bronchial asthma / Jindal S.K., Gupta D. // *Indian J. Med. Res.* – 2004. – № 120. – P.443-453.
146. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe / S.J. Klebanoff // *J. Leukoa Biol.* – 2005. – № 77. – P. 598-625.
147. Koskela, H.O. Cold air-provoked respiratory symptoms: the mechanisms and management / H.O. Koskela // *Int. J. Circumpolar Health.* – 2007. – № 66. – P. 91-100.
148. Kuwano, K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling / K. Kuwano // *Cell. Mol. Immunol.* – 2007. – № 6. – P. 419-429.
149. Lange, P. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma / P. Lange, J. Parner, J. Vestbo // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – № 339. – P.1194-1200.
150. Larsson, K. Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects / K. Larsson // *Eur. Respir. J.* – 1998. – № 12. – P. 825-830.
151. Li, M. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats / M. Li, G. Yang, X.-D. Zhou // *Int. J. Mol. Med.* – 2014. – № 1. – P. 83-90.

152. Li, H. TRP Channel Classification / H. Li // [Adv. Exp. Med. Biol.](#) – 2017. – № 976. – P.1-8.
153. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis / J.A. Sanchez., K.E. Pierce., J.E. Rice [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – № 7. – P. 1933–1938.
154. Lung function decline in asthma: association with inhaled corticosteroids, smoking and sex / A. Dijkstra, J.M. Vonk, H. Jongepier // *Thorax.* – 2006. – № 2. – P.105-110.
155. Manfreda J. Geographic and gender variability in the prevalence of bronchial responsiveness in Canada / J. Manfreda // *Chest.* – 2004. – № 125. – P.1657–1664.
156. Meltzer, L. A review of the efficacy and safety of once-daily tiotropium Respimat 2.5 micrograms in adults and adolescents with asthma / L. Meltzer, W.L. Berger // *Allergy and Asthma Proceedings.* – 2018. – № 1. – P. 14-26.
157. Millqvist, E. TRPV1 and TRPM8 in Treatment of Chronic Cough / E. Millqvist Pharmaceuticals (Basel). – 2016. – № 9. – E.45.
158. Modelling the asthma phenotype: impact of cigarette smoke exposure / M.G. Belvisi, K. Baker, N. Malloy [et al.] // *Respir Res.* – 2018. – № 1. – P. 89.
159. Moderate-to-severe asthma in individuals of European ancestry: a genome-wide association study / N. Shrine, M. A. Portelli, C. John [et al.] // *The Lancet. Respiratory medicine.* – 2019. – № 7. – P.20–34.
160. MONICA study group. Add-on montelukast in inadequately controlled asthma patients in a 6-month open-label study: the Montelukast in Chronic Asthma (MONICA) study / J.C. Virchow, A. Mehta, L. Ljungblad [et al.] // *Respir. Med.* – 2010. – № 5. – P. 644-651.
161. Montelukast inhibits neutrophil pro-inflammatory activity by a cyclic AMP-dependent mechanism / R. Anderson, A.J. Theron, C.M. Gravett [et al.] // *J. Pharmacol.* – 2009. – № 1. – P. 105-115.
162. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis / E.A. Podrez, H.M. Abu-Soud, S.L. Hazen [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – № 12. – P. 1717-1725.

163. Ober, C. Asthma genetics 2006: The long and winding road to gene discovery / C. Ober, S. Hoffjan // *Genes Immun.* – 2006. – № 7. – P. 95–100.
164. Ober, C. The genetics of asthma and allergic disease: A 21st century perspective / C. Ober, T.C. Yao. // *Immunol. Rev.* – 2011. – № 242. – P. 10–30.
165. Pak, W.L. Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster* / W.L. Pak, J. Grossfield, K.S. Arnold // *Nature.* 1970. – 1997. – № 5257. – P. 518-520.
166. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment / J.M. Drazen, C.N. Yandava, S. Dubé [et al.] // *L. Nat. Genet.* – 1999. – № 22. – P. 168–170.
167. Prikhodko, A.G. The particularities of cold-induced bronchial hyperreactivity in patients with chronic respiratory diseases / A.G. Prikhodko, A.V. Kolosov // *Russian Pulmonology.* – 2008. – № 1. – P.69–74.
168. Ramsey, I.S. An introduction to TRP channels / I.S. Ramsey, M. Delling, D.E. Clapham // *Annu. Rev. Physiol.* – 2006. – № 68. – P. 619–647.
169. Regulation of inducible nitric oxide synthase by selfgenerated NO / H.M. Abu-Soud, K. Ichimori, H. Nakazawa [et al.] // *Biochemistry.* – 2001. – № 40. – P. 6876-6881.
170. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study / V. Siroux., I. Pin, M. Oryszczyn [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2010. – № 15. – P. 470–477.
171. Repeated cross-sectional survey of patient-reported asthma control in Europe in the past 5 years / P. Demoly, K. Annunziata, E. Gubba [et al.] // *Eur. Respir. Rev.* – 2012. – № 21. – P. 66-74.
172. Rosasco, M.G., Gordon S.E. TRP Channels: What Do They Look Like? / M.G. Rosasco, S.E. Gordon // *Source Neurobiology of TRP Channels.* Second edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. – 2017. – № 3. – C.1.
173. Salmeterol / fluticasone propionate (50 / 500 microg) in combination in a Diskus inhaler (Seretide) is effective and safe in the treatment of steroid-dependent asthma / M. Aubier, W.R. Pieters, N.J. Schlosser [et al.] // *Respir. Med.* – 1999. – № 93. – P. 876-884.

174. Samanta, A. Transient Receptor Potential (TRP) Channels / A. Samanta, T. Hughes, V.Y. Moiseenkova-Bell // *Sub-cellular biochemistry*. – 2018. – № 87. – P.141–165.
175. Schaefer, M. Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits / M. Schaefer // *Pflugers Arch.* – 2005. – № 451. – P.35–42.
176. Sensitivity of bronchopulmonary receptors to cold and heat mediated by transient receptor potential cation channel subtypes in an ex vivo rat lung preparation / Y. Zhou, B. Sun, Q. Li [et al.] // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2011. – № 177. – P.327–332.
177. Silverman, R. Cigarette smoking among asthmatic adults presenting to 64 emergency departments / R. Silverman, E. Boudreaux, P. Woodruff [et al.] // – 2014. – № 123. – P.1472-1479.
178. Single-nucleotide polymorphism rs11562975 of the thermosensitive ion channel TRPM8 gene and human sensitivity to cold and menthol / T.V. Kozyreva, E.Y. Tkachenko, T.A. Potapova [et al.] // *Human Physiology*. – 2011. – № 2. – P.188–192.
179. Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8 / Y. Yin., M. Wu, L. Zubcevic [et al.] // *Science*. – 2018. – № 359. – P.237-241.
180. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells / T. Hofmann, M. Schaefer, G. Schultz [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – № 99. – P. 7461–7466.
181. Tai, Y. TRPC Channels and Neuron Development, Plasticity, and Activities / Y. Tai, Y. Jia // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – № 976. – P. 95-110.
182. Tantisuwat, A. Effects of smoking on chest expansion, lung function, and respiratory muscle strength of youths / A. Tantisuwat, P. Thaveeratitham. *J. Phys. Ther. Sci.* – 2014. – №2. – P.167–170.
183. The activation of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) receptors induces airway inflammation in bronchial asthma / J.H. Kim, Y.S. Jang, J.Y. Park [et al.] // *J. of Allergy and Clin. Immunology* // – 2017. – № 139. – I.2.

184. The association of GSDMB and ORMDL3 gene polymorphisms with asthma: A meta-analysis / C.N. Zhao, Y. Fan, J.J. Huang [et al.] // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2015. – № 37. – P.175–185.
185. The course of persistent airflow limitation in subjects with and without asthma / S. Guerra, D.L. Sherrill, M. Kurzius-Spencer [et al.] // *Respir. Med.* – 2008. – № 10. – P. 1473-1482.
186. The effect of smoking on lung function: a clinical study of adult-onset asthma / M. Tommola, P. Ilmarinen, L.E. Tuomisto // *Eur Respir J.* – 2016. – № 5. – P.1298-1306.
187. The ENFUMOSA cross-sectional European multicenter study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe asthma // *Eur. Respir. J.* – 2003. – № 22 – P. 470-477.
188. The genetics of asthma: Towards a personalised approach to diagnosis and treatment / D.A. Meyers, E.R. Bleeker, J.W. Holloway [et al.] // *Lancet Respir. Med.* – 2014. – № 2. – P.405–415.
189. The glucocorticoid receptor hetero-complex gene STIP1 is associated with improved lung function in asthmatics subjects treated with inhaled corticosteroids / G.A. Hawkins, R. Lazarus, R.S. Smith [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2009. – № 123. – P.1376–1383.
190. The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4⁺ T cells / S. Bertin, Y. Aoki-Nonaka, P.R. de Jong [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2014. – № 15. – P.1055–1063.
191. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma / L.G. Wood, K.I. Baines, J. Fu [et al.] // *Chest.* – 2012. – № 1. – P.86–93.
192. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology / I. Wessler, H. Kilbinger, F. Bittinger [et al.] // *Life Sci.* – 2003. – № 72. – P. 2055-2061.

193. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats / M. Li, G. Yang, X. Zhou [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2014. – № 1. – P. 83-90.
194. The prevalence of severe refractory asthma / P.W. Hekking, R.R. Wener, M. Ame-link [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2015. – № 135. – P. 896-902.
195. The role of trigeminal nasal TRPM8-expressing afferent neurons in the antitussive effects of menthol / J. Plevkova, M. Kollarik, I. Poliacek [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 2013. – № 115. – P.268–274.
196. The short-term association between asthma hospitalisations, ambient temperature, other meteorological factors and air pollutants in Hong Kong: a time-series study / H.C. Lam, A.M. Li, E.Y. Chan [et al.] // *Thorax*. – 2016. – № 71. – P. 1097–1109.
197. Thermal mapping of the airways in humans / E.R. Jr. McFadden, B.M. Pichurko, H.F. Bowman [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 1985. – № 58. – P.564-570.
198. Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties / W. Cheng, F. Yang, C.L. Takanishi [et al.] // *J. Gen. Physiol.* – 2007. – № 129. – P.191–207.
199. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation / A. Patapoutian, A.M. Peier, G.M. Story [et al.] // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2003. – № 7. – P. P.529-539.
200. Tiotropium improves lung function in patients with severe uncontrolled asthma: a randomized controlled trial / H.A. Kerstjens, B. Disse, W. Schröder-Babo [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011. – № 128. – P. 308–314.
201. Tiotropium improves lung function, exacerbation rate, and asthma control, independent of baseline characteristics including age, degree of airway obstruction, and allergic status / H.A. Kerstjens, P. Moroni-Zentgraf, D.P. Tashkin [et al.] // *Respir. Med.* – 2016. – № 117. – P. 198-206.
202. Toluene diisocyanate exposure induces airway inflammation of bronchial epithelial cells via the activation of transient receptor potential melastatin 8 / J. Kim, Y.S. Jang, S.H. Jang [et al.] // *Exp. Mol. Med.* – 2017. – № 49. – P. e299.

203. Transient receptor potential melastatin 8 gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma / D.E. Naumov, J.M. Perelman, V.P. Kolosov [et al.] // *Respirology*. – 2015. – Vol. 20, № 8 – P. 1192–1197.
204. Trevor, J.L. Refractory asthma: mechanisms, targets, and therapy / J.L. Trevor, J.S. Deshane // *Allergy*. – 2014. – № 69 – P. 217-227.
205. TRPC Channels in Health and Disease / Y. Tai, S. Yang, Y. Liu // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – № 976. – P. 35-45.
206. TRPM8 genetic variations associated with COPD risk in the Chinese Han population / M. Xiong, J. Wang, M. Guo [et al.] // *Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2016. – № 11. – P.2563-2571.
207. TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway / H. Xing., J.X. Ling, M. Chen [et al.] // *Mol. Pain.* – 1998. – № 4. – P. 22.
208. TRPM8 mediates cold and menthol allergies associated with mast cell activation / Y. Cho., Y. Jang, Y.D. Yang [et al.] // *Cell Calcium*. – 2010. – № 48. – P.202–208.
209. TRPM8, a novel prostate-specific gene, is upregulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins / L. Tsavaler, M.H. Shapero, S. Morkowski [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – № 9. – P. 3760-3769.
210. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma / J. Bousquet, E. Mantzouranis, A.A. Cruz J. [et al.] // *Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – № 126 – P. 926-938.
211. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data / W. Wu, E. Bleecker, W. Moore [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2015. – № 133. – P. 1280 – 1288.
212. Vriens, J. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels / J. Vriens, G. Appendino, B. Nilius // *Mol. Pharmacol.* – 2009. – № 16. – P.1262-1279.

213. Weiss, S.T. Asthma genetics and genomics 2009 / S.T. Weiss, B.A. Raby, A. Rogers [et al.] // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2009. – № 19. – P.279–282.
214. Wenzel, S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes / S. Wenzel // *Clin. Exp. Allergy.* – 2012. – № 42. – P. 650-658.
215. Wenzel, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches / S.E. Wenzel // *Nat. Med.* – 2012. – № 18. – P. 716-725.
216. Willis-Owen, S.A.G. The Genetics and Genomics of Asthma / S.A.G. Willis-Owen, W.O.C. Cookson, M.F. Moffatt [et al.] // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2018. – № 19. – P.223-246.
217. Winer, R.A. Asthma incidence among children and adults: findings from the Behavioral Risk Factor Surveillance system asthma call-back survey - United States, 2006 – 2008 / R.A. Winer, X. Qin, T. Harrington [et al.] // *J. Asthma.* – 2012. – № 49 – P. 16-22.
218. World Health Organization. Chronic respiratory diseases. [Электронный ресурс] Available from <https://who.int/respiratory/rus/>. Дата обращения 21.03.2019
219. World Health Organization. Tobacco. [Электронный ресурс] Available from <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/tobacco/data-and-statistics>. Дата обращения 21.03.2019.
220. Yudin, Y. Regulation of TRPM8 channel activity / Y. Yudin, T. Rohacs // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2012. – № 353. – P.68–74.
221. Zheng, J. Molecular Mechanism of TRP Channels / J. Zheng // *Comprehensive Physiology.* – 2013. – № 3. – P. 221–242.
222. Zierler, S. TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases / S. Zierler, S. Hampe, W. Nadolni // *Cell Calcium.* – 2017. – № 67. – P.105-115.
223. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes / A.T. Hastie, W.C. Moore, D.A. Meyers [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – № 125. – P. 1028–1036.