

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СЕМЕРНИК ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ  
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ С  
УЧЕТОМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ

14.01.08 – Педиатрия

Диссертация  
на соискание учёной степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант:  
профессор, д.м.н. Лебедеко А.А.

Ростов-на-Дону – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

|   |    |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ  | 6  |
| ГЛАВА 1. АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ:<br>ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА, РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-<br>ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)              | 16 |
| 1.1. Актуальность проблемы  | 16 |
| 1.2. Фактор роста эндотелия сосудов – общая характеристика и<br>функциональная значимость его полиморфизмов   | 23 |
| 1.2.1. Фактор роста эндотелия сосудов и бронхиальная астма:<br>клинические и генетические аспекты   | 25 |
| 1.2.2. Фактор роста эндотелия сосудов и атопический дерматит:<br>клинические и генетические аспекты   | 30 |
| 1.3. Трансформирующий фактор роста – характеристика и<br>функциональная значимость его полиморфизмов при<br>аллергических заболеваниях              | 33 |
| 1.3.1. Трансформирующий фактор роста $\beta$ и бронхиальная астма:<br>клинические и генетические аспекты  | 36 |
| 1.3.2. Трансформирующий фактор роста $\beta$ и атопический дерматит:<br>клинические и генетические аспекты  | 41 |
| 1.4. Матриксные металлопротеиназы - общая характеристика<br>группы и функциональная значимость полиморфизмов их генов                               | 43 |
| 1.4.1. Металлопротеиназы и бронхиальная астма: клиническое и<br>генетическое значение   | 50 |
| 1.4.2. Металлопротеиназы и атопический дерматит: клиническое и<br>генетическое значение   | 55 |
| 1.5. Протеомный профиль сыворотки крови больных с<br>аллергическими заболеваниями – современный взгляд на проблему<br>диагностики и прогнозирования | 59 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.5.1. Основные понятия и задачи протеомики  | 59        |
| 1.5.2. Протеомный анализ   | 62        |
| 1.5.3. Протеомные методы в диагностике аллергических заболеваний                               | 64        |
| <b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>  | <b>72</b> |
| 2.1. Дизайн исследования   | 72        |
| 2.2. Исследование фактора роста эндотелия сосудов.   | 79        |
| 2.3. Исследование трансформирующего фактора роста $\beta$                                      | 79        |
| 2.4. Исследование матриксной металлопротеиназы 9   | 81        |
| 2.5. Методика молекулярно-генетического исследования   | 81        |
| 2.6. Протеомный анализ сыворотки крови   | 83        |
| 2.7. Методы статистической обработки полученных данных   | 85        |
| <b>ГЛАВА 3. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ</b>    | <b>89</b> |
| 3.1. Общая характеристика детей, страдающих бронхиальной астмой                                | 93        |
| 3.2. Общая характеристика детей, страдающих atopическим дерматитом                             | 96        |
| 3.3. Общая характеристика детей с сочетанием бронхиальной астмы и atopического дерматита       | 101       |
| 3.4. Результаты аллергологического обследования детей, страдающих аллергическими заболеваниями | 106       |
| 3.5. Модель прогнозирования риска развития тяжелого течения atopического дерматита у детей     | 115       |

|   |     |
|---|-----|
| 3.6. Модель прогнозирования риска развития тяжелого течения бронхиальной астмы у детей  | 123 |
| 3.7. Модель прогнозирования риска развития тяжелого течения бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом   | 132 |
| ГЛАВА 4. РОЛЬ ФАКТОРОВ РОСТА И МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ   | 144 |
| 4.1. Значение фактора роста эндотелия сосудов в формировании бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей  | 145 |
| 4.2. Изучение роли трансформирующего фактора роста $\beta$ в патогенезе бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей   | 155 |
| 4.3. Металлопротеиназа 9 и ее значение в генезе бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей   | 164 |
| ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗИ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА И МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ | 181 |
| 5.1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в генетическое исследование   | 181 |
| 5.2. Исследование частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом   | 184 |
| 5.3. Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с бронхиальной астмой  | 193 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.4. Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с атопическим дерматитом  | 208 |
| 5.5. Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита  | 220 |
| 5.6. Модели межгенного взаимодействия полиморфизмов генов <i>VEGFA</i> , <i>TGFβ1</i> , <i>MMP9</i> , рассчитанные с помощью программы MDR у больных, страдающих бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и сочетанием данных патологий | 230 |
| ГЛАВА 6. МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ  | 243 |
| 6.1. Модель прогнозирования неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей, страдающих атопическим дерматитом  | 243 |
| 6.2. Модель прогнозирования тяжелого течения БА у детей, страдающих атопическим дерматитом   | 252 |
| ГЛАВА 7. ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМНОГО СПЕКТРА СЫВОРОТКИ КРОВИ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ (ДАННЫЕ ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)   | 257 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ   | 282 |
| ВЫВОДЫ   | 306 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  | 309 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ  | 310 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ  | 311 |

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

В течение последних десятилетий во всем мире отмечается значительный рост аллергических заболеваний [79, 149, 229, 257]. Особенно значимо это для детской популяции. Так, по данным Европейской ассоциации аллергологии и клинической иммунологии, в настоящее время каждый четвертый ребенок школьного возраста страдает аллергией [249, 175], причем только в Европе около 150 миллионов человек страдают от той или иной ее формы. При этом пищевая аллергия поражает до 8 % детей, в то время как аллергические заболевания дыхательных путей, такие как бронхиальная астма (БА) - до 20 % [85, 224, 229, 256]. Распространенность атопического дерматита (АД) значительно варьирует в географическом отношении, но в некоторых странах может затрагивать до 20 % детей [123, 249]. Если говорить о нашей стране, то по данным проведенного в последние годы эпидемиологического исследования, в Российской Федерации распространенность БА среди взрослых составляет 6,9 % [13], а среди детей и подростков – около 10 % [40]. Распространенность симптомов АД в различных регионах Российской Федерации по данным стандартизированного эпидемиологического исследования ISAAC колеблется от 6,2 до 15,5 % [6].

Аллергические заболевания - это хронические патологические процессы, которые не только снижают качество жизни детей, но и могут прогрессировать, приводя к формированию опасных для жизни состояний [152, 204]. При этом такие нозологии как бронхиальная астма и атопический дерматит часто сопровождаются когнитивными расстройствами, нарушением сна, интеллектуальной дисфункцией и ограничением активности детей, что приводит не только к физическому, но и психическому страданию [93, 156]. Кроме того, возникнув в детском или подростковом возрасте, эти заболевания могут сохраняться и во взрослом возрасте, что требует

комплексного подхода к диагностике и дальнейшему ведению данных больных [123, 256].

Однако, несмотря на многочисленные работы, посвященные исследованию аллергических заболеваний, до конца не раскрыты механизмы патогенеза, лежащие в их основе, и до сих пор не установлены все факторы, определяющие тяжесть их клинических проявлений.

Важная роль в возникновении и поддержании хронического воспалительного процесса при аллергических заболеваниях может принадлежать ряду специфических и неспецифических факторов, вызывающих морфологические и функциональные изменения во всех структурах тканей бронхов и кожи [154, 232, 236, 241]. При этом особое влияние оказывают цитокины, такие как факторы роста (фактор роста эндотелия сосудов (VEGFA), трансформирующий фактор роста  $\beta$  [TGF $\beta$ ]), ферменты, участвующие в реорганизации тканей (металлопротеиназы [ММР]), и другие биологически активные молекулы (глутатионпероксидаза, транстиретин, различные фракции комплемента). В то же время, их роль в развитии воспаления, а также перестройке тканей пораженных органов, особенности генетических взаимосвязей являются недостаточно изученными. Поэтому определение их экспрессии, а также особенностей наследования, дает возможность установить новые данные о неатопическом генезе БА и АД.

Особого внимания при этом заслуживает изучение молекулярных аспектов патогенеза аллергических заболеваний, а именно, протеомного профиля сыворотки крови детей. Знание особенностей экспрессии определенных белковых молекул позволяет с достаточной долей информативности говорить о роли данных молекул в поддержании хронического воспаления. А разработка современных подходов к диагностике, а также программ прогнозирования течения БА и АД у детей, основанных на результатах молекулярно-генетического исследования,

является наиболее перспективной в структуре первичной и вторичной профилактики наиболее социально-значимых заболеваний у детей.

Полученные в ходе проведенного исследования данные дали возможность предположить, что невоспалительные факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов, трансформирующий фактор роста  $\beta 1$ , металлопротеиназа 9, а также полиморфные варианты генов, ответственных за их экспрессию играют важную роль в формировании аллергических заболеваний. А выявленные изменения протеомного профиля сыворотки крови детей, страдающих аллергическими заболеваниями, являются свидетельством повреждений на молекулярном уровне, приводящих к метаболическим и функциональным нарушениям в организме больного ребенка. Сформированная на основании полученных данных новая концепция патогенеза БА и АД, позволяет сделать еще один шаг вперед на пути к персонифицированной медицине, к своевременному выявлению факторов, способствующих формированию тяжелого течения заболевания, ранней диагностике и подбору адекватной терапии с учетом индивидуальных молекулярно-генотипических особенностей каждого больного ребенка.

### **Цель исследования**

Усовершенствовать методы комплексной диагностики аллергических заболеваний у детей путем изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза для уточнения прогноза и тяжести течения бронхиальной астмы, атопического дерматита и сочетания данных патологий.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить особенности клинико-лабораторных показателей у детей с БА, АД и БА+АД для определения наиболее значимых факторов, лежащих в основе их развития, для последующего использования в прогнозировании тяжести течения заболеваний.
2. Оценить роль фактора роста эндотелия сосудов, трансформирующего фактора роста и металлопротеиназы 9 в патогенезе

бронхиальной астмы, атопического дерматита и сочетания данных патологий у детей.

3. Провести сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов изучаемых полиморфных вариантов генов у пациентов с бронхиальной астмой, атопическим дерматитом, сочетанием данных патологий и детей контрольной группы.

4. Изучить ассоциации полиморфных вариантов генов фактора роста эндотелия сосудов (*C634G* гена *VEGFA*), трансформирующего фактора роста  $\beta$  (*Arg25Pro* гена *TGF $\beta$ <sub>1</sub>*), рецептора эпителиального фактора роста (*2073A>T* гена *EGFR*), металлопротеиназ (*320A>C* гена *MMP20*, *837T >C* гена *MMP20* и *-8202 A>G* гена *MMP9*) у детей, страдающих бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и сочетанием данных патологий для установления межгенных взаимодействий, предрасполагающих к развитию различных клинико-патогенетических вариантов их течения.

5. Изучить особенности протеомного профиля сыворотки крови детей, страдающих бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и сочетанием данных патологий.

6. На основании клинических данных и результатов молекулярно-генетических исследований разработать программы прогнозирования течения аллергических заболеваний у детей.

### **Научная новизна работы**

Впервые выявлены изменения концентрации факторов роста и металлопротеиназы 9 в сыворотке крови у детей при БА и АД, разных степенях тяжести заболеваний, продолжительности патологического процесса и особенностях аллергоанамнеза.

Впервые показана высокая значимость фактора роста эндотелия сосудов и трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1 в оценке степени тяжести течения БА у детей.

Впервые установлены генетические особенности наследования факторов роста и металлопротеиназ, отвечающих за ремоделирование тканей при БА, АД и сочетании данных патологий. Показано, что у детей, являющихся носителями *ArgArg*-генотипа по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>*, значительно повышен риск развития БА (*OR* составил 10,57; 95 % *CI* – 4,17-26,79, *p* < 0,001) и сочетания БА и АД (*OR* = 6,57 [95 % *CI* – 3.02 – 14.33, *p* < 0,001]), а у носителей аллельного *A/A*-варианта полиморфизма -8202A > G гена *MMP9* повышен риск развития АД более чем в 7,55 раза (*OR* = 7,55 [95 % *CI* – 2,97 – 19,21, *p* < 0,001]).

Впервые показано, что между полиморфными вариантами *634G > C* гена *VEGFA*, *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и -8202A > G гена *MMP9* отмечаются сильные синергичные связи, способствующие повышению риска развития бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей.

Впервые исследованы особенности белковых профилей сыворотки крови больных с БА, АД и сочетанием данных нозологий. На основании результатов клинико-лабораторного, протеомного и генетических исследований определены факторы риска развития тяжелого течения бронхиальной астмы, атопического дерматита у детей. На основании полученных результатов разработаны программы прогнозирования течения данных заболеваний у детей. Результаты исследования позволили разработать принципиально новые подходы к диагностике БА и АД.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В результате проделанной научной работы получены совершенно новые данные об особенностях протеома детей с различными видами аллергических заболеваний, установлены биологические маркеры их тяжелого течения, что позволило значительно расширить наши знания о механизмах патогенеза как аллергии в целом, так и отдельных ее клинических проявлений.

Разработанные на основании полученных данных молекулярно-генетические программы прогнозирования развития данных заболеваний (бронхиальной астмы, атопического дерматита и их сочетания) позволяют индивидуализировать подходы не только к диагностике, но и к лечению.

При этом результаты проведенных исследований предоставляют возможность сфокусировать внимание практикующих специалистов на патогенетических основах данных заболеваний, а также позволили определить новые таргетные терапевтические мишени для оптимизации фармакотерапевтических подходов к лечению БА и АД.

Материалы диссертации используются в работе клиник г. Ростова-на-Дону (педиатрическое отделение клиники РостГМУ, отделений раннего возраста № 1 и 2 НИИАП, МБУЗ ДГБ № 2 г. Ростова-на-Дону). Результаты исследований включены в лекции и практические занятия на кафедре детских болезней № 2 Ростовского государственного медицинского университета для студентов педиатрического факультета, представлены на семинарах для практических врачей.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Концентрация фактора роста эндотелия сосудов достоверно повышается при БА, АД и их сочетании у детей, причем ее значения коррелируют со степенью тяжести БА, а у носителей гетерозиготного варианта -634G > C гена VEGFA риск развития данного заболевания повышен более чем в 2 раза.
2. Уровень трансформирующего фактора роста  $\beta_1$  значительно возрастает при БА, АД и их сочетании у детей, причем гомозиготы по *Arg*-аллели полиморфного варианта *Arg25Pro* гена *TGF $\beta_1$*  имеют повышенный риск развития БА.
3. Повышение концентрации металлопротеиназы 9 играет важную роль в

- патогенезе аллергических заболеваний у детей, при этом у пациентов с атопическим дерматитом отмечаются достоверно значимые различия распределения аллелей и генотипов по полиморфизму  $-8202A>G$  гена *MMP9*, а у носителей A/A-генотипа риск развития АД повышен в 7,55 раз.
4. Модели межгенного взаимодействия полиморфных вариантов  $634G > C$  гена *VEGFA*, *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и  $-8202A > G$  гена *MMP9* определяют наиболее клинически важные комбинации для прогнозирования течения БА и АД у детей.
  5. Тяжесть течения БА, АД и их сочетания у детей может быть предопределена наличием сочетаний различных экзо- и эндогенных факторов, учёт совокупного влияния которых позволил разработать ряд моделей прогнозирования риска их тяжелого течения.
  6. Особенности протеомного профиля крови детей, страдающих БА, АД и их сочетанием, характеризуются различиями в белковом спектре и экспрессии молекул в диапазоне молекулярных масс 25-46 кДа.
  7. Сформулирована новая концепция патогенеза БА и АД, отличающаяся включением невоспалительных молекулярно-генетических факторов.

### **Степень достоверности результатов**

Применение современных методик и программ статистической обработки данных (непараметрических и параметрических вариантов анализа) в сочетании с новейшими методами лабораторной и инструментальной диагностики, достаточным количеством обследуемых пациентов, включенных в исследование, позволило обеспечить высокий уровень достоверности полученных результатов. При этом следует отметить, что установленные в ходе данной работы данные согласуются с общепринятыми позициями в отношении изучаемых заболеваний.

### **Апробация результатов исследования и публикации**

Апробация результатов диссертационной работы была проведена на заседании научно-координационных советов ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России и ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

На основании результатов диссертационной работы опубликована 51 научная работа, из них 17 статей в периодических изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 4 статьи в периодических зарубежных изданиях, а также 12 статей в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus. Получено 3 патента на изобретение № 2530658 от 27.06.2013 г., № 2545895 от 31.03.2014 г. и № 2706377 от 2.07.2019 г.

Результаты диссертационной работы представлены на XXIII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Казань), 2013; Международных Конгрессах Европейского Респираторного Общества ERS (Мюнхен, Германия) 2014, (Милан, Италия) 2017, (Мадрид, Испания) 2019; IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (Ростов-на-Дону), 2017; XVII-XIX Российских конгрессах «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» с международным участием (Москва), 2018-2020; XII Всемирном конгрессе по Астме, ХОБЛ и иммунопатологии (Москва), 2018; XXVIII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Москва) 2018; I-II Международных конгрессах по молекулярной аллергологии ММАМ (Москва) 2018-2019гг.; Российской научно-практической конференция «Актуальные проблемы заболеваний органов дыхания у детей и подростков» (Ростов-на-Дону), 2019; межрегиональной научно-практической конференции педиатров Юга России, посвященной 90-летию основателя кафедры педиатрии и неонатологии РостГМУ, Заслуженного врача Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора Г.В. Хорунжего (Ростов-на-Дону), 2019; Конгрессах Европейской академии

аллергологии и клинической иммунологии ЕААСІ (Лиссабон, Португалия), 2019, (Лондон, Великобритания), 2020; XIII Всемирном конгрессе по астме, аллергии и иммунопатологии, III Международный конгресс по молекулярной аллергологии (Санкт-Петербург), 2020.

### **Связь диссертационной работы с планами НИР, участием в грантах**

Тема диссертации утверждена решением ученого совета ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, №11 от 20.10.2020г.

Диссертационная работа выполнялась в рамках комплексной темы НИР кафедры детских болезней №2 и по гранту президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики СП-761.2019.4 по проекту: «Разработка молекулярно-генетических программ прогнозирования риска развития и течения аллергических заболеваний у детей». Ее результаты вошли в отчеты по НИР кафедры детских болезней №2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования апробированы и внедрены в практическую работу отделения педиатрического клиники Ростовского государственного медицинского университета, отделений раннего возраста № 1 и № 2 НИИАП, МБУЗ ДГБ № 2 г. Ростова-на-Дону. Основные научные положения, выводы и рекомендации данного исследования используются в научной работе на кафедре детских болезней № 2 Ростовского государственного медицинского университета.

### **Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации**

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Соискателем проведено планирование работы, формулировка научной гипотезы, поставлены цель и задачи исследования, определены объем и методы исследований, осуществлен анализ отечественной и зарубежной литературы, охватывающей актуальные вопросы диагностики и патогенеза аллергических заболеваний у детей. Автором лично проведен подбор пациентов, подписание информированного согласия, сбор первичного материала, оформление его в статистические таблицы, с дальнейшим анализом и расчетом показателей. Лично соискателем проведена интерпретация полученных результатов, написан текст диссертационной работы, подготовлены иллюстрации, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы, разработаны программы прогнозирования течения аллергических заболеваний у детей.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа включает 342 страницы машинописного текста, содержит 69 рисунков и 61 таблицу. Диссертационная работа структурирована и содержит введение, обзор литературы, главы материалов и методов исследования, собственные результаты, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Список литературы включает 266 научно-исследовательских работ, из которых 77 российских и 189 зарубежных авторов.

# **ГЛАВА 1. АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ: ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА, РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ. (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)**

## **1.1. Актуальность проблемы**

В последние десятилетия распространенность аллергических заболеваний во всем мире значительно возросла [102]. По оценкам проекта "Международное исследование астмы и аллергии в детском возрасте", распространенность БА у детей в возрасте 6-7 лет колеблется от 0,9 до 22,5 %, при этом следует отметить, что значительно возросла заболеваемость БА в развивающихся странах [146, 161]. В Российской Федерации распространенность БА среди взрослых составляет 6,9 % [13], а среди детей и подростков – около 10 % [40]. Также в настоящее время возросла заболеваемость атопическим дерматитом. Являясь одним из наиболее распространенных воспалительных заболеваний кожи, АД поражает около 13 % детей и примерно 7 % взрослых [257]. При этом стоит отметить, что проведенный ряд лонгитюдных и кросс-секционных исследований показали наличие взаимосвязи между БА и АД и позволили дать содержательное представление о формировании атопии в целом и атопического марша в частности [102, 110, 128, 259].

Бронхиальная астма является сложным, гетерогенным заболеванием [113], характеризующимся гиперчувствительностью бронхов и хроническим аллергическим воспалением дыхательных путей, которые приводят к эпизодам кашля, хрипов и одышки. Будучи наиболее распространенным хроническим неинфекционным заболеванием детского возраста, БА не только сопровождается значительными социальными трудностями, но и накладывает значительное финансовое бремя на систему здравоохранения в целом. К сожалению, этиология астмы до конца не изучена, но считается, что она развивается из-за нарушения взаимодействия между внутренними

факторами (генетической предрасположенностью) и воздействием окружающей среды [180]. Причем особое внимание в последнее время уделяется патогенетическим механизмам, лежащим в основе данного заболевания [13]. Так как, не смотря на то, что у большей части больных БА регистрируется контролируемое течение заболевания (на фоне адекватной терапии), около 20-30 % пациентов относятся к сложной группе больных, которые отличаются фенотипически (имеют ожирение, поздний дебют заболевания, фиксированную бронхиальную обструкцию, фенотип тяжелой атопической БА и др.). Именно у этих больных астма зачастую характеризуется высокой частотой обострений и рефрактерна к традиционным схемам лечения, а, следовательно, приводит к достаточно частым обращениям за неотложной медицинской помощью [13]. При этом рецидивы бронхообструкции могут привести к необратимому повреждению функции легких, а также значительно снизить качество жизни не только детей, но и их родителей [8, 79, 47]. В настоящее время проводится целый ряд исследований, направленных на понимание патогенеза тяжелых форм БА, поиск предикторов персистенции данного заболевания, а также внедрения новых методов лечения, основанных на использовании биологических агентов. Особое внимание ученых привлекают молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе различных форм БА. Понимание этих механизмов позволит не только выявить новые мишени для терапии данного заболевания, но и обеспечит более индивидуализированный подход к каждому больному. Крайне важно, чтобы при рассмотрении этих особенностей патогенеза БА появилась возможность предложить более точную и экономически эффективную медицинскую тактику, ориентированную на пациента [104].

Фундаментальные и клинические исследования выявили ряд факторов, которые можно использовать в качестве мишеней для таргетной биологической терапии (моноклональных антител и ингибиторов ряда

молекул), направленной против провоспалительных цитокинов. Безусловно, последние научные достижения в изучении патофизиологии заболевания, в особенности клеточных и молекулярных механизмов, которые могут лежать в основе патогенеза резистентных форм заболевания, в перспективе могут быть использованы для обоснования новых направлений терапии БА и АД у детей.

Кроме того в последнее время активно ведутся исследования, посвященные оценке эффективности использования различных методов прогнозирования тяжести и определения уровня контроля данного заболевания [40, 79]. В одних работах представлена значимость отдельных показателей и биомаркеров, например, траектории функции легких (по данным авторов траектория нормальной функции легких от рождения до смерти имеет три фазы: фазу роста, фазу плато и фазу спада, возникающую в результате физиологического старения легких, при этом многочисленные генетические и экологические факторы могут изменить одну или несколько из этих фаз), различных биомаркеров (от банальной эозинофилии крови и мокроты, до определения уровня IL-4, IL-5, IL-13, оксида азота в выдыхаемом воздухе и др.) [40, 79]. В других особое внимание уделяется сочетанному влиянию различных факторов на прогноз, так, например, Комплексный индекс тяжести астмы (Composite Asthma Severity Index, CASI) включает в себя такие факторы, как симптомы (сочетание дневных и ночных симптомов, а также использование бронхолитиков), базисная терапия (назначенные ингаляционные кортикостероиды и назначенные  $\beta$ -агонисты длительного действия), параметры функции внешнего дыхания (ОФВ1 и ОФВ1/ФЖЕЛ), использование пероральных кортикостероидов и частоту обращений за неотложной помощью и госпитализаций [79]. Риск формирования БА после перенесенного вирусного бронхолита можно определить с помощью индекса риска астмы (Asthma predictive index – API), который разработан для детей до 3 лет, имеющих более 3(4) эпизодов

свистящих хрипов за последний год [40]. Также в настоящее время широкое применение нашли опросники, позволяющие выявить степень контроля БА: тест по контролю над астмой (ACT), опросник и тест по контролю симптомов астмы [Asthma Control Questionnaire(ASQ), Asthma Control Test (ACT)], опросник TRACK (Test for Respiratory and Asthma Control in Kids, TRACK) [40, 79].

Не менее важным, с точки зрения распространенности аллергических заболеваний, и влияния на качество жизни детей, является атопический дерматит [8]. АД - это хроническое воспалительное заболевание кожи, характеризующееся экзематозными поражениями и часто интенсивным зудом [100, 115]. АД поражает до 17,5 % детей во всем мире [95, 109], при этом примерно треть больных имеют умеренное или тяжелое течение заболевания [176]. Бремя АД средней и тяжелой степени для детей и их родителей является значительным, особенно, если говорить о зуде, приводящем к хроническому нарушению сна, который может оказывать значительное влияние на повседневное функционирование, качество жизни, социальные взаимодействия и психосоциальное здоровье ребенка [7, 115, 137, 178]. В патогенезе данного заболевания участвуют различные факторы, в том числе дефекты кожного барьера, нарушения микробиома, снижение содержания антимикробных пептидов, дисфункция врожденного иммунного ответа, Th2-обусловленное воспаление кожи и др. [7, 187]. К сожалению, до сих пор окончательно не определены механизмы развития иммунных отклонений в организме в целом и непосредственно в коже больных, а также недостаточно изучены факторы, способствующие снижению активности неспецифической защиты организма, метаболические нарушения и их взаимосвязь с иммунной реактивностью при развитии различных форм АД.

При этом в последнее время все чаще и чаще отмечается высокая частота встречаемости сочетанных форм БА и АД. Анализ частоты встречаемости аллергических заболеваний у детей показал, что у 30–60 %

больных АД развивается БА [40]. Причем больные с сочетанными проявлениями аллергии, как правило, имеют более тяжелые проявления заболевания. Доказано, что АД в раннем детском возрасте является фактором риска развития БА у детей, подростков и взрослых. А сочетанные кожные и респираторные проявления аллергии характеризуются поливалентной сенсibilизацией, сопровождаются эозинофилией, высокими уровнями общего и специфических IgE в сыворотке крови [14]. Поэтому особое внимание следует уделять больным с сочетанием БА и АД, имеющих высокий риск развития тяжелых форм заболевания.

В настоящее время показано, что ключевую роль в патогенезе аллергических заболеваний играет не только дисбаланс между Th2 - и Th1-типами иммунного ответа, но и дисрегуляторные воздействия цитокинов различных групп, в том числе различных протеаз и факторов роста [125, 252]. Цитокины являются основными медиаторами, управляющими патофизиологическими и патохимическими процессами как в стенке дыхательных путей при БА, так и в коже больных с АД [241, 246]. Воспалительный процесс, развивающийся при аллергии под воздействием специфических и неспецифических факторов, вызывает морфологические и функциональные изменения во всех структурах [154, 185]. При этом установлено, что наиболее тяжелые формы аллергических заболеваний сопровождаются ремоделированием тканей.

Однако не стоит забывать о генетической предрасположенности. Установлено, что многие заболевания человека не только обусловлены последствиями мутационных изменений в линейной структуре ДНК хромосом, но и являются результатом кооперативных взаимоотношений генома, эпигенома и окружающей среды. В настоящее время достигнуты значительные успехи не только в понимании структуры и функции ДНК и РНК, а также различных белков, но и функционировании генома, репарации и рекомбинации ДНК, модификации, обратной транскрипции, транскрипции

и трансляции мРНК. Иными словами, благодаря достижениям в области молекулярной генетики и медицины, происходит революция в представлениях об этиологии, патогенезе и терапии болезней человека [19].

Еще одним направлением развития современной науки являются постгеномные исследования, им уделяется особое внимание в рамках такого научного направления, как протеомика [53]. На уровне академических центров, различных НИИ России, стран СНГ, Западной Европы, США и Канады развиваются и внедряются в клинику результаты работы научных технологических платформ для биомедицинских и фармацевтических исследований. Цель данных исследований – изучить основы протеомики и протеомного картирования. В сентябре 2010 года в Сиднее стартовал Международный проект «Протеом человека», став продолжением проекта «Геном человека». В состав участников проекта «Протеом человека» входят шесть стран-инициаторов: Республика Корея, США, Россия, Швеция, Канада и Иран. Данный проект направлен на создание протеомной карты, включающей все белки, кодируемые геномом человека. Однако, речь в данном проекте идет о здоровом организме взрослого человека, а исследования протеомного профиля больных людей до сих пор носят единичный характер. Если говорить об аллергических заболеваниях, то стоит отметить, что в литературе имеются разрозненные работы, посвященные данной тематике. При этом исследователи используются различные методики и среды для изучения протеомного профиля [221, 244].

Кроме этого, в настоящее время активно проводятся исследования различных факторов роста и особенностей их наследования у детей с аллергической патологией. Важное значение в патогенезе аллергических заболеваний играют такие факторы роста, как трансформирующий фактор роста  $\beta$  и фактор роста эндотелия сосудов, а также ряд металлопротеиназ. Данные биологически активные вещества не только изменяют активность иммунной системы, но и на фоне хронического воспаления приводят к

ремоделированию тканей [125, 221, 241]. Так, например, TGF $\beta$  осуществляет контроль за пролиферацией, клеточной дифференцировкой, а также выполняет ряд иммуноопосредованных функций в большинстве клеток нашего организма. Установлено, что TGF $\beta$  регулирует функции В-лимфоцитов, NK-клеток, дендритных клеток, макрофагов, тучных клеток и гранулоцитов, но наибольшее антипролиферативное влияние оказывает на Т-клетки: регулирует процессы дифференцировки Т-клеток, препятствуя тем самым формированию цитотоксических CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, Т-хелперов 1 и 2 типов, кроме того он блокирует секрецию IL-2 (интерлейкина-2) Т-лимфоцитами, усиливает активность ингибиторов клеточного цикла и снижает экспрессию генов. В последние годы было показано, что его повышенное образование приводит к усилению синтеза коллагенов, а, следовательно, не только к ускорению репарации тканей, но и их ремоделированию в процессе хронического аллергического воспаления. Поэтому TGF $\beta$  вовлекается во все варианты фиброза или склероза [54].

Еще одним фактором, оказывающим значительное влияние на патогенез аллергических заболеваний, является фактор роста эндотелия сосудов. Стимулируя эндотелиальные клетки, VEGFA играет центральную роль в процессах активации неоангиогенеза, тем самым, стимулируя ремоделирование бронхиальной стенки и кожи, а, следовательно, способствуя прогрессированию заболевания [12].

Также важную роль в процессах ремоделирования тканей при аллергических заболеваниях играют матриксные металлопротеиназы. Данные цитокиновые протеазы не только отвечают за реорганизацию и белковый обмен в межклеточном матриксе, но и оказывают значительное влияние на пролиферацию различных клеток и тканей, миграцию, адгезию и др. [154, 185]. Наибольший клинический интерес представляет изучение MMP9 и MMP20.

Однако, в процессах регуляции ремоделирования тканей, инициированных данными ферментами, и проявлениями заболевания немаловажную роль играют генетические факторы. Поэтому изучение изменений данных тканевых факторов роста в сыворотке крови и ассоциации различных полиморфных вариантов генов данных цитокинов с клиническими проявлениями аллергических заболеваний у детей, представляет большой практический интерес.

Но также следует помнить, что в отличие от мутационных, эпигенетические изменения связаны не только с нарушением нуклеотидной последовательности ДНК, а с ее модификацией в результате ацетилирования, метилирования, фосфорилирования и других воздействий. При этом эпигенетические модификации сохраняются. Поэтому единственная возможность поиска биомаркера – это оценка результатов протеомного анализа, т.е. конечных результатов модификации белков. Однако, клиническая реализация этого возможна только после преодоления ряда препятствий. Поэтому, чтобы правильно поставить диагноз ребенку с аллергическими заболеваниями, необходим целостный подход, сочетающий клиническую информацию и результаты инструментального обследования.

Таким образом, изучение таких социально значимых заболеваний, как БА и АД с точки зрения системной биологии и медицины позволяет по-новому взглянуть на патогенез этих заболеваний за счет более детального подхода к анализу каждого компонента, а также предоставляет широкие возможности для разработки и совершенствования эффективных способов диагностики и терапии.

## **1.2. Фактор роста эндотелия сосудов – общая характеристика и функциональная значимость его полиморфизмов**

VEGF (англ. Vascular endothelial growth factor) — это сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования васкуло- и ангиогенеза. Впервые выделил и дал соответствующее название молекуле

VEGF Наполеон Феррара в 1989 году [138]. В настоящее время установлено около пяти основных видов данного семейства: VEGFA, плацентарный фактор роста (PGF) и белки VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, но кроме этого также установлен белок VEGF, кодируемый вирусами (VEGF-E), и белок VEGF-F (он содержится в яде змей) [56, 139]. Каждый из этих факторов в организме человека выполняет свои определенные функции (рис. 1). Однако наибольшее клиническое значение имеет VEGFA. Все другие факторы роста были обнаружены чуть позже, чем VEGFA.

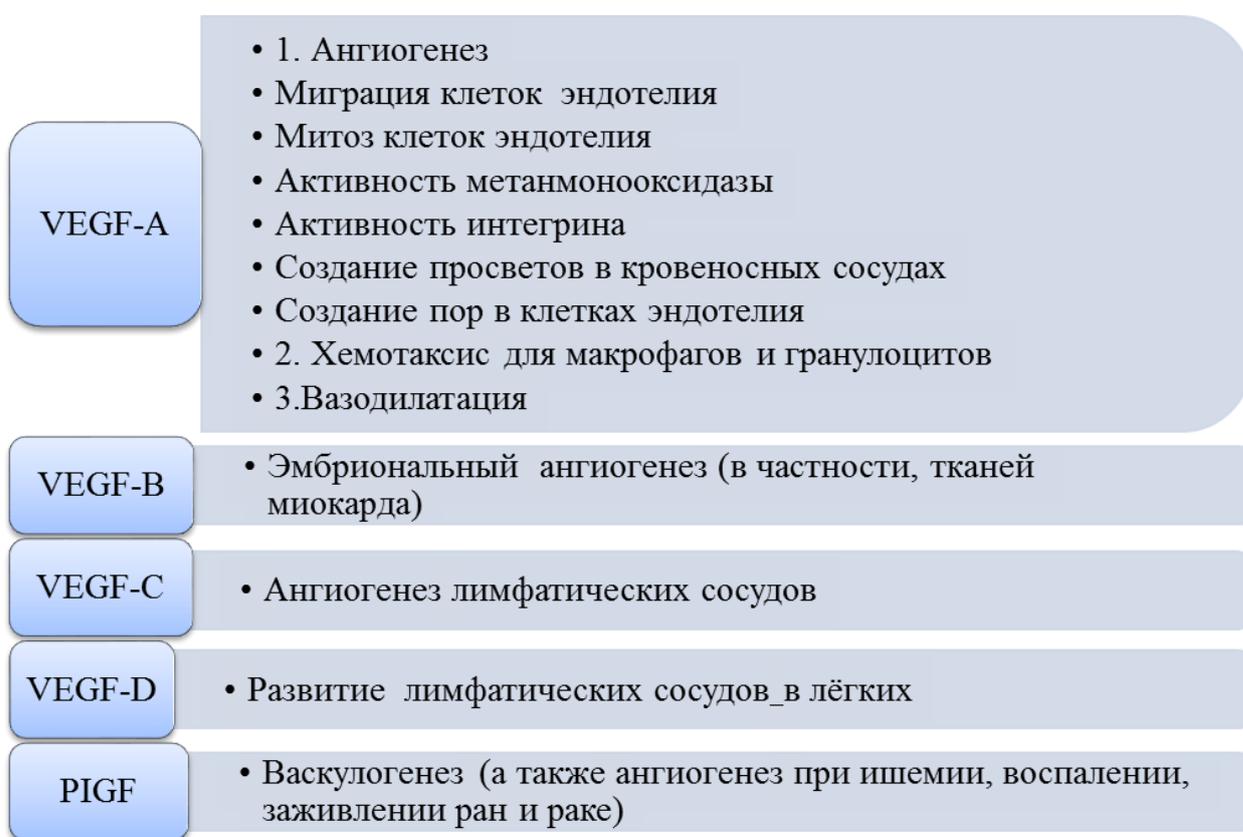


Рис. 1. Функции различных видов фактора роста эндотелия сосудов

VEGFA — гликопротеид с молекулярной массой около 45 кД. В настоящее время идентифицирован ряд изоформ VEGFA, в частности VEGF-121, -145, -162, -165, -165b, -183, -189, -206. Важно отметить, что у различных изоформ данного фактора роста есть отличия по способности проникать через биологические мембраны [231]. Кроме клеток эндотелия, VEGF оказывают влияние на другие клетки, в том числе нейроны, а также

VEGF вызывает хемотаксис моноцитов, индуцирует лимфангиогенный ответ и экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и A1 в клетках эндотелия [59, 139, 140, 260]. Он активирует экспрессию оксида азота, простаглицлина и других цитокинов, способствующих вазодилатации. К важным функциям VEGFA также можно отнести его влияние на развитие новых кровеносных сосудов и способность за счет связывания с тирозинкиназными рецепторами (рецептором VEGF1 и рецептором VEGF2) оказывать сосудистую поддержку. За счет выживания и пролиферации эндотелиальных клеток сосудов под действием данного фактора возможно осуществление ряда процессов (например, вазоконстрикции, вазодилатации, презентации антигенов и др.) [12].

### **1.2.1. Фактор роста эндотелия сосудов и бронхиальная астма: клинические и генетические аспекты**

VEGFA, наряду с другими факторами, цитокинами и эндотелинами, играет одну из ключевых ролей в формировании и поддержании хронического воспаления при БА. При этом выраженная реакция сосудов дыхательных путей, проявляющаяся прежде всего возрастанием их количества, обычно коррелирует с тяжестью заболевания. При бронховидеоскопии сверхвысокого разрешения выявлено, что процесс гипervasкуляризации затрагивает все уровни респираторного тракта (бронхи, трахея), а также установлено, что в стенке бронхиального дерева существуют две капиллярные сети: первая расположена в субэпителиальном пространстве, вторая — в глубокой перибронхиальной части, причем эти две системы связаны между собой сосудами, которые расположены вокруг гладких мышц [138]. При этом неоваскуляризация индуцируется в основном фактором роста эндотелия сосудов. Причем для VEGF отмечена возможность проявления координирующего действия как на рост сосудов, так и на их проницаемость. Отмечена четкая связь между процессами воспаления дыхательных путей и реакцией сосудов при ремоделировании. А повышение

уровня VEGF связано с возрастанием тяжести клинических проявлений БА, которые усиливают процессы, осуществляемые в дыхательных путях при участии Th2-лимфоцитов [74].

Способность VEGFA усиливать проницаемость сосудов, обуславливает его важную роль в развитии воспаления. Микроциркуляторные нарушения, возникающие при этом, способствуют синтезу огромного количества биологически активных веществ, в том числе и воспалительных медиаторов, которые способствуют формированию «микрососудистых утечек», сопровождающихся экссудацией плазмы в дыхательные пути. Таким образом, белки плазмы, которые благодаря этим утечкам попадают в межклеточное пространство, способствуют тем самым утолщению и отеку стенки дыхательных путей, а, следовательно, сужению их просвета. Также еще одним фактором патогенеза является прохождение плазмы через поврежденный внутрисосудистыми факторами эпителий и адсорбция его непосредственно в бронхах, приводящая к дополнительному повреждению целостности эпителия. Итогом этого порочного круга является уменьшение клиренса слизи, а, следовательно, формирование обструкции дыхательных путей [198]. Нашими коллегами было установлено, что данные морфофункциональные изменения кровеносных сосудов тесно связаны с нарушениями вентиляционной функции легких и структуры дыхательных путей при бронхиальной астме и во многом определяют прогноз заболевания [198]. При этом нейрогенное воспаление, сопровождающееся повышенным синтезом VEGFA, и играет ключевую роль в патогенезе данного заболевания [198]. Важно отметить, что еще до возникновения обострения заболевания и развития бронхообструкции отмечается раннее увеличение экспрессии данного фактора [167]. Кроме того, у пациентов с БА зарегистрировано повышение уровня VEGFA в слизистой оболочке дыхательных путей [153]. При этом уровень VEGF и его рецепторов

VEGFR-1 и VEGFR-2 обратно коррелирует с выраженностью обструкции дыхательных путей [11].

Одним из наиболее важных факторов, индуцирующих экспрессию VEGF, является гипоксия. При дефиците кислорода в клетке активируется ряд факторов транскрипции, в том числе и фактор, индуцируемый гипоксией (HIF), который, помимо модуляции эритропоэза, стимулирует высвобождение белков фактора роста эндотелия сосудов, отвечающих за восстановление подачи кислорода к тканям в ситуации, когда циркуляция крови недостаточна. На клетках эндотелия располагается VEGF-рецептор, способный связываться с циркулирующим белком VEGF и активировать тем самым тирозинкиназу, запускающую ангиогенез. Показано, что целый ряд клеток при развитии гипоксии способен переходить из обычного состояния в активное и запускать ангиогенез за счет повышения синтеза VEGF. К таким клеткам можно отнести: миоциты гладкой и поперечнополосатой мускулатуры, фибробласты, астроциты и эндотелиальные клетки, пигментный эпителий сетчатки, а также некоторые опухолевые клетки [21]. Поэтому при обострении БА, прогрессировании бронхиальной обструкции и развитии гипоксии отмечается повышение концентрации VEGF в сыворотке крови [132, 217]. Причем изменения концентрации данного фактора роста коррелируют со степенью тяжести заболевания и показателями функции внешнего дыхания. Так, по данным М.С. Блинчиковой (2013), среди пациентов со среднетяжелой БА было выявлено большее число лиц с повышенным уровнем спонтанной и индуцированной продукции VEGF по сравнению с больными, имеющими легкое течение заболевания, что может свидетельствовать о более выраженной гипоксии и более активном процессе повреждения эндотелия бронхов [12]. При этом установлено, что концентрация VEGFA в сыворотке крови также зависит от фенотипа заболевания. Так, было показано, что у пациентов, имеющих эозинофильный фенотип БА, отмечено достоверно значимое повышение

уровня VEGFA не только в сыворотке крови, но и в индуцированной мокроте, по сравнению с больными с нейтрофильным фенотипом. Также ими установлено, что экспрессия VEGFA значительно выше у пациентов с диагностированным снижением соотношения ОФВ1/ФЖЕЛ ниже 70 % (где ОФВ1 – объем форсированного выдоха за 1 минуту, а ФЖЕЛ – функциональная жизненная емкость легких), по сравнению с больными, у которых этот показатель выше [88]. Важно отметить, что повышение уровня VEGFA в сыворотке крови больных БА отмечается уже в детском возрасте [114]. Следовательно, можно предположить, что процессы ремоделирования, запускаемые данным фактором, начинаются довольно рано и обусловлены избыточной функциональной нагрузкой на дыхательные пути, возникающей во время обострения заболевания.

Также особый интерес представляет изучение генетических аспектов влияния VEGF на патогенез БА. Установлено, что VEGF – это секретируемый белок (сигнальным пептидом в структуре VEGF являются первые 26 аминокислотных остатков), и ген, кодирующий VEGF человека, представляет собой восемь экзонов, разделенных семью интронами [167]. В организме человека VEGF может быть представлен четырьмя изоформами (VEGF121, VEGF165, VEGF189 и VEGF206), образующимися в результате альтернативного сплайсинга гена VEGF [140, 167]. При этом в клетках, секретирующих VEGF, чаще встречается изоформа VEGF165 (это гомодимер с молекулярной массой 45 кДа) [138]. В спокойном состоянии изоформы VEGF служат для клетки своеобразным депо этого фактора роста. Высвобождение их из клетки происходит при расщепления плазмином в области С-конца с образованием биологически активного фрагмента. При этом наиболее оптимальными свойствами обладает VEGF165 [140].

Но при этом важно отметить, что особое влияние на развитие БА оказывают однонуклеотидные замены в геноме пациентов, так называемые полиморфные варианты генов. Доказано их значительное влияние на

фенотип заболевания, а также они могут предопределять клиническую форму данной патологии (темпы прогрессирования, частоту обострений, чувствительность к фармакотерапии, тяжесть течения и др.) [58, 128]. При этом гены цитокинов, таких как *VEGFA*, обладают чрезвычайно высокой степенью полиморфизма [64]. Так, установлено, что полиморфизмы *rs3025020* и *rs3025039* гена *VEGFA* ассоциированы с повышенным риском развития БА ( $p = 0.001$  и  $p = 0.011$ , соответственно). При этом *T*-аллели данных полиморфизмов значительно чаще встречаются среди больных БА, по сравнению со здоровыми людьми ( $p = 0,001$ , соответственно) [202]. А полиморфные варианты генов не только способствуют формированию специфических аллелей генов, но и вносят существенный вклад в фенотипические различия течения одних и тех же нозологических форм у носителей разных вариантов того или иного гена [64]. Также в работе Esposito S. и соавторов была установлена ассоциация *VEGFA-rs833058CT* полиморфизма с риском возникновения БА ( $p = 0,05$ ) и рецидивирующей обструкции верхних дыхательных путей ( $p = 0,04$ ) [143]. В исследовании Lachheb J. и соавторов (2008) доказана ассоциация полиморфизмов  $+936 C > T$  (*rs3025039*) и  $-634 G > C$  (*rs2010963*) с тяжестью течения БА [97]. Установлено, что однонуклеотидные полиморфизмы *rs833058* и *rs4711750* гена *VEGFA* также ассоциируются с тяжестью заболевания, показателями функции внешнего дыхания и бронхиальной гиперреактивностью [98].

Дальнейшие исследования в данном научном направлении показали, что знание полиморфизмов гена *VEGFA* у пациента с БА поможет не только вовремя диагностировать заболевание, но и индивидуализировать его терапию. В работе Balantic M. и соавторов показано, что существует связь между носителями различных полиморфизмов гена *VEGFA* и ответом на проводимую больным терапию. Установлено, что пациенты, являющиеся гомозиготами *AA* по полиморфизму *rs2146323 A > C* гена *VEGFA* не

отвечают контролем над заболеванием при применении антилейкотриеновых препаратов [99]. В то время, как носители *TT*-полиморфизма *rs833058 C > T* гена *VEGFA* быстрее достигают контроля над БА при применении ингаляционных кортикостероидов, чем гетерозиготные *CT* или гомозиготные *CC* носители данного полиморфизма [99]. Продолжение исследований в данном направлении представляет большой практический интерес.

### **1.2.2. Фактор роста эндотелия сосудов и атопический дерматит: клинические и генетические аспекты**

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные в нашей стране и за рубежом, патогенез АД до конца еще не изучен. Доказано, что важную роль в развитии заболевания играют дезрегуляция Th1/Th2 клеток, дефекты кожного барьера и влияние факторов окружающей среды, включая аллергены и микробы. Однако, помимо инфильтрации воспалительными клетками, гистологическая картина поражений кожи, происходящих в процессе заболевания, свидетельствует не только о наличии отека, но и репаративных процессах, проявляющихся в виде фиброза и ангиогенеза, а, следовательно, указывает на участие факторов, способствующих повышению эндотелиальной проницаемости и прогрессированию заболевания. Особое значение при этом играет VEGF - это многофункциональный провоспалительный цитокин, который в 50 000 раз сильнее, чем гистамин, повышает проницаемость эндотелия сосудов и играет важную роль в ангиогенезе. Роль данного цитокина в различных фазах развития заболевания до конца не изучена, хотя установлено, что у пациентов с АД отмечается повышенный синтез VEGF в коже и высвобождение в кровотоки пациентов [90, 165, 168].

Причем установлено, что значения VEGF в сыворотке крови коррелируют с выраженностью клинических показателей (величиной

SCORAD) и степенью тяжести заболевания у обследованных пациентов [91, 136].

В исследовании Zhang Y и соавт. также было показано, что у больных АД отмечается повышенная продукция VEGF, по сравнению со здоровыми людьми. Кроме того, установлено, что 121 изоформа VEGF способствует повышению проницаемости кровеносных сосудов и поддержанию эритемы и отека в очаге поражения при АД [160].

Синтезируется данный фактор роста различными клетками врожденного и адаптивного иммунитета, экстрацеллюлярного матрикса, а также самими эндотелиальными клетками, являющимися основным источником ангиогенных факторов, которые активируют или ингибируют специфические рецепторы и, следовательно, влияют на внутриклеточные сигнальные пути [216].

При исследовании содержания VEGF в роговом слое кожи у больных АД было установлено значительное повышение его экспрессии, по сравнению со здоровыми лицами. Причем выявлена сильная корреляционная зависимость уровня VEGF с величиной эритемы и отека у больных, и слабая - с показателями эксориации, ксероза и зуда. Также показано, что значения VEGF коррелируют с трансэпидермальной потерей воды и содержанием воды в коже. Поэтому авторами предложено считать уровень VEGF маркером для оценки степени выраженности острых воспалительных реакций при поражении кожи у больных с АД [122, 136].

Также особую роль VEGF и его рецепторы играют в процессах сосудистого ремоделирования. Они способствуют повышению проницаемости сосудов, а, следовательно, прогрессированию хронического аллергического воспаления в коже больных АД [266].

Важно отметить, что дегрануляция тучных клеток сопровождается повышенным выбросом VEGF и происходит в основном под воздействием – IL-9. При этом установлено, что у пациентов, страдающих АД, отмечается

повышенная экспрессия рецепторов IL-9 и его концентрация в очагах поражения кожных покровов при АД. В то время, как в сыворотке крови больных концентрация IL-9 не отличается от нормы. Эти результаты предполагают, что функциональные взаимодействия между IL-9 и другими иммунными клетками могут привести к высвобождению VEGF и способствовать инициированию и распространению воспаления в кожных покровах людей с АД [155].

По данным исследований Jarvicallio A. et al., в пораженной и непораженной коже у больных АД выявлено повышение числа тучных клеток и увеличение количества нервных волокон, что может способствовать секреции кератиноцитами цитокинов и усилению зуда. Установлено, что фактор роста нейронов повышает уровень VEGF в нейрочитах и стимулирует тем самым ангиогенез в условиях ишемии. А VEGF в свою очередь является ключевым фактором ангиогенеза и оказывает нейротрофическое действие. При этом доказано, что нейротрофины вызывают повышение экспрессии VEGF через индукцию гипоксия-индуцирующего фактора-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), способствуя тем самым поддержанию хронического воспаления в очаге поражения [46].

Изучению полиморфизма VEGF, ассоциированного с риском развития АД, посвящен ряд научных исследований [94]. Однако до сих пор до конца не изучено влияние генетических факторов на предрасположенность к развитию данного заболевания и выраженность клинических проявлений у больных.

Принимая во внимание тот факт, что в литературе представлены лишь отдельные разрозненные данные о роли VEGF в патогенезе аллергических заболеваний, исследование данного фактора и его генетических аспектов у детей с БА и АД представляет большой клинический и научный интерес.

### **1.3. Трансформирующий фактор роста – характеристика и функциональная значимость его полиморфизмов при аллергических заболеваниях**

Трансформирующий фактор роста  $\beta$  (англ. *Transforming growth factor beta*) — это белок, который не только отвечает за контроль над процессами эмбрионального развития, репродукции, формирования нервной и костной ткани, но и регулирует механизмы дифференцировки, пролиферации, подвижности и адгезии различных клеток, а также является основным фактором в поддержании иммунологической толерантности. Являясь представителем большого семейства, включающего в себя более чем 40 молекул со схожей структурой (активины, ингибины, костный морфогенетический белок, анти-мюллеровы гормоны, декапентаплегический белковый фактор и VG-1) TGF $\beta$  является первым исследованным цитокином. Он синтезируется практически во всех клетках и тканях организма. Впервые он был выделен из тромбоцитов в начале 80-х годов XX в. [219]. Существуют различные изоформы данного фактора (1, 2 и 3), которые, несмотря на то, что обладают идентичными свойствами, кодируются уникальными последовательностями на разных хромосомах, при этом пептидные структуры их очень похожи. Белковые предшественники TGF $\beta$ 1 закодированы в цепи ДНК как крупные молекулы, состоящие из 390 аминокислот, тогда как TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 содержат по 412 аминокислот. При этом каждая из данных изоформ включает в себя участок-предшественник активного белка LAP (ассоциированный с латентностью пептид), N-концевой сигнальный пептид, состоящий из 20—30 аминокислот, который необходим для секреции из клетки, а также последовательность из 112—114 аминокислот в C-концевой области, которая становится зрелой молекулой TGF $\beta$  после протеолитического отщепления от LAP. Для активации TGF $\beta$  из данного комплекса задействованы сывороточные протеиназы (например, плазмин), которые, адсорбируясь на поверхности макрофага в том месте, где

предшественник  $TGF\beta$  через его лиганд тромбоспондин-1 связан с рецептором CD36, осуществляют каталитическую реакцию. При этом важно отметить, что запускают данный процесс и активируют макрофаги, способствуя не только активации плазмиды, но и поглощению с помощью эндоцитоза связанных с IgG латентных комплексов  $TGF\beta$ , секретирующихся плазмидитами, воспалительные стимулы, воздействующие на клетку. В результате чего макрофаги секретируют в межклеточную жидкость значительное количество активного  $TGF\beta$ . Созревший белок  $TGF\beta$  является димером и образует молекулу массой 25 кДа, которая за счет связывания с рецепторами  $TGF\beta$  RI, -II и -III реализует свои функции – активирует клеточные сигнальные пути: MAPK киназа, Smad с большим числом факторов транскрипции, PP2A фосфатаза, PI3K киназа, белки семейства Rho и другие.

Изоформа  $TGF\beta$ 1 экспрессируется преимущественно в иммунной системе и продуцируется различными типами лимфоцитов и клеток стромы. Установлено, что в норме  $TGF\beta$ 1 регулирует клеточную пролиферацию, дифференцировку и ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса [45]. Однако необходимо отметить, что при воздействии на иммунную систему преобладают его ингибирующие эффекты. Причем плеiotропный, аутокринный и паракринный эффекты  $TGF\beta$ 1 различны в тимусе и периферическом кровотоке. В проведенных ранее экспериментальных работах на мышах было установлено, что на периферии  $TGF\beta$  путем активной иммуносупрессии Th1- и Th2-клеток и активации регуляторных T-клеток и Th17-клеток способствует опосредованной T-клетками аутоиммунной толерантности. Тогда как в тимусе, напротив, он ингибирует развитие натуральных регуляторных (супрессорных) T-клеток и стимулирует дифференцировку CD8<sup>+</sup> T-клеток и T-клеток натуральных киллеров [45]. При этом особое значение имеет  $TGF\beta$ , который синтезируется T-клетками и находится в плазме крови, данный цитокин оказывает супрессирующее влияние на дифференцировку Th-клеток 1-го и 2-го типов, тем самым

осуществляя контроль над процессом воспаления [45]. Также данный фактор усиливает синтез белков межклеточного матрикса, коллагена, активирует нейтрофилы, способствует новообразованию соединительной ткани и сосудов. В исследованиях, проведенных *in vivo*, показано его ангиогенное действие и способность к индукции образования грануляционной ткани [45]. А также он играет важную роль в процессе заживления ран и физиологическом восстановлении структуры тканей при повреждении [218]. Однако необходимо помнить, что  $TGF\beta 1$  также может блокировать переход клеточного цикла через фазу G1 и активировать процессы апоптоза в клетках нашего организма.

Уровень  $TGF\beta 1$  в крови здоровых людей варьирует в пределах от 0,5 до 80 нг/мл и не зависит от пола, однако отмечается изменение его концентрации у пациентов различного возраста. Так, согласно данным Y. Okamoto с соавт., уровень данного цитокина у взрослых людей значительно ниже ( $40,3 \pm 17,7$  нг/мл), чем у детей до 14 лет ( $61,7 \pm 18,5$  нг/мл), т.е. отмечается его обратная корреляционная зависимость с возрастом пациентов. Высокий уровень  $TGF\beta$  найден в тромбоцитах и костной ткани, *in vitro* он продуцируется клетками многих типов [106]. В настоящее время уровень данного цитокина рассматривается как биомаркер ряда патологических процессов, таких как онкопатология, аутоиммунные, воспалительные заболевания, фиброз различных тканей, поэтому измерение концентрации  $TGF\beta 1$  в кровотоке и тканях имеет не только важное клиническое, но и прогностическое значение [72].

В последние годы особое внимание ученых привлекает изучение генетических аспектов влияния полиморфизмов гена  $TGF\beta 1$  на патогенез аллергических заболеваний у детей.

Ген  $TGF\beta 1$  локализован на 19 хромосоме и содержит 7 экзонов и значительное количество интронов. В настоящее время в данном гене идентифицировано 5 значимых однонуклеотидных полиморфизмов.

Установлено, что измененный уровень цитокина, обусловленный генетическими поломками, может быть не только следствием заболевания, но и его причиной. Ученые предполагают, что причиной генетически детерминированной активности цитокина и, следовательно, его связи с различными патологическими процессами является значительная выраженность полиморфизма данного гена. Показано, что высокопродуцирующий генотип *TGFβ1* является фактором риска развития аутоиммунного гепатита у детей, а в сочетании с другими цитокинами – хронической нефропатии трансплантата и многих других патологий [34].

А результаты исследования зарубежных ученых показали, что нарушения в сигналинге белка  $TGF\beta$  могут быть причиной аномального ответа клеток иммунной системы человека на распространенные пищевые аллергены и аллергены окружающей среды, а, следовательно, приводить к развитию различных форм аллергии [235]. Поэтому особый интерес представляет исследование изменений уровня  $TGF\beta1$  в сыворотке крови, а также генетических аспектов его наследования у детей, страдающих аллергическими заболеваниями.

### **1.3.1. Трансформирующий фактор роста $\beta1$ и бронхиальная астма: клинические и генетические аспекты**

Оказывая значительное влияние на иммунологические процессы,  $TGF\beta1$  принимает активное участие в регуляции аллергического воспаления при БА. Данный цитокин индуцирует хемотаксис целого ряда клеток, в том числе макрофагов, Т-лимфоцитов, а также обладает противовоспалительным и иммуносупрессивным действием, играя ключевую роль в поддержании гомеостаза иммунного ответа. Доказательством этому является ряд исследований, проведенных в нашей стране и за рубежом.

Так, согласно данным S. Isajevs, иммунорегуляторное влияние TGFβ1 осуществляется активацией пула Т-лимфоцитов и возрастанием числа CD8+-клеток [124]. Причем у пациентов с тяжелой бронхолегочной патологией, имеющих повышенное содержание TGFβ1 в сыворотке крови, обнаружено повышение плотности CD8+-клеток, локализующихся суб- и интраэпителиально [57].

А также его участие в иммуномодулирующих процессах подтверждается выявленной достоверной отрицательной корреляционной связью ( $r = -0,52$ ,  $p = 0,024$ ) между этим ростовым фактором и показателем IL-8 в лаважной жидкости у больных с тяжелыми формами БА [29].

Однако, несмотря на значительную роль данного фактора в патогенезе аллергических бронхолегочных заболеваний, корреляционных зависимостей между концентрацией TGFβ1 с уровнем IgE (иммуноглобулин E) и относительным количеством эозинофилов у детей с БА не было установлено [15].

Воспалительный процесс, развивающийся при БА под воздействием различных эндогенных и экзогенных факторов, вызывает не только функциональные, но и морфологические изменения во всех структурах бронхов, таким образом, приводя к ремоделированию дыхательных путей. При этом значительные изменения происходят в процессах метаболизма соединительной ткани: не только нарушаются процессы миграции, созревания структурных клеток, их развития, дифференцировки, но и происходит десквамация эпителиальных клеток, их повреждение и дезорганизация, которая в конечном итоге приводит к гипертрофии гладких мышц, склерозированию субэпителиальной части базальной мембраны, сопровождающихся инфильтрацией просвета и стенки бронхов эозинофилами, тучными клетками и Т-лимфоцитами. Немаловажную роль в этом сложном процессе играет TGFβ1 [76]. Данный цитокин является мультифункциональным фактором роста, регулирующим процессы

ремоделирования дыхательных путей посредством влияния на синтез белков экстрацеллюлярного матрикса, прежде всего, коллагена I и III типов, протеогликанов, фибронектина. Причем TGF $\beta$ 1 может одновременно тормозить расщепление коллагена путем снижения уровня протеаз и повышения содержания тканевых ингибиторов протеаз, являясь одним из основных факторов индукции фиброза и склероза в дыхательных путях. Эта морфологическая перестройка в стенке бронха приводит к появлению частично обратимой или необратимой обструкции дыхательных путей, лежащей в основе патогенеза БА. В многочисленных исследованиях, проведенных учеными, доказан профиброзный эффект TGF $\beta$ 1.

Так, в работе Геренг Е.А. и соавт. установлено, что у пациентов с фенотипом «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» отмечается повышение содержания данного фактора роста в клетках бронхиального эпителия (0,526 (0,437–0,688) усл. ед.), по сравнению с контрольной группой (0,223 (0,098–0,395) усл. ед.) [ $p = 0,002$ ]. Причем у больных тяжелой формой БА высокие показатели экспрессии рецепторов к TGF $\beta$ 1 в бронхиальном эпителии сочетаются с утолщением базальной мембраны и большей плотностью клеток фибробластического ряда [57]. Важно отметить, что увеличение количества TGF $\beta$ 1 в супернатанте лаважной жидкости у пациентов с тяжелой формой БА сопряжено со значительным снижением показателей индекса Тиффно у обследованных пациентов [29].

В исследованиях, проведенных на мышах, также было показано, что снижение уровня TGF $\beta$  отмечается у животных со значительно более низкой степенью развития перибронхиального фиброза и меньшей толщиной гладкой мускулатуры бронхиальной стенки [26].

Установлено, что уровень TGF $\beta$  в крови детей, имеющих его положительную экспрессию в эндотелии бронхов, по иммуноцитохимическому анализу был достоверно выше, чем в группе детей, у которых данный фактор не был идентифицирован, а также в сравнении с

группой контроля. Что свидетельствует о высокой диагностической значимости данного фактора для определения группы риска по развитию необратимых морфофункциональных изменений в бронхолегочной системе [26].

Также доказано, что  $TGF\beta 1$  обеспечивает фенотическое превращение коллагенобластов в миофибробласты, их активацию и угнетение апоптоза миофибробластов, приводя тем самым к гипертрофии первичной гладкомышечной клетки бронхов, а, следовательно, способствуя прогрессированию бронхообструкции в периоде обострения БА [54]. Кроме того, персистирующее хроническое воспаление в дыхательных путях приводит к значительному снижению пластичность системы внешнего дыхания: формируется эластическая деструкция паренхимы, приводящая к уменьшению упругой отдачи легкого [52]. Доказательством этому являются исследования D.S. Postma, H.A.M. Kerstjens, показавшие, что ремоделирование бронхолегочной системы, возникающее в ходе воспаления, существенно изменяет механические свойства стенки дыхательных путей, способствуя формированию необратимого компонента обструкции. Одним из клинических проявлений данного процесса является снижение реакции на бронхолитики у больных с БА и ХОБЛ. Важно отметить, что эти изменения происходят за счет избыточной продукции  $TGF\beta 1$ , способного менять низкоуровневую регуляцию  $\beta 2$ -адренорецепторов у больных с хронической бронхолегочной патологией и способствовать снижению реакции на  $\beta 2$ -агонисты [76].

Воспалительная реакция при БА также сопровождается миграцией клеток воспаления, активацией провоспалительных цитокинов и секрецией матриксразрушающих протеиназ. Известно, что процесс воспаления в норме завершается восстановлением поврежденных тканей, однако при дисрегуляции процессов репарации запускаются механизмы «неадекватного» пневмофиброза и прогрессирует разрастание соединительной ткани в легких.

Рецидивирующие воспалительные процессы, сопровождающиеся повреждением эпителиальной ткани, в конечном счете, истощают способность к реэпителизации. В данном случае формируется неадекватный процесс заживления, который ослабляет внеклеточный матрикс и стимулирует перемещение фибробластов в пораженные участки. При этом необходимо отметить, что в норме в эндотелии бронхов данный цитокин не определяется, а его появление во внеклеточном матриксе является прогностически неблагоприятным фактором развития патологического фиброза и потенцирования апоптоза бронхиальных эпителиальных клеток. Доказательством активного участия  $TGF\beta$  в процессе фиброза является значительное повышение его концентрации в экстрацеллюлярном пространстве и бронхоальвеолярной жидкости у пациентов с идиопатическим фиброзом легких. В экспериментальных работах на животных определена высокая экспрессия данного фактора в альвеолярных макрофагах в острую фазу воспаления и в эпителиальных клетках бронхиального дерева в позднюю стадию легочного фиброза [150, 170].

Важно отметить, что помимо всего перечисленного,  $TGF\beta 1$  также стимулирует образование VEGFA, способствуя тем самым хронизации аллергического воспаления.

А изучение генетических аспектов влияния  $TGF\beta 1$  на развитие БА выявило ряд клинически значимых полиморфизмов. Так, установлено, что у пациентов с неаллергической формой БА отсутствуют редкие гомозиготы  $GG$  по полиморфизму *rs1800470* гена *TGF $\beta$ 1*, а риск формирования заболевания повышен у носителей  $AA$  и  $AG$  генотипов ( $p=0,025$ ). Выявлено, что риск развития неаллергической БА возрастает при наличии данных генотипов по сравнению с группой контроля (ОШ = 1,631; 95 %-й ДИ = 1,37-1,94) и с другой группой больных (ОШ = 1,128; 95 %-й ДИ = 1,08-3,17) [25].

### 1.3.2. Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ и атопический дерматит: клинические и генетические аспекты

В настоящее время установлено, что большое значение в патогенезе АД имеет дисфункция иммунной системы, ее функциональный иммунодефицит, проявляющийся нарушением активности Т-системы иммунитета, дисбалансом продукции сывороточных иммуноглобулинов с увеличением уровня IgE [23]. Причем особую роль в модулировании данного патологического процесса играют иммунологические сдвиги, обусловленные изменениями состояния простагландинов и цитокинов, в том числе и факторов роста.

TGF $\beta 1$ , оказывая разнообразное влияние на иммунную систему, выступает преимущественно как супрессорный фактор, сдерживающий развитие аллергической реакции. Так как его мишенями служат разнообразные клетки, и экспрессия его высокоаффинного рецептора широко распространена, он оказывает разнообразные эффекты: подавляет гемопоэз, синтез воспалительных цитокинов, изменяет ответ лимфоцитов на IL-2, 4 и 7, предотвращает формирование цитотоксических NK- и Т-клеток и мн. др.

Модулирующее действие TGF $\beta 1$  на иммунную систему больных АД показано в исследованиях зарубежных ученых, установивших, что данный цитокин также ингибирует продукцию интерферона- $\gamma$  и фактора некроза опухоли  $\alpha$ , индуцированных в клетках иммунной системы через Smad2/3. Авторы предполагают, что модуляция сигнального пути TGF $\beta$ /Smad может быть использована для разработки новых методов терапии АД [233, 234].

В исследованиях, проведенных на мышах, было показано, что подкожное введение TGF $\beta 1$  макроскопически подавляло экзематозное поражение кожи и сопровождалось снижением уровня иммуноглобулина IgE в сыворотке крови. Гистологический анализ, проведенный в ходе данной работы, установил, что TGF $\beta 1$  значительно ингибирует инфильтрацию воспалительными клетками, такими как тучные клетки и эозинофилы в коже

мышей с АД. Введение данного фактора роста также способствует снижению синтеза интерферона- $\gamma$  у мышей. Причем ингибирующее действие TGF $\beta$ 1 на пораженные кожные покровы длилось не менее 1 недели после прекращения лечения. Эти данные свидетельствуют о том, что TGF $\beta$ 1 способен не только подавлять аллергическое воспаление кожи при АД, но и обладает значительным терапевтическим потенциалом в отношении данного заболевания [250].

Интересно, что в ходе исследования уровня TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови у грудных детей, проведенного зарубежными учеными, было показано, что значения данного фактора у пациентов с АД оказались значительно ниже по сравнению с контрольной группой. При этом не обнаружено статистически значимой корреляционной зависимости между уровнем данного цитокина в сыворотке крови и значениями объективного индекса SCORAD, а также показателями общего IgE. Возможно, это связано с тем, что иммунопатогенез атопии в раннем детском возрасте более сложный, чем у детей старшей возрастной группы [220].

Также одним из ключевых факторов в патогенезе АД является нарушение эпидермального барьера, которое проявляется сухостью кожных покровов, нарушением гомеостатических реакций, что способствует воспалению и увеличению проникновения аллергенов и раздражителей. Барьерная дисфункция в большинстве своем вызвана несбалансированной активацией протеиназ, снижением церамидов и ненасыщенных жирных кислот, а также измененной экспрессией структурных белков [31]. Хронический, длительно протекающий воспалительный процесс приводит к необратимым морфологическим изменениям в виде резкого утолщения базальной мембраны с нарушением микроциркуляции и развитием склероза, и, как следствие, ремоделированием кожных покровов. Данный процесс сопровождается высвобождением цитокинов, хемокинов и в том числе факторов роста, действующих в качестве межклеточных посредников в

процессе реализации паракринной связи.  $TGF\beta 1$  синтезируется эпителиальными клетками, макрофагами, фибробластами и является основным модулятором процесса заживления после повреждения тканей [62].

Исключительно важную роль трансформирующего фактора роста  $\beta$  в функционировании иммунной системы иллюстрируют результаты исследования его гена. Так, в работе Stavric K. и соавт. показано, что генотип  $TGF\beta\ cdn25C:G$  предрасполагает к развитию АД, а генотип  $TGF\beta\ cdn25/G:G$  оказывает протективный эффект в отношении данной патологии у детей, проживающих в Македонии [141].

В исследовании Arkwright PD с соавт. установлена ассоциация  $+869\ C > T$  [кодон 10] и  $+915\ G > C$  [кодон 25] полиморфизмов гена  $TGF\beta 1$  с риском развития АД [101]. Причем данные зарубежных коллег свидетельствуют о том, что некоторые вариации генов  $TGF\beta$ , участвующих в иммунной регуляции, связаны с биологическими и клиническими фенотипами и могут увеличить риск последующего развития БА у детей с проявлениями АД на первом году жизни [145].

Однако, принимая во внимание то, что в научной литературе представлены только единичные результаты исследований роли  $TGF\beta$  в патогенезе АД у детей, причем некоторые из них достаточно противоречивы, необходимо продолжение исследования данного цитокина у пациентов с аллергическими заболеваниями.

#### **1.4. Матриксные металлопротеиназы - общая характеристика группы и функциональная значимость полиморфизмов их генов**

В последнее время внимание ученых привлекает мультигенное семейство структурно и функционально сходных Zn- и Ca-зависимых эндопептидаз, получившее название матриксных металлопротеиназ (ММП). Особенностью данных ферментов является их способность модифицировать

не только все известные компоненты экстрацеллюлярного матрикса, но и многие нематриксные молекулы [36]. Первые упоминания о ММР появились в 1962г., когда Дж. Гросс и Ч.М. Лэпир в процессе исследования метаморфоза хвоста головастика было установлено наличие фермента, отвечающего за деградацию коллагена (получившего название промежуточная коллагеназа). Позднее в 1966 г. такие же вещества были выделены из человеческой кожи и беспозвоночных планарий [36]. В конце 80-х (учитывая способность данных ферментов гидролизовать основные белки матрикса) было предложено использовать название матриксных металлопротеиназ или матриксинов. Позднее Международный союз биохимии и молекулярной биологии закрепил за семейством уникальное название металлопротеиназ и присвоил каждому ферменту определенный номер в соответствии с классификацией ферментов.

В настоящее время изучено более 60 ММР, которые обладают одинаковыми свойствами: содержат  $Zn^{2+}$  в активном центре и используют  $Ca^{2+}$  для стабилизации молекулы; гидролизуют один или несколько компонентов матрикса и базальных мембран; имеют сходную доменную структуру; секретируются в виде проферментов, пропептидный домен которых содержит консервативную последовательность, отвечающую за активацию про-ММР; каталитическая активность данных ферментов подавляется специфическими тканевыми ингибиторами [36].

Если говорить о структуре ММР, то она представлена сигнальным пептидом (необходимым для успешной секреции из клетки), пропептидным участком (при отщеплении которого ММР активируется), каталитическим доменом (имеющим координационные связи с катионом цинка каталитического центра и шарнирным регионом) и концевым гемопексиноподобным доменом, содержащим центр связывания субстрата (за исключением ММР-7, которая не содержит данного домена). Также необходимо отметить, что в каталитическом домене ММР-2 и ММР-9

имеется дополнительный участок включения, имеющих структуру, идентичную фибронектину 2-го типа, что, скорее всего, и обеспечивает высокое сродство данных ферментов к мембранным компонентам [51].

В организме человека ММР продуцируются нормальными или трансформированными клетками (моноцитами, фибробластами, нейтрофилами, эндотелиальными и эпителиальными клетками, макрофагами, остеокластами, хондроцитами, кератиноцитами).

Принимая во внимание субстратную специфичность, все ММР в настоящее время классифицированы в несколько подсемейств [104, 256] (табл. 1).

Таблица 1

## Классификация металлопротеиназ

| Группа  | Субстрат   |
|---|--|
| Коллагеназы [ММР1, 8, 13]<br>(интерстициальная коллагеназа, нейтрафильная коллагеназа, коллагеназа) | Коллагены (I, II, III, IV, IX, X, XIV), желатин, активатор плазминогена-2, агрекан, перлекан, большой тенасцин-С и фибронектин, стеонектин   |
| Желатиназы [ММР2, 9]<br>(желатиназа А, В, коллагеназа IV типа)                                      | Коллаген I, IV, V, X типов, желатин, ламинил V   |
| Стромелиезины [ММР3, 10, 11]<br>(Стромилезин 1, 2, 3)   | Желатин, ламинил, проММР-1, протеогликаны, коллаген, III, IV, V, IX, X типов десмоплакин, Е-кадгерин, А1-антипротеаза, $\alpha$ 1-антитрипсин, казеин, IGF-связывающий белок-1                         |
| Мембраносвязанные матриксные металлопротеиназы [ММР14-17, 24, 25]                                   | Про-ММР-2, желатин, коллагены, про-ММР-2, фибронектин, большой тенасцин-С, энактин, ламинин, агрекан, перлекан, GST-TNF, коллаген III  |
| Неклассифицированные матриксные металлопротеиназы [ММР7, 12] (матрилизин, металлоэластаза)          | Желатин, про-ММР-1, фибронектин, эластин, коллаген IV, желатин, к-эластин, казеин, $\alpha$ 1-антитрипсин, витронектин, ламинин, энтактин, протеогликан, GST-TNF, МВР, фибриноген, фибрин, плазминоген |

|   |   |
|---|---|
| Неклассифицированные матриксные металлопротеиназы [MMP20, 21, 23A, 23B, 27, 28] | Коллаген IV типа, гамма2-цепи ламинина 5, нидоген-1, большая изоформа тенасцина-С, фибронектин, олигомерный матриксный протеин хряща (COMP) и агрекан, IGFBP-3, Амелогенин, Белки нервной ткани, NCAM-1, NRG1 |
|---|---|

Немаловажное значение играет деградация под действием MMP таких веществ, как плазминоген, фибрин, фибронектин, казеин, кор-протеин, а также предшественников цитокинов и самих цитокинов, факторов свертывания. Также MMP принимают участие в активации ряда факторов роста (VEGFA, TGF, EGFR и др.), что способствует ремоделированию как тканей, так и внеклеточного матрикса [51].

Эти ферменты принимают участие в процессах морфогенеза, резорбции, дифференцировки и пролиферации клеток, репарации тканей, неоангиогенезе, эмбриогенезе, адгезии, миграции клеток, опухолевой трансформации и метастазировании. Сейчас активно изучается их роль при ревматоидных артритах, эндометриозе, аутоиммунных поражениях кожи, атероматозе, аневризмах аорты, периодонтитах, язвообразовании и др. [16, 77, 129].

В обычных условиях MMP секретируются в виде неактивных ферментов, а превращение в активные формы происходит под действием сериновых протеиназ, плазмина, урокиназоподобного активатора плазминогена, эластазы и других денатурирующих агентов (мочевина, Ds-Na, NaSCN) и модификаторов (иодоацетат, 4-аминофенилмеркурий ацетат (APMA), окисленный глутатион), а также при тепловом воздействии, кроме того, MMP способны активизировать друг друга [32, 41, 75]. Контроль над активностью MMP осуществляют тканевые ингибиторы металлопротеиназ [32]. По мнению R. Pankar, специфическое взаимодействие между MMP и тканевыми ингибиторами является ключевым моментом регуляции

ремоделирования тканей. У млекопитающих существует четыре известных ТИМП, которые ингибируют все MMP в соотношении 1:1, посредством сильной ковалентной связи [16, 41, 230].

Особая роль в нашем организме принадлежит MMP-20, или энамелизину, который отвечает за разрушение органического матрикса эмали зубов для последующего его замещения минеральными веществами. При этом установлено, что экспрессия данной MMP зависит от TGF $\beta$ 1 и его рецептора (TGFBR1), активация данного фактора роста усиливает секрецию MMP20. Кроме того доказано, что полиморфный вариант rs1711437 гена MMP-20 ассоциирован со старением почек. А в ходе ряда исследований, проведенных на крысах, было показано, что MMP-20 играет определенную роль при поражении спинного мозга [16, 77, 129]. Однако исследований особенностей наследования данной металлопротеиназы у детей с аллергическими заболеваниями не проводилось.

Важно помнить, что снижение активности MMP приводит к избыточному накоплению коллагена в интерстициальной ткани, что является одним из ключевых моментов в развитии фиброза. Выявлено увеличение содержания металлопротеиназ разных групп в смывах из бронхов у больных эмфиземой легких. Увеличение активности металлопротеиназ играет важную роль в поддержании хронического воспалительного процесса у больных БА и ХОБЛ (хронической обструктивной болезнью) [42]. Особая роль при этом принадлежит MMP9.

MMP9 (желатиназа В) секретируется преимущественно кератиноцитами, моноцитами, лейкоцитами, макрофагами и фибробластами в виде профермента с молекулярной массой 92 кДа. Субстратами для MMP9 являются такие вещества, как денатурированный коллаген I типа (желатин), фибриноген, витронектин, нативные коллагены типов IV, V, VII, X, XI, IL-1 и энтактин, который соединяет ламинин и коллаген IV типа. MMP9 принимает участие в процессах ремоделирования тканей и репарации,

мобилизации матрикс-связанных факторов роста и процессинга цитокинов, а также поддержании воспаления (при этом уровень ее экспрессии контролируется цитокинами/хемокинами, включая TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухолей-альфа) [77, 129]. В ряде исследований была показана роль MMP9 в патогенезе аутоиммунного воспаления при таких заболеваниях как ревматоидный артрит, синдром Шегрена, идиопатический увеит и системная красная волчанка. Данный фермент способствует клеточной инвазии в базальную мембрану клеток, принимающих участие в патогенезе эндометриоза, артрита и рака (а именно Т-клеток, мононуклеарных фагоцитов, синовиальных фибробластов, метастатических опухолевых клеток). Более того, чрезмерная экспрессия MMP9 отмечалась при различных патологических состояниях, характеризующихся избыточным фиброзом, включая идиопатический легочный склероз, бронхиальную астму, экспериментальный билиарный фиброз, хронический панкреатит [16].

Обладая способностью разрушать денатурированный коллаген, эта желатиназа запускает целый каскад реакций дегградации внеклеточного матрикса. При этом MMP9 действует синергично с другими металлопротеиназами. А находясь в перичеллюлярном пространстве, данный вид MMP может создавать обратные связи между белками матрикса посредством фибронектиноподобного фрагмента [75].

Кроме того при повреждении тканей происходит активация нейтрофилов с повышенной секрецией MMP9 [22]. При этом установлена прямая корреляционная связь между числом нейтрофилов в тканях раны и активностью MMP9, и обратная зависимость между количеством фибробластов и активностью данного фермента. По мнению М.И Кузина и Б.М. Косточенко (1990), это характеризует антагонизм между процессом острого воспаления и репаративного гистогенеза [22]. Важно отметить, что ключевая роль в синтезе MMP отводится эозинофилам и тучным клеткам, а

повышенная экспрессия данного фермента может привести к формированию выраженной воспалительной реакции в нижних дыхательных путях [41].

Еще одной особенностью данного фермента является способность MMP9 деградировать коллаген IV и V типа. Принимая во внимание то, что коллаген IV входит в состав базальной пластинки, а коллаген V в состав интерстициальной ткани, носительство различных полиморфных вариантов гена, ответственного за синтез MMP9, может привести к повышению риска развития различных видов легочной патологии [71].

MMP9 в обычных условиях содержится в тканях в незначительных количествах, а процесс транскрипции данной протеазы находится под контролем ростовых факторов, таких как эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов, цитокинов – TNF  $\alpha$ ,  $\beta$ , IL-1, IL-6, мелатонина, гормонов и нейропептидов, физического и оксидантного стресса [68, 254]. Гормоны, цитокины, метаболические изменения через специфические клеточные рецепторы также влияют на экспрессию и секрецию MMP, так, например, установлено, что  $\gamma$ -интерфероны ингибируют активность MMP9, а TGF $\beta$ , напротив, активирует ее продукцию [37]. Так, по данным W. Kim и соавторов, уровень циркулирующего TGF $\beta$  находится в прямой корреляционной зависимости с концентрацией MMP9. В то время, как повышение экспрессии MMP9 приводит к активации TGF $\beta$ , а, следовательно, принимает участие в профибротической реакции [51]. Доказательством данному факту является значительное повышение экспрессии MMP9 в культурной среде альвеолярных макрофагов у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом или БА [51].

Также MMP9 играет ведущую роль в ангиогенезе. Данный фермент способствует растворению стромальных элементов, тем самым прокладывая путь для растущих капилляров. Так в эксперименте, проведенном на мышцах, было показано, что у особей с удаленным с помощью генных технологий геном, отвечающим за продукцию MMP9, происходит задержка

неоангиогенеза. Однако добавление очищенного фермента этим мышам приводит к восстановлению данной функции [32, 68, 71].

#### **1.4.1. Металлопротеиназы и бронхиальная астма: клиническое и генетическое значение**

ММР играют важную роль в механизмах воспалительных заболеваний нижних дыхательных путей. Известно, что в норме в альвеолярной и бронхиальной жидкости присутствуют ММР2, ММР14, а уровень ММР7, ММР9 и ММР12 повышается при патологии [41]. Так, например, у больных БА отмечается повышение содержания ММР1, ММР2, ММР3, ММР8 и ММР9 в бронхоальвеолярной жидкости и мокроте [41]. Что еще раз доказывает роль ММР в патогенезе деструктивных процессов в легочной ткани, а также ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, ассоциированного с воспалением бронхолегочной системы [41]. Исследование, проведенное на больных БА, показало, что между тяжестью заболевания и активностью ММР9 в бронхоальвеолярной жидкости имеется прямая корреляционная зависимость. А в работе P. D. Vermeer также было показано, что при бронхиальной астме регистрируется экспрессия ММР9 в эпителий, альвеолярные клетки, подслизистый слой бронхов. Причем степень экспрессии ММР9 напрямую коррелирует с числом эозинофилов [41].

В работе Соболева С.С. и соавт. установлена гиперэкспрессия коллагена IV типа, сочетающаяся с существенным повышением содержания тканевого ингибитора ММР1 и уровня ММР2, а также уменьшением более, чем в 2 раза уровней ММР9 ( $p < 0,05$ ) в сыворотке крови больных, по сравнению с группой контроля. При этом у больных с односторонним поражением бронхолегочной системы выраженность этих изменений была меньше по сравнению с контролем. Однако стоит отметить, что у детей с длительным течением БА значимое повышение уровней коллагена IV типа и существенное повышение содержания тканевого ингибитора ММР1 и

увеличение MMP2 не сопровождалось изменением концентрации MMP9. Возможно, нарушения баланса коллагена IV типа и данных матриксных металлопротеиназ указывают на преобладание фиброза в процессе активного ремоделирования легочной ткани [65].

Также установлено, что MMP9 может наравне с уровнем FeCO служить маркером, отражающим интенсивность воспаления дыхательных путей у курильщиков с персистирующей БА. Увеличение продолжительности и интенсивности курения у больных БА усиливает воспаление дыхательных путей (негативную роль в этом процессе играет, в том числе, увеличение концентрации в сыворотке крови MMP9). В исследовании Гноевых В.В. и соавторов было показано, что в выборке курильщиков отмечается четкая взаимосвязь между уровнем MMP9 и выраженностью усталости до теста с 6-минутной ходьбой (ТШХ) и в конце ТШХ, а также одышки до ТШХ и в конце нагрузочного ТШХ. Причем уровень MMP9 коррелирует с интенсивностью воспаления дыхательных путей ( $1,2 \pm 0,19$  в контрольной группе до  $2,9 \pm 0,70$  нг/мл;  $p < 0,05$ ). Кроме этого, корреляционный анализ, проведенный в обследованной выборке курильщиков, выявил прямую связь ( $p < 0,05$ ) между уровнем MMP9 и выраженностью одышки до ТШХ ( $r = 0,37$ ) и в конце ТШХ ( $r = 0,39$ ), усталости до ТШХ ( $r = 0,40$ ) и в конце ТШХ ( $r = 0,40$ ), а также показателем пачко-лет ( $r = 0,42$ ) [35].

Многими исследователями была доказана роль MMP9 в процессах ремоделирования тканей при БА. Так, Ко F.W. и соавт. было проведено исследование уровня MMP9 у больных с БА различной степени тяжести и здоровых лиц. Учеными было установлено, что неконтролируемая среднетяжелая и тяжелая астма сопряжены с большей активностью протеолитических ферментов, а, следовательно, несмотря на аналогичное воспаление дыхательных путей, это может играть значительную роль в ремоделировании бронхов и ускорить процессы снижения функции легких у этих пациентов [80].

Maria P. Foschino Barbaro и ее коллегами было проведено изучение концентрации MMP9, pH, уровня NO в выдыхаемом воздухе, а также воспалительных клеток в мокроте у больных, страдающих БА. Результаты исследования показали значительное увеличение выдыхаемого MMP9 у больных по сравнению с контролем. При этом отмечено, что максимальные концентрации MMP9 отмечались у больных с тяжелой БА, по сравнению с пациентами, страдающими легкой и среднетяжелой формами заболевания. Повышение MMP9 наиболее часто регистрировалось у больных с нейтрофильным воспалением дыхательных путей. Также была установлена корреляция между выдыхаемой MMP9 и процентом нейтрофилов в мокроте, ОФВ1, выдыхаемых оксида азота и pH. Полученные результаты свидетельствуют о значимой роли MMP9 в патогенезе ремоделирования дыхательных путей при астме, а также позволяет предположить, что мониторинг MMP9 в выдыхаемом воздухе может помочь не только контролировать текущее ремоделирование дыхательных путей, но и распознавать тяжелые формы БА для того, чтобы вовремя провести соответствующий выбор терапии [134]. Данный факт подтверждают и исследования, проведенные K. Grzela и соавт. [80, 159]. При этом важно отметить, что повышение концентрации MMP9 в выдыхаемом воздухе сопровождается увеличением его концентрации в сыворотке крови больных БА [80, 112].

Установлено, что у пациентов, страдающих БА, VEGF и MMP9 являются медиаторами воспаления и ремоделирования дыхательных путей. В исследовании Lee K.S. и соавторов было показано, что уровни VEGF и MMP9 значительно выше в мокроте пациентов с астмой, чем у здоровых контрольных субъектов, и существует значительная корреляция между уровнями VEGF и MMP9. А ингибирование рецептора VEGF снижает экспрессию MMP9. Эти данные свидетельствуют о том, что VEGF

регулирует секрецию MMP9 и играет решающую роль в иницировании и поддержании астмы [261].

Установлено, что у пациентов с БА отмечаются более высокие концентрации MMP9 в индуцированной мокроте, по сравнению со здоровыми людьми [118].

Принимая во внимание значимую роль активности MMP в ремоделировании дыхательных путей, учеными были предприняты попытки поиска новых путей лечения данной патологии, основанные на применении ингибиторов MMP. Однако, сами MMP могут играть диаметрально противоположную роль в организме человека. Установлено, что низкие физиологические уровни данных протеаз необходимы для поддержания тканевого гомеостаза и иммунологической защиты, в то время, как повышение экспрессии MMP может привести к деструкции ткани и нарушению ее функции, способствуя тем самым появлению нежелательных эффектов и ухудшению течения заболевания [41]. Так, во второй половине XX в. широкое распространение получила концепция нарушения баланса в системе протеолиза–антипротеолиза как одна из причин развития эмфиземы легких и хронического бронхита. Нарушение равновесия между протеолитическими ферментами и их ингибиторами может, при определенных условиях, привести к избыточному действию протеолитических ферментов, разрушению тончайших межальвеолярных перегородок и слиянию отдельных альвеол в более крупные эмфизематозные полости с постепенным уменьшением общей дыхательной поверхности легких. MMP в легких лизируют такие молекулы экстрацеллюлярного матрикса, как факторы роста, хемокины, протеиназы и молекулы клеточной адгезии [2]. Поэтому особое значение имеет изучение особенностей наследования данных протеаз.

Гены MMP картированы на хромосомах 1, 8, 11, 14, 16, 20 и 22, большинство из них расположены кластером на длинном плече 11й

хромосомы (MMP1, MMP3, MMP7, MMP8, MMP10, MMP12, MMP13 и MMP20) [2].

По данным исследования, проведенного К. Nakashima и соавт., было показано наличие ассоциации некоторых полиморфных вариантов гена *MMP9* с риском развития атопической БА у детей. В рамках данной работы были изучены 17 полиморфных вариантов данного гена у 290 детей, страдающих БА, а также у 638 здоровых лиц. Установлено, что полиморфизмы  $2127G > T$  и  $5546G > A$  (*R668Q*) гена *MMP9* были достоверно связаны с риском развития атопической астмы у детей ( $p = 0,0032$  и  $0,0016$ , соответственно). Изучение полиморфных вариантов  $1831T > A$  и  $1590C > T$  гена *MMP9*, показало, что наследование *1590T*-аллели может приводить к увеличению транскрипционной активности гена *MMP9* *in vivo*, а вариант  $1831T > A$  мало влияет на его транскрипционную активность [81].

Исследование ассоциации полиморфных вариантов гена *MMP9* у детей, страдающих БА, в Мексике показало, что SNPs *rs2274755*, *rs17577* и *rs3918249* полиморфные варианты были связаны с риском развития БА. При этом наиболее значимые ассоциации из представленных выше: *rs2274755* (OR = 2.10, 95 % CI 1.31–3.39,  $p = 0,001$ ) и *rs17577* (OR = 2,07, 95 % CI 1,29–3,30,  $p = 0,001$ ). Следует отметить, что оба полиморфных варианта связаны с атопической астмой (OR = 2.38, 95 % CI 1.44–3.96,  $p = 0,0005$ ). При этом у лиц женского пола наиболее часто регистрировалась связь между полиморфизмом *rs3918249* гена *MMP9* и риском развития заболевания (OR = 1,66, 95 % ДИ 1,14–2,43,  $p = 0,007$ ). Эти данные еще раз подтверждают, что полиморфизмы *MMP9* могут играть определенную роль в предрасположенности к БА в детском возрасте [201].

Полученные нашими коллегами данные также свидетельствуют о важной роли *MMP9* в патогенезе БА и диктуют необходимость дальнейшего исследования связи между генотипами и уровнем экспрессии *MMP9* в дыхательных путях.

## 1.4.2. Металлопротеиназы и

### атопический дерматит: клиническое и генетическое значение

Атопический дерматит является продуктом сложного взаимодействия генетики, окружающей среды и иммунной системы, и значительный компонент этой сложной этиологии может быть приписан нарушению эпидермального барьера кожи. К сожалению, роль матриксных металлопротеиназ в патологии АД в настоящее время недостаточно изучена. MMP уже давно ассоциируются с воспалением, и их экспрессия воспалительными клетками хорошо известна. В норме они не экспрессируются в коже, за исключением ремоделирования тканей, связанного с ростом и заживлением ран. При АД потенциальными источниками MMP являются иммунные клетки, такие как эозинофилы, мононуклеарные клетки, тучные клетки и клетки Лангерганса. Биопсийные исследования у пациентов с АД показали наличие MMP2 в клетках эпидермиса, а MMP9 в дендритных клетках кожи, пораженной аллергенами [84].

В исследовании, проведенном Devillers A.C. и соавторами, также установлено, что MMP9 играет важную роль в поддержании аллергического воспаления при АД. Было показано, что у пациентов, страдающих АД, отмечается значительное повышение уровня MMP9 в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой [130].

В работе J.I. Harper и соавт. было показано, что MMP, и в частности MMP8 и MMP9, представляют собой важный потенциальный компонент патологии АД. Исследования смывов с пораженных АД участков кожи установили, что в образцах, полученных от больных, активность MMP в 10-24 раза больше, чем у нормальной контрольной кожи ( $p < 0,02$ ) и в пять раз больше, чем на участках непораженной АД кожи, взятых у пациентов с данным заболеванием. Ряд проведенных автором исследований (желатиновая цимография и анализ антительного массива) позволил выявить существенные

уровни MMP8 и MMP9 в образцах, полученных у больных детей, при этом отмечались более низкие уровни MMP10 и тканевых ингибиторов металлопротеиназ 1 и 2; а также низкие уровни MMP1 (фибробластной коллагеназы), MMP3 (стромелизина 1) и тканевого ингибитора MMP4. Полученные результаты исследований еще раз доказывают высокую значимости MMP в патогенезе АД [84].

В работе T. de Oliveira Titz и соавт., напротив, показано отсутствие статистически значимых различий между уровнем сывороточной MMP9 у пациентов с АД и пациентов контрольной группы. Также не было установлено наличие связи между концентрацией данной протеазы в сыворотке крови и тяжестью течения заболевания. Это еще раз доказывает сложный иммунопатогенез АД и оправдывает непрерывный поиск специфических терапевтических мишеней для этого широко распространенного и продолжительного кожного заболевания, оказывающего влияние на качество жизни людей [157].

В работе A. C. A. Devillers и соавт. также было показано, что матриксная металлопротеиназа-9 играет значимую роль в инфильтрации воспалительных клеток в различных тканях при АД. Установлено, что уровни MMP9 в плазме крови у пациентов, страдающих данным заболеванием, были значительно выше по сравнению с контролем. При этом отмечалась корреляционная зависимость между концентрацией MMP9 и количеством лейкоцитов в периферической крови больных. Однако, достоверной корреляции между уровнями MMP9 в плазме крови и индексом SCORAD, как маркером тяжести заболевания, установлено не было. В данной работе показано, что особое влияние на концентрацию MMP9 оказывает наличие у больного сопутствующей патологии респираторного тракта, а именно БА и аллергического ринита. У больных, имеющих сочетанную патологию, величина MMP9 в сыворотке крови значительно выше [130].

Кроме того, значимость MMP9 в патогенезе АД подтверждают результаты иммуногистохимического исследования, показавшие наличие MMP9-позитивных реакций в кератиноцитах и дермальных макрофагах ( $p < 0,01$ ). Принимая во внимание тот факт, что именно MMP9 является коллагеназой, способной индуцировать изменения в тканях путем разрушения белков, которые составляют внеклеточный матрикс и базальную мембрану, можно предположить, что именно MMP9 способствует формированию отека тканей, который облегчает миграцию клеток в участок воспаления при АД [127].

Недавние исследования показали, что некоторые MMP, особенно MMP8 и MMP9, значительно выше у пациентов с АД [130, 205]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что MMP действительно могут играть определенную роль в патологии АД и что ингибирование активности MMP, либо непосредственно специфическим ингибитором, либо косвенно путем снижения его экспрессии, может быть эффективным терапевтическим методом противодействия ремоделированию (склерозу) кожи, связанному с данной патологией. В исследованиях наших корейских коллег было показано значительное влияние местного воздействия морских вод на состояние иммунореактивности MMP9. Результаты, полученные в этом исследовании, свидетельствуют о том, что купание во всех четырех различных типах морских вод, собранных вокруг Республики Корея, обладает противовоспалительными, антиоксидантными эффектами, благоприятными системными и местными иммуномодулирующими, активными цитопротекторными антиапоптотическими эффектами, в том числе ингибирующими эффектами в отношении MMP [103].

В исследовании Margarete Niebuhr и соавторов, напротив, были описаны внутренние изменения в кератиноцитах у пациентов с АД по сравнению с контрольной группой, сопряженные со снижением способности этих клеток продуцировать IL-6, IL-8, CCL-20 и MMP9, а, следовательно,

меньшим ответом на стимуляцию TLR-2, что может способствовать более повышенной восприимчивости этих пациентов к кожным инфекциям с *S. Aureus* [162].

Также установлено, что при экзематозных поражениях кожи отмечается повышение не только проколлагена-3 и тенасцина С, но и MMP9, как маркера ремоделирования. При этом отмечается корреляция числа IL-17+ Т-клеток с тенасцин с-экспрессирующими клетками и MMP9. Интересно, что также зарегистрирована корреляционная зависимость между количеством присутствующих IL-17+ Т-клеток и количеством эозинофилов, экспрессирующих MMP9 ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,03$ ), что еще раз подтверждает их роль в ремоделировании кожи [237].

В настоящее время дискутируется вопрос о роли кератиноцитов в индукции зуда при АД. По мнению зарубежных ученых, продукция связанных с зудом медиаторов индуцируется при стимуляции экстрактами *Dermatophagoides farinae*. Было показано, что клещевые сериновые протеазы клещей также индуцировали продукцию эндотелина-1 и MMP-9, способствовавших индукции зуда при АД [265]. Установлено, что кроме способности разрушать компоненты внеклеточного матрикса, MMP играют важную роль в миграции клеток, а также расширении нейритов. Причем эти эндогенные пептидазы участвуют в проникновении нервных волокон в базальные мембраны, а аксональные направляющие молекулы, в свою очередь, модулируют экспрессию и ферментативную активность MMP. Эти механизмы играют важную роль в патогенезе внутриклеточного зуда. В исследовании, проведенном М. Tominaga и соавт., было показано, что в культивированных нейронах уровни транскриптов MMP2 были значительно увеличены, в то время как такие изменения не наблюдались в отношении MMP9. При этом блокирование активности MMP9 молекулой ингибитора не оказывало ингибирующего действия на проникновение нервных волокон [158].

Исследования генетических аспектов влияния ММР на патогенез АД не многочисленны. В работе Margaritte-Jeannin P. и соавт. было показано взаимодействие между полиморфизмом *rs2287807* гена *COL5A3* и *rs17576* гена *MMP9*, которое предрасполагает к развитию экземы у пациентов, страдающих БА [239]. При этом изучение полиморфного локуса *C-1562T* (*rs3918242*) в гене *MMP9* показало наличие повышенной транскрипционной активности у носителей *T*-аллели, сопряженное с повышенным уровнем данной протеазы в плазме и мРНК *MMP9* в лейкоцитах по сравнению с носителями генотипа *C/C* [28]. Однако работ, посвященных изучению особенностей наследования генов ММР при АД, не так много, поэтому проведение исследований в данном научном направлении представляет большой практический интерес.

## **1.5. Протеомный профиль сыворотки крови больных с аллергическими заболеваниями – современный взгляд на проблему диагностики и прогнозирования**

### **1.5.1. Основные понятия и задачи протеомики**

Протеомика (англ. proteomics) — это наука, исследующая особенности белкового состава биологических объектов, а также структурно-функциональные свойства белковых молекул. Впервые данное название появилось в 1997 году и происходит от двух слов «протеин» и «геномика». К основным задачам протеомики можно отнести: поиск, определение, разделение, количественное и качественное определение белковых молекул, содержащихся в биологических образцах (биоптатах, спинномозговой жидкости, сыворотке крови, моче и др.). Причем исследование протеомного профиля можно проводить на разных стадиях патологического процесса, на фоне различных видов проводимой терапии [53].

Совокупность всех белков организма носит название «протеом». Впервые данный термин был предложен австралийским исследователем Марком Уилкинсом в 1994 году. Однако, протеом – это величина не постоянная, так как любые молекулярно-биологические процессы, происходящие в живых организмах, находят отражение в нем. И если мы знаем, что количество генов человека примерно равно сорока тысячам, то посчитать количество белков, которые вновь синтезируются, довольно-таки сложно. Так как многие из этих белков взаимодействуют друг с другом, не только приводя к образованию совершенно новых молекул, но также и оказывают влияние на синтез совершенно других белковых молекул. Также не стоит забывать о том, что значительное количество факторов как внешней, так и внутренней среды может оказывать влияние на экспрессию генов, а, следовательно, приводить к изменению белкового состава организма. Поэтому для идентификации белков по молекулярной массе и обнаружения их фрагментов необходимо использование современных методов диагностики, например, таких как масс-спектрометрия и биоинформатика, которые с использованием специализированных программ позволяют обработать огромные объемы данных и получить подробную информацию о строении организма человека. Изучение протеома - чрезвычайно сложная задача, требующая значительных усилий многих ученых. И в настоящее время на стыке биохимии, биологии и медицины появляются новые методы протеомного анализа, исчерпывающие базы данных, содержащие последовательности всех белков человека, а также их протеолитических ферментов, полученных в стандартных условиях. 23 сентября 2010 года в Сиднее объявлено о запуске нового проекта «Протеом человека», который является логичным продолжением проекта «Геном человека». Расшифровка протеома очень важна для идентификации новых молекулярных маркеров, позволяющих не только диагностировать заболевание, но и найти причину развития патологического процесса. В настоящее время уже составлены протеомы биологических жидкостей человека и лабораторных животных

(белковая карта человеческой слюны у представителей разных этнических групп, различного пола и возраста, позволившая идентифицировать более тысячи белков). Ведутся многочисленные исследования по изучению белков крови, слезной жидкости, биоптатов тканей.

Однако, принимая во внимание то, что при развитии заболевания функционирование всех клеток и тканей нашего организма сопровождается отклонением от физиологического белкового профиля нормального здорового человека, только подробный анализ данных изменений позволит определить скрытые и латентные белки-«предвестники» многих заболеваний, и кроме того, оценить эффективность применяемых методов терапии.

Поэтому главной целью клинической протеомики является обнаружение нового белкового или пептидного биомаркера, который связан с определённым заболеванием. Сравнение протеомов здорового и больного пациентов позволит выявить конкретные белки, потенциально вовлечённые в развитие болезни. Эти белки могут в дальнейшем стать мишенями для новых лекарственных препаратов, а анализ протеома использоваться как метод ранней диагностики [33].

В настоящее время, благодаря протеомному анализу, определены многие маркеры болезней Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, рака толстой кишки, поджелудочной железы и молочной железы, а также диабета. Однако дальнейшие исследования в данной области могут значительно расширить этот список заболеваний [3].

Исходя из всего выше сказанного, можно сделать вывод, что протеомика, будучи наукой фундаментальной, незаменима при решении ряда практических медицинских и прикладных научных задач. Исследование протеомного профиля может предоставить врачу достаточные объёмы информации, необходимые для верной постановки диагноза либо оценки рисков развития заболевания у пациентов [53].

### 1.5.2. Протеомный анализ

Если говорить о технической стороне протеомного анализа, то его условно можно разделить на несколько этапов: подготовка проб, разделение белков протеома и их дальнейшая идентификация посредством современных методов масс-спектрометрии.

После выделения белков из биоматериала происходит их разделение различными методами. Одним из распространенных методов является двумерный электрофорез в полиакриламидном геле (2-dimensional gel electrophoresis; 2DE), основанный на разделении совокупности белков на основании их заряда и массы. Выполняется он в два этапа: на первом белки перемещаются в геле в зависимости от значения своих изоэлектрических точек, на втором - происходит их разделение по молекулярной массе (за счет их солюбилизации додецилсульфатом натрия). В итоге все белки выглядят как окрашенные разной интенсивности пятна на геле.

Еще одним вариантом разделения белковых молекул является жидкостная хроматография (liquid chromatography; LC). При выполнении данного метода перед нанесением на хроматографическую колонку белки протеома обычно расщепляют на пептиды протеазой (например, трипсином), так как высокоэффективная жидкостная хроматография плохо совместима с высокомолекулярными соединениями.

Идентифицировать белки в исследуемых образцах можно с помощью метода масс-спектрометрии. Данный физико-химический метод основан на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации компонентов исследуемой пробы. Полученный в ходе исследования масс-спектр позволяет определить молекулярные массы соединений, их состав и структуру. Важно отметить, что использование данного метода позволяет одновременно считывать с образца несколько сотен белков.

В настоящее время применяется две основные модификации масс-спектрометрии - это MALDI-TOF и SELDI-TOF. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight) — это времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация. Впервые данный метод был внедрен в конце 80-х годов прошлого века в качестве современной технологии, позволяющей анализировать протеины в составе сложных комплексов биологического материала. MALDI-TOF масс-спектрометрия позволяет быстро идентифицировать молекулярные массы и гетерогенность малых количеств белков и пептидов, однако в связи с тем, что в основе метода лежит десорбционная ионизация белков с нарушением ионных взаимодействий, но сохранением дисульфидных связей, с помощью данного метода нельзя определить некоторые значимые группировки, такие как сиаловые кислоты, ионизированные молекулы белков, сульфатные группы и др. А для анализа пептидной смеси возможно использование совместно жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization time-of-flight) — это времяпролетная поверхностно-активированная лазерная десорбция / ионизация масс-спектрометрия. В отличие от MALDI-TOF для данного метода характерна упрощенная стадия разделения белков: часть белков биоматериала связывается с хроматографическим носителем, а остальные удаляются путем промывки, после чего чип помещается в масс-спектрометр, и регистрируются очищенные и обессоленные белки. Однако идентифицировать данные белки, к сожалению, невозможно. Поэтому, несмотря на высокую производительность SELDI-TOF (способность обработки сотен образцов и более за короткое время), он является менее чувствительным и специфичным (80-85 %) по сравнению с MALDI-TOF масс-спектрометрией (95-97 %).

Важно отметить, что благодаря разработке сверхчувствительных и селективных детектирующих систем, методов концентрирования, созданию

высокоэффективных и стабильных колонок и повышению надежности аппаратуры в целом, современные методы хроматографии позволяют определять биомаркеры на уровне  $1 \cdot 10^9 - 10^{15}$  г (от нано- до фемтограммов). Еще одним преимуществом данного метода является необходимость в малом количестве пробы для анализа, достаточно миллиграмма или его доли. Также необходимо отметить, что его можно использовать и при неинвазивном отборе таких проб, как пот, слюна, моча, слезы, выдыхаемый воздух, волосы и др.) [48].

В настоящее время данная методика широко используется для идентификации биологических маркеров при различных патологических состояниях. Также протеомные исследования позволяют идентифицировать белковые молекулы и для диагностики и мониторинга аллергических заболеваний. А использование чувствительных количественных протеомных методов предоставляет возможность не только идентифицировать биомаркеры БА, АД, крапивницы, но и в ряде случаев прогнозировать течение заболевания.

### **1.5.3. Протеомные методы в диагностике аллергических заболеваний**

В настоящее время исследования в области протеомики аллергических заболеваний находятся на ранней стадии развития. Однако в аллергологии протеомный анализ представляется перспективным направлением, позволяющим значительно расширить знания специалистов о молекулярных механизмах патогенеза многих хронических аллергических заболеваний. А применение данного метода исследования даст возможность не только идентифицировать новые белковые молекулы, но и определить биологические маркеры ряда заболеваний. Изучение этих веществ в дальнейшем позволит определить мишени для воздействия лекарственных средств, а также создаст предпосылки для развития в аллергологии современных подходов доказательной молекулярной медицины.

Наиболее распространенной среди аллергических заболеваний в настоящее время является БА. К сожалению, несмотря на значительную распространенность данного заболевания, до сих пор не разработаны современные методы, позволяющие ее достоверно диагностировать у пациентов раннего возраста, в связи с тем, что у них достаточно сложно объективно оценить состояние бронхолегочной системы с помощью стандартных способов обследования. Поэтому применение метода протеомного анализа, возможно, позволит идентифицировать белковые биомаркеры для диагностики и мониторинга не только БА у маленьких пациентов, но и других аллергических заболеваний.

За последние годы было проведено всестороннее изучение потенциальных биомаркеров данных заболеваний, определяемых в различных средах, начиная от инвазивных методов (например, бронхоскопии) и заканчивая неинвазивными способами (такими как тестирование конденсата выдыхаемого воздуха) [105]. Благодаря многим из них удалось приблизиться к разработке современных методик ранней диагностики аллергических заболеваний. Наибольшее количество работ посвящено исследованию компонентов крови и клеточных элементов.

Так, в исследовании Hamsten С. и соавт. был проанализирован широкий спектр белков плазмы крови у детей с определенными фенотипами БА для выявления потенциальных маркеров заболевания. С помощью протеомного анализа были определены 362 белка у 154 детей с персистирующей и интермиттирующей формами БА, а также в группе контроля. После скрининга для дальнейшего исследования были отобраны: хемокиновый лиганд 5 (CCL5), гемопозитическая простагландин-D-синтаза (HPGDS) и рецептор нейропептида C1 (NPSR1). Установлено, что уровень NPSR1 был значительно повышен у детей с легкой формой БА по сравнению с группой контроля, в то время как у пациентов с персистирующим течением заболевания отмечались более низкие уровни CCL5 и HPGDS [207].

В другой работе протеомный анализ периферических лимфоцитов установил, что отмечается увеличение 13 и уменьшение 12 белковых пятен в Т-лимфоцитах больных БА, по сравнению со здоровыми лицами. Среди идентифицированных белков отмечалась повышенная экспрессия РНК фосфодиэстеразы 4С и тиоредоксин-2, и снижение экспрессии РНК глутатион-S-трансферазы М3. Причем полученные данные подтверждены с помощью метода ПЦР-анализа [210]. А протеомное исследование мононуклеарных клеток периферической крови больных, страдающих БА, показало увеличение экспрессии внутриклеточной активированной митогеном белковой киназы (МКК3) более чем в 3,65 раза по сравнению с контрольной группой [83].

Также с помощью протеомного анализа было проведено исследование 24 образцов крови детей, страдающих БА, в возрасте 3 и 11 лет, а также 12 образцов здоровых детей 5 и 9 лет. В ходе данной работы выявлены ранговые различия 444 исследованных белков. В дальнейшем для идентификации протеинов, специфичных для развития БА, была изучена корреляция с факторами риска развития данного заболевания, такими как наличие предшествующих клинической симптоматики астмы экземы или свистящих хрипов у детей до 1 года. В результате проделанной работы были установлены 2 белка, имеющих достоверные ранговые отличия у пациентов с БА и контрольной группы – это эритропоэтин, уровень которого был достоверно ниже по сравнению с контролем ( $0.750 \pm 0.048$  МЕ/л и  $0.898 \pm 0.035$  МЕ/л;  $p = 0,006$ ), и растворимый белок GP130, содержание которого было выше у детей с БА ( $302 \pm 13$  нг/мл и  $270 \pm 8$  нг/мл;  $p = 0,041$ ). Другие 2 белка (галактин-3 и эотаксин-3) не отличались у пациентов обеих групп. Причем установлена корреляционная зависимость между уровнем эритропоэтина и проявлениями экземы, а sGP130 - с наличием свистящих хрипов на первом году жизни у больных. Авторы предполагают, что уровень

эритропоэтина и sGP130 в плазме связаны с риском развития БА у детей и могут являться ранними маркерами данного заболевания [135].

Rhim T. и соавт. исследован протеомный профиль сыворотки крови больных легкой формой БА до воздействия аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.p.) и после его ингаляционного введения. Оказалось, что после контакта с D. p. у обследованных пациентов отмечается повышение С3-фракции комплимента и снижение уровня гамма-фибриногена в сыворотке крови. Следовательно, данные изменения можно считать предикторами формирования бронхообструкции у людей, страдающих БА и имеющих сенсibilизацию к клещам домашней пыли [200].

Интересное исследование по изучению влияния наличия БА у матери на белковые профили плацентарной и пуповинной крови было проведено V.E. Murphy и соавт. Оказалось, что 14 протеомных пика плацентарной крови имели отличия у женщин с БА и пациенток, не страдающих данным заболеванием. Причем 4 пика были более выражены, а шесть менее выражены в пуповинной крови детей, рожденных от больных матерей. Важно отметить, что имелись достоверные отличия протеомного профиля пуповинной крови у детей мужского и женского пола (значительно различались 4 плацентарных и 3 протеиновых пика) [242].

Также зарубежными учеными проведен ряд исследований на мышах, показавших высокую информативность метода протеомного анализа в идентификации биологических маркеров на модели БА и современных методах ее терапии [203, 209].

Несмотря на сложность выполнения, S.E. O'Neil и соавторами изучен протеомный профиль биопсийного материала бронхов больных, страдающих БА, а также описано влияние глюкокортикостероидов на полученные результаты. В ходе исследования в бронхиальных биоптатах испытуемых были выявлены и определены количественные значения более 1800 белков. Причем установлено, что у пациентов, получавших плацебо и

ингаляровавшихся будесонидом выявлены достоверные отличия в протеомном профиле. Авторы предполагают, что протеомный анализ материала бронхиальной биопсии может быть использован не только для выявления и количественной оценки белков с использованием высокочувствительных технологий, но и определения патофизиологических особенностей БА. А количественная протеомика может быть применена для выявления механизмов заболевания, позволяющих провести точную и своевременную диагностику астмы [190].

Исследования протеомного профиля конденсата выдыхаемого воздуха у больных с БА показали, что полученные протеолитические паттерны пептидов также коррелируют с объективными методами обследования больных (показателями спирометрии, содержанием оксида азота в выдыхаемом воздухе) и некоторыми другими маркерами (ЕВС рН, LTB). Было установлено наиболее массивное содержание в конденсате выдыхаемого воздуха таких белков, как цитокератины, альбумин, актин, гемоглобин, лизоцим, дермицин и кальгранулин В. Данные исследования показали, что конденсат выдыхаемого воздуха, несмотря на простоту получения, также содержит белки, которые представляют интерес для будущей неинвазивной диагностики БА [82, 126].

Также зарубежными учеными проведено протеомное исследование индуцированной мокроты у больных, страдающих БА, и здоровых людей. Комплексный масс-спектрометрический анализ выявил более тысячи белков (1126) в мокроте у пациентов с БА, имеющих отличия от группы контроля, среди которых наибольшее значение имели 23 секретированных протеина. Эти белки участвуют в многочисленных биологических процессах, поддержании иммунитета, противовоспалительных реакциях, они являются ферментами, ингибиторами протеаз, метаболитами, транспортными белками, гидролизатами и активаторами васкулогенеза. Сравнительный анализ со здоровыми лицами показал, что наблюдается значительный рост A2 M,

APOA2, ELANE, GPI, S100A8, S100A9 и S100A12-белков у всех пациентов, страдающих БА. Следовательно, можно предположить, что именно эти протеины могут являться диагностическими маркерами данного заболевания [211].

Некоторое количество работ посвящено изучению протеомного профиля у людей, страдающих АД. Так, Y. Park и соавт. провели исследования первичной культуры фибробластов, полученных из очагов поражения у больных с АД. Контрольную группу составили фибробласты, полученные при обследовании здоровых лиц. Методом MALDI-TOF были идентифицированы белки с повышенной экспрессией (белок 4, связывающий FK-506, оптинейрин, аннексин А5, PGM 3), а также 4 белка с посттрансляционными модификациями были определены методом полуколичественно-полимеразной цепной реакции (ПЦР). Также с помощью метода двумерного электрофореза был выделен 31 белок, экспрессия 18 из которых была увеличена по сравнению с контролем, экспрессия 8 белков была снижена и в 5 - были обнаружены посттрансляционные модификации. Следует отметить, что в данном исследовании была показана значительная роль посттрансляционной модификации белков при АД. К дифференциально-значимым белковым молекулам можно отнести промежуточную АТФазу, виментин, архаин и NCC27, а также следует отметить увеличение экспрессии белков PGM3, OPTIN и промежуточной АТФазы, фактора некроза опухоли  $\alpha$  (установленного в макрофагах больных), по сравнению с нормальной кожей [248].

Также исследования, проведенные учеными, позволили установить наличие повышения экспрессии убиквитин-специфичной протеиназы 14 у больных АД, сопряженное со снижением экспрессии цитовиллина-1, изоформы С глутаминазы, изоформы 5 кальдесмона 1, нуклеофосмина-1, хлоридного внутриклеточного канала-4 и эстеразы D. Принимая во внимание тот факт, что данные белковые молекулы не только способствуют адгезии клеток (цитовиллин), входят в состав цитоскелета (хлоридный

внутриклеточный канал 4) и внеклеточного матрикса, но и регулируют апоптоз кератиноцитов и Т-лимфоцитов, можно предположить, что они играют важную роль при цитокинопосредованном воспалении при АД [194].

Также у больных АД был исследован протеомный профиль эозинофилов [117]. Методом 2D-электрофореза у пациентов, страдающих АД, обнаружено больше белковых пятен ( $1310 \pm 58$ ), чем в образцах от здоровых доноров ( $1121 \pm 40$ ). А с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии было идентифицировано 70 белков, 51 из которых имели различия в уровне экспрессии между исследуемыми группами. Важно отметить, что при эозинофилии было выявлено увеличение экспрессии 46 белков, 19 из которых задействованы в передаче сигнала (signalling), 8 - в регуляции метаболизма, 4 - в запуске апоптоза и 3 участвуют в воспалении. А экспрессия 5 белков у больных АД была снижена по сравнению с контролем [117, 253].

Также у больных АД методом 2D-электрофореза с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией был проведен протеомный анализ мононуклеарных клеток из периферической крови. При этом установлены значительные различия в экспрессии 14 белков у обследованных пациентов и в группе контроля. Зарегистрировано увеличение экспрессии белка PTPNB, а также двукратное снижение экспрессии белка  $\alpha$ -SNAB, который участвует в трансмембранном транспорте, у больных АД [89]. Экспрессия белков цитоскелета винкулина и FLNA также снижена в мононуклеарах периферической крови больных АД, а увеличена экспрессия белка PTPNB [48].

Однако исследования протеомного профиля у больных с аллергическими заболеваниями на этом не заканчиваются, так, в 2013 году инициировано многоцентровое исследование, посвященное протеомному анализу сыворотки крови детей, страдающих тяжелой формой БА, а в январе

2016 года стартовало еще одно малоинвазивное исследование, посвященное определению эпидермальных маркеров у пациентов с АД.

Можно сказать, что эволюция открытия биомаркеров привела к совершенно новому подходу в диагностике, основанному на изучении протеинового спектра у пациентов с аллергическими заболеваниями. И, может быть, в дальнейшем это способствует объединению всех открытий в области геномики, протеомики, метаболомики и созданию совершенно нового метода, который поможет врачам не только улучшить раннюю диагностику заболеваний, но и прогнозировать их течение и вовремя назначать адекватное лечение.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – проф., д.м.н. Шлык С.В.), в педиатрическом отделении клиники РостГМУ (зав. отделением – к.м.н. Мальцев С.В.). В исследование также включены больные, которые находились на стационарном лечении в МБУЗ ДГБ №2 г. Ростова-на-Дону.

### 2.1. Дизайн исследования

Реализация поставленной цели и задач исследования осуществлялась в несколько этапов.

На первом этапе проведено одномоментное исследование анамнестических, клинических, лабораторных данных, а также результатов функциональных методов исследования 627 больных с аллергическими заболеваниями. Набор материала осуществляли сплошным методом. В ходе исследования дети были распределены на три группы:

- больные с установленным диагнозом БА (213 человек);
- больные, страдающие АД (209 человек);
- больные, имеющие сочетание БА и АД (205 человек).

Верификация диагноза БА была проведена на основании клиничко-анамнестических данных, а также результатов дополнительных методов исследования в соответствии с действующими клиническими рекомендациями [40].

Критерии включения больных БА в исследование:

- девочки и мальчики в возрасте от 1 месяца до 18 лет с установленным диагнозом БА;

- наличие подписанного пациентом (в возрасте старше 15 лет) или родителями (для детей младше 15 лет) информированного согласия на проведение исследования;

- частота и выраженность симптомов бронхообструкции, степень ограничения физической активности, а также показатели вариабельности ПСВ (пиковой скорости выдоха) и ОФВ1, соответствующие определенной степени тяжести БА [40].

Критерии исключения больных из исследования:

- отсутствие информированного согласия;
- наличие сопутствующей хронической бронхолегочной патологии;
- крайне тяжелое состояние больного, требующее проведения реанимационных мероприятий;
- отказ от проведения необходимых лечебных и диагностических мероприятий.

Пациентам, страдающим АД, диагноз был установлен согласно клиническим рекомендациям «Атопический дерматит у детей» (пересмотр 2016).

Критерии включения данных пациентов в исследование:

- возраст пациентов от 1 месяца до 18 лет;
- наличие сопутствующей патологии неаллергического генеза;
- наличие подписанного пациентом (в возрасте старше 15 лет) или родителями (для детей младше 15 лет) информированного согласия на проведение исследования.

Критерии исключения:

- наличие сопутствующей патологии кожных покровов;

- наличие указания в анамнезе или клинические проявления БА на момент обследования больного;
- отсутствие подписанного информированного согласия;
- отказ от проведения необходимых лечебных и диагностических мероприятий.

В третью группу были включены пациенты, имеющие сочетание АД и БА. При этом критерии включения и исключения, приведенные выше, также учитывались при формировании данной выборки больных.

Всем детям было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. Для выявления факторов риска развития аллергических заболеваний особое внимание в ходе исследования уделялось данным анамнеза жизни: подробно изучался акушерский анамнез, особенности вскармливания на первом году жизни, курение в семье, место проживания (город/сельская местность), количество членов семьи, особенности санитарно-гигиенических условий (наличие бытовых, эпидермальных, грибковых аллергенов и др.), перенесенные инфекционные заболевания, социальные факторы, частота респираторных заболеваний в течение года. Тщательно анализировался анамнез заболевания (продолжительность заболевания, частота приступов бронхообструкции за предшествующий обследованию год, требующих применения бронхолитических препаратов, наиболее значимые аллергены и триггеры, наличие и продолжительность базисной терапии, сопутствующая патология). Особое внимание уделялось аллергологическому анамнезу (наличие/отсутствие эпизодов крапивницы, лекарственной, пищевой аллергии, с чем связано появление первого приступа, отмечается ли связь с временем года, периодом цветения растений, определенными запахами, переменой погоды, контактом с домашними животными, есть ли реакция на бытовые аллергены, связь обострения с эмоциональными факторами, физической нагрузкой, наличие аллергических

заболеваний у мамы, папы, брата, сестры, бабушек и дедушек по отцовской и материнской линиям родства). А также проведен ряд лабораторно-инструментальных исследований (общий и биохимические анализы крови, определение общего и специфических IgE, пикфлоуметрия, спирография). С целью определения уровня контроля у детей, страдающих БА, проводился АСТ-тест. На основании полученных данных определены наиболее значимые клиничко-anamнестические факторы риска развития тяжелого, неконтролируемого течения бронхиальной астмы, атопического дерматита и сочетанного варианта аллергопатологии у детей, разработаны программы прогнозирования степени тяжести заболевания.

На втором этапе исследования для изучения роли цитокинов в патогенезе аллергических заболеваний из пациентов представленных выше были отобраны 205 больных с аллергическими заболеваниями (84 ребенка, страдающих бронхиальной астмой, 49 детей с АД, 75 пациентов, имеющих сочетание БА и АД), не имеющих сопутствующей патологии со стороны других органов и систем, за исключением аллергического ринита. Контрольную группу составили 35 детей I и IIa групп здоровья, сопоставимые по полу и возрасту с основной выборкой, не имеющих в анамнезе указаний на перенесенные ранее аллергические заболевания у себя и у близких родственников. Всем пациентам на данном этапе исследования был проведен забор крови для дальнейшего исследования содержания факторов роста ( $TGF\beta$  и  $VEGFA$ ) и уровня  $MMP9$  в сыворотке с помощью метода иммуноферментного анализа.

Третий этап включал генетические исследования для определения распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов фактора роста эндотелия сосудов ( $C634G$  гена  $VEGFA$ ), трансформирующего фактора роста  $\beta$  ( $Arg25Pro$  гена  $TGF\beta_1$ ), рецептора эпителиального фактора роста ( $2073A >T$  гена  $EGFR$ ) и металлопротеиназ ( $320A >C$  гена  $MMP20$ ,  $837 >C$  гена  $MMP20$  и  $-8202 A >G$  гена  $MMP9$ ). На данном этапе

исследования в работу были включены 152 ребенка с аллергическими заболеваниями (60 детей, страдающих БА, 26 пациентов с установленным диагнозом АД и 66 больных, имеющих сочетание БА и АД). Контрольную группу составили 122 ребенка I и IIa групп здоровья, также сопоставимые по полу и возрасту с группой детей, страдающих аллергическими заболеваниями. Дополнительными критериями исключения для пациентов, вошедших в когорту обследуемых на данном этапе исследования, явились отсутствие сопутствующей патологии (за исключением аллергического ринита), указаний в анамнезе на наличие генетических мутаций и близкородственных браков в предыдущих поколениях, а также клинических проявлений каких-либо аллергических заболеваний в течение всей жизни у себя, а также у близких родственников (мамы, папы, братьев, сестер, бабушек и дедушек). Стоит отметить, что все дети в данной выборке относились к русской этнической группе. Репрезентативность выборки рассчитывали с использованием калькулятора для определения равновесия Харди-Вайнберга, позволяющего рассчитать  $\chi^2$  <http://www.oege.org>. Проведенный сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов позволил выявить ассоциации исследуемых полиморфизмов с риском развития БА и АД у детей, с клиническими формами, тяжестью течения, возрастом манифестации и другими параметрами у обследованных больных, а также провести анализ межгенных взаимодействий, предрасполагающих к развитию различных клиничко-патогенетических вариантов течения аллергических заболеваний.

На четвертом этапе с целью углубленного изучения невоспалительного генеза аллергических заболеваний у детей с тяжелым и среднетяжелым течением заболевания проведено исследование протеомного профиля сыворотки крови. В эту группу из общей выборки были отобраны больные, имеющие самые тяжелые проявления аллергических заболеваний (8 человек, страдающих БА, 6 детей с АД, а также 4 больных, имеющих сочетание

данных нозологий). Данным пациентам проведен забор крови, к образцам которой добавляли коктейль ингибиторов протеаз (*Thermo Fisher Scientific*, США) в пропорции 1:99, аликвотировали и подвергали консервации в низкотемпературном холодильнике при  $-86^{\circ}\text{C}$  до подбора идентичного по полу, возрасту и массо-ростовым параметрам ребенка, относящегося к I и II группам здоровья ( $n = 8$ ). Далее в ходе исследования проводилось попарное сопоставление пятен на электрофореграммах, полученных из разных образцов, с помощью специальной программы компьютерного анализа изображений PDQuest версии 8.0.1. (Bio-Rad, США). В связи с высокой стоимостью и трудоемкостью метода, к нескольким образцам крови больных с аллергическими заболеваниями был подобран один соответствующий ребенок из группы контроля.

На основании полученных в ходе исследований данных проведена разработка программ прогнозирования неконтролируемого и тяжелого течения БА, АД, а также сочетаний БА и АД, основанных на анамнестических данных и результатах молекулярно-генетического обследования пациентов. Полученные программы позволяют не только прогнозировать тяжесть течения заболевания у детей, но и корректировать терапевтическую тактику, оптимизировать подходы к диагностике и лечению больных (рис. 2).

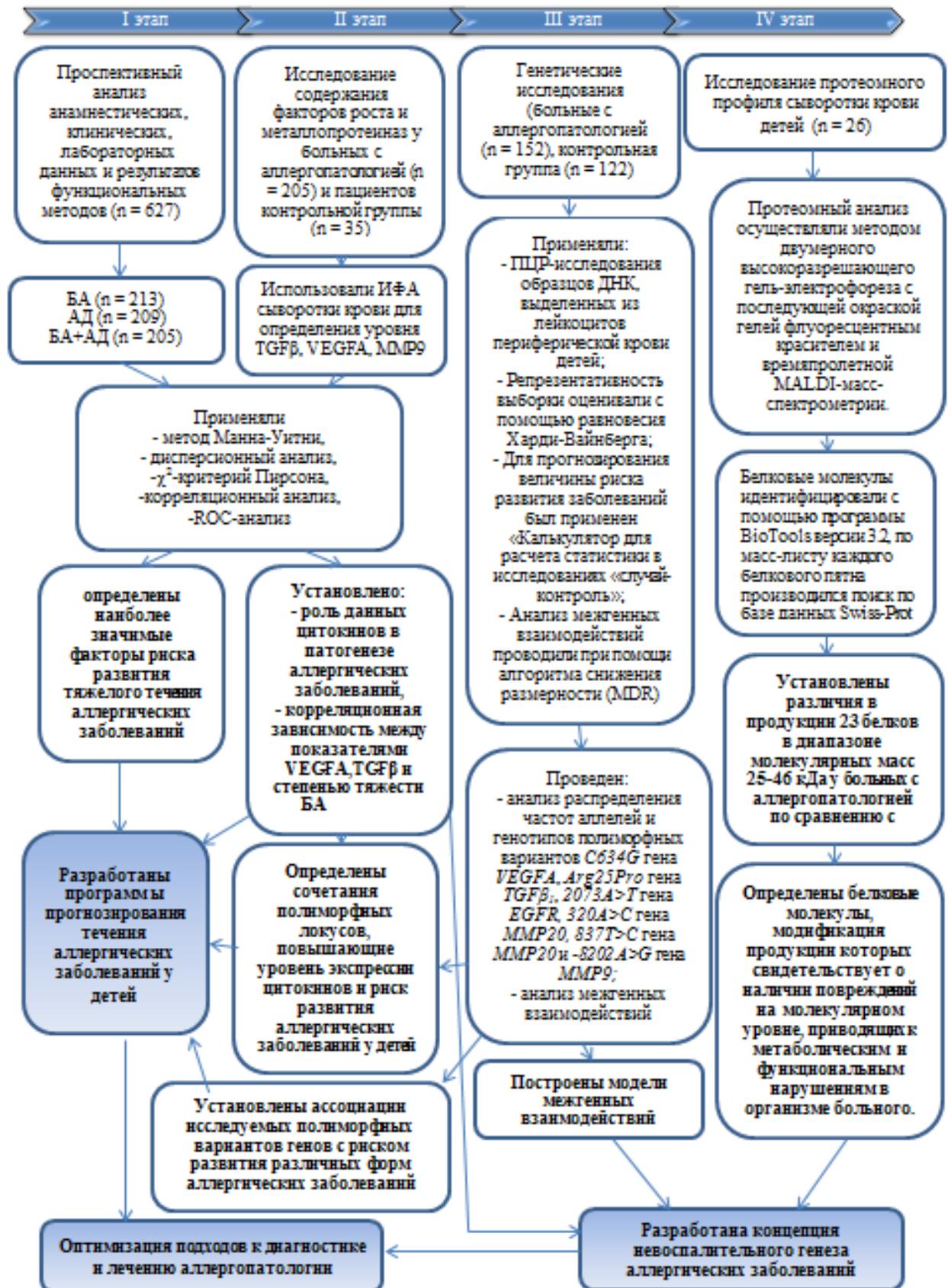


Рисунок 2. Дизайн исследования

## **Исследование фактора роста эндотелия сосудов**

Количественное определение уровня активной формы человеческого фактора роста эндотелия сосудов А (VEGFA) в сыворотке крови проводилось с помощью наборов Human VEGFA Platinum ELISA, производства "Бендер МедСистемс ГмбХ", Австрия (Bender VtdSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2 1030 Vienna, Austria), методом иммуноферментного анализа (ИФА) на многофункциональном счетчике для иммунологических исследований с компьютером и программным обеспечением Multilabel Counter Victor – 2 1420 (Финляндия). Рекombинантный VEGF-рецептор, образцы пациентов, а также стандарт были внесены в соответствующие ячейки планшета, после чего были добавлены биотинилированные моноклональные анти-VEGFA антитела и инкубировались в течение 2 часов при комнатной температуре. Через два часа содержимое ячеек было удалено аспирацией с последующей 6-ти кратной промывкой буфером для промывок, был добавлен биотиновый конъюгат во все ячейки, который инкубировался в течение 1 часа при комнатной температуре (25°C), затем содержимое ячеек было удалено методом аспирации с последующей 6-ти кратной промывкой буфером для промывок. В дальнейшем во все ячейки был добавлен стрептавидин-HRP и планшет, закрытый пленкой, инкубировался в течение 1 часа при комнатной температуре (25° C). После удаления содержимого ячеек и промывки был внесен субстратного раствора ТМБ (тетраметилбензидина) во все лунки и проведена инкубация при комнатной температуре (25° C) в темноте 30 минут. Затем добавлен стоп-раствор во все ячейки и проведено определение оптической плотности содержимого ячеек при длине волны 450 нм. Результат выражали в пг/мл.

### **2.3. Исследование трансформирующего фактора роста $\beta$ 1**

Содержание человеческого трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) в сыворотке крови определяли с помощью наборов Human TGF  $\beta$  1

Platinum ELISA, производства "Бендер МедСистемс ГмбХ", Австрия (Bender VtdSystems GmbX, Campus Vienna Biocnter 2 1030 Vienna, Austria) также методом конкурентного ИФА на многофункциональном счетчике для иммунологических исследований с компьютером и программным обеспечением Multilabel Counter Victor – 2 1420 (Финляндия). В разведенные 20 мкл сыворотки и 180 мкл рабочего буфера (1:10) были добавлены 20 мкл 1 N HCL, после чего образцы перемешивались и инкубировались в течение 1 часа при комнатной температуре (25° C). Далее приготовленный раствор нейтрализовался с помощью 20 мкл 1 N NaOH. В стрипы из защитного пакета, ячейки которых были дважды промыты 400 мкл промывочного буфера, были добавлены 100 мкл рабочего буфера во все лунки, предназначенные для стандартов, для "бланка", а также 60 мкл рабочего буфера помещены в лунки, предназначенные для образцов. После чего планшет, закрытый пленкой, инкубировался 2 часа при комнатной температуре (25° C). Затем содержимое ячеек было удалено аспирацией с последующей 5-ти кратной промывкой 400 мкл промывочного буфера. Далее во все ячейки было внесено 100 мкл биотинового конъюгата, закрытый пленкой планшет вновь инкубировался в течение 2 часов при комнатной температуре (25° C). После удаления содержимого ячеек, с последующей 3-х кратной промывкой 400 мкл промывочного буфера, во все ячейки было внесено 100 мкл стрептавидина-NPR для последующей инкубации в течение часа при комнатной температуре (25° C). В дальнейшем содержимое ячеек также было удалено, с последующей 5-ти кратной промывкой 400 мкл промывочного буфера и было добавлено 100 мкл субстратного раствора ТМБ во все лунки для инкубации при комнатной температуре (25° C) в темноте 30 минут и последующего внесения 100 мкл стоп-раствора во все ячейки. На завершающем этапе было проведено определение оптической плотности содержимого ячеек при длине волны 450 нм. Результат выражали в пг/мл.

## **2.4. Исследование матриксной металлопротеиназы 9**

Исследование уровня MMP9 в сыворотке крови проводили с помощью набора для определения Матриксной металлопротеиназы 9 (MMP9) производства Cloud-Clone Corp. (USA) методом ИФА на многофункциональном счетчике для иммунологических исследований с компьютером и программным обеспечением Multilabel Counter Victor – 2 1420 (Финляндия). Микропланшет в наборе сорбирован антителами, конъюгированными с биотином и специфичными к MMP9. Стандарты или образцы были помещены в определенные лунки планшета и после добавления авидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, проводилась инкубация. После добавления ТМБ отмечалось изменение цвета в лунках, содержащих MMP9, антитела с биотином и авидин с пероксидазой хрена. Ферментативная реакция была остановлена при добавлении раствора серной кислоты. После того, как жидкость приобрела желтый цвет, она была помещена в ридер и проведены измерения оптической площади фотометрическим методом на длине волны 450 нм. Концентрация MMP9 в исследуемых образцах рассчитывалась в соответствии со стандартной (калибровочной) кривой и выражалась в нг/мл.

## **2.5. Методика молекулярно-генетического исследования**

Молекулярно-генетические исследования выполнялись в лаборатории кафедры генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет», под руководством доктора биол. наук, проф., зав. кафедрой Т.П. Шкурат и доктора биол. наук, доцента кафедры генетики Е.В. Машкиной.

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови детей, страдающих аллергическими заболеваниями. Качественные и количественные

исследования ДНК методом полимеразной цепной реакции проводились на амплификаторе детектирующем ДТ-96. В настоящей работе использовался термокоагуляционный метод выделения ДНК из лейкоцитов периферической цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, Россия). В ходе работы в пробирку типа «Эппендорф» было внесено 500-700 мкл цельной крови, после чего пробирка закрывалась и центрифугировалась со скоростью 3000 об/мин в течение 5 мин. при комнатной температуре. После удаления плазмы, полученная взвесь клеток выдерживалась при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до полного замораживания форменных элементов и в дальнейшем размораживалась при комнатной температуре. Далее в пробирку был внесен реактив «ДНК-экспресс-кровь» в объеме, равном объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы, и содержимое пробирки перемешивалось и осаждалось на вортексе. Полученные образцы инкубировались в заранее разогретом до  $99^{\circ}\text{C}$  термостате в течение 15 мин. После их остывания до  $70^{\circ}\text{C}$  пробирки центрифугировались со скоростью 12000 об/мин в течение 60 сек. в высокоскоростной микроцентрифуге. Полученный в результате этого супернатант использовался для дальнейшего исследования полиморфных вариантов генов.

Определение полиморфизма генов *TGF $\beta$ <sub>1</sub>* (*Arg25Pro*), *VEGFA* (*634C > G*), *EGFR* (*2073A > T*), *MMP9* (*-8202A > G*), *MMP20* (*320A > C*, *837T > C*) проводилось с использованием набора реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия). Анализ был основан на одновременном проведении двух реакций амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Одна пара праймеров комплементарна нормальной аллели, вторая комплементарна мутантной аллели. Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3 % агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили под УФ на трансиллюминаторе GelDoc (BioRad, США).

## 2.6. Протеомный анализ сыворотки крови

Исследование протеомного профиля сыворотки крови проводили в лаборатории протеомного анализа НИИ акушерства и педиатрии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации под руководством к.б.н., старшего научного сотрудника В.О. Гунько.

Материалом для исследования послужила сыворотка крови, к образцам которой добавляли коктейль ингибиторов протеаз (*Thermo Fisher Scientific*, США) в пропорции 1:99, аликвотировали и подвергали консервации в низкотемпературном холодильнике при  $-86^{\circ}\text{C}$  до проведения исследований. Перед проведением протеомного анализа проводили количественное определение содержания белков в биопробе по методу Бредфорда [193] при длине волны 595 нм на спектрофотометре СФ-104 (Аквилон, Россия).

Обеднение сыворотки (удаление альбумина и иммуноглобулина G) проводили с использованием коммерческих наборов Aurum Serum Protein Mini Kit (*Bio-Rad*, США) согласно протоколу фирмы производителя. Затем обедненные образцы концентрировали и обессоливали на пористых фильтрах Amicon Ultra 10кДа (*Millipore*, США). После чего повторно измеряли концентрацию белка в каждой пробе, необходимый объём пробы пересчитывался, чтобы загрузка белка на 1 гель составляла 125 мкг, для этого отобранная аликвота биообразца доводилась до 315 мкл буфером для изоэлектрофокусирования, содержащем (7М мочевины, 2М тиомочевину, 1 % дитиотреитол, 1 % амфолиты 3-10, 4 % CHAPS, 0,05 % бромфеноловый синий).

Фракционирование белков сыворотки проводили методом двумерного электрофореза (2Д-ЭФ) в полиакриламидном геле [194]. Первое направление 2Д-ЭФ — изоэлектрофокусирование осуществляли с использованием иммобилизованных стрипов с градиентом  $\text{pH}=3-10$  (*Ready Strip IPG Strips*, «*Bio-Rad*», США) на приборе Protein IEF Cell («*Bio-Rad*», США). Сначала

проводилась пассивная регидратация образцов на 15 часов при 20° С, а затем программа изоэлектрофокусирования, включающая следующие этапы: 250 В быстро - 30 минут, этап: до 10000 В линейно - 2 часа, этап: до набора 45000 В/ч быстро, этап: 1000 В быстро – удержание.

Второе направление электрофореза (вертикальный электрофорез в 12,5 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях) проводили в камере Protean II xi Multi-Cell («Bio-Rad», США) при силе тока 40 mA на гель в течение 18 часов. В качестве стандартов молекулярных масс использовали набор белков (SDS-PAGE Standart, «Bio-Rad», США), включающий миозин (205 кДа), β-галактозидазу (114 кДа), сывороточный альбумин (79,6 кДа), овальбумин (47 кДа), карбоангидразу (34 кДа), ингибитор трипсина (27 кДа), лизоцим (17,6 кДа), апротинин (6 кДа).

Для визуализации белковых пятен в гелях (после завершения 2-ого направления 2Д-ЭФ) электрофореграммы окрашивали флуоресцентным красителем Flamingo («Bio-Rad», США) согласно протоколу производителя, сканировали на приборе Chemidoc MP (Bio-Rad, США) и сохраняли в TIFF-формате. Анализ гелей, включающий сопоставление пятен на электрофореграммах, полученных из разных образцов, проводился с помощью специальной программы компьютерного анализа изображений PDQuest версии 8.0.1. (Bio-Rad, США).

Для анализа распределения белков на двумерных электрофореграммах образцов сыворотки крови были осуществлены следующие операции: выравнивание (поиск одинаковых белковых зон), стандартизация изображений по реперным точкам, формирование "мастер-геля", представляющего собой эталонный гель, который суммирует все точечные идентификаторы и служит основой для сравнения различных белковых паттернов, сравнительный пофрагментарный анализ гелей между группами, а также определение белков отличий для последующей их масс-спектрометрической идентификации.

Белковые пятна, представлявшие интерес, вырезали из геля, подвергали трипсинолизу согласно методике [179] и смешивали с матрицей. В качестве матрицы использовалась 2,5-дигидроксibenзойная кислота (Bruker, Германия). Масс-спектры триптических гидролизатов белков были получены на MALDI-TOF-масс-спектрометре Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия). Параметры прибора были установлены следующие: для ионного источника 19 кВ и напряжение на рефлекторе 20 кВ. Для получения и анализа масс-спектров использовали программы FlexControl версии 3.4 и FlexAnalysis версии 3.4 (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации белков использовали программу BioTools версии 3.2 (Bruker Daltonics, Германия). По масс-листу каждого белкового пятна производился поиск по базе данных Swiss-Prot (2013\_12) с использованием локальной версии программы Mascot Search 2.4.1 (Matrix Science, США). Были использованы параметры поиска: точность определения массы 70 миллионных долей, таксон *Homo sapiens*, одно пропущенное расщепление, модификации - окисление метионинов и алкилирование цистеинов ацетамидом.

Результаты идентификации белков принимались как достоверные при уровне значимости не менее 95 % и совпадении не менее трёх идентификаций точек с одинаковым значением массы белка и его изоэлектрической точки на разных гелях. При анализе масс-спектров пептидных отпечатков учитывались особенности характеристик матрицы и разрешающая способность прибора и метода в целом.

## **2.7. Методы статистической обработки полученных данных**

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 10.0. фирмы StatSoft. Inc.) и Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp.)

Для оценки на нормальность распределения количественных данных в группе по количественным факторам нами использовались критерии Лиллифорса и Колмогорова – Смирнова. При значениях  $p > 0,05$

исследуемое распределение значений признака считалось не отличающимся от нормального. Описательная статистика включала в себя определение средних значений показателей и стандартного отклонения (при нормальном распределении данных) -  $M \pm SD$  ( $M$  – среднее арифметическое,  $SD$  – стандартное отклонение), а также определение медианы и квартилей (при отличии от нормального распределения) –  $Me [Q25; Q75]$  (где  $Me$  – медиана,  $Q25$  и  $Q75$  – нижний и верхний квартили).

Для сравнение двух независимых выборок при нормальном распределении признаков использовался критерий Стьюдента (t-критерий), при отличном от нормального распределении - критерии Манна-Уитни.

При сравнении средних трех и более выборок применяли методы дисперсионного анализа: при нормальном распределении параметрический дисперсионный анализ ANOVA (при попарном сравнении как этапе дисперсионного анализа оценка статистической значимости отличия между группами при равном объеме выборок проводили с помощью критерия Тьюки, при неравных  $N$  предпочтение отдавали критерию Дункана); при распределении, отличном от нормального, дисперсионный анализ осуществляли с помощью критерия Крускала–Уоллиса. Статистически значимыми отличия считались при  $p < 0,05$ .

При сравнении бинарных признаков применяли  $\chi^2$ -критерий Пирсона после построения таблиц сопряженности  $2 \times 2$  (при сравнении выборок малого объема использовали критерий Фишера) для определения сопряжения между исследуемыми величинами.

Кроме того, использовали логистический регрессионный анализ с определением критерия  $\chi^2$ . Связь признавалась статистически значимой только в случае, если  $p < 0,05$ .

Определение силы связи между признаками с помощью метода корреляционного анализа осуществлялось с определением коэффициента Пирсона при нормальном распределении значений фактора в группе, и

коэффициента Спирмена при ненормальном. Коэффициент корреляции ( $r$ ) считали статистически значимым при  $p < 0,05$ .

Для построения моделей прогнозирования высокой степени тяжести аллергических заболеваний использовался ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic curve) с построением кривых и определением площади под ROC кривой (AUC). Способность диагностического метода распознавать наличие или отсутствие какого-либо состояния (болезни, осложнения, прогрессирующего либо тяжелого течения, неконтролируемого течения) оценивали по величине AUC и статистической значимости отличия ROC-кривой от диагональной опорной линии. Соответствие между величиной AUC и информативностью теста оценивали следующим образом: при величине AUC равной 1,0-0,9 способность диагностического теста распознавать наличие или отсутствие состояния оценивалась как отличная, при 0,8-0,9 – хорошая, при 0,7-0,8 – удовлетворительная, при 0,6-0,7 – посредственная, при 0,5-0,6 – неудовлетворительная и при  $< 0,5$  - абсурдная («вредная»).

Репрезентативность выборки больных, включенных в исследование, оценивали с помощью равновесия Харди-Вайнберга. Ожидаемые частоты аллелей и генотипов определяли с помощью расчета  $\chi^2$  на калькуляторе равновесия Харди-Вайнберга, включающий анализ погрешности определения <http://www.oege.org>.

Также для оценки результатов генетических исследований использовалась программа «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль», позволившая с помощью критерия  $\chi^2$  выявить различия в распределении полиморфных вариантов генов в обследованных группах.

Для прогнозирования величины риска развития заболеваний был применен «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль», показывающий величину отношения шансов OR с 95 %-ым доверительным интервалом CI.

Анализ межгенных взаимодействий проводили при помощи алгоритма снижения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Среди n-моделей выбирались только модели с наиболее высокой воспроизводимостью и точностью предсказания.

### ГЛАВА 3. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ

Несмотря на то, что аллергические заболевания являются достаточно актуальной медико-социальной проблемой и им посвящены многочисленные исследования во всех странах мира, к сожалению, ежегодно увеличивается частота непрерывно рецидивирующих и прогрессирующих форм данных заболеваний, требующих стационарного лечения.

Так, проведенный в г. Ростове-на-Дону мониторинг частоты обращений детей с аллергическими заболеваниями показал, что в детскую городскую больницу № 2 (специализированную для приема детей с острой аллергической патологией всего города) за 2017-2019 г. поступило 1654 ребенка. Причем следует отметить, что наиболее часто госпитализация требовалась пациентам с бронхолегочной патологией (75,3 %), на втором месте по частоте обращений были больные с атопическим дерматитом (24,7 %) [табл. 2].

Таблица 2

Распределение больных с аллергическими заболеваниями в зависимости от года поступления в стационар

| Диагноз | Число (доля) пациентов за годы наблюдения |      |      |      |      |      |
|---------|---|------|------|------|------|------|
|         | 2017                                      |      | 2018 |      | 2019 |      |
|         | чел.                                      | %    | чел. | %    | чел. | %    |
| БА      | 497                                       | 76,9 | 374  | 70,7 | 375  | 78,3 |
| АД      | 149                                       | 23,1 | 155  | 29,3 | 104  | 21,7 |
| Всего   | 646                                       | 100  | 529  | 100  | 479  | 100  |

Подробный анализ частоты обращений в течение исследуемых лет показал, что графики подъемов госпитализации неоднородны и ежегодно меняются пики обострения заболеваемости (рис. 3).

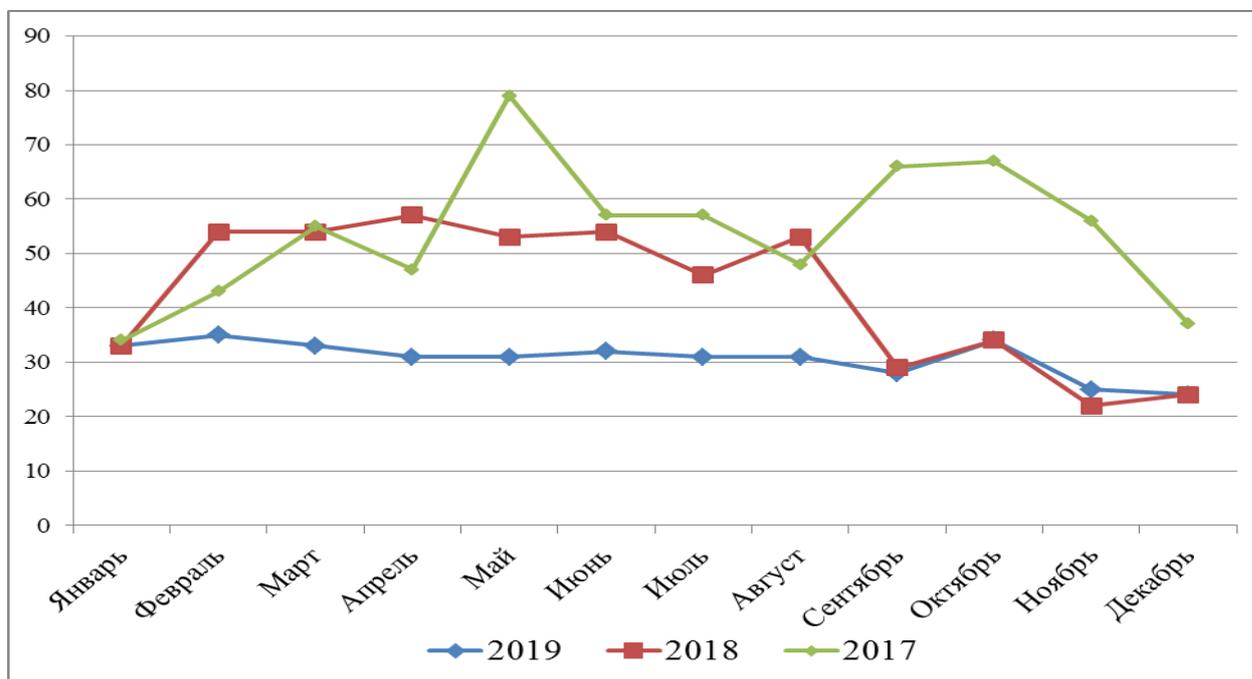


Рисунок 3. Динамика частоты обращений за стационарной помощью больных с аллергическими заболеваниями в течение 2017-2019 гг.

Так, если анализировать 2017 год, то максимальные подъемы заболеваемости приходились в весеннее время на май, а также на сентябрь и октябрь осенью. Тогда как в 2018 году относительно равномерно распределялась частота обращений за стационарной помощью в течение первого полугодия, в то время как в июле-августе отмечается вначале подъем, а затем спад обращаемости за стационарной помощью. В 2019 году, напротив, кривая имеет ровный вид с небольшим подъемом в октябре.

Так, если говорить о бронхиальной астме, то максимальное количество больных, обратившихся за стационарной помощью в 2017 году, было зарегистрировано в период с сентября по ноябрь. В 2018 г. отмечается повышение заболеваемости БА преимущественно с февраля по август, в то

время как в 2019 г. кривая имеет более равномерный характер, с небольшим подъемом в сентябре-октябре (рис. 4).

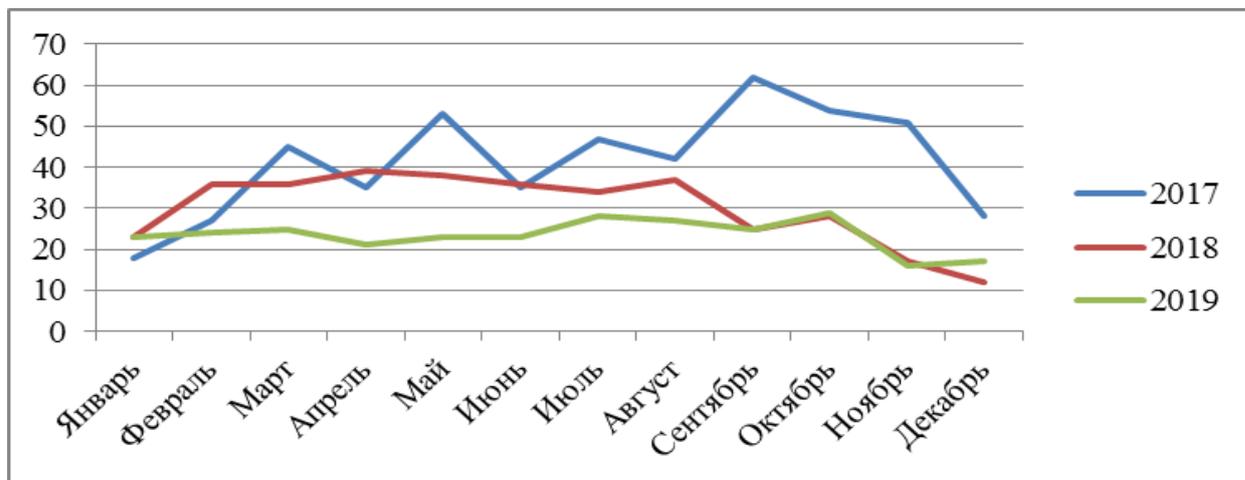


Рисунок 4. Динамика заболеваемости бронхиальной астмой в течение года (по данным за 2017-2019 гг.)

Столь частое обращение больных БА за стационарной помощью в осенние месяцы может быть обусловлено не только пылевой нагрузкой сорных трав, но и, возможно, грибковой сенсibilизацией, значение которой возрастает при повышении влажности воздуха. Доказательством этому являются исследования, проведенные в Ростовской области, показавшие, что в осеннем периоде в воздухе отмечается значительное увеличение концентрации спор грибов рода *Alternaria* и *Cladosporium* [245].

Также еще одним фактором, способствующим сенсibilизации в данный временной период, является изменение конформационной структуры аллергенов под действием повышенной влажности воздуха. Так, в исследовании Р.Е. Taylor было показано, что под влиянием паров воды и сушки происходит дегрануляция молекул пыльцы тимофеевки, они приобретают форму фрагментированной цитоплазмы размером от 0,12 до 4,67 мкм и тем самым становятся еще более высокоаллергенными [215]. Возможно, этим и объясняется высокая частота обращений больных, страдающих БА и АД, за стационарной помощью в данный временной период (сентябрь-октябрь).

Если же говорить об атопическом дерматите, то стоит отметить, что динамика заболеваемости данной патологией в течение 2017-2019 гг. имеет однородную тенденцию с повышением частоты обращений за стационарной помощью в начале года с последующим снижением количества заболевших в осенне-зимний период (рис. 5). При этом установлено значительное повышение заболеваемости АД в мае-июне, зафиксированное в 2017 году. В большинстве своем обострения заболевания в данный временной период были обусловлены погрешностями в диете и употреблением в пищу ягод (в основном клубники).

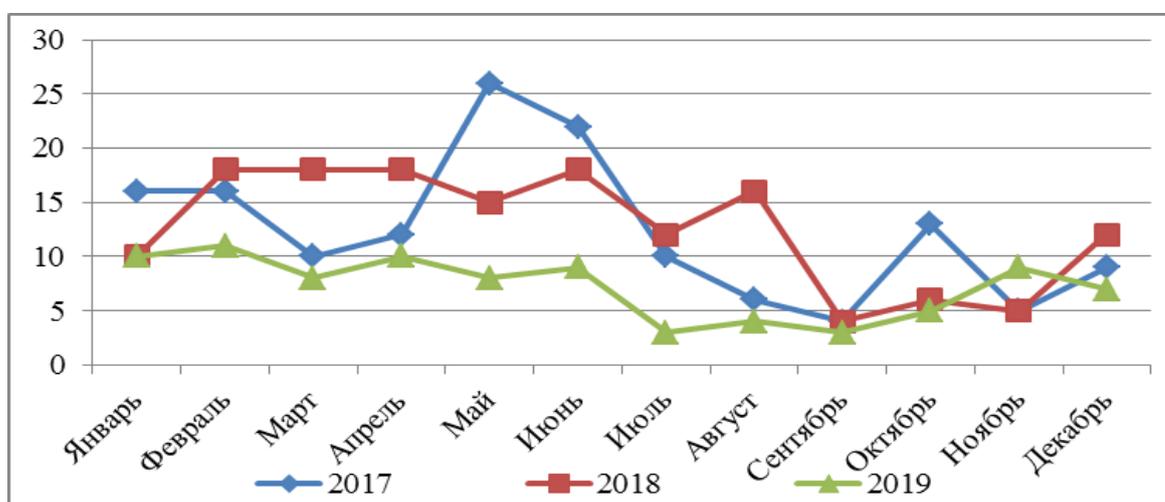


Рисунок 5. Динамика заболеваемости атопическим дерматитом по годам (2017-2019 гг.)

Принимая во внимание высокую частоту обострений БА и АД среди поступающих в течение года больных с аллергическими заболеваниями, требующих стационарного лечения, необходимо проведение тщательного анализа клинико-anamnestических и лабораторных показателей для определения факторов, предрасполагающих к развитию данных нозологий, а также определения предикторов неблагоприятного прогноза течения данных видов патологии у детей, для построения моделей прогнозирования их течения.

### 3.1. Общая характеристика детей, страдающих бронхиальной астмой

В рамках данного исследования обследовано 213 детей, страдающих БА различной степени тяжести (табл. 3).

Таблица 3

Распределение больных в зависимости от клинических проявлений БА

| №  | Диагноз                            | Количество детей        | % от общего количества |      |
|----|------------------------------------|-------------------------|------------------------|------|
| 1. | Тяжесть течения бронхиальной астмы | Легкое                  | 181                    | 85,0 |
|    |                                    | Среднетяжелое           | 22                     | 10,3 |
|    |                                    | Тяжелое                 | 10                     | 4,7  |
| 2  | Уровень контроля над заболеванием  | Контролируемая          | 6                      | 2,8  |
|    |                                    | Частично-контролируемая | 18                     | 8,5  |
|    |                                    | Неконтролируемая        | 189                    | 88,7 |
| 3  | Период заболевания                 | Период обострения       | 182                    | 85,5 |
|    |                                    | Период ремиссии         | 31                     | 14,6 |

Установлено, что распределение пациентов по степени тяжести БА в нашей работе примерно соответствует опубликованным данным в согласительных документах по астме. Однако обращает на себя внимание чрезвычайно высокое количество детей с неконтролируемой БА, потребовавшее проведения коррекции противовоспалительной терапии.

Среди обследованных пациентов преобладали лица мужского пола (76,1 %), тогда как девочек было 51 (23,9 %) ( $p < 0,001$ ). Средний возраст манифестации заболевания составил  $6,0 \pm 3,5$  лет.

Массо-ростовые показатели, установленные у обследованных нами больных, показали, что средние значения индекса массы тела составили 18 [15; 21], тогда как 6,6 % детей, страдающих БА, имели избыточную массу телу, у 2,3 % отмечалось ожирение. Однако, при этом не установлена корреляционная зависимость между степенью тяжести течения БА и индексом массы тела ребенка ( $p > 0,05$ ).

В структуре сопутствующей патологии у детей данной группы преобладал аллергический ринит (его проявления были отмечены у 86,4 % больных), на втором месте стоит крапивницы – 16,9 %, острый ринофарингит зарегистрирован у 4,7 %, искривление носовой перегородки у 7 детей (3,3 %), одинаково часто встречался двусторонний сальпингоотит, гиперплазия лимфоузлов и нарушения пуринового обмена – 2,3 %. И только 13 пациентов (6,1 %) не имели сопутствующей патологии. Однако, стоит отметить, что влияния сопутствующей патологии на тяжесть течения обследованных больных БА выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

Большинство больных БА получали препараты базисной терапии – 67,1 % (рис. 6).

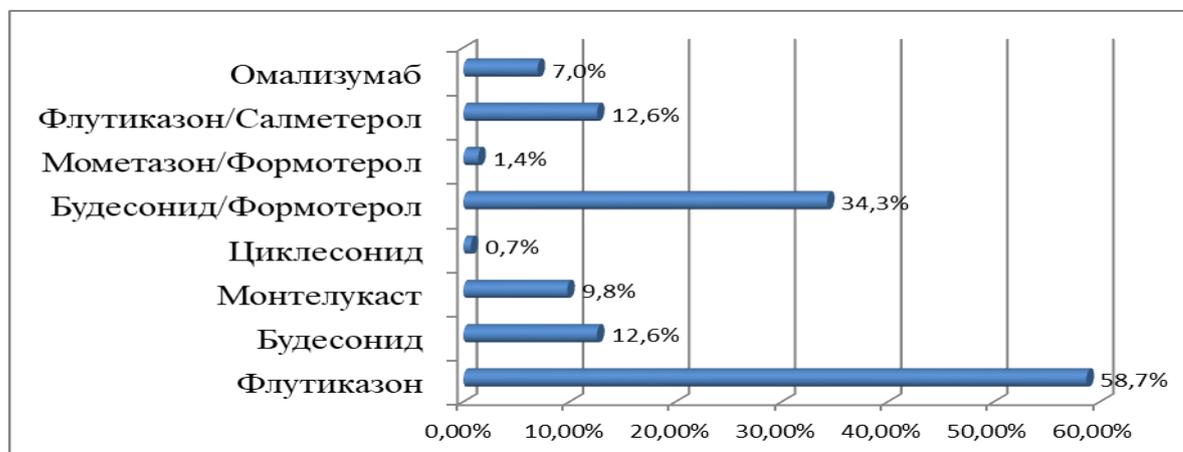


Рисунок 6. Частота назначения различных препаратов пациентам с БА

Анализ анамнестических данных показал, что более чем у половины обследованных пациентов приступы бронхообструкции отмечались в ночное время (68,1 %), в течение дня данные эпизоды наблюдались в 31,9 % случаев. Нами установлено преобладание бытовой (34,7 %) и пылевой (44,2 %) сенсibilизации у пациентов с ночными приступами удушья, в то время как при обострениях в дневное время такой взаимосвязи выявить не удалось. При этом необходимо отметить, что наиболее частыми триггерами у пациентов с дневными приступами являлись пылевые (67,1%) и бытовые (48,4 %) аллергены, на третьем месте – пищевые аллергены (38,5%), несколько реже бронхоспазм у больных развивался после контакта с домашними животными (33,3%). Аллергическая реакция на лекарственные препараты отмечалась в 17,4% случаев, чаще всего на антибиотики пенициллинового ряда и жаропонижающие (ибупрофен). Подробный опрос детей и родителей установил, что в 70,9% случаев больные проживают в квартирах, а 29,1% в частных домах. Различий между спектрами сенсibilизации в зависимости от типа жилища установлено не было ( $p > 0,05$ ).

Подробный анализ экзогенных факторов, способствующих обострению заболевания и персистенции симптоматики, установил, что у 42,7 % детей приступ БА развивается после физической нагрузки или перемены погоды (при повышении влажности окружающего воздуха) [39,0 %]. Особую роль в развитии обострения заболевания опрошенные пациенты уделяют эмоциональным нагрузкам: эмоциональный стресс явился пусковым фактором в 33,3 % случаев. Средняя частота ОРВИ у обследованных нами детей составила  $3,6 \pm 2,7$  эпизода в год. При этом к группе часто болеющих могут быть отнесены лишь 16,4 % больных, что дает нам основание еще раз подчеркнуть значение вирусной инфекции как триггерного фактора у детей с атопией.

Принимая во внимание тот факт, что БА является заболеванием, в этиологии которого сочетаются как воздействие экзогенных, так и эндогенных факторов (при этом особое внимание следует уделить генетическим аспектам его наследования), нами проведен подробный анализ родословных обследованных детей. Установлено, что отягощенную наследственность по аллергическим заболеваниям имели 126 (59,2 %) пациентов. Наиболее часто симптомы аллергических заболеваний отмечались по материнской линии (25,4 %), тогда как по отцовской в 15,0 % случаев, сочетание клинических проявлений аллергии по обеим линиям родства имели 18,8 % опрошенных пациентов. Этот факт может быть объяснен тем, что генетическая составляющая заболевания в данном случае обеспечивается совокупным патологическим действием различных групп генов, которые наследует ребенок. Подтверждением этому является то, что у сибсов частота встречаемости проявлений атопии также достаточно высока – 46 (41,8 %) из 110 обследованных. При этом респираторные проявления аллергии были зарегистрированы у 104 родственников обследованных пациентов (48,8 %), тогда как кожные - у 25 человек (11,7 %). Однако, для более глубокого понимания роли данных факторов в патогенезе БА необходимо проведение генетических исследований в сопоставлении с данными о семейном аллергоанамнезе.

### **3.2. Общая характеристика детей, страдающих атопическим дерматитом**

В рамках данного исследования было обследовано 209 детей, страдающих атопическим дерматитом. Средний возраст обследованных пациентов в данной группе составил  $5,1 \pm 4,1$  лет. Распределение по полу было примерно равным [девочек - 110 (52,6 %), мальчиков – 99 (47,4 %)].

Распределение больных в зависимости от формы, особенностей клинического течения и распространенности проявлений АД

| № | Диагноз                        | Количество детей<br>(n = 213) | %   |      |
|---|--------------------------------|-------------------------------|-----|------|
| 1 | Форма АД                       | Младенческая                  | 83  | 33,6 |
|   |                                | Детская                       | 108 | 52,9 |
|   |                                | Подростковая                  | 18  | 13,5 |
| 2 | Тяжесть течения заболевания    | Легкое                        | 103 | 52,9 |
|   |                                | Среднетяжелое                 | 92  | 41,2 |
|   |                                | Тяжелое                       | 14  | 5,9  |
| 3 | По распространенности процесса | Ограниченный                  | 117 | 20,2 |
|   |                                | Распространенный              | 87  | 77,3 |
|   |                                | Диффузный                     | 5   | 2,5  |
| 4 | Стадия заболевания             | Стадия обострения             | 209 | 100  |
|   |                                | Стадия ремиссии               | 0   | 0    |

Клинические проявления заболевания отличались у пациентов различных возрастных групп. Так, у детей в возрасте от 1 года до 5 лет преимущественно отмечалось появление пятнисто-папулезной сыпи, сопровождающейся интенсивным зудом, при этом локализовались высыпания преимущественно в области лица, задней поверхности шеи и на конечностях. У детей более старшего возраста преобладали лихеноидные изменения с локализацией в области кистей, локтевых сгибов, а также с патогномоничными изменениями кожных покровов в области лица (гиперпигментация век, периорбикулярной, периоральной области, отмечалось появление характерной складки кожи под нижним веком - линии

Денье-Моргана) и шеи (в виде «декольте»), сопровождающиеся выраженной сухостью кожных покровов, причем изменения носили преимущественно диффузный характер.

Средние значения показателя SCORAD в данной выборке составили  $32,4 \pm 11,8$  баллов, однако выраженность клинических проявлений варьировала в зависимости от степени тяжести заболевания (табл. 5).

Таблица 5

Особенности клинических показателей выраженности АД в зависимости от степени тяжести заболевания

| Признак                            | Легкое течение | Среднетяжелое течение | Тяжелое течение | P  |
|------------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------|--|
|                                    | 1              | 2                     | 3               |  |
| Распространенность процесса, баллы | 27 [20,5; 27]  | 39 [29; 47,5]         | 53,5 [44,5;70]  | <b><math>p_{123} = 0,00007</math></b><br><b><math>p_{1,2} = 0,126</math></b><br><b><math>p_{1,3} &lt; 0,0001</math></b><br><b><math>p_{2,3} = 0,003</math></b>   |
| Интенсивность зуда, баллы          | 4 [3; 5]       | 8 [5; 9]              | 10 [9; 12]      | <b><math>p_{123} &lt; 0,0001</math></b><br><b><math>p_{1,2} = 0,0008</math></b><br><b><math>p_{1,3} = 0,00005</math></b><br><b><math>p_{2,3} = 0,0007</math></b> |
| Эритема, баллы                     | 1 [1; 1]       | 2 [1; 2]              | 2 [2; 2,5]      | <b><math>p_{123} = 0,002</math></b><br><b><math>p_{1,2} = 0,072</math></b><br><b><math>p_{1,3} = 0,0005</math></b><br><b><math>p_{2,3} = 0,039</math></b>        |

Продолжение таблицы 5

|   |          |            |              |  |
|---|----------|------------|--------------|--|
| Отек/папула,<br>баллы                   | 0 [0; 0] | 1,5 [0; 2] | 1,5 [0,5; 2] | <b>p<sub>123</sub> = 0,005</b><br><b>p<sub>1,2</sub> = 0,015</b><br><b>p<sub>1,3</sub> = 0,018</b><br>p <sub>2,3</sub> = 0,955               |
| Корки/мокнут<br>ие                      | -        | 0 [0; 1]   | 1,5 [0,5; 2] | <b>p<sub>123</sub> = 0,016</b><br>p <sub>1,2</sub> = 0,135<br><b>p<sub>1,3</sub> = 0,003</b><br>p <sub>2,3</sub> = 0,079                     |
| Экскориации,<br>баллы                   | -        | 1 [0; 1]   | 1 [1; 2]     | <b>p<sub>123</sub> &lt; 0,0001</b><br><b>p<sub>1,2</sub> = 0,024</b><br><b>p<sub>1,3</sub> &lt; 0,0001</b><br><b>p<sub>2,3</sub> = 0,004</b> |
| Лихенификац<br>ия, баллы                | 0 [0; 1] | 1 [1; 2]   | 1,5 [0,5; 2] | p <sub>123</sub> = 0,020<br><b>p<sub>1,2</sub> = 0,044</b><br><b>p<sub>1,3</sub> = 0,049</b><br>p <sub>2,3</sub> = 0,875                     |
| Сухость<br>кожи, баллы                  | 2 [3; 5] | 2 [2; 3]   | 3 [2; 3]     | p <sub>123</sub> = 0,190<br>p <sub>1,2</sub> = 0,253<br>p <sub>1,3</sub> = 0,169<br>p <sub>2,3</sub> = 0,749                                 |
| Субъектив-<br>ные<br>симптомы,<br>баллы | 6 [3; 8] | 5 [3; 8]   | 7 [3; 10]    | p <sub>123</sub> = 0,629<br>p <sub>1,2</sub> = 0,793<br>p <sub>1,3</sub> = 0,343<br>p <sub>2,3</sub> = 0,453                                 |

Продолжение таблицы 5

|                      |                      |                        |                       |   |
|----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|---|
| Зуд, баллы           | 2 [2; 4]             | 2 [2; 3]               | 3 [2,5; 4]            | $p_{123} = 0,411$<br>$p_{1,2} = 0,899$<br>$p_{1,3} = 0,158$<br>$p_{2,3} = 0,174$  |
| Нарушение сна, баллы | 1 [0; 3]             | 1 [1; 2]               | 1 [0,5; 3]            | $p_{123} = 0,942$<br>$p_{1,2} = 0,988$<br>$p_{1,3} = 0,724$<br>$p_{2,3} = 0,717$  |
| SCORAD, баллы        | 24,2<br>[19,9; 28,6] | 37,4<br>[31,10; 44,50] | 57,4<br>[43,4; 62,70] | <b><math>p_{123} &lt; 0,0001</math></b><br><b><math>p_{1,2} = 0,0002</math></b><br><b><math>p_{1,3} = 0,00006</math></b><br><b><math>p_{2,3} = 0,001</math></b> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса);

$p_{12}$  значимость различий между 1 и 2 группами;

$p_{13}$  значимость различий между 1 и 3 группами;

$p_{23}$  значимость различий между 2 и 3 группами.

Жирным шрифтом выделены  $p \leq 0,05$ .

Анализ сопутствующей патологии установил высокую частоту встречаемости у обследованных пациентов заболеваний желудочно-кишечного тракта 24,4 % ( $n = 51$ ), причем наиболее часто среди них отмечались дисфункция билиарного тракта – у 39,2 % ( $n = 20$ ) и хронический гастродуоденит - у 9,8 % ( $n = 5$ ). Однако обращает на себя внимание несопоставимо более весомое обнаружение патологии ЖКТ при проведении инструментальной обследования. Так, патология печени и желчевыводящих путей по данным ультразвукового исследования органов брюшной полости была установлена у 135 (64,6 %) больных, диффузные изменения паренхимы печени отмечались у 30 детей (14,4 %), гепатомегалия – у 72 (34,5 %),

дисфункция билиарного тракта – у 14 человек [причем у 13 (92,9 %) по гипомоторному типу], аномалии развития желчного пузыря - в 35,9 % случаев. Нарушение пуринового обмена зарегистрировано у 15 больных (7,2%).

Сопутствующая аллергическая патология имела место у 29 (13,9 %) детей с АД: аллергический ринит отмечался у 21 человека (10,1 %), острая крапивница, сопровождающаяся отеком Квинке – у 8 больных (3,8 %).

Анализ анамнестических данных показал, что у половины обследованных пациентов (51,7 %) имеется сенсibilизация к пищевым продуктам. Наиболее часто аллергическая реакция отмечалась после употребления в пищу молока, яиц, цитрусовых, шоколада, моркови, клубники и томатов. Аллергическая реакция на лекарственные препараты была зафиксирована у 13,9 % ( $n = 29$ ) детей. При этом у 92 (44,0 %) обследованных пациентов также имеется указание на отягощенную аллергологическую наследственность, при этом по материнской линии – у 50 (23,9 %) детей, по отцовской – у 22 (10,5 %), по обеим линиям родства – у 20 (9,6 %) пациентов. Кожные проявления аллергии у родителей пациентов с АД отмечались у 29 (13,9 %), респираторные – у 57 (27,3 %), в то время как системные аллергические реакции по типу крапивницы и отека Квинке были зарегистрированы лишь у 4 родственников (и отмечались преимущественно на лекарственные препараты).

### **3.3. Общая характеристика детей с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита**

В данную группу вошло 205 детей, 147 (71,7 %) из которых были мальчики, а 58 (28,3 %) – девочки. Средний возраст детей был равен  $11,2 \pm 3,8$  лет.

Важно отметить, что среди пациентов данной группы, по сравнению с группой с монопатологией, гораздо чаще регистрировались случаи среднетяжелого 46 (22,2 %) и тяжелого 18 (16,3 %) течения БА, тогда как легкий вариант проявления данной патологии отмечался у 141 (61,4 %) больного (табл. 6).

Таблица 6

Частота встречаемости различной степени тяжести БА в группе с монопатологией и среди больных с сочетанием БА и АД

| Группы пациентов         | БА<br>(n = 213) |      | БА + АД<br>(n = 205) |      | $\chi^2$ | P                |
|--------------------------|-----------------|------|----------------------|------|----------|------------------|
|                          | чел.            | %    | чел.                 | %    |          |                  |
| Легкое течение БА        | 181             | 85,0 | 141                  | 68,8 | 15,49    | <b>&lt;0,001</b> |
| Среднетяжелое течение БА | 22              | 10,3 | 46                   | 22,4 | 11,25    | <b>0,001</b>     |
| Тяжелое течение БА       | 10              | 4,7  | 18                   | 8,8  | 2,79     | 0,095            |

При попарном сравнении p рассчитывали по критерию  $\chi^2$  для абсолютных значений, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Анализ массо-ростовых показателей позволил установить, что лишь 4,4 % больных, имеющих сочетание БА и АД, имели избыточную массу тела, при этом корреляционной зависимости между индексом массы тела и степенью тяжести БА у детей выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

Изучение анамнестических и клинических данных показало, что у 173 (84,4 %) больных отмечались проявления аллергического ринита, у 9,3 % - острый ринофарингит, около 2 % обследованных имели двусторонний сальпингоотит (2,0 %), гиперплазию лимфоидного кольца (2,4 %) и искривление носовой перегородки (1,5 %), нарушения пуринового обмена были зарегистрированы у 2 детей (1 %). Важно отметить, что среди детей, имеющих сочетание БА и АД, гораздо чаще встречается указание в анамнезе

на перенесенный эпизод острой крапивницы (33,2 %), по сравнению с группой больных БА – 16,9 % ( $p = 0,0001$ ).

Исследование функции внешнего дыхания у пациентов с сочетанной патологией не выявило значимых отличий скоростных показателей от больных с БА (табл. 7).

Таблица 7

Сравнительные показатели функции внешнего дыхания у пациентов с БА и сочетанием БА и АД

| Показатели       | БА              | БА и АД         | P     |
|------------------|-----------------|-----------------|-------|
| ЖЕЛ, %           | 72 [62; 81]     | 75 [62; 94]     | 0,076 |
| ФЖЕЛ, %          | 84 [71; 92]     | 79 [70; 95]     | 0,587 |
| ОФВ1, %          | 75 [63; 95]     | 71 [60; 88]     | 0,779 |
| Индекс Тиффно, % | 102,5 [94; 113] | 93 [80,85; 103] | 0,177 |
| МОС 25, %        | 55 [41,5; 82]   | 65 [42,5; 81]   | 0,713 |
| МОС 50, %        | 62,5 [42,5; 86] | 62 [44; 83]     | 0,804 |
| МОС 75, %        | 65 [49; 87,5]   | 62 [44; 84,5]   | 0,632 |
| ПОС, %           | 56 [42; 75]     | 59 [44; 75]     | 0,599 |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль]; p рассчитана по критерию Манна-Уитни.

Проведенный нами анализ анамнестических данных установил, что пищевая аллергия отмечается у 81,5 % ( $n = 167$ ) пациентов данной группы, лекарственная – у 43,4 % ( $n = 89$ ). Об имеющейся у пациентов гиперреактивности бронхов и кожных покровов свидетельствует наличие более чем у половины обследованных больных (63,4 %) реакции на физическую нагрузку, изменение погоды (59,0 %) и резкие запахи (34,2 %).

Также стоит отметить, что почти треть пациентов (28,3 %), включенных в данную выборку, относится к категории часто болеющих

детей. Данный факт подтверждает сведения о том, что у детей с атопией имеются определенные особенности как общего, так и мукозального иммунитета (преобладают Th2-лимфоциты, которые активируют дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки, синтезирующие IgE, а, следовательно, способствуют формированию непосредственно атопии; также у них отмечается значительное снижение секреции IgA и ингибирующего действия интерферона  $\gamma$  на синтез IgE, приводящее к гиперпродукции последнего) [39]. В конечном итоге, все эти факторы определяют не только ответ организма ребенка на вирусную респираторную инфекцию, частоту и длительность ОРВИ, но и могут способствовать обострению аллергических заболеваний, а порой и определять их тяжесть течения.

Важно также отметить, что базисную терапию в данной группе не получали всего 34 (16,6 %) пациента, что также говорит о более тяжелом течении аллергического процесса. Причем, наиболее часто у больных с сочетанной патологией используются комбинированные препараты (38,5 %) или комбинации из нескольких противовоспалительных фармакологических средств – 23,9 % (рис. 7).

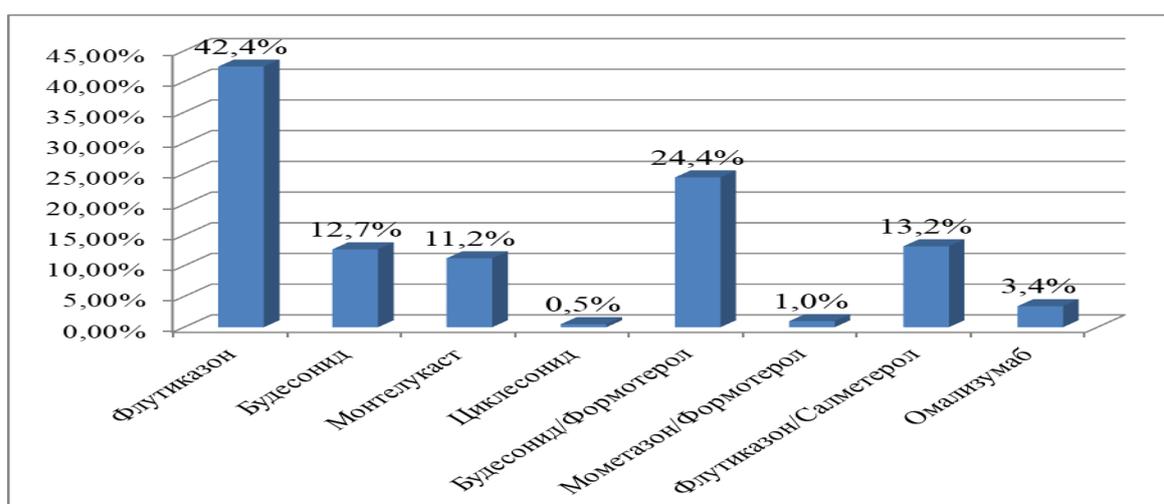


Рисунок 7. Сравнительная частота использования препаратов базисной терапии, применяемых у пациентов с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита (%)

Процент детей, имеющих отягощенную наследственность в данной группе, значительно выше, чем в предыдущих выборках (71,2 %) [рис. 8].

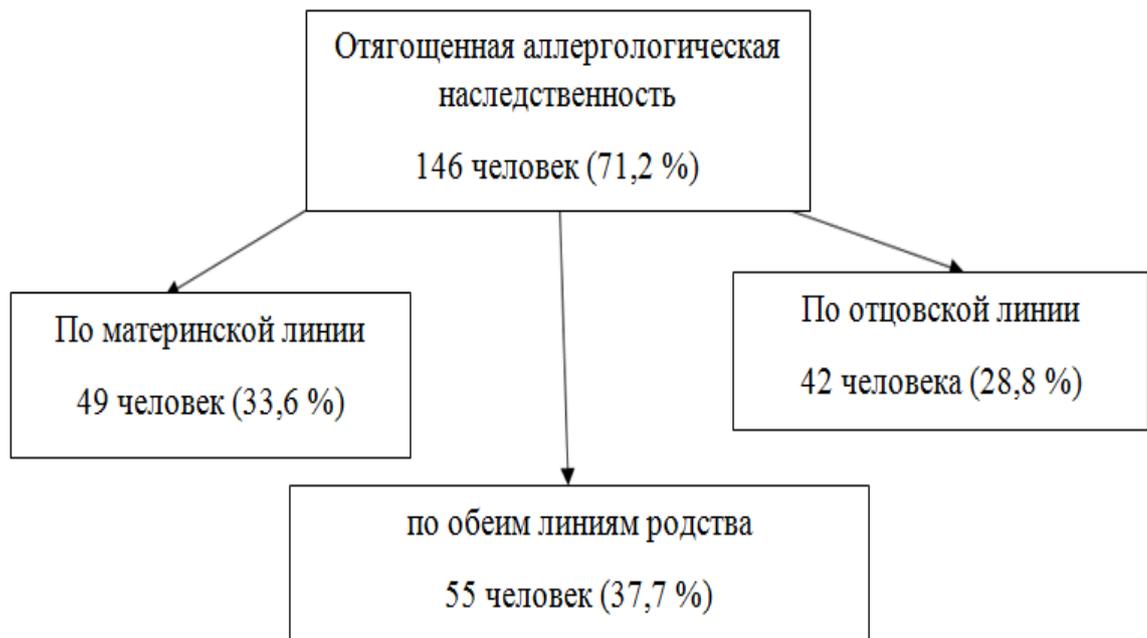


Рисунок 8. Структура отягощенной аллергологической наследственности у больных с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита

Роль генетической предрасположенности в развитии атопии также подтверждает тот факт, что в 17,6 % случаев у обследованных sibсов, рожденных от родителей с данными генотипами, зарегистрированы различные аллергические заболевания. Поэтому дальнейшее изучение генетической составляющей данной патологии позволит не только расширить наши представления о механизмах ее формирования, но и послужит основой для ранней диагностики и выработки тактики профилактических и в дальнейшем фармакотерапевтических воздействий.

### 3.4. Результаты аллергологического обследования детей, страдающих аллергическими заболеваниями

В настоящее время установлено, что в основе развития аллергических заболеваний у многих детей лежит IgE-обусловленная аллергическая реакция. Однако проведенное нами обследование показало, что из общей когорты больных, имеющих клинические проявления БА, АД или сочетание данных нозологий, повышенные уровни общего IgE были зарегистрированы только у 39,8 % больных, в то время как данный показатель находился в пределах референтных значений в 60,2 % случаев (рис. 9).

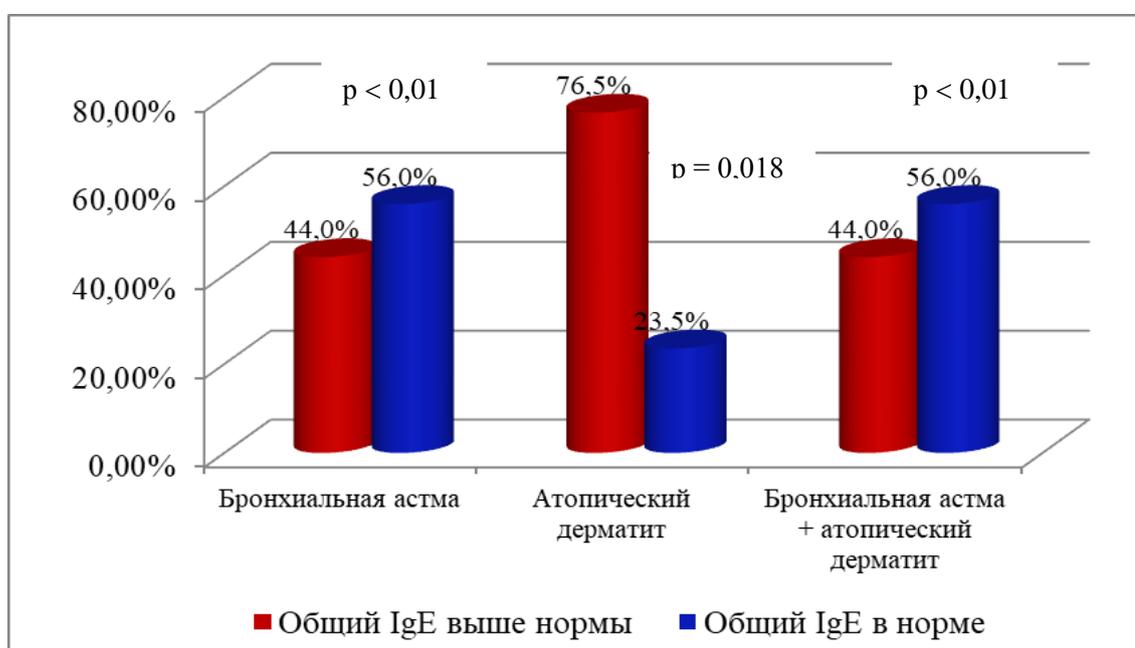


Рисунок 9. Частота выявления нормального и повышенного уровня общего IgE в группах обследованных больных

Причем обращает на себя внимание, что среди больных, имеющих клинические проявления БА, более чем у половины детей значения общего IgE не превышали 100 МЕ/мл.

Также следует отметить, что достоверные отличия концентрации у больных с различной степенью тяжести заболевания отмечались только в когорте больных, страдающих БА, среди детей с клиническими

проявлениями АД и сочетанной патологией значимые различия не были зарегистрированы ( $p > 0,05$ ) [табл. 8].

Таблица 8

Показатели общего IgE у больных с различным течением заболевания

| Диагноз | Легкое течение            | Среднетяжелое течение     | Тяжелое течение             | P  |
|---------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|--|
|         | 1                         | 2                         | 3                           |  |
| БА      | 290,05 [126,8;<br>877,05] | 46,25 [12,04;<br>148,8]   | 641,65 [266,57;<br>1096,35] | <b><math>p_{1,2,3} = 0,014</math></b><br>$p_{1,2} = 0,134$<br>$p_{1,3} = 0,641$<br><b><math>p_{2,3} = 0,032</math></b> |
| АД      | 16,22 [7,43; 134]         | 75,99 [21,02;<br>390,00]  | 169,40 [37,73;<br>939,90]   | $p_{1,2,3} = 0,055$<br>$p_{1,2} = 0,152$<br>$p_{1,3} = 0,297$<br>$p_{2,3} = 0,745$                                     |
| БА+АД   | 271,40 [89,17;<br>860,20] | 220,40 [55,71;<br>957,05] | 726,00 [614,10;<br>1062,00] | $p_{1,2,3} = 0,128$<br>$p_{1,2} = 0,995$<br>$p_{1,3} = 0,296$<br>$p_{2,3} = 0,319$                                     |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса);

$p_{12}$  значимость различий между 1 и 2 группами;

$p_{13}$  значимость различий между 1 и 3 группами;

$p_{23}$  значимость различий между 2 и 3 группами.

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Важно отметить, что у больных, страдающих БА, показатели общего IgE не коррелировали с уровнем контроля над заболеванием, а также показателями функции внешнего дыхания и степенью тяжести ДН, зафиксированной у больных при поступлении в стационар ( $p > 0,05$ ). В

группе пациентов с БА, имеющих указание в анамнезе на перенесенный АД, также отсутствовали корреляционные связи между продолжительностью заболевания и его клиническими проявлениями ( $p > 0,05$ ).

Следует учесть, что в ходе анализа полученных данных не была установлена зависимость между концентрацией IgE в сыворотке крови и отягощенной наследственностью, что еще раз свидетельствует о наличии иных механизмов, лежащих в основе патогенеза аллергических заболеваний у детей.

Исследование уровня аллергенспецифических IgE позволило не только проанализировать спектр сенсибилизации, но и установить наиболее значимые аллергены среди обследованных больных (табл. 9, 10).

Таблица 9

## Спектр пищевой сенсибилизации обследованных больных

| Аллерген                 | БА (n = 53) |      | АД (n = 65) |      | БА и АД (n = 37) |      | P <sub>123</sub> |
|--------------------------|-------------|------|-------------|------|------------------|------|------------------|
|                          | чел.        | %    | чел.        | %    | чел.             | %    |                  |
|                          | 1           | 1'   | 2           | 2'   | 3                | 3'   |                  |
| <b>Пищевые аллергены</b> |             |      |             |      |                  |      |                  |
| <b>Молоко</b>            | 26          | 49,1 | 40          | 61,5 | 16               | 43,2 | 0,162            |
| Говядина                 | 22          | 41,5 | 25          | 38,5 | 13               | 35,1 | 0,828            |
| Яйцо куриное             | 21          | 39,6 | 21          | 32,3 | 14               | 37,8 | 0,691            |
| Пшеничная мука           | 31          | 58,5 | 28          | 43,1 | 21               | 56,8 | 0,193            |
| Ячменная крупа           | 11          | 20,8 | 19          | 29,7 | 7                | 18,9 | 0,405            |
| Свинина                  | 18          | 34,0 | 19          | 28,8 | 12               | 32,4 | 0,760            |
| Курица                   | 19          | 35,9 | 19          | 29,2 | 13               | 35,1 | 0,709            |
| Гречка                   | 26          | 49,1 | 31          | 47,0 | 12               | 32,4 | 0,235            |

Продолжение таблицы 9

|                         |    |      |    |      |    |      |       |
|-------------------------|----|------|----|------|----|------|-------|
| Овсянка                 | 15 | 28,3 | 17 | 26,2 | 10 | 27,0 | 0,966 |
| Рис                     | 14 | 26,4 | 24 | 36,9 | 17 | 46,0 | 0,155 |
| Ржаная мука             | 18 | 34,0 | 16 | 24,6 | 4  | 10,8 | 0,043 |
| Арахис                  | 11 | 20,8 | 18 | 27,7 | 10 | 27,0 | 0,658 |
| Масло<br>растительное   | 2  | 3,9  | 2  | 3,1  | 0  | 0    | 0,511 |
| Молоко козье            | 3  | 5,7  | 10 | 15,4 | 3  | 8,1  | 0,198 |
| Соя                     | 16 | 30,2 | 11 | 16,9 | 14 | 37,8 | 0,053 |
| Яблоко                  | 6  | 11,3 | 7  | 10,8 | 3  | 8,1  | 0,875 |
| Банан                   | 2  | 3,8  | 5  | 7,7  | 2  | 5,4  | 0,505 |
| Картофель               | 11 | 20,8 | 18 | 27,7 | 8  | 21,6 | 0,635 |
| Капуста<br>белокачанная | 11 | 20,8 | 12 | 18,5 | 11 | 29,7 | 0,404 |
| Сахар                   | 10 | 18,9 | 14 | 21,2 | 5  | 13,5 | 0,607 |
| Дрожжи                  | 15 | 28,3 | 13 | 20,0 | 9  | 24,3 | 0,573 |
| Судак                   | 8  | 15,1 | 7  | 10,8 | 7  | 18,9 | 0,512 |
| Кукурузная крупа        | 17 | 32,1 | 19 | 29,2 | 7  | 18,9 | 0,367 |
| Пшено                   | 7  | 13,2 | 8  | 12,3 | 3  | 8,1  | 0,739 |
| Хек                     | 3  | 5,7  | 2  | 3,1  | 3  | 8,1  | 0,533 |
| Сельдь                  | 6  | 11,3 | 5  | 7,7  | 8  | 21,6 | 0,115 |
| Сазан                   | 7  | 13,2 | 6  | 9,4  | 8  | 21,6 | 0,212 |

Продолжение таблицы 9

|                  |    |      |    |      |    |      |       |
|------------------|----|------|----|------|----|------|-------|
| Скумбрия         | 3  | 5,7  | 5  | 7,7  | 0  | 0    | 0,236 |
| Треска           | 7  | 13,2 | 6  | 9,2  | 7  | 18,9 | 0,372 |
| Кролик           | 3  | 5,7  | 4  | 6,2  | 3  | 8,1  | 0,890 |
| Индейка          | 18 | 34,0 | 20 | 30,8 | 12 | 32,4 | 0,934 |
| Баранина         | 7  | 13,2 | 17 | 26,2 | 7  | 18,9 | 0,213 |
| Шампиньоны       | 3  | 5,7  | 1  | 1,5  | 3  | 8,1  | 0,272 |
| Абрикос          | 7  | 13,2 | 9  | 13,9 | 5  | 13,5 | 0,995 |
| Вишня            | 6  | 11,3 | 7  | 10,8 | 4  | 10,8 | 0,995 |
| Томаты           | 28 | 52,8 | 31 | 47,7 | 20 | 54,1 | 0,781 |
| Свекла           | 10 | 18,9 | 12 | 18,5 | 7  | 18,9 | 0,998 |
| Морковь          | 12 | 22,6 | 14 | 21,5 | 8  | 21,6 | 0,998 |
| Тыква            | 11 | 20,8 | 14 | 21,5 | 6  | 16,2 | 0,800 |
| Арбуз            | 9  | 17,0 | 13 | 20,0 | 4  | 10,8 | 0,490 |
| Перец болгарский | 8  | 15,1 | 7  | 10,9 | 5  | 13,5 | 0,778 |
| Груша            | 10 | 18,9 | 9  | 13,9 | 9  | 24,3 | 0,410 |
| Виноград         | 7  | 13,2 | 11 | 16,9 | 8  | 21,6 | 0,575 |
| Апельсин         | 10 | 18,9 | 9  | 13,9 | 7  | 18,9 | 0,709 |

Примечание: р рассчитывали по критерию  $\chi^2$

Анализ полученных данных показал, что пищевые аллергены значимы для пациентов всех трех групп. При этом стоит обратить внимание, что специфические IgE у обследованных детей выявлены к таким «гипоаллергенным» продуктам, как гречка, рис и мясо индейки. Причем на

первом месте по частоте встречаемости среди детей с аллергическими заболеваниями стоят такие пищевые аллергены как молоко, пшеничная мука, гречка и томаты – более чем у трети обследованных больных были зарегистрированы специфические IgE к данным молекулам.

Также в ходе данного исследования была показана значимость сенсibilизации к бытовым аллергенам у обследованных больных (рис. 10).

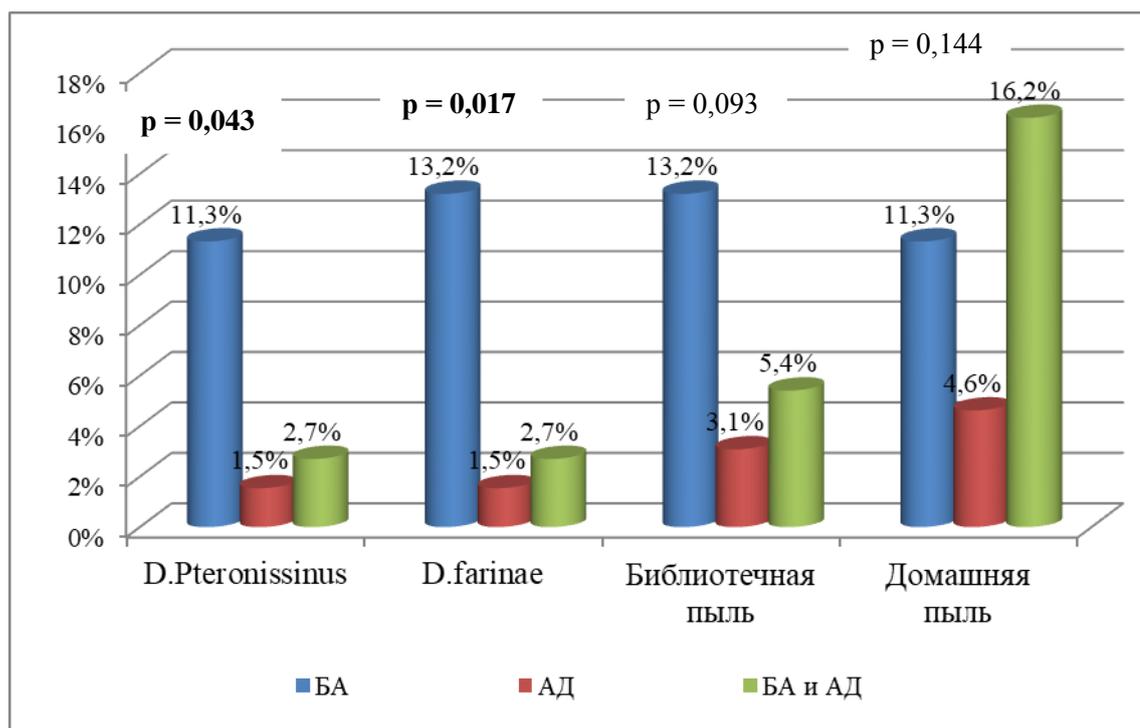


Рисунок 10. Частота сенсibilизации к различным бытовым аллергенам у детей с бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и их сочетанием

Причем, на представленном рисунке видно, что большинство из бытовых аллергенов играет ключевую роль в патогенезе БА, в то время как в когорте больных с АД частота встречаемости данных веществ в несколько раз ниже (рис. 10). Если говорить о группе пациентов с БА и АД, то среди них наиболее часто встречается аллергическая реакция на молекулы домашней пыли.

Среди пыльцевых аллергенов наиболее значимой являлась пыльца сорных и луговых трав (таких как тимофеевка, амброзия, костер, полевица), пыльца деревьев (преимущественно бузины) [табл. 10].

Спектр сенсibilизации к пыльцевым аллергенам обследованных больных

| Аллерген                   | БА (n = 53) |      | АД (n = 65) |      | БА и АД (n = 37) |      | P <sub>123</sub> |
|----------------------------|-------------|------|-------------|------|------------------|------|------------------|
|                            | чел.        | %    | чел.        | %    | чел.             | %    |                  |
|                            | 1           | 1'   | 2           | 2'   | 3                | 3'   |                  |
| <b>Пыльцевые аллергены</b> |             |      |             |      |                  |      |                  |
| Табак                      | 6           | 11,1 | 8           | 12,3 | 3                | 8,1  | 0,804            |
| Акация                     | 11          | 20,4 | 5           | 7,7  | 8                | 21,1 | 0,074            |
| Каштан                     | 8           | 14,8 | 12          | 18,5 | 11               | 29,0 | 0,214            |
| Липа                       | 8           | 14,8 | 12          | 18,5 | 8                | 21,1 | 0,727            |
| Клен                       | 9           | 16,7 | 6           | 9,2  | 6                | 15,8 | 0,408            |
| Ясень                      | 2           | 3,7  | 1           | 1,5  | 0                | 0    | 0,422            |
| Ольха                      | 10          | 18,5 | 4           | 6,2  | 6                | 15,8 | 0,097            |
| Орешник                    | 13          | 24,1 | 9           | 13,4 | 7                | 18,4 | 0,334            |
| Дуб                        | 12          | 22,2 | 7           | 10,8 | 8                | 21,1 | 0,178            |
| Береза                     | 10          | 18,5 | 8           | 12,3 | 8                | 21,1 | 0,424            |
| Бузина                     | 15          | 27,8 | 14          | 21,5 | 10               | 26,3 | 0,671            |
| Ель обыкновенная           | 2           | 3,7  | 3           | 4,6  | 2                | 5,3  | 0,934            |
| Тимофеевка                 | 16          | 29,6 | 14          | 21,5 | 15               | 39,5 | 0,123            |
| Овсяница                   | 15          | 28,3 | 12          | 18,5 | 8                | 21,1 | 0,440            |
| Одуванчик                  | 9           | 16,7 | 2           | 3,1  | 3                | 7,9  | 0,031            |
| Пырей                      | 7           | 13,0 | 10          | 15,2 | 6                | 15,8 | 0,913            |

Продолжение таблицы 10

|                             |           |             |           |             |           |             |              |
|-----------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|--------------|
| Лисохвост                   | 9         | 16,7        | 10        | 15,4        | 6         | 15,8        | 0,973        |
| Крапива                     | 3         | 5,6         | 4         | 6,2         | 5         | 13,2        | 0,320        |
| Цветы сирени                | 4         | 7,4         | 6         | 9,2         | 1         | 2,6         | 0,461        |
| Ежа                         | 8         | 14,8        | 12        | 18,5        | 8         | 21,1        | 0,727        |
| Костер                      | 18        | 33,3        | 18        | 27,7        | 16        | 42,1        | 0,278        |
| Полевица                    | 17        | 31,5        | 21        | 31,8        | 15        | 39,5        | 0,647        |
| Мятлик                      | 10        | 18,5        | 10        | 15,4        | 8         | 21,1        | 0,721        |
| Амброзия                    | <b>22</b> | <b>40,7</b> | <b>12</b> | <b>18,5</b> | <b>14</b> | <b>36,8</b> | <b>0,016</b> |
| Полынь                      | 6         | 11,1        | 6         | 9,2         | 1         | 2,6         | 0,331        |
| Лебеда                      | 12        | 22,2        | 11        | 16,9        | 5         | 13,2        | 0,516        |
| Подсолнечник                | 8         | 14,8        | 8         | 12,3        | 4         | 10,5        | 0,822        |
| Конопля                     | 2         | 3,7         | 5         | 7,6         | 1         | 2,6         | 0,469        |
| Пыльца кукурузы             | 13        | 24,1        | 8         | 12,3        | 6         | 15,8        | 0,214        |
| Рожь                        | 16        | 29,6        | 13        | 20,0        | 12        | 31,6        | 0,294        |
| Ромашка аптечная            | 8         | 14,8        | 4         | 6,2         | 1         | 2,6         | 0,079        |
| Микст луговых трав          | 11        | 20,4        | 9         | 13,9        | 8         | 21,1        | 0,507        |
| Микст пыльцевых<br>деревьев | 6         | 11,1        | 5         | 7,7         | 4         | 10,5        | 0,775        |
| Циклохена                   | 4         | 7,4         | 7         | 10,8        | 5         | 13,2        | 0,650        |

Примечание: р рассчитывали по критерию  $\chi^2$ . Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Изучение спектра грибковой сенсibilизации также позволило установить, что данный вид аллергенов играет значимую роль преимущественно при респираторных проявлениях атопии и сочетании БА и

АД, в то время как сенсibilизация к грибам в группе больных с АД в разы меньше (рис. 11).

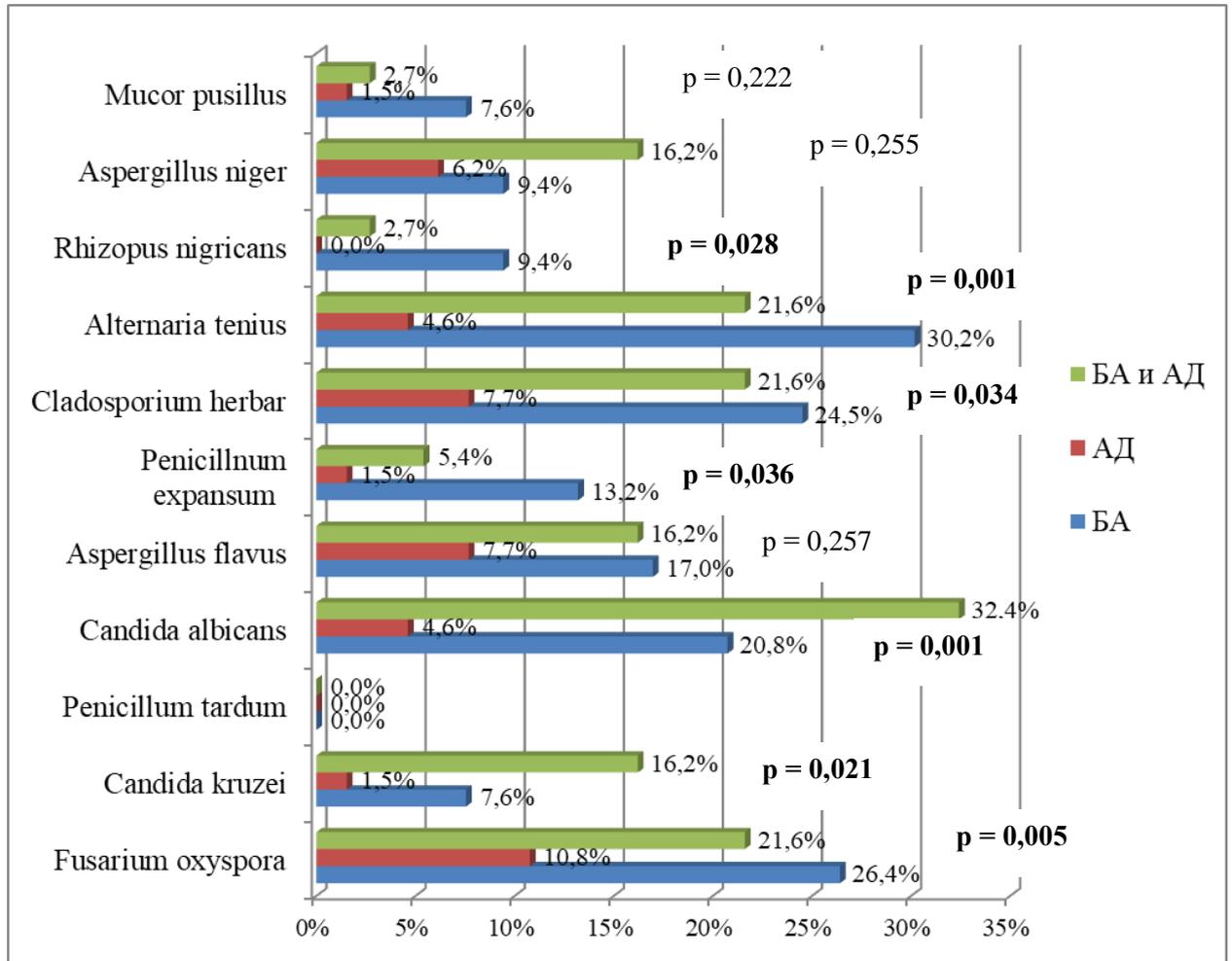


Рисунок 11. Частота сенсibilизации к различным грибковым аллергенам у больных бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и их сочетанием

Изучение спектра сенсibilизации к эпидермальным аллергенам показало, что для больных, страдающих БА, наиболее значимыми являются аллергены шерсти овцы (34,0%) и кошки (18,0%). У пациентов с кожными проявлениями аллергической реакции наиболее часто регистрировалась реакция на шерсть собаки (15,9 %) и кролика (12,7 %). В то время как у больных с сочетанием БА и АД, наиболее часто отмечались специфические IgE к шерсти овцы (15,2 %) [рис. 12].

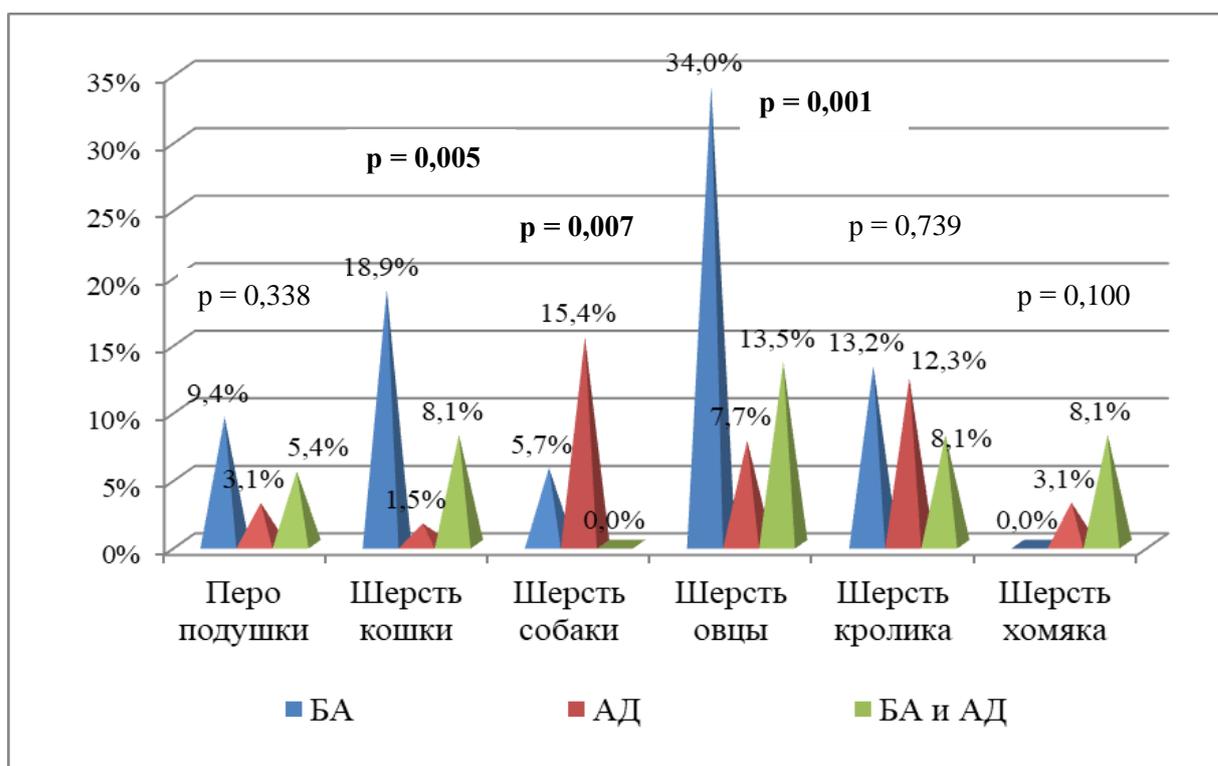


Рисунок 12. Частота сенсibilизации к различным эпидермальным аллергенам у больных бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и их сочетание

Проведенное аллергологическое обследование показало, что не у всех пациентов отмечается повышение уровня общего IgE в сыворотке крови, а определение уровня специфических IgE позволило изучить спектр сенсibilизации обследованных нами пациентов.

### 3.5. Модель прогнозирования риска развития тяжелого течения атопического дерматита у детей

Кожные проявления аллергии не только являются фактором риска развития БА, но и оказывают значительное влияние на качество жизни детей. Поэтому прогнозирование течения АД является важной составляющей адекватного ведения данных пациентов и контроля назначенной терапии для нивелирования риска развития осложнений заболевания.

Прежде чем приступить к анализу полученных нами данных, все включенные в данное исследование больные были ранжированы на две группы: в первую вошли больные с тяжелым и среднетяжелым течением АД (им был присвоен ранг «1»), во вторую – с легкими проявлениями заболевания (ранг «0»). Далее методом логит-регрессии была дана характеристика нелинейной связи между риском тяжелого течения АД и комплексом показателей (табл. 11)

Таблица 11

Показатели силы влияния установленных факторов риска на вероятность развития тяжелого течения АД у детей

| Фактор риска                                    | Величина коэффициента в модели | OR      | P      |
|---|--------------------------------|---------|--------|
| Постоянная (B0)                                 | 2,266E+01                      |         |        |
| Возраст больного, лет                           | 0,493                          | 535,979 | 0,04   |
| Возраст манифестации АД, ранг                   | -0,317                         | 0,387   | 0,002  |
| SCORAD, баллы                                   | -0,547                         | 0,000   | 0,0001 |
| Распространенность процесса                     | -4,499                         | 0,0001  | 0,001  |
| Наличие патологии печени и желчевыводящих путей | -1,102                         | 0,332   | 0,003  |

Примечание: OR- отношение шансов

Причем следует обратить внимание, что в число факторов риска тяжелого течения АД вошел такой параметр, как возраст манифестации, ранжированный в зависимости от возрастной группы пациентов: в первую возрастную группу (с рангом «1») были включены дети, у которых появление кожных проявлений аллергии отмечалось в возрасте до 6 месяцев, т.е. до введения прикормов; во вторую группу (с рангом «2») вошли пациенты с манифестацией заболевания в возрасте от 6 месяцев до года; в третью группу (с рангом «3») – от года до трех лет и в четвертую (с рангом «4») – это дети с клиникой АД, возникшей старше трех лет. Важно отметить, что чем младше

возраст манифестации заболевания, тем выше риск тяжелых кожных проявлений аллергии у ребенка в будущем.

Особое внимание следует также уделить такому предиктору тяжелого течения АД, как наличие патологии печени и желчевыводящих путей. В проведенном нами ранее исследовании было показано, что почти четверть детей, страдающих АД, имеют патологию желудочно-кишечного тракта (24,4 %). Возможно, наличие изменений со стороны печени и желчевыводящих путей способствует нарушению пищеварения (расщепления пищевых веществ), тем самым потенцируя развитие тяжелых клинических проявлений заболевания.

Также значимую роль в прогнозировании заболевания играют данные объективного осмотра больного, на основании которых рассчитывается индекс SCORAD и степень распространенности поражения кожных покровов на момент осмотра больного. В сочетании с другими факторами данные параметры позволяют более достоверно описать проявления степени тяжести АД у каждого больного.

Прежде чем составить уравнение линейной регрессии, всем включенным в данную группу пациентам были присвоены ранги: 1 – больным с среднетяжелым и тяжелым течением заболевания, 0 – детям с легкими проявлениями атопии.

Зависимость между всеми описанными выше факторами описывает математическое выражение:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = 22,7 + 0,49 * B - 0,32 * BM - 0,55 * S - 4,5 * P - 1,1 PP,$$

где

B – возраст больного, лет;

BM – возраст манифестации заболевания (до 6 мес – 1; от 6 мес до 1 года – 2, от 1 года до 3 лет – 3; старше 3 лет – 4);

S – индекс SCORAD, баллы;

P – распространенность повреждения кожи (ограниченный - 1, распространенный - 2, диффузный – 3);

ПП – наличие патологии печени и/или желчевыводящих путей (при наличии патологии – 1, при отсутствии – 0).

Между включенными в данную модель факторами установлена статистически значимая зависимость ( $\chi^2 = 35,3$ ,  $p = 0,000$ ), что в дальнейшем позволило провести ROC-анализ и найти дифференциальную точку разделения для Y, повышающую риск тяжелого течения АД при ее превышении (рис. 13).

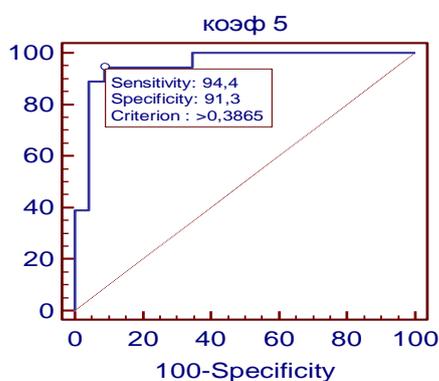


Рисунок 13. ROC-кривая соотношения чувствительности и специфичности для точки разделения Y по прогнозу риска тяжелого течения АД

При превышении значения Y величины 0,386 риск тяжелого течения АД повышался с диагностической чувствительностью 94,4 % и специфичностью 91,3 %. Площадь под ROC кривой составила  $0,954 \pm 0,0325$ , что свидетельствовало о высоком качестве прогностической системы. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии была высокой и составила  $p < 0,0001$  ( $z = 13,98$ ). По величине площади под ROC кривой (AUC), соответствующей диапазону 0,9-1,0, способность модели определять риск тяжелого течения АД интерпретировали как отличную с высокой статистической значимостью.

С помощью данной модели можно достаточно быстро определить прогноз тяжести течения АД у детей. Преобразованная в компьютерную программу, она в течение нескольких секунд может рассчитать значения  $Y$  и получить заключения о вероятности тяжелого течения заболевания у ребенка (рис. 14).

| Внесите данные больного в желтую область  |    |       |   |
|---|----|-------|---|
| Возраст, лет  | 10 | 0,49  | 22,7                                    |
| Возраст манифестации АД(до 6 мес – 1; от 6 мес до 1 года - 2, от 1 года до 3 лет – 3; старше 3 лет – 4) | 4  | -0,32 | -1,28                                   |
| SCORAD, баллы   | 40 | -0,55 | -22                                     |
| Распространенность повреждения кожи (ограниченный - 1, распространенный - 2, диффузный – 3);            | 2  | 0,096 | 0,192                                   |
| Наличие патологии печени и/или желчевыводящих путей (при наличии патологии – 1, при отсутствии – 0)     | 1  | 1,09  | 1,09                                    |
|   |    |       | 5,602                                   |
| Расчетное значение коэффициента "У"   |    |       | 0,996                                   |
| <b>Заключение</b>   |    |       | <b>Риск тяжелого течения АД высокий</b> |

Рисунок 14. Окно автоматического расчета риска тяжелого течения АД у детей

**Клинический пример 1.** Пациент Т., 7 лет, поступил для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: атопический дерматит, детская форма, среднетяжелое течение, распространенный, период обострения заболевания. При поступлении отмечались жалобы на интенсивный зуд, высыпания по всему телу. Со слов мамы вышеперечисленные жалобы беспокоят ребенка с рождения. В течение последних двух дней, после нарушений диеты, состояние мальчика ухудшилось, в связи с чем он госпитализирован в стационар для проведения обследования и лечения. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы бледные, сухие с пятнисто-папулезной сыпью, локализующейся преимущественно в области верхних, нижних конечностей и лица, с участками лихенификации и экскориации. По системе SCORAD – 45 баллов. Частота дыхания 18 дыхательных движений в минуту. Над легкими перкуторно определяется ясный легочной звук, аускультативно – везикулярное дыхание, хрипов нет. Тоны сердца ясные, ритмичные. ЧСС – 85 ударов в минуту, артериальное давление –

100/60 мм.рт.ст. По другим органам и системам объективные данные без особенностей. По результатам УЗ-исследования органов брюшной полости диагностировано увеличение размеров печени, перегиб желчного пузыря в области шейки, УЗИ-признаки дисфункции билиарного тракта по гипотоническому типу.

Для прогнозирования степени тяжести дальнейшего течения АД у ребенка было проведено исследование согласно представленному выше методу.

На основании клинико-anamnestических данных и результатов ультразвукового исследования определены значения параметров В (7), VM (1), S (45), P (2), ПП (1). Затем вычислили значения коэффициента «У» по формуле:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = 22,7 + 0,49 * 7 - 0,32 * 1 - 0,55 * 45 - 4,5 * 2 - 1,1 * 1 = 0,912$$

Поскольку У равен 0,912, что гораздо больше уровня 0,386, можно предположить, что у данного больного риск развития тяжелого течения АД высокий.

Расчеты с помощью автоматизированного окна (рис. 15), подтверждают сделанное заключение.

| Внесите данные больного в желтую область  |    |       |   |
|---|----|-------|---|
| Возраст, лет  | 7  | 0,49  | 3,43                                    |
| Возраст манифестации АД(до 6 мес – 1; от 6 мес до 1 года - 2, от 1 года до 3 лет – 3; старше 3 лет – 4) | 1  | -0,32 | -0,32                                   |
| SCORAD, баллы   | 45 | -0,55 | -24,75                                  |
| Распространенность повреждения кожи (ограниченный - 1, распространенный - 2, диффузный – 3):            | 2  | 0,096 | 0,192                                   |
| Наличие патологии печени и/или желчевыводящих путей (при наличии патологии – 1, при отсутствии – 0)     | 1  | 1,09  | 1,09                                    |
| Расчетное значение коэффициента "У"   |    |       | 0,912                                   |
| <b>Заключение</b>   |    |       | <b>Риск тяжелого течения АД высокий</b> |

Рисунок 15. Окно автоматизированного расчета значений У у больного Т.

Принимая во внимание высокую вероятность развития тяжелого течения АД у данного больного, ему была назначена терапия местными глюкокортикостероидами в сочетании с увлажняющими средствами, антигистаминные препараты, а также проведено парентеральное введение ГКС и антигистаминных препаратов в течение трех дней. На фоне проводимой терапии состояние ребенка улучшилось и в течение месяца удалось добиться стабилизации состояния.

**Клинический пример 2.** Пациентка И., 4 лет, поступила для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: атопический дерматит, детская форма, легкое течение, ограниченный, период обострения заболевания. При поступлении отмечались жалобы на зуд и высыпания в области верхних и нижних конечностей. Со слов мамы вышеперечисленные жалобы беспокоят ребенка с рождения. Ухудшение состояния отмечалось в течение последней недели (мама связывает с введением новых продуктов питания). При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы бледные, сухие с пятнисто-папулезной сыпью. По системе SCORAD – 48 баллов. Частота дыхания 20 дыхательных движений в минуту. Над легкими перкуторно определяется ясный легочной звук, аускультативно – пуэрильное дыхание, хрипов нет. Тоны сердца ясные, ритмичные. ЧСС – 105 ударов в минуту, артериальное давление – 90/60 мм.рт.ст. По другим органам и системам объективные данные без особенностей. По результатам УЗ-исследования органов брюшной полости – патологии не зарегистрировано.

Для прогнозирования степени тяжести дальнейшего течения АД у ребенка было проведено исследование согласно представленному выше методу.

На основании клинико-anamnestических данных и результатов ультразвукового исследования определены значения параметров В (4),

BM (1), S (48), P (1), ПП (0). Затем вычислили значения коэффициента «Y» по формуле:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = 22,7 + 0,49 * 4 - 0,32 * 1 - 0,55 * 48 - 4,5 * 1 - 1,1 * 0 = 0,123$$

Поскольку Y равен 0,123, что меньше 0,386, можно предположить, что у данного больного риск развития тяжелого течения АД низкий.

Расчеты с помощью автоматизированного окна (рис. 16), подтверждают сделанное заключение.

| Внесите данные больного в желтую область  |    |       |  |
|---|----|-------|--|
| Возраст, лет  | 4  | 0,49  | 1,96                                   |
| Возраст манифестации АД(до 6 мес – 1; от 6 мес до 1 года - 2, от 1 года до 3 лет – 3; старше 3 лет – 4) | 1  | -0,32 | -0,32                                  |
| SCORAD, баллы   | 48 | -0,55 | -26,4                                  |
| Распространенность повреждения кожи (ограниченный - 1, распространенный - 2, диффузный – 3);            | 1  | 0,096 | 0,096                                  |
| Наличие патологии печени и/или желчевыводящих путей (при наличии патологии – 1, при отсутствии – 0)     | 0  | 1,09  | 0                                      |
|   |    |       | -1,964                                 |
| Расчетное значение коэффициента "Y"   |    |       | <b>0,123</b>                           |
| <b>Заключение</b>   |    |       | <b>Риск тяжелого течения АД низкий</b> |

Рисунок 16. Окно автоматизированного расчета значений Y у больной И.

Принимая во внимание низкую вероятность развития тяжелого течения АД у данной больной, ей была назначена только терапия местными глюкокортикостероидами в сочетании с увлажняющими средствами. На фоне проводимой терапии состояние ребенка улучшилось и удалось достичь контроля над заболеванием.

Применение данных моделей в клинической практике показало, что изучение значимости факторов, влияющих на развитие АД, не только позволяют расширить теоретические знания в данной области, но и представляют большой практический интерес. А проведение математических

расчетов позволило не только выявить наиболее чувствительные параметры для определения дальнейшего течения заболевания, но и оценить их прогностическую значимость в развитии тяжелых проявлений кожной атопии.

### **3.6. Модель прогнозирования риска развития тяжелого течения бронхиальной астмы у детей**

Оптимизация методов диагностики и профилактики аллергических заболеваний – залог эффективного лечения больных. А прогнозирование их дальнейшего течения позволяет не только предвидеть возможные негативные изменения в организме больного, но и изменить объем терапии, не дожидаясь развития серьезных осложнений. Поэтому изучение влияния различных экзо- и эндогенных факторов на течение заболевания представляет большой научный и практический интерес.

Обследование когорты пациентов с аллергическими заболеваниями позволило выявить наиболее значимые факторы, предрасполагающие к более тяжелому течению заболевания, и разработать на основе комбинации различных параметров, программы прогнозирования риска тяжелого и неконтролируемого течения БА, АД, а также при сочетании данных патологий.

Методом логит-регрессии был проведен статистический анализ клинико-лабораторных параметров, позволивший выявить ряд факторов, повышающих вероятность развития более тяжелого течения БА у детей. В данный анализ были включены такие параметры, как возраст, пол, масса, рост, индекс массы тела, возраст манифестации заболевания, степень дыхательной недостаточности, частота использования бронхолитиков, вид базисной терапии и ее продолжительность, показатели пикфлоуметрии, показатели общего IgE, количество детей в семье, отягощенный аллергоанамнез (по материнской, отцовской и обеим линиям родства), частота ОРВИ, продолжительность заболевания, наличие сопутствующей

аллергической патологии (крапивница, пищевая, лекарственная аллергия и др.), наличие связи обострения заболевания с временем года, периодом цветения растений, определенными запахами, переменной погоды, контактом с домашними животными, физической нагрузкой, наиболее частое время возникновения приступов, а также показатели спирограммы (ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ1, индекс Тиффно, МОС 25, МОС 50, МОС 75, ПОС) и общего анализа крови (количество эритроцитов, лейкоцитов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, уровень гемоглобина, величина скорости оседания эритроцитов).

Прежде чем перейти к анализу среди обследованных нами больных были выделены две группы, ранжированные в зависимости от тяжести течения заболевания. В первую группу (с рангом 1) вошли дети, имеющие тяжелое и среднетяжелое течение заболевания (32 ребенка, 15,0 %), во вторую группу (с рангом 0) пациенты с легкими проявлениями БА (181 человек, 85,0 %). Проведенный анализ установил наличие нелинейной связи между риском более тяжелого течения БА и целым комплексом клинико-функциональных показателей (табл. 12).

Таблица 12

Показатели силы влияния установленных факторов риска на  
вероятность развития тяжелого течения БА

| Фактор риска                             | Величина коэффициента в модели | OR    | P     |
|--|--------------------------------|-------|-------|
| Постоянная (B0)                          | -4,989                         |       |       |
| Возраст (B)                              | 0,135                          | 5,040 | 0,023 |
| Степень дыхательной недостаточности (ДН) | -0,009                         | 0,403 | 0,001 |
| Результат пикфлоуметрии (ПСВ)            | 0,004                          | 1,741 | 0,041 |
| Продолжительность заболевания (Пр), лет  | 0,096                          | 4,204 | 0,001 |

Продолжение таблицы 12

|  |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|
| Связь обострений БА с переменной погоды (ПП)             | 1,090 | 8,846 | 0,003 |
| Связь обострений заболевания с физической нагрузкой (ФН) | 0,640 | 1,896 | 0,001 |

Примечание: OR- отношение шансов

Обращает на себя внимание выраженная зависимость тяжести течения БА от таких факторов, как связь обострений заболевания с физической нагрузкой (OR = 1,896,  $p = 0,001$ ) и переменной погоды (OR = 8,846) [ $p = 0,003$ ]. Эти показатели свидетельствуют о сохраняющейся гиперреактивности бронхов у больного, которая является ведущим патофизиологическим механизмом в развитии БА. Наличие столь высоких положительных значений данных показателей у обследованных детей диктует необходимость более пристального внимания к данным пациентам и изменения тактики ведения этих больных.

Также стоит отметить положительную взаимосвязь между продолжительностью заболевания и вероятностью развития более тяжелого течения заболевания. Это объяснимо с точки зрения патогенеза БА – длительно сохраняющееся хроническое воспаление бронхов приводит к их структурным изменениям (ремоделированию), поэтому, чем дольше наблюдаются клинические проявления заболевания, тем больше вероятность его осложнений и снижения эффективности проводимой терапии.

Результаты анализа показали, что увеличение продолжительности заболевания сопровождается значительным повышением риска его тяжелого течения - более чем в 4 раза (OR = 4,20,  $p = 0,001$ ).

Представленный сравнительный анализ демонстрирует также статистически достоверное значение в развитии тяжелого течения БА таких факторов как дыхательная недостаточность (ДН) и пиковая скорость выдоха (ПСВ). Следует отметить, что все включенные в данную модель параметры

можно определить при первичном сборе анамнеза и осмотре больного, что важно для практического использования данной программы как в условиях стационара, так и поликлиники.

Зависимость между всем комплексом параметров описывает математическое выражение:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = -4,99 + 0,135 * B - 0,009 * ДН + 0,004 * ПСВ + 0,096 * ПР + 1,09 * ПП + 0,64 * ФН,$$

где

B – возраст ребенка, лет;

ДН – степень дыхательной недостаточности;

ПСВ – величина пиковой скорости выдоха, %;

ПР – продолжительность заболевания, лет;

ПП – связь обострений заболевания с переменной погоды (1 – есть, 0 – нет);

ФН – связь обострений заболевания с физической нагрузкой (1 – есть, 0 – нет).

При этом установлено, что между включенными в данное уравнение факторами отмечается статистически значимая зависимость с риском развития тяжелого течения заболевания ( $\chi^2 = 19,97$ ,  $p = 0,0028$ ).

Далее методом ROC анализа была найдена дифференциальная точка разделения для Y, повышающая риск тяжелого течения БА при ее превышении (рис. 17).

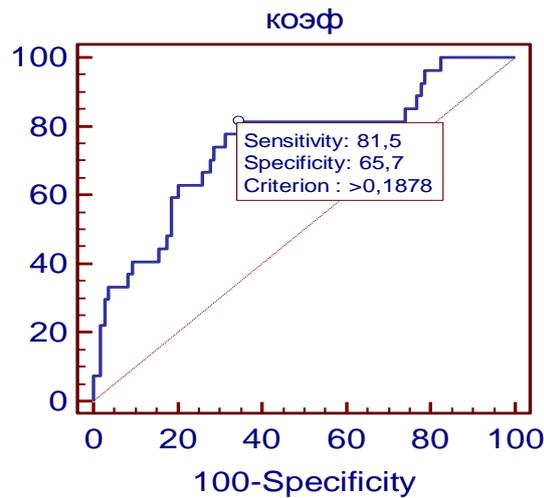


Рисунок 17. ROC-кривая соотношения чувствительности и специфичности для точки разделения  $Y$  по прогнозу риска тяжелого течения бронхиальной астмы

При превышении значения  $Y$  величины 0,189 риск тяжелого течения БА повышался с диагностической чувствительностью 81,5 % и специфичностью 65,7 %. Площадь под ROC кривой составила  $0,748 \pm 0,057$ , доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии была высокой и составила  $p < 0,0001$  ( $z = 4,32$ ). По величине площади под ROC кривой (AUC), соответствующей диапазону 0,7-0,8, способность модели определять риск тяжелого течения БА интерпретировали как удовлетворительную с высокой статистической значимостью.

Данная модель позволяет достаточно быстро определить прогноз тяжести течения БА у детей. Однако для облегчения работы врача нами создана компьютерная программа, позволяющая после внесения данных пациента в течение нескольких секунд автоматически рассчитать значения  $Y$  и получить заключение о вероятности тяжелого течения заболевания у ребенка, позволяющее вовремя провести коррекцию базисной терапии и профилактировать развитие осложнений в будущем (рис. 18).

|    | B | C   | D  | E      | F      | G      | H            | I | J | K                                       | L |
|----|---|---|----|--------|--------|--------|--------------|---|---|---|---|
| 6  |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 7  |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 8  |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 9  |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 10 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 11 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 12 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 13 |   | <b>Внесите данные больного в желтую область</b>                         |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 14 |   |   |    |        |        | -4,99  |              |   |   |   |   |
| 15 |   | Возраст, лет  | 9  | 0,135  | 1,215  |        |              |   |   |   |   |
| 16 |   | Дыхательная недостаточность, степень                                    | 1  | -0,009 | -0,009 |        |              |   |   |   |   |
| 17 |   | ПСВ, %  | 65 | 0,004  | 0,26   |        |              |   |   |   |   |
| 18 |   | Продолжительность заболевания, лет                                      | 5  | 0,096  | 0,48   |        |              |   |   |   |   |
| 19 |   | Связь обострения заболевания с переменной погоды (есть - 1, нет - 0)    | 1  | 1,09   | 1,09   |        |              |   |   |   |   |
| 20 |   | Связь обострения заболевания с физической нагрузкой (есть - 1, нет - 0) | 1  | 0,64   | 0,64   |        |              |   |   |   |   |
| 21 |   |   |    |        |        | -1,314 | 0,268743     |   |   |   |   |
| 22 |   | Расчетное значение коэффициента "у"                                     |    |        |        |        | <b>0,212</b> |   |   |   |   |
| 23 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 24 |   | <b>Заключение</b>   |    |        |        |        |              |   |   | <b>Риск тяжелого течения БА высокий</b> |   |
| 25 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 26 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 27 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 28 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 29 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |
| 30 |   |   |    |        |        |        |              |   |   |   |   |

Рисунок 18. Окно автоматического расчета риска тяжелого течения БА

**Клинический пример 3.** Пациент К., 12 лет, поступил для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, легкое течение, период обострения. При поступлении отмечались жалобы на слабость, одышку, сухой кашель. Из анамнеза известно, что ребенок болеет БА с 2 лет, впервые обструктивный синдром развился на фоне острой респираторно-вирусной инфекции. При этом мама отмечает частое появление приступов после физической нагрузки (бег), а также при перемене погоды (преимущественно после дождя). В течение последнего года базисной терапии ребенок не получал. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы бледные, цианотичные, без патологических элементов. Отмечается экспираторная одышка, частота дыхания 30 дыхательных движений в минуту. Над легкими перкуторно определяется коробочный звук, аускультативно – на фоне ослабленного дыхания рассеянные сухие свистящие хрипы на выдохе. Тоны сердца отчетливые, ритм учащен: ЧСС – 100 ударов в минуту, артериальное давление – 100/60 мм.рт.ст.



Принимая во внимание высокую вероятность развития тяжелого течения БА у данного больного, ему была назначена терапия комбинированным препаратом пролонгированных  $\beta$ -адреномиметиков и ИГКС. Контроль за состоянием ребенка, проведенный в динамике через 3 месяца показал, что в течение данного времени состояние ребенка было удовлетворительным, однако, сохранялись эпизоды одышки после физической нагрузки. В связи с этим в план терапии данного больного были добавлены антилейкотриеновые препараты. На фоне проводимой терапии состояние пациента значительно улучшилось, удалось достичь контроля над заболеванием.

**Клинический пример 4.** Пациент В., 10 лет, поступил для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, легкое течение, период обострения. При поступлении отмечались жалобы на затрудненное дыхание, сухой кашель. Из анамнеза известно, что впервые обструктивный синдром развился в возрасте 8 лет во время похода в цирк. При этом связи обострений заболевания с переменной погодой и физической нагрузкой мама не отмечает. В течение последнего года ребенок получал антилейкотриеновые препараты в качестве базисной терапии. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы розовые, без патологических элементов. Отмечается экспираторная одышка. Над легкими перкуторно определяется коробочный звук, аускультативно – на фоне ослабленного дыхания рассеянные сухие свистящие хрипы на выдохе. Тоны сердца отчетливые, ритм учащен: ЧСС – 90 ударов в минуту, артериальное давление – 110/70 мм.рт.ст.

Для прогнозирования степени тяжести дальнейшего течения БА у ребенка было проведено исследование согласно представленному выше методу.

По данным опроса родителей было установлено, что ребенку на момент исследования 10 полных лет. Продолжительность заболевания составила 2 года. При этом у него отсутствует связь обострений заболевания с переменной погоды и физической нагрузкой. При объективном осмотре больного диагностированы симптомы дыхательной недостаточности 1 степени. По данным пикфлоуметрии пиковая скорость выдоха составила 75 %.

Затем вычислили значения коэффициента «Y» по формуле:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = -4,99 + 0,135 * 10 - 0,009 * 1 + 0,004 * 75 + 0,096 * 2 + 1,09 * 0 + 0,64 * 0$$

Поскольку Y равно 0,041, что гораздо меньше уровня 0,189, можно предположить, что у данного больного риск развития тяжелого течения БА низкий. Расчеты с помощью автоматизированного окна (рис. 20), подтверждают сделанное заключение.

| Внесите данные больного в желтую область                                |    |        |        |  |
|---|----|--------|--------|--|
| Возраст, лет  | 10 | 0,135  | -4,99  |  |
| Дыхательная недостаточность, степень                                    | 1  | -0,009 | -0,009 |  |
| ПСВ, %  | 75 | 0,004  | 0,3    |  |
| Продолжительность заболевания, лет                                      | 2  | 0,096  | 0,192  |  |
| Связь обострения заболевания с переменной погоды (есть - 1, нет - 0)    | 0  | 1,09   | 0      |  |
| Связь обострения заболевания с физической нагрузкой (есть - 1, нет - 0) | 0  | 0,64   | 0      |  |
|   |    |        | -3,157 | 0,042553                               |
| Расчетное значение коэффициента "Y"                                     |    |        |        | <b>0,041</b>                           |
| <b>Заключение</b>   |    |        |        | <b>Риск тяжелого течения БА низкий</b> |

Рисунок 20. Окно автоматизированного расчета значений Y у больного В.

Принимая во внимание низкую вероятность развития тяжелого течения БА у данного больного, ему была назначена монотерапия низкими дозами

ИГКС, позволившая в течение месяца достигнуть контроля над заболеванием.

Как видно из представленной модели, наибольшую силу связи влияния на риск развития тяжелого течения БА имеют такие анамнестические факторы, как возраст, продолжительность заболевания, реакция бронхов на предшествующую физическую нагрузку или изменение погоды, а также объективно оцениваемая при осмотре больного степень дыхательной недостаточности и величина пиковой скорости выдоха. Определение данных параметров позволяет с высокой степенью достоверности говорить о значениях коэффициента риска развития тяжелого течения БА. И в случае, если  $Y$  более 0,189, расценивать прогноз заболевания как неблагоприятный, а, следовательно, необходимо проведение коррекции терапии на данном этапе.

### **3.7. Модель прогнозирования риска развития тяжелого течения бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом**

Проведенный анализ влияния различных факторов на течение БА позволил выявить ряд параметров, оказывающих в комплексе значительное влияние на прогноз течения данной монопатологии у детей. Однако, как было показано нами в предыдущем разделе работы, сочетанные кожные и респираторные проявления аллергии характеризуются более тяжелыми клиническими проявлениями у больных. При этом изучение экзо- и эндогенных факторов у обследованных нами пациентов позволило установить, что данный патогенетический процесс является многофакторным механизмом. И определение комплекса факторов, лежащих в основе данного заболевания, позволит прогнозировать развитие его тяжелых форм.

Проведенный методом логит-регрессии статистический анализ полученных данных позволил дать характеристику нелинейной связи между

риском тяжелого течения БА на фоне АД и целым комплексом таких показателей, как возраст, пол, масса, рост, индекс массы тела, возраст манифестации заболевания, степень дыхательной недостаточности, частота использования бронхолитиков, вид базисной терапии и ее продолжительность, показатели пикфлоуметрии, показатели общего IgE, количество детей в семье, отягощенный аллергоанамнез (по материнской, отцовской и обеим линиям родства), частота ОРВИ, продолжительность заболевания, наличие сопутствующей аллергической патологии (крапивница, пищевая, лекарственная аллергия и др.), наличие связи обострения заболевания с временем года, периодом цветения растений, определенными запахами, переменной погоды, контактом с домашними животными, физической нагрузкой, наиболее частое время возникновения приступов, а также показатели спирограммы (ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ1, индекс Тиффно, МОС 25, МОС 50, МОС 75, ПОС) и общего анализа крови (количество эритроцитов, лейкоцитов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, уровень гемоглобина, величина скорости оседания эритроцитов).

Однако, наличие нелинейной связи между риском тяжелого течения БА на фоне АД было установлено только в отношении показателей, представленных в таблице 13.

Таблица 13

Показатели силы влияния установленных факторов риска на вероятность развития тяжелого течения БА у детей с сопутствующим АД

| Фактор риска          | Величина коэффициента в модели | OR      | P    |
|-----------------------|--------------------------------|---------|------|
| Постоянная (B0)       | -29,624                        |         |      |
| Возраст больного, лет | 0,442                          | 128,567 | 0,03 |

Продолжение таблицы 13

|  |        |          |       |
|--|--------|----------|-------|
| Возраст манифестации БА, лет                       | -0,006 | 0,908    | 0,001 |
| Дыхательная недостаточность                        | 2,061  | 61,662   | 0,04  |
| Продолжительность базисной терапии, мес            | -0,074 | 0,383    | 0,002 |
| Связь обострений с физической нагрузкой            | -0,556 | 0,573    | 0,001 |
| Пиковая экспираторная объемная скорость, л/сек     | -0,050 | 0,024    | 0,003 |
| Уровень эритроцитов в сыворотке крови, $10^{12}/л$ | 4,737  | 1277,810 | 0,001 |

Примечание: OR- отношение шансов

Следует обратить внимание, что среди факторов, играющих важную роль в прогнозе тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА и АД, как и при монопатологии, является связь обострений заболевания с физической нагрузкой. Бронхоспазм при физическом напряжении, свидетельствующий о сохраняющейся бронхиальной гиперреактивности, является результатом зачастую реактинзависимой аллергической реакции, вызванной высвобождением лейкотриенов. А, следовательно, маркером сохраняющегося воспаления в бронхах. Поэтому столь важно в данной ситуации не только оценить степень дыхательной недостаточности у больного, но и уточнить продолжительность базисной терапии.

Столь же важным параметром, включенным в данную модель, является возраст манифестации заболевания. В настоящее время показано, что данный параметр в большинстве случаев определяет прогноз течения заболевания. Так, например, если БА впервые появляется у детей старше 12 лет, в этом возрастном периоде могут возникнуть проблемы с комплаенсом больных, а, следовательно, эффективностью проводимого лечения. С другой стороны, у детей раннего возраста достаточно значимо влияние острых

респираторных заболеваний на частоту обострений БА, способствующих поддержанию хронического воспаления в бронхах, что также необходимо учитывать при прогнозировании его течения.

Также стоит отметить, что у пациентов данной когорты среди клинико-лабораторных показателей установлено влияние уровня эритроцитов в сыворотке крови. В ежедневной практике мы не уделяем значения данному показателю у детей с аллергическими заболеваниями, хотя, повышение уровня эритроцитов может свидетельствовать о недостаточном контроле над заболеванием и может быть отражением компенсаторной реакции детского организма в ответ на хроническую гипоксию, вызванную сохраняющейся бронхообструкцией.

Среди показателей, оценивающих функциональное состояние бронхолегочной системы, прогностически значимыми критериями являются значения пиковой экспираторной скорости потока (ПОС). ПОС – это один из наиболее чувствительных маркеров, отражающих силу дыхательных мышц, а также изменение калибра «главных» бронхов, что немаловажно в патогенезе БА. Бронхоспазм в сочетании с отеком слизистой бронхов, а также гиперсекрецией слизи может приводить к изменению скоростных показателей при оценке функции внешнего дыхания. Поэтому ПОС является показателем, отражающим максимальную объемную скорость потока воздуха, и тем самым характеризует даже самые минимальные изменения в бронхолегочной системе.

Следует обратить внимание, что в отдельности каждый из включенных в данную модель факторов риска не отражает тяжести клинических проявлений заболевания, однако, суммарный эффект данных параметров позволяет с высокой степенью вероятности говорить о повышенном риске развития тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА и АД.

Зависимость между вышеописанными факторами описывает математическое выражение:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = -29,6 + 0,44 * B - 0,006 * BM + 2,06 * ДН - 0,07 * ПБТ - 0,56 * ФН - 0,05 * ПОС + 4,7 * Эри,$$

где

B – возраст, лет;

BM – возраст манифестации БА, лет;

ДН – степень дыхательной недостаточности;

ПБТ – продолжительность базисной терапии, мес.;

ФН – связь обострений заболевания с физической нагрузкой (при наличии связи показателю ФН присваивается значение равное «1», при отсутствии связи – «0»);

ПОС - пиковая экспираторная скорость потока, л/сек;

Эри – показатель уровня эритроцитов в крови больного,  $10^{12}/л$ .

Следует отметить, что прежде чем провести математическую обработку полученных данных все обследованные нами больные были рандомизированы на две группы: в первую (с рангом «1») вошли дети со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания, во вторую (с рангом «0») больные с легкой формой БА.

Достоверность полученных нами результатов подтверждает статистически значимая зависимость между включенными в данную модель факторами ( $\chi^2 = 24,1$ ,  $p = 0,001$ ).

Принимая во внимание высокий уровень достоверности разработанной модели, далее методом ROC анализа была найдена дифференциальная точка разделения для Y, повышающая риск тяжелого течения БА у больных с сочетанием БА и АД при ее превышении (рис. 21).

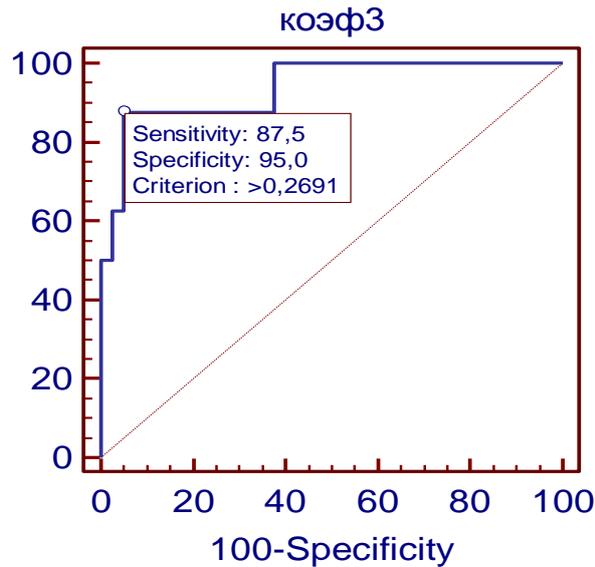


Рисунок 21. ROC-кривая соотношения чувствительности и специфичности для точки разделения  $Y$  по прогнозу риска тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА и АД

Установлено, что при превышении значения  $Y$  величины 0,269 риск тяжелого течения заболевания повышался с диагностической чувствительностью 87,5% и специфичностью 95%. Площадь под ROC кривой составила  $0,937 \pm 0,048$ , что свидетельствует о хорошем качестве прогностической системы. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии высокая и составила  $p < 0,0001$  ( $z = 9,056$ ). По величине площади под ROC кривой (AUC), соответствующей диапазону 0,9-1,0, способность модели определять риск тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА и АД интерпретировали как отличную с высокой статистической значимостью.

Высокая диагностическая чувствительность и специфичность данной модели позволяет с высокой долей вероятности прогнозировать тяжелое течение БА у детей, страдающих сочетанием БА и АД. Для оптимизации работы специалистов нами была создана компьютерная программа, позволяющая автоматически рассчитать риск развития тяжелого течения БА у детей с установленными диагнозами БА и АД (рис. 22).

|    | B | C   | D   | E      | F      | G     | H        | I | J | K | L                                       |
|----|---|---|-----|--------|--------|-------|----------|---|---|---|---|
| 9  |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 10 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 11 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 12 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 13 |   | <b>Внесите данные больного в желтую область</b>                         |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 14 |   |   |     |        |        | -29,6 |          |   |   |   |   |
| 15 |   | Возраст, лет  | 5   | 0,44   | 2,2    |       |          |   |   |   |   |
| 16 |   | Возраст манифестации, лет   | 3   | -0,006 | -0,018 |       |          |   |   |   |   |
| 17 |   | Дыхательная недостаточность, степень                                    | 2   | 2,06   | 4,12   |       |          |   |   |   |   |
| 18 |   | Продолжительность базисной терапии, мес                                 | 3   | -0,07  | -0,21  |       |          |   |   |   |   |
| 19 |   | Связь обострения заболевания с физической нагрузкой (есть - 1, нет - 0) | 1   | 1,09   | 1,09   |       |          |   |   |   |   |
| 20 |   | ПОС, %  | 53  | -0,05  | -2,65  |       |          |   |   |   |   |
| 21 |   | Количество эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л                             | 5,1 | 4,7    | 23,97  |       |          |   |   |   |   |
| 22 |   |   |     |        |        | 1,552 | 4,720903 |   |   |   |   |
| 23 |   | Расчетное значение коэффициента "У"                                     |     |        |        |       |          |   |   |   | <b>0,825</b>                            |
| 24 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 25 |   | <b>Заключение</b>   |     |        |        |       |          |   |   |   | <b>Риск тяжелого течения БА высокий</b> |
| 26 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 27 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 28 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 29 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 30 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 31 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 32 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |
| 33 |   |   |     |        |        |       |          |   |   |   |   |

Рисунок 22. Окно автоматического расчета риска тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА и АД

**Клинический пример 5.** Пациентка О., 6 лет, поступила для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, среднетяжелое течение, период обострения. Сопутствующий диагноз: атопический дерматит, детская форма, распространенный, среднетяжелое течение, период обострения. При поступлении отмечались жалобы на кашель, затрудненное дыхание, высыпания, зуд. Из анамнеза известно, что ребенок болеет БА с 2 лет, впервые обструктивный синдром развился после контакта с домашним животным - кошкой. При этом мама отмечает частое появление приступов после физической нагрузки (бег). В течение последних 6 месяцев в качестве базисной терапии получает ИГКС в низких дозах. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы бледные, сухие с множественными элементами экскориаций и лихенификаций, пятнисто-папулезная сыпь в области туловища, верхних и нижних конечностей. После физической нагрузки отмечается появление цианоза. При осмотре экспираторная одышка, частота

дыхания 34 дыхательных движений в минуту. Над легкими перкуторно определяется коробочный звук, аускультативно – на фоне ослабленного дыхания рассеянные сухие свистящие хрипы на выдохе. Тоны сердца отчетливые, ритм учащен: ЧСС – 100 ударов в минуту, артериальное давление – 100/60 мм.рт.ст. По данным спирографии ПОС – 48%. В общем анализе крови отмечается эозинофилия 12 %, эритроциты –  $5,2 \times 10^{12}$  /л.

Для прогнозирования степени тяжести дальнейшего течения БА у ребенка было проведено исследование согласно представленному выше методу.

По данным опроса родителей было установлено, что ребенку на момент исследования 6 полных лет. Возраст манифестации заболевания 2 года. Базисную терапию девочка получала в течение последних 6 месяцев. При этом у нее отмечается связь обострений заболевания с физической нагрузкой. При объективном осмотре больного диагностированы симптомы дыхательной недостаточности 2 степени. По данным спирографии ПОС составила 48 %. Уровень эритроцитов в крови –  $5,2 \times 10^{12}$  /л.

Затем вычислили значения коэффициента «Y» по формуле:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = -29,6 + 0,44 * 6 - 0,006 * 2 + 2,06 * 2 - 0,07 * 6 - 0,56 * 1 - 0,05 * 48 + 4,7 * 5,2,$$

Поскольку Y равно 0,905, что гораздо больше уровня 0,189, можно предположить, что у данного больного риск развития тяжелого течения БА высокий.

Расчеты с помощью автоматизированного окна (рис. 23), подтверждают сделанное заключение.

|    | B | C   | D   | E      | F      | G     | H            | I | J | K | L                                       |
|----|---|---|-----|--------|--------|-------|--------------|---|---|---|---|
| 9  |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 10 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 11 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 12 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 13 |   | <b>Внесите данные больного в желтую область</b>                         |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 14 |   |   |     |        |        | -29,6 |              |   |   |   |   |
| 15 |   | Возраст, лет  | 6   | 0,44   | 2,64   |       |              |   |   |   |   |
| 16 |   | Возраст манифестации, лет   | 2   | -0,006 | -0,012 |       |              |   |   |   |   |
| 17 |   | Дыхательная недостаточность, степень                                    | 2   | 2,06   | 4,12   |       |              |   |   |   |   |
| 18 |   | Продолжительность базисной терапии, мес                                 | 6   | -0,07  | -0,42  |       |              |   |   |   |   |
| 19 |   | Связь обострения заболевания с физической нагрузкой (есть - 1, нет - 0) | 1   | 1,09   | 1,09   |       |              |   |   |   |   |
| 20 |   | ПОС, %  | 48  | -0,05  | -2,4   |       |              |   |   |   |   |
| 21 |   | Количество эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л                             | 5,2 | 4,7    | 24,44  |       |              |   |   |   |   |
| 22 |   |   |     |        |        | 2,258 | 9,563942     |   |   |   |   |
| 23 |   | Расчетное значение коэффициента "У"                                     |     |        |        |       | <b>0,905</b> |   |   |   |   |
| 24 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 25 |   | <b>Заключение</b>   |     |        |        |       |              |   |   |   | <b>Риск тяжелого течения БА высокий</b> |
| 26 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 27 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 28 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 29 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 30 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 31 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 32 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |
| 33 |   |   |     |        |        |       |              |   |   |   |   |

Рисунок 23. Окно автоматизированного расчета значений У у больной О.

Принимая во внимание высокую вероятность развития тяжелого течения БА у данной пациентки, ей была назначена терапия ИГКС в высоких дозах в сочетании с антилейкотриеновыми препаратами. На фоне проводимой терапии состояние девочки значительно улучшилось, удалось достичь контроля над заболеванием.

**Клинический пример 6.** Больной С., 10 лет, поступил для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, легкое течение, период обострения. Сопутствующий диагноз: атопический дерматит, детская форма, ограниченный, легкое течение, период ремиссии. При поступлении отмечались жалобы на кашель, периодическую одышку. Из анамнеза известно, что ребенок болеет БА с 8 лет, впервые обструктивный синдром развился после контакта с пыльцевыми аллергенами (у бабушки на даче). При этом связи обострений заболевания с физической нагрузкой мальчик не отмечает. Базисную терапию не получал. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы бледные, сухие. При осмотре экспираторная одышка, частота дыхания 28

дыхательных движений в минуту. Над легкими перкуторно определяется коробочный звук, аускультативно – на фоне ослабленного дыхания рассеянные сухие свистящие хрипы на выдохе. Тоны сердца отчетливые, ритм учащен: ЧСС – 105 ударов в минуту, артериальное давление – 90/60 мм.рт.ст. По данным спирографии ПОС – 68 %. В общем анализе крови отмечается эозинофилия 8%, эритроциты –  $4,5 \times 10^{12}$  /л.

Для прогнозирования степени тяжести дальнейшего течения БА у ребенка было проведено исследование согласно представленному выше методу.

По данным опроса родителей было установлено, что ребенку на момент исследования 10 полных лет. Возраст манифестации заболевания 8 лет. Базисную терапию не получал. При этом не отмечает наличие связи обострений заболевания с физической нагрузкой. При объективном осмотре больного диагностированы симптомы дыхательной недостаточности 1 степени. По данным спирографии ПОС составила 68 %. Уровень эритроцитов в крови –  $4,5 \times 10^{12}$  /л.

Затем вычислили значения коэффициента «Y» по формуле:

$$y = \exp z / (1 + \exp z),$$

при

$$z = -29,6 + 0,44 * 10 - 0,006 * 8 + 2,06 * 1 - 0,07 * 0 - 0,56 * 0 - 0,05 * 68 + 4,7 * 4,5.$$

Поскольку Y равно 0,155, что меньше 0,189, можно предположить, что у данного больного риск развития тяжелого течения БА низкий.

Расчеты с помощью автоматизированного окна (рис. 24), подтверждают сделанное заключение.

| Внесите данные больного в желтую область                                |     |        |  |
|---|-----|--------|--|
| Возраст, лет  | 10  | 0,44   | 4,4                                    |
| Возраст манифестации, лет   | 8   | -0,006 | -0,048                                 |
| Дыхательная недостаточность, степень                                    | 1   | 2,06   | 2,06                                   |
| Продолжительность базисной терапии, мес                                 | 0   | -0,07  | 0                                      |
| Связь обострения заболевания с физической нагрузкой (есть - 1, нет - 0) | 0   | 1,09   | 0                                      |
| EOS, %  | 68  | -0,05  | -3,4                                   |
| Количество эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л                             | 4,5 | 4,7    | 21,15                                  |
| Расчетное значение коэффициента "Y"                                     |     |        | 0,130289                               |
|   |     |        | <b>0,115</b>                           |
| <b>Заключение</b>   |     |        | <b>Риск тяжелого течения БА низкий</b> |

Рисунок 24. Окно автоматизированного расчета значений Y у больного С.

Принимая во внимание низкую вероятность развития тяжелого течения БА у данного больного, ему была назначена терапия ИГКС в низких дозах. На фоне проводимой терапии состояние мальчика улучшилось, жалобы отсутствуют.

Важно отметить, что используя метод нелинейной логистической регрессии, получены статистически достоверные данные, подтверждающие прогностическое значение данных клинико-лабораторных факторов риска в повышении вероятности развития тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА и АД. Данный метод прогнозирования применим в обычной практике как узких специалистов, так и педиатров.

### Резюме.

1. Установлено, что у больных с БА, имеющих указание в анамнезе на перенесенный ранее АД, отмечается более тяжелое течение заболевания по сравнению с пациентами, имеющими монопатологию ( $p = 0,05$ ).
2. Зарегистрировано, что дети с сочетанием БА и АД имеют отягощенный аллергоанамнез в 71,2 % случаев [причем наличие аллергических заболеваний по обеим линиям родства зарегистрировано более чем у трети (37,7 %) обследованных], в то

время как в группе больных, страдающих только БА, этот показатель составил 59,2 %, а в группе детей с АД - 44,0 %.

3. Установлено, что среди всех обследованных больных с аллергическими заболеваниями повышенные уровни общего IgE зарегистрированы только в 39,8 % случаев, в то время как данный показатель находился в пределах референтных значений у 60,2 % больных. При этом у детей, страдающих БА, показатели общего IgE не коррелировали с уровнем контроля над заболеванием, а также показателями функции внешнего дыхания и степенью тяжести ДН, зафиксированной при поступлении в стационар ( $p > 0,05$ ).
4. На основании полученных данных определены наиболее значимые факторы, определяющие тяжесть течения заболевания, а также разработаны программы прогнозирования степени тяжести различных видов аллергических заболеваний у детей.

Проведенный в ходе данного исследования анализ полученных данных показал, насколько значимо влияние как экзо- так и эндогенных факторов на тяжесть течения аллергических заболеваний у детей. Однако до сих пор остаются неизвестными некоторые звенья патогенеза данных нозологий (особенно у пациентов, не имеющих лабораторного подтверждения атопии). Дальнейшее изучение молекулярно-генетических механизмов формирования как БА, АД, так и сочетаний данных заболеваний позволит раскрыть не только новые патогенетические звенья, лежащие в основе хронического аллергического воспаления, но и, возможно, определить точки таргетной терапии данных пациентов.

## ГЛАВА 4. РОЛЬ ФАКТОРОВ РОСТА И МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ

Факторы роста и металлопротеиназы могут играть значимую роль в процессах возникновения, поддержания воспаления и ремоделирования тканей при аллергических заболеваниях. Это связано с тем, что они являются одними из основных медиаторов, управляющих патофизиологическими и патохимическими процессами как в эпидермисе кожи при АД, так и в стенке бронхов при БА. Поэтому изучение вклада этих клеточно-молекулярных факторов в патогенез аллергических заболеваний у детей представляет большой практический интерес.

На данном этапе исследования нами проведено комплексное обследование детей, страдающих различными аллергическими заболеваниями и пациентов контрольной группы, с определением у них уровня VEGFA, TGF $\beta$  и MMP9 в сыворотке крови. В когорту данных больных вошли 84 пациента, страдающих БА, 49 детей с установленным диагнозом АД и 75 человек, имеющих обе патологии. Контрольную группу составили 35 детей I и IIa групп здоровья, сопоставимые по полу и возрасту с основной выборкой пациентов.

При этом в группу пациентов, страдающих только БА, были включены 36 (42,9 %) пациентов с легким течением заболевания, 15 (17,9 %) со среднетяжелыми и 33 (39,3 %) с тяжелыми проявлениями заболевания. В то время как среди больных АД одинаковое количество детей - 9 (18,4 %) были с легкой и тяжелой формой АД, а большинство [31 (63,3 %)] составили больные со среднетяжелым течением заболевания. В группе детей, страдающих и БА и АД, 43 (57,3 %) человека имели легкие проявления БА, 18 (24,0 %) – среднетяжелые и 14 (18,7 %) тяжелые клинические проявления заболевания, в то время как АД легкой степени тяжести был зарегистрирован у 41 (54,7 %), среднетяжелой у 23 (30,7 %) и тяжелой у 11 (14,7 %) [табл. 14].

Распределение больных по степени тяжести бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей

| Течение заболевания | БА   |       | АД   |       | БА+АД |       | $\chi^2$                | Р                                      |                        |  |
|---------------------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------------------------|--|------------------------|--|
|                     | 1    | 1'    | 2    | 2'    | 3     | 3'    |                         |  |                        |  |
|                     | чел. | %     | чел. | %     | чел.  | %     |                         |  |                        |  |
| Легкое              | 36   | 42,9  | 43   | 57,3  | 9     | 18,4  | $\chi^2_{123} = 41,131$ | <b><math>p_{123} = 0,0005</math></b>   |                        |  |
| Средне-тяжелое      | 15   | 17,9  | 18   | 24,0  | 31    | 63,3  |                         |  | $\chi^2_{12} = 28,224$ | <b><math>p_{12} &lt; 0,0001</math></b> |
| Тяжелое             | 33   | 39,3  | 14   | 18,7  | 9     | 18,4  |                         |  | $\chi^2_{13} = 8,090$  | <b><math>p_{13} = 0,018</math></b>     |
| Всего               | 84   | 100,0 | 75   | 100,0 | 49    | 100,0 | $\chi^2_{23} = 22,295$  | <b><math>p_{23} &lt; 0,0001</math></b> |                        |  |

Примечание: р - значимость различий между группами.

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп;

$p_{12}$  значимость различий между больными БА и АД

$p_{13}$  значимость различий между больными БА и БА+АД

$p_{23}$  значимость различий между больными АД и БА+АД

При попарном сравнении р рассчитывали по критерию  $\chi^2$ , жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Средний возраст обследованных больных в группах варьировал, так среди пациентов с БА он составил 11,5 [8,5; 14,5] лет, тогда как в группе больных АД - 8,0 [7,0; 10,0] лет, а среди детей, имеющих сочетание БА и АД - 10,0 [9,0; 13,0] лет.

#### 4.1. Значение фактора роста эндотелия сосудов в формировании бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей

Фактор роста эндотелия сосудов играет значимую роль в патогенезе аллергических заболеваний. Являясь индуктором неоангиогенеза и мощным митогеном клеток эндотелия сосудов, он способствует не только формированию функциональных нарушений микроциркуляции, сопровождающихся повышенной проницаемостью сосудов, но и поддержанию воспаления в очаге поражения. Главным механизмом регуляции процессов неоангиогенеза является высвобождение VEGF А, источником которого могут быть эндотелиальные и тучные клетки,

макрофаги и др. Под действием данного ангиогенного фактора происходит активация эндотелиоцитов (преимущественно в посткапиллярных венулах) и миграция их за пределы базальной мембраны с формированием ответвлений основных сосудов. Важно отметить, что индуцированная экспрессия VEGF не только не сопровождается образованием полноценных сосудов, но и резко повышает проницаемость существующих [85, 93], в то время как экспрессия VEGF в комплексе с прочими факторами стимулирует рост и развитие новой сосудистой сети [109, 249]. Процесс ремоделирования тканей при развитии аллергических заболеваний, происходящий под влиянием VEGF, достаточно сложный. Поэтому столь важно оценить его значимость в патогенезе не только БА, АД, но и при сочетании данных патологий у детей.

Проведенное нами исследование показало, что концентрация данного цитокина у пациентов с аллергическими заболеваниями намного превышает значения у детей, включенных в группу контроля (табл. 15).

Таблица 15

Концентрация фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови у обследованных пациентов, пг/мл

| № | Диагноз           | Me [Q25; Q75], пг/мл   |
|---|-------------------|--|
| 1 | БА (n = 27)       | 145,80 [62,36; 180,50]   |
| 2 | АД (n = 35)       | 203,78 [115,96; 310,98]  |
| 3 | БА + АД (n = 34)  | 124,0 [70,60; 144,62]  |
| 0 | Контроль (n = 35) | 16,90 [14,80; 25,72]   |
|   | P                 | <p><b><math>p_{01} &lt; 0,0001</math></b></p> <p><b><math>p_{02} &lt; 0,0001</math></b></p> <p><b><math>p_{03} = 0,0036</math></b></p> <p><b><math>p_{0123} &lt; 0,0001</math></b></p> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{0123}$  значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса);

$p_{01}$  значимость различий между группой контроля и больными БА;

$p_{02}$  значимость различий между группой контроля и больными АД;

$p_{03}$  значимость различий между группой контроля и больными БА+АД

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Подробный анализ полученных данных, проведенный в каждой группе обследованных пациентов показал, что среди детей, страдающих БА, установлены достоверно значимые отличия концентрации фактора роста эндотелия сосудов у пациентов с легким, среднетяжелым и тяжелым течением заболевания (табл. 16). Принимая во внимание тот факт, что гипоксия является одним из наиболее значимых факторов, индуцирующих экспрессию фактора роста эндотелия сосудов в организме человека, можно предположить, что трехкратное повышение концентрации данного цитокина у пациентов с тяжелым течением, по сравнению с легкой формой БА, обусловлено частыми и выраженными по клиническим проявлениям эпизодами бронхообструкции. Следовательно, показатель VEGF в сыворотке крови больных БА может быть биологическим маркером, отражающим тяжесть клинического течения заболевания.

Таблица 16

## Показатели VEGFA у больных с различным течением БА, пг/мл

| № | Течение БА    | Концентрация VEGFA, пг/мл<br>Me [Q25; Q75]  |
|---|---------------|---|
| 1 | Легкое        | 65,48 [35,71; 79,36]  |
| 2 | Среднетяжелое | 161,80 [57,47; 168,70]  |
| 3 | Тяжелое       | 190,0 [150,90; 201,47]  |
|   | P             | <p><b><math>p_{123} &lt; 0,0001</math></b></p> <p><b><math>p_{12} = 0,0008</math></b></p> <p><b><math>p_{23} = 0,011</math></b></p> <p><b><math>p_{13} &lt; 0,0001</math></b></p> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса);

$p_{12}$  значимость различий между легким и среднетяжелым течением БА;

$p_{13}$  значимость различий легким и тяжелым течением БА;

$p_{23}$  значимость различий среднетяжелым и тяжелым течением БА

Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Доказательством данному факту является установленная значимая корреляционная зависимость между значением VEGFA и течением БА у детей ( $r = 0,802$ ;  $p < 0,0001$ ) [рис. 25].

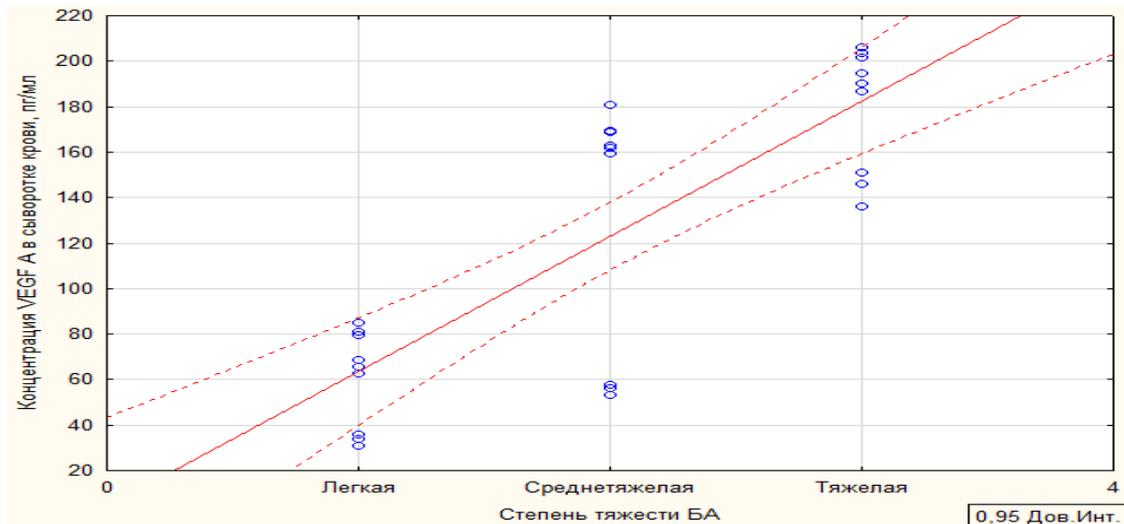


Рисунок 25. Корреляционная зависимость между концентрацией VEGFA в сыворотке крови (пг/мл) и тяжестью течения БА у детей

При этом установлено, что значения VEGFA у лиц женского пола (134,94 [65,48; 203,32] пг/мл) не имеют достоверных отличий от мужского (145,80 [57,47; 168,70] пг/мл) [ $p = 0,62$ ].

Важно отметить, что у пациентов с поливалентной сенсibilизацией показатели VEGFA практически в два раза выше (155,08 [59,92; 183,41] пг/мл), чем у детей, отмечающих реакцию на один вид аллергена (80,64 [79,36; 84,97] пг/мл).

Подробный анализ результатов, полученных в ходе данного исследования установил, что у детей с БА, не отвечающих на терапию противовоспалительными препаратами, величина VEGFA была значительно выше (161,80 [150,90; 168,70] пг/мл), чем в группе пациентов, у которых удалось достичь контроля над заболеванием (73,89 [56,00; 190,02]) пг/мл [ $p = 0,028$ ]. При этом у детей, получающих монотерапию ИГКС значения данного параметра были достоверно ниже (73,89 [65,48; 80,64]) пг/мл, чем у детей, использующих комбинации ИГКС и ДДБА (162,72 [159,25; 168,70]) пг/мл [ $p = 0,004$ ]. Следовательно, можно предположить, что изменение

концентрации VEGFA в сыворотке крови больных свидетельствует об иных механизмах, лежащих в основе патогенеза БА, требующих детального изучения и играющих важное значения при подборе базисной терапии. Возможно, отсутствие адекватной реакции на проводимую противовоспалительную терапию обусловлено конформационными изменениями, произошедшими в бронхах на фоне хронического аллергического воспаления. Так, в ходе данного исследования было установлено, что между концентрацией VEGF A в сыворотке крови пациентов и приростом ОФВ1 после ингаляции бронхолитика отмечается обратная корреляционная зависимость ( $r = -0,438$ ;  $p = 0,022$ ) [рис. 26]. Таким образом, чем выше значения фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови, тем меньше прирост скоростных показателей у больных после проведенной ингаляции бронхолитиков. Следовательно, в патогенезе заболевания, кроме спазма гладкой мускулатуры бронхов, также принимают участие и другие механизмы, а установленные нами изменения свидетельствуют о реорганизации стенки бронхов, произошедшей под влиянием VEGFA у обследованных больных.

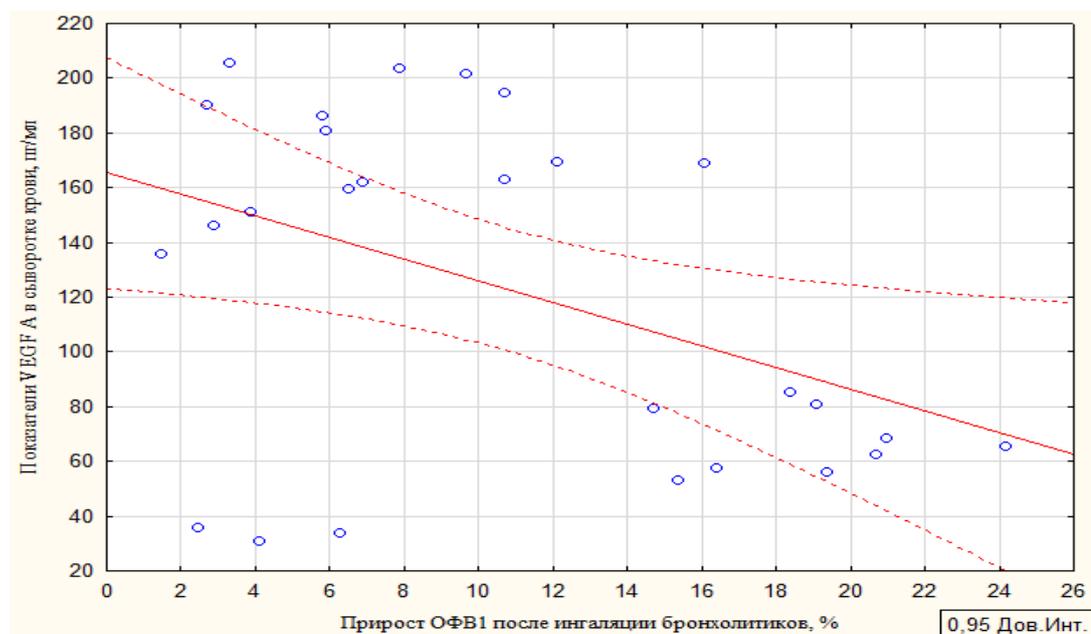


Рисунок 26. Линия регрессии и корреляционное поле точек связи между показателями VEGFA в сыворотке крови и процентом прироста ОФВ1 в сыворотке крови больных БА

Анализ анамнестических данных показал, что средняя частота использования бронхолитических препаратов у обследованных нами детей составила 3 [2; 8] раза в год. При этом значимой корреляционной зависимости между показателями VEGF A в сыворотке крови и частотой применения данных препаратов зарегистрировано не было ( $p > 0,05$ ).

Изучение взаимосвязи между индексом массы тела и значениями данного цитокина у больных, страдающих БА, также не выявило достоверной зависимости ( $p > 0,05$ ).

Также проведенное лабораторное исследование показало, что у всех детей, страдающих АД, отмечается значительное повышение уровня VEGFA в сыворотке крови (203,78 [115,96; 310,98] пг/мл), по сравнению с детьми контрольной группы (16,90 [14,80; 25,72] пг/мл) [табл. 14]. Полученные нами данные согласуются с результатами исследований зарубежных коллег [224, 249, 256]. Причем концентрация данного цитокина коррелирует с площадью поражения кожных покровов ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,0001$ ). Так, у пациентов с ограниченной формой его величина равна 116,64 [94,18; 204,0] пг/мл, тогда как при распространенном АД – 320,40 [312,10; 606,88] пг/мл [ $p = 0,0001$ ]. Возможно, это связано с тем, что VEGF не только оказывает влияние на развитие кровеносных сосудов кожи, но и является аутокринным регулятором гиперплазии эпидермиса [224], что проявляется в виде обширных очагов лихенификации у обследованных нами пациентов.

Достоверной корреляционной зависимости между клиническими проявлениями заболевания (по данным шкалы SCORAD) и изменением содержания VEGF в сыворотке крови больных нами не было зарегистрировано ( $r = -0,31$ ;  $p = 0,068$ ). Однако, практически у всех обследованных нами детей, имеющих повышенный уровень данного цитокина, интенсивность зуда ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,0001$ ) и степень нарушения сна ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,0001$ ) оценивалась в пределах 8-10 баллов. Возможно, это связано с тем, что фактор роста эндотелия сосудов может проявлять нейротрофические свойства [229]. А именно, повышенный синтез VEGF

способствует активации фактора роста нейронов, способствуя тем самым увеличению чувствительности тканей в очаге поражения и, следовательно, усилению зуда – одного из главных клинических симптомов АД.

Также анализ показателей VEGFA в сыворотке крови больных АД установил наличие прямой корреляционной зависимости между значениями данного цитокина и возрастом манифестации заболевания ( $r = 0,50$ ;  $p = 0,002$ ) [рис. 27]. Следовательно, чем в более старшем возрасте отмечается появление первых симптомов заболевания, тем более высокие значения фактора роста эндотелия сосудов регистрируются в сыворотке крови больных, а, следовательно, у них выше вероятность активации процессов ремоделирования тканей, а также развития тяжелых клинических проявлений данного заболевания.

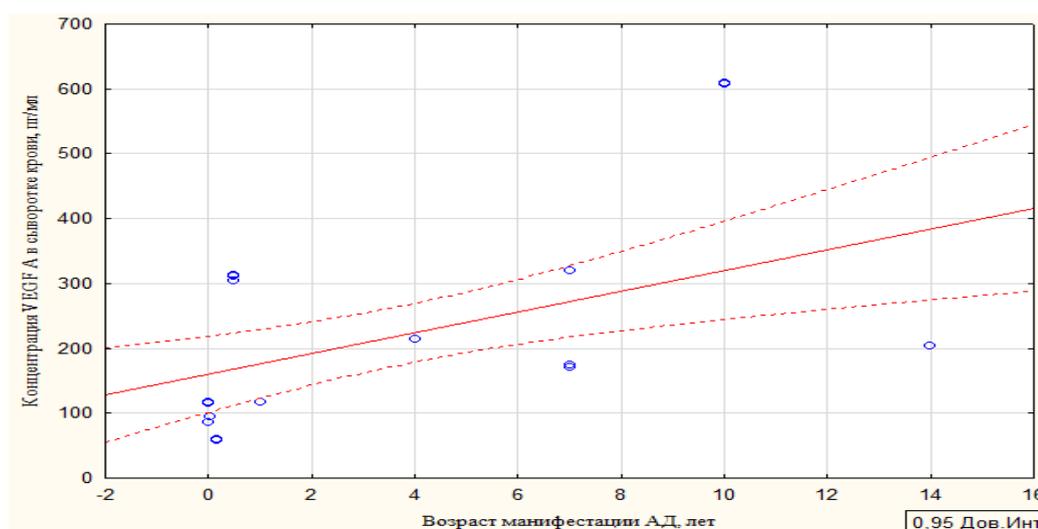


Рисунок 27. Линия регрессии и корреляционное поле точек связи возраста манифестации заболевания и значений показателя VEGFA в сыворотке крови больных АД

При проведении иммунологического обследования было установлено, что средние значения общего IgE у детей, страдающих АД (167,10 [77,38; 356,0] МЕ/мл) превышают норму. При этом показатели общего IgE не коррелируют со значениями VEGF ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,157$ ), что говорит о многофакторности механизмов формирования данной патологии.

Подробный анализ результатов комплексного обследования пациентов с сочетанием БА и АД также установил значительное повышение концентрации VEGF (124,0 [70,60; 144,62]) пг/мл) по сравнению с контрольной группой (16,90 [14,80; 25,72]) пг/мл) [ $p = 0,0036$ ]. Причем стоит отметить, что в данной группе отмечается достоверное повышение значений фактора роста эндотелия сосудов у детей с тяжелой БА, по сравнению с легким ( $p = 0,007$ ) и среднетяжелым течением заболевания ( $p = 0,015$ ) [табл. 17].

Таблица 17

Показатели VEGFA у больных с различным течением БА в группе  
БА+АД, пг/мл

| № | Течение БА            | Концентрация VEGF A, пг/мл<br>Me [Q25; Q75]  |
|---|-----------------------|--|
| 1 | Легкое (n = 16)       | 98,15 [20,04; 124,57]  |
| 2 | Среднетяжелое (n =14) | 131,12 [70,60; 144,62]   |
| 3 | Тяжелое (n = 4)       | 124,0 [70,60; 239,60]  |
|   | P                     | $p_{12} = 0,034$<br>$p_{12} = 0,649$<br>$p_{23} = \mathbf{0,015}$<br>$p_{13} = \mathbf{0,007}$ |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].  
 $p_{123}$  значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса);  
 $p_{12}$  значимость различий между легким и среднетяжелым течением БА;  
 $p_{13}$  значимость различий легким и тяжелым течением БА;  
 $p_{23}$  значимость различий среднетяжелым и тяжелым течением БА  
Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

А установленная значимая корреляционная зависимость между показателями VEGFA в сыворотке крови и тяжестью течения БА ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,025$ ) является подтверждением высокой чувствительности данного цитокина как биологического маркера тяжести состояния больного ребенка как у детей, страдающих только БА, так и при сочетании БА и АД (рис. 28).

Установлено, что аналогично данным, полученным у больных с монопатологией (БА), и в группе пациентов, страдающих БА и АД одновременно, дети, не отвечающие на стандартную противовоспалительную терапию, имели показатели VEGFA (133,13 [127,56; 214,80]) пг/мл в два раза выше, чем у больных, достигших контроля над симптомами заболевания (85,12 [27,04; 116,28]) пг/мл [ $p = 0,002$ ].

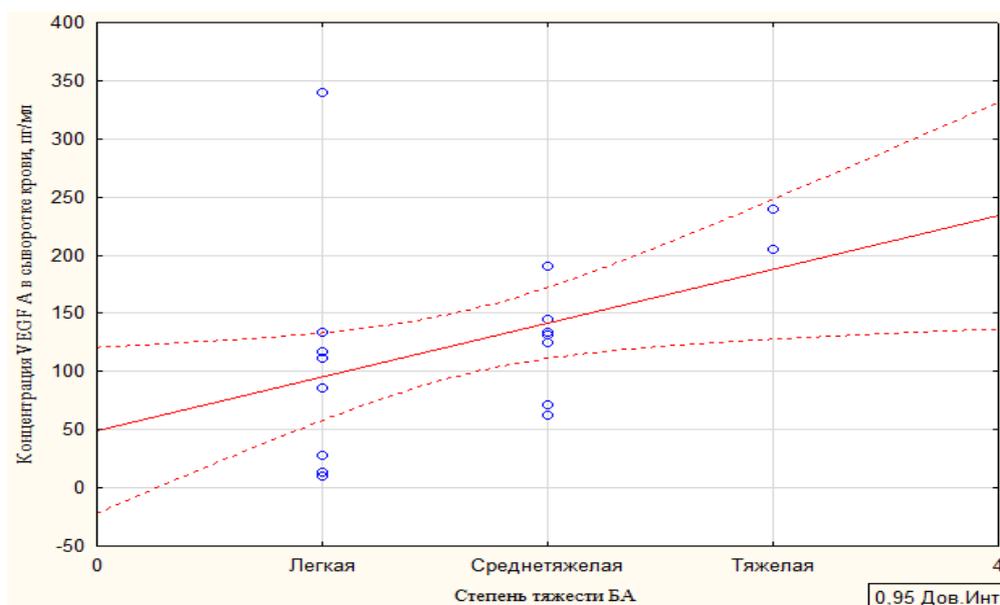


Рисунок 28. Линия регрессии и корреляционное поле точек связи между показателями VEGFA в сыворотке крови и тяжестью течения БА в группе больных с сочетанием БА и АД

Как и в первой группе обследованных пациентов, у больных с сочетанием БА и АД зарегистрирована достоверная корреляционная зависимость между показателями прироста ОФВ1 после ингаляции бронхолитика и концентрацией данного фактора роста в сыворотке крови ( $r = -0,692$ ;  $p < 0,0001$ ), что свидетельствует о значительном влиянии VEGFA на процессы ремоделирования бронхолегочной системы.

Однако, именно в этой группе отмечено значительное влияние неблагоприятной наследственности. У детей, имеющих неблагоприятный аллергоанамнез по материнской линии, показатели данного цитокина в сыворотке крови были значительно выше, чем у пациентов с благоприятным аллергоанамнезом ( $p = 0,025$ ) [табл. 18].

Концентрация VEGFA в сыворотке крови у больных в зависимости от  
отягощенности аллергоанамнеза

| № | Аллергоанамнез  | Концентрация VEGFA, пг/мл<br>Me [Q25; Q75]  |
|---|---|---|
| 0 | Благоприятный аллергоанамнез<br>(n = 12)                      | 44,49 [13,03; 70,60]  |
| 1 | Отягощенный аллергоанамнез по<br>материнской линии (n = 4)    | 192,11 [144,62; 239,6]  |
| 2 | Отягощенный аллергоанамнез по<br>отцовской линии (n = 10)     | 133,4 [131,12; 190,0]   |
| 3 | Отягощенный аллергоанамнез по<br>обеим линиям родства (n = 8) | 117,59 [98,15; 128,43]  |
|   | P   | $p_{0123} = 0,079$<br>$p_{01} = \mathbf{0,025}$<br>$p_{02} = 0,128$<br>$p_{03} = 0,528$<br>$p_{12} = 0,378$<br>$p_{13} = 0,080$<br>$p_{23} = 0,318$ |

Примечание:

$p_{0123}$  значимость различий между всеми группами (по критерию Кораскелла-Уоллиса);

$p_{01}$  значимость различий между больными без отягощенной наследственности и больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по материнской линии;

$p_{02}$  значимость различий между больными без отягощенной наследственности и больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по отцовской линии;

$p_{03}$  значимость различий между больными без отягощенной наследственности и больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по обеим линиям родства;

$p_{12}$  значимость различий между больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по материнской и отцовской линиям;

$p_{13}$  значимость различий между больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по материнской линии и по обеим линиям родства;

$p_{23}$  значимость различий между больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по отцовской линии и по обеим линиям родства;

Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Таким образом, результаты проведенного исследования подчеркивают значимость VEGF в патогенезе БА и АД, его роль в поддержании воспаления, ремоделировании тканей, а также развитии зуда. Однако многие вопросы взаимодействия нейрогенных и иммунных факторов остаются до

конца не изученными. Дальнейшие исследования в данном научном направлении могут не только помочь в формировании комплексного и углубленного представления о механизмах развития данного заболевания, но и способствовать разработке новых патогенетически обоснованных подходов к лечению БА и АД.

#### 4.2. Изучение роли трансформирующего фактора роста $\beta$ в патогенезе бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей

TGF $\beta$ 1 является одним из важнейших цитокинов, принимающих участие в регуляции процессов аллергического воспаления и ремоделирования трахей. Проведенное нами исследование показало, что его концентрация в сыворотке крови у детей, страдающих БА и АД, значительно превышает показатели контрольной группы (табл. 19).

Таблица 19

Показатели TGF $\beta$ 1 в группах обследованных пациентов, пг/мл

| № | Диагноз           | Концентрация TGF $\beta$ 1,<br>Me [Q25; Q75]  |
|---|-------------------|---|
| 1 | БА (n = 27)       | 2,47 [2,15; 250,88]   |
| 2 | АД (n = 35)       | 66,30 [25,50; 417,90]   |
| 3 | БА + АД (n = 34)  | 2,7 [2,34; 139,80]  |
| 0 | Контроль (n = 35) | 2,54 [2,34; 3,02]   |
|   | P                 | <b>p<sub>01</sub> = 0,002</b><br><b>p<sub>02</sub> &lt; 0,0001</b><br><b>p<sub>03</sub> = 0,003</b> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].  
 p<sub>01</sub> значимость различий между группой контроля и больными БА;  
 p<sub>02</sub> значимость различий между группой контроля и больными АД;  
 p<sub>03</sub> значимость различий между группой контроля и больными БА+АД.  
 При попарном сравнении p рассчитывали по критерию Манна-Уитни. Жирным шрифтом выделены p < 0,05.

Так как данный цитокин усиливает синтез белков межклеточного матрикса, способствует реорганизации пораженных тканей, можно

предположить, что повышение его концентрации может являться биологическим маркером активации процессов ремоделирования, происходящих у пациентов с аллергическими заболеваниями. Также стоит отметить, что установленное нами повышение концентрации данного цитокина у пациентов, страдающих БА, согласуется с достоверным увеличением уровня TGF $\beta$ 1 в лаважной жидкости и структурными нарушениями тканей, выявленными нашими коллегами у больных с бронхолегочной патологией [29].

Стоит отметить, что достоверных отличий между группами обследованных нами больных, страдающих БА, АД и их сочетанием, установлено не было ( $p > 0,05$ ) [рис. 29].

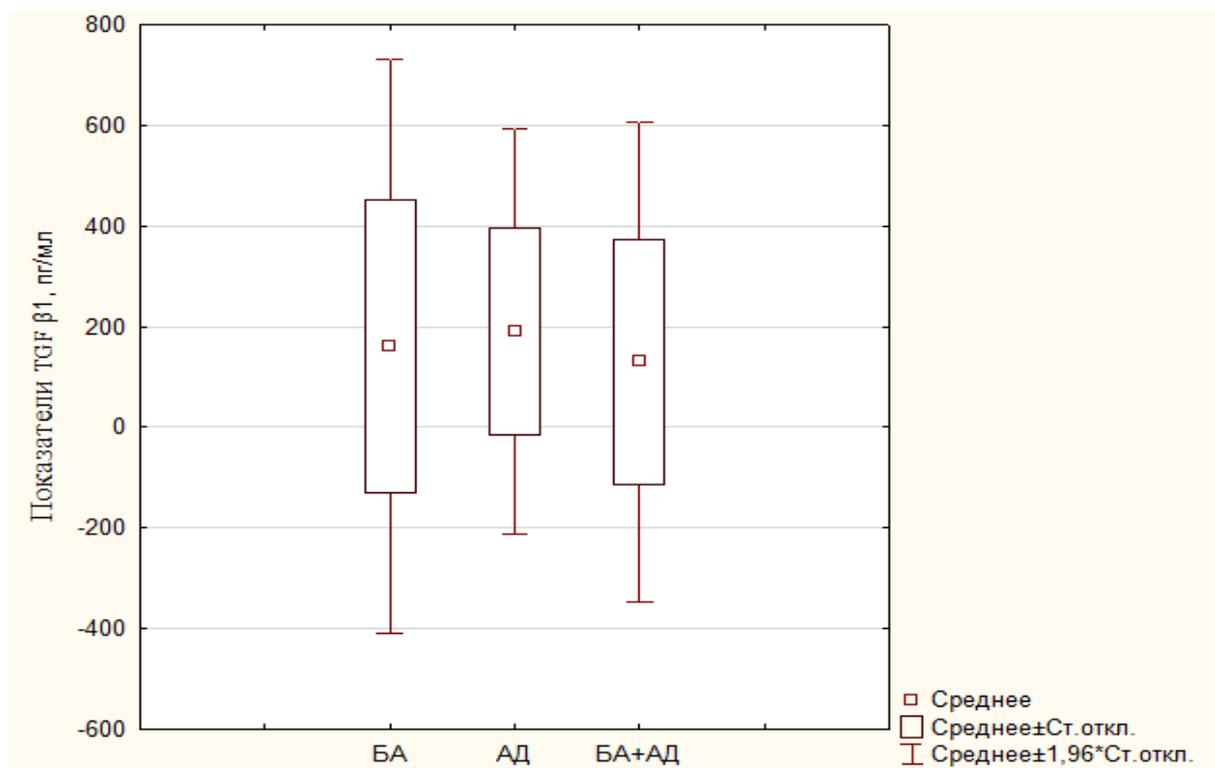


Рисунок 29. Распределение показателей TGF $\beta$ 1 в сыворотке больных с различными аллергическими заболеваниями

Анализ показателей уровня TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови больных бронхиальной астмой в зависимости от тяжести течения заболевания выявил достоверно значимые отличия концентрации данного цитокина среди

пациентов с легким и тяжелым течением БА ( $p = 0,005$ ) [табл. 20].

Таблица 20

Показатели TGF $\beta$ 1 у детей с различной степенью тяжести  
бронхиальной астмы, пг/мл

| № | Течение БА            | Концентрация TGF $\beta$ 1,<br>Ме [Q25; Q75]   |
|---|-----------------------|--|
| 1 | Легкое (n = 9)        | 236,47 [2,93; 867,16]  |
| 2 | Среднетяжелое (n = 9) | 2,34 [2,26; 277,62]  |
| 3 | Тяжелое (n = 9)       | 2,15 [2,10;2,47]   |
|   | p                     | <p><b><math>p_{123} = 0,009</math></b></p> <p><b><math>p_{12} = 0,023</math></b></p> <p><b><math>p_{23} = 0,429</math></b></p> <p><b><math>p_{13} = 0,005</math></b></p> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].  
 $p_{123}$  значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса);  
 $p_{12}$  значимость различий между легким и среднетяжелым течением БА;  
 $p_{13}$  значимость различий легким и тяжелым течением БА;  
 $p_{23}$  значимость различий среднетяжелым и тяжелым течением БА  
 Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

При этом установлена обратная корреляционная зависимость между степенью тяжести БА и концентрацией TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови ( $r = -0,52$ ;  $p = 0,006$ ). Принимая во внимание тот факт, что данный фактор роста оказывает ингибирующее влияние на иммунную систему, подавляет синтез воспалительных цитокинов и ответ лимфоцитов на ИЛ-2, 4 и 7, можно предположить, что снижение его концентрации в сыворотке крови у больных с тяжелыми проявлениями заболевания свидетельствует об истощении компенсаторных механизмов организма ребенка, страдающего БА.

А также следует отметить, что у больных тяжелой БА значения TGF $\beta$ 1 (2,15 [2,10;2,47]) пг/мл) приближаются к средним показателям, установленным в группе контроля (2,54 [2,34; 3,02]) пг/мл). Можно предположить, что столь значимое снижение концентрации данного фактора

свидетельствует о завершении процессов ремоделирования межклеточного матрикса у больных с тяжелым течением заболевания. Доказательством данному факту является прямая корреляционная зависимость, установленная между показателями  $TGF\beta 1$  в сыворотке крови больных и динамикой прироста ОФВ1 после пробы с бронхолитиками ( $r = 0,790$ ;  $p < 0001$ ). Т.е. чем меньше значения данного цитокина были установлены у пациентов, тем менее выражен ответ на проводимую ингаляционную терапию.

Анализ показателей в зависимости от гендерной принадлежности установил, что у лиц мужского пола его значения (434,82 [2,15; 922,20] пг/мл) значительно выше, чем у лиц женского пола (2,47 [2,18; 224,88]) пг/мл [ $p = 0,003$ ]. Возможно, данный факт является объяснением более высокой частоты встречаемости тяжелого течения БА у мальчиков, по сравнению с девочками.

Проведенный анализ взаимосвязи между уровнем общего IgE и  $TGF\beta 1$  показал, что достоверная корреляционная зависимость между изменениями концентрации данных факторов в сыворотке крови отсутствует ( $r = 0,368$ ;  $p = 0,06$ ). Однако у детей с высокими значениями общего IgE (более 1000 МЕ/л) уровень трансформирующего фактора роста выше (113,91 [2,22; 559,02] пг/мл), чем у пациентов без выраженной атопии (2,34 [2,13; 2,76] пг/мл) [ $p = 0,040$ ]. Следовательно, это подтверждает участие  $TGF\beta 1$  в иммуномодулирующих процессах, регулирующих изменение соотношения Т-лимфоцитов и приводящее не только к трансформации цитокинового профиля, но и к высокой продукции иммуноглобулинов класса E.

Также следует отметить, что у пациентов, имеющих в анамнезе указания на наличие аллергических заболеваний у родственников по материнской линии концентрация  $TGF\beta 1$  в сыворотке крови значительно выше (280,59 [250,88; 867,16]) пг/мл), чем у детей без отягощенного аллергоанамнеза (2,24 [2,08; 2,69]) пг/мл) [ $p = 0,0003$ ]. Это еще раз подтверждает высокую значимость наследственной предрасположенности и

диктует необходимость проведения генетических исследований для прогнозирования риска развития и тяжести течения заболевания.

Также нами проведено сравнение уровней данного цитокина в зависимости от выраженности ответа на проводимую противовоспалительную терапию. Оказалось, что среди больных БА, имеющих положительную реакцию на базисную терапию и отмечающих ее высокую эффективность, значения  $TGF\beta 1$  в сыворотке крови значительно выше (113,91 [2,15; 280,59] пг/мл), чем у детей резистентных к проводимому лечению (2,28 [2,18; 2,47] пг/мл) [ $p = 0,043$ ]. При этом у больных, находящихся на монотерапии ИГКС концентрация данного фактора в сотни раз выше (559,02 [236,47; 922,20]) пг/мл, чем у пациентов, получающих фиксированные комбинации ИГКС+ДДБА (2,34 [2,01; 2,76]) пг/мл [ $p = 0,0005$ ]. Следовательно, можно предположить, что в патогенезе заболевания у данных детей задействованы не только механизмы аллергического воспаления, на подавление которых направлены используемые противовоспалительные препараты, но и иные иммунопатологические реакции, требующие детального изучения и индивидуального подхода при подборе базисной терапии ребенку.

При этом установлена прямая корреляционная зависимость между показателями ОФВ1 и уровнем  $TGF-\beta 1$  ( $r = 0,439$ ;  $p = 0,022$ ), следовательно, чем ниже значения данного фактора в сыворотке крови пациентов, тем ниже у него показатели функции дыхания, т.е. тем больше вероятность формирования необратимых изменений в бронхолегочной системе.

Доказательством наличия ремоделирования бронхов при тяжелом течении БА у детей является практически полное отсутствие изменений показателей функции внешнего дыхания после проведения пробы с бронхолитиками. Так, если у больных с легким течением заболевания средние значения прироста ОФВ1 составили  $14,75 \pm 5,36$  л/мин, у пациентов со среднетяжелым -  $11,13 \pm 4,09$  л/мин, то у детей с тяжелой БА они

варьировали в диапазоне  $8,21 \pm 4,44$  л/мин ( $p < 0,0001$ ). Причем между показателями TGF- $\beta$ 1 и динамикой прироста значений ОФВ1 после ингаляции сальбутамола выявлена прямая корреляционная зависимость ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,0001$ ) [рис. 30].

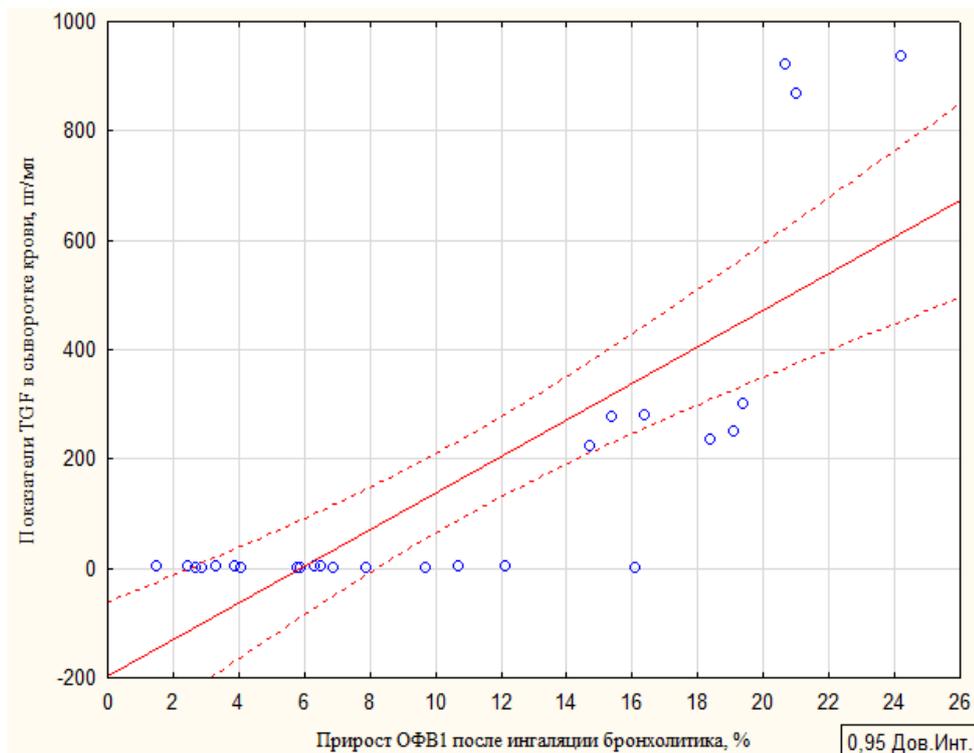


Рисунок 30. Линия регрессии и корреляционное поле точек зависимости между показателями TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови и приростом ОФВ1 после ингаляции бронхолитика у больных, страдающих БА

Об участии TGF $\beta$ 1 в процессах реорганизации дыхательных путей также говорится в работе В.И. Пыцкого [2010], который считает, что ремоделирование бронхолегочной системы при БА начинается довольно рано в детском возрасте и выявляется как у атопиков с астмой, так и у атопиков без признаков астмы и данный фактор роста при этом играет не последнюю роль. Он стимулирует образование коллагена коллагенобластами, обеспечивает фенотипическое превращение коллагенобластов в миофибробласты, их активации и угнетение апоптоза миофибробластов. А также значение данного фактора в патогенез БА подтверждается многочисленными генетическими исследованиями, установившими роль полиморфизмов гена TGF в генезе ремоделирования

бронхов при БА [25, 144, 258].

Нами проведен тщательный анализ данного показателя у детей, страдающих атопическим дерматитом. В ходе исследования было установлено, что концентрация TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови детей с АД значительно больше (66,30 [25,50; 417,90] пг/мл), чем детей контрольной группы (2,54 [2,34; 3,02] пг/мл) [ $p < 0,0001$ ]. Принимая во внимание тот факт, что TGF $\beta$ 1 оказывает профиброзные эффекты на ткани, проявляющиеся усилением пролиферации, дифференцировки и функциональной активности фибробластов по наработке коллагена, значительное увеличение концентрации данного цитокина, зарегистрированное у больных с атопическим дерматитом, свидетельствует об интенсивных механизмах формирования фиброза, которые видны невооруженным глазом при развитии лихенификации кожи у детей. При этом у девочек его значения выше (261,0 [39,11; 418,50] пг/мл), чем у мальчиков (25,69 [24,74; 66,30] пг/мл) [ $p = 0,024$ ].

Отмечено, что у пациентов с легким течением заболевания величина TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови значительно меньше, чем у больных с тяжелым и особенно со среднетяжелым АД (табл. 21). Полученные данные позволяют предположить, что по мере увеличения степени тяжести заболевания происходит нарастание метаболических и иммунопатологических сдвигов в организме ребенка, сопровождающихся активацией клеток, синтезирующих цитокины, в том числе и трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1. Однако, при этом стоит отметить, что концентрация данного цитокина в сыворотке крови больных практически не зависит от площади поражения кожных покровов у детей, так при ограниченной форме АД его средние значения составили  $169,50 \pm 206,36$  пг/мл, тогда как при распространенном процессе –  $249,65 \pm 202,25$  пг/мл [ $p = 0,320$ ].

Таблица 21

Показатели TGFβ1 у детей с различной степенью тяжести атопического дерматита, пг/мл

| № | Течение АД             | Концентрация TGFβ1, пг/мл,<br>Me [Q25; Q75]  |
|---|------------------------|--|
| 1 | Легкое (n = 9)         | 25,12 [20,0; 74,89]  |
| 2 | Среднетяжелое (n = 20) | 312,3 [25,8; 475,8]  |
| 3 | Тяжелое (n = 6)        | 149,54 [38,43; 261,00]   |
|   | P                      | <p><b><math>p_{123} = 0,013</math></b></p> <p><b><math>p_{12} = 0,016</math></b></p> <p><math>p_{23} = 0,175</math></p> <p><math>p_{13} = 0,213</math></p> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий в трех группах;

$p_{12}$  значимость различий между легким и средним течением АД;

$p_{13}$  значимость различий между легким и тяжелым течением АД;

$p_{23}$  значимость различий между средним и тяжелым течением АД

Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$

Для оценки влияния данного фактора при сочетанном течении БА и АД также важным представляется анализ концентрации данного вещества в зависимости от степени тяжести заболевания (табл. 22).

Таблица 22

Сравнение показателей TGFβ1 у пациентов с сочетанием БА и АД в зависимости от тяжести течения бронхиальной астмы

| № | Течение БА      | Концентрация TGFβ1, пг/мл<br>Me [Q25; Q75] |
|---|-----------------|--|
| 1 | Легкое (n = 16) | 3,05 [2,27; 368,85]                        |

Продолжение таблицы 22

|   |                        |   |
|---|------------------------|---|
| 2 | Среднетяжелое (n = 14) | 2,61 [2,31; 189,0]  |
| 3 | Тяжелое (n = 4)        | 2,57 [2,34; 2,79]   |
|   | P                      | $p_{123} = 0,298$<br>$p_{12} = 0,426$<br>$p_{23} = 0,454$<br>$p_{13} = 0,149$ |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий в трех группах;

$p_{12}$  значимость различий между легким и среднетяжелым течением БА;

$p_{13}$  значимость различий легким и тяжелым течением БА;

$p_{23}$  значимость различий среднетяжелым и тяжелым течением БА

Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

В целом, как видно из таблицы 22 в отличие от группы с монопатологией у детей, страдающих и БА и АД, отсутствуют достоверно значимые отличия концентрации TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови при различной тяжести течения БА ( $p = 0,298$ ). Однако следует отметить, что средние значения показателей в группе больных с легким течением БА ( $193,73 \pm 308,98$  пг/мл) значительно превосходят данные, полученные у пациентов с тяжелыми проявлениями заболевания ( $2,57 \pm 0,26$  пг/мл). Известно, что при БА усиление высвобождения TGF $\beta$ 1 из клеток бронхиального эпителия приводит к утолщению базальной мембраны посредством усиления продукции коллагена I, III, VIII, осуществляемой фибробластами, и компонентов основного вещества (фибронектина, тенасцина), синтезируемых тучными клетками, следовательно, снижение концентрации данного цитокина у детей с тяжелым течением заболевания может являться свидетельством истощения пула медиаторов, синтезируемых тучными клетками. Это имеет прогностически неблагоприятное значение и говорит о возможной резистентности пациентов к проводимой базисной терапии. Подробный анализ результатов функциональных методов

исследования показал, что именно у этих больных регистрируется низкий ответ на проводимую бронхолитическую терапию ( $r = 0,392$ ;  $p = 0,22$ ).

Полученные нами данные свидетельствуют о значимой роли исследуемых факторов роста в патогенезе аллергических заболеваний, а также о роли неатопической составляющей в их генезе, способствующей формированию необратимых склеротических изменениях в бронхолегочной системе и коже больных. Данный аспект патогенеза диктует необходимость формирования новых подходов к диагностике и прогнозированию течения аллергических заболеваний у детей для профилактики развития осложнений.

#### **4.3. Металлопротеиназа 9 и ее значение в генезе бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей**

Металлопротеиназы – это целая группа ферментов, участвующих в различных как физиологических, так и патологических процессах в организме человека. Причем их роль не ограничивается влиянием на деградацию компонентов внеклеточного матрикса и гидролизом ряда регуляторных белков, также они отвечают за поддержание архитектоники и гомеостаза, способствуют освобождению пространства для миграции клеток, воздействуют на межклеточные контакты. Они обладают способностью модулировать взаимодействие между клетками и внеклеточными элементами, регулируя тем самым клеточную пролиферацию и дифференцировку. Поэтому изучение изменений экспрессии ММР у детей, страдающих аллергическими заболеваниями, необходимо не только для понимания патогенеза данных заболеваний, но и разработки современных методов диагностики и прогнозирования их течения, а, возможно, и методов таргетной терапии. Принимая во внимание тот факт, что наиболее значимую роль в ремоделировании тканей играет ММР9, в настоящем исследовании особое внимание уделено изучению изменений концентрации данной протеазы в сыворотке крови детей, страдающих бронхиальной астмой, атопический дерматитом, а также сочетанием данных патологий.

Результаты проведенных нами исследований показали, что у всех детей, имеющих клинические проявления аллергических заболеваний, концентрация ММР9 в сыворотке крови была достоверно выше, чем в группе контроля (табл. 23).

Таблица 23

## Показатели ММР9 у обследованных пациентов, нг/мл

| № | Группа            | Показатели ММР9 в сыворотке крови, нг/мл, Ме<br>[Q25; Q75]  |
|---|-------------------|---|
| 1 | БА (n = 48)       | 431,76 [316,47; 625,29]   |
| 2 | АД (n = 36)       | 385,24 [228,12; 639,96]   |
| 3 | БА+АД (n = 52)    | 473,02 [339,33; 687,26]   |
| 0 | Контроль (n = 32) | 251,80 [155,67; 352,79]   |
|   | P                 | <p><b><math>p_{01} = 0,002</math></b></p> <p><b><math>p_{02} &lt; 0,0001</math></b></p> <p><b><math>p_{03} = 0,003</math></b></p> <p><b><math>p_{0123} = 0,001</math></b></p> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].  
 $p_{0123}$  значимость различий в трех группах;  
 $p_{01}$  значимость различий между группой контроля и больными БА;  
 $p_{02}$  значимость различий между группой контроля и больными АД;  
 $p_{03}$  значимость различий между группой контроля и больными БА+АД  
 При попарном сравнении p рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Причем достоверных отличий количественных значений данного показателя между группами обследованных пациентов не установлено ( $p \geq 0,05$ ) [рис. 31].

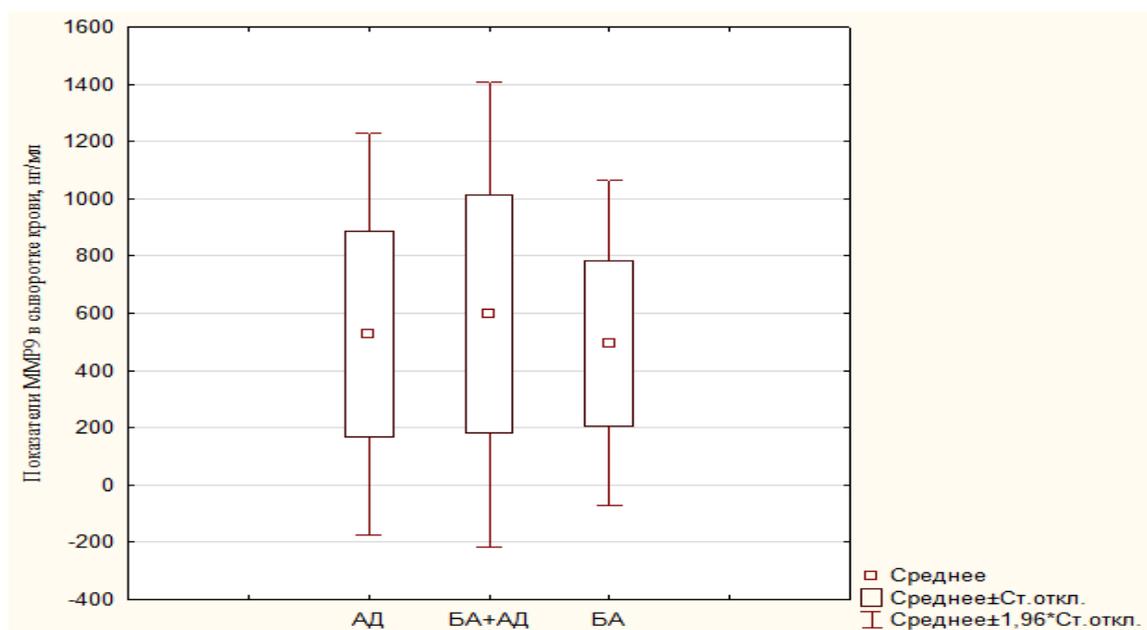


Рисунок 31. Диаграмма размаха показателей ММР9 в сыворотке крови обследованных пациентов

Анализ показателей ММР9 у детей, страдающих БА, установил наличие значимого повышения уровня данной протеазы (473,02 [339,33; 687,26] нг/мл), по сравнению с контрольной группой (251,80 [155,67; 352,79]) нг/мл) [ $p = 0,002$ ]. Это свидетельствует о важной роли дисбаланса данного дегративного энзима в патогенезе заболевания. Мы можем предположить, что у пациентов с высоким содержанием ММР9 в сыворотке крови процессы бронхиального фиброгенеза преобладают над аллергическим воспалением, а, следовательно, могут способствовать ремоделированию тканей.

Аналогичные результаты были получены Куликовым Е.С. и соавторами (2013), установившими, что при тяжелой астме отмечается повышение экспрессии ММР9 и снижение TIMP-1 [249]. При этом было показано, что низкий коэффициент соотношения ММР9/TIMP-1 наблюдается у больных с терапевтической резистентностью. По словам автора, «ремоделирование бронха при тяжелой БА можно рассматривать не только как статический компонент, формирующий бронхиальную обструкцию, но и

как компонент, участвующий в воспалительном каскаде, способствующий персистенции воспаления» [249].

Доказательством этому являются изменения показателей ММР9 у детей, страдающих БА различной степени тяжести. Установлено, что максимальные значения данной протеазы отмечаются у детей со среднетяжелым течением заболевания (933,72 [902,51; 1088,50] нг/мл), тогда как с легким их величина составила 481,53 [384,20; 572,35] нг/мл, а с тяжелым – 349,87 [121,35; 408,15] нг/мл ( $p < 0,0001$ ) [рис. 32].

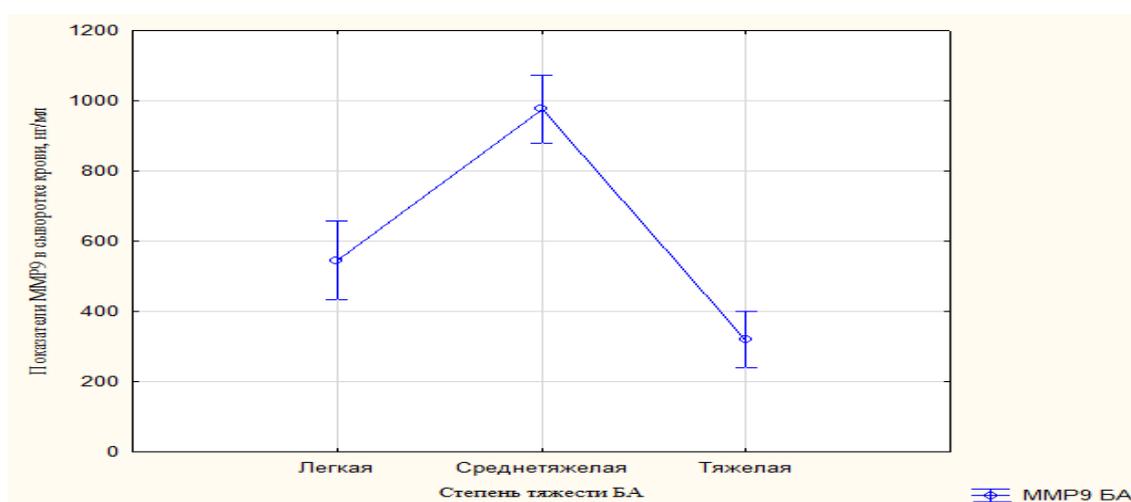


Рисунок 32. Концентрация ММР 9 в сыворотке крови в зависимости от степени тяжести БА

По данным, представленным на графике (рис. 32), видно, что концентрация ММР9 у больных с тяжелым течением заболевания значительно ниже, чем при среднетяжелой форме заболевания. Возможно это связано с тем, что процессы реорганизации тканей у пациентов с более тяжелым течением уже частично завершены, а, следовательно, снижение концентрации ММР9 может быть прогностически неблагоприятным фактом и предиктором резистентности к проводимой терапии. Доказательством этому является то, что у больных БА с неконтролируемым течением заболевания полученные значения данного фермента ниже (386,48 [135,87; 468,37] нг/мл), чем у пациентов, достигших контроля над заболеванием

(538,34 [390,60; 900,67] нг/мл) [ $p = 0,011$ ]. Однако, анализ распределения показателей ММР9 в сыворотке крови больных, получающих разные группы базисных препаратов, не выявил достоверных отличий. При этом установлена обратная корреляционная зависимость между концентрацией ММР9 в сыворотке крови больных и продолжительностью базисной терапии ( $r = -0,414$ ;  $p = 0,003$ ) [рис. 33].

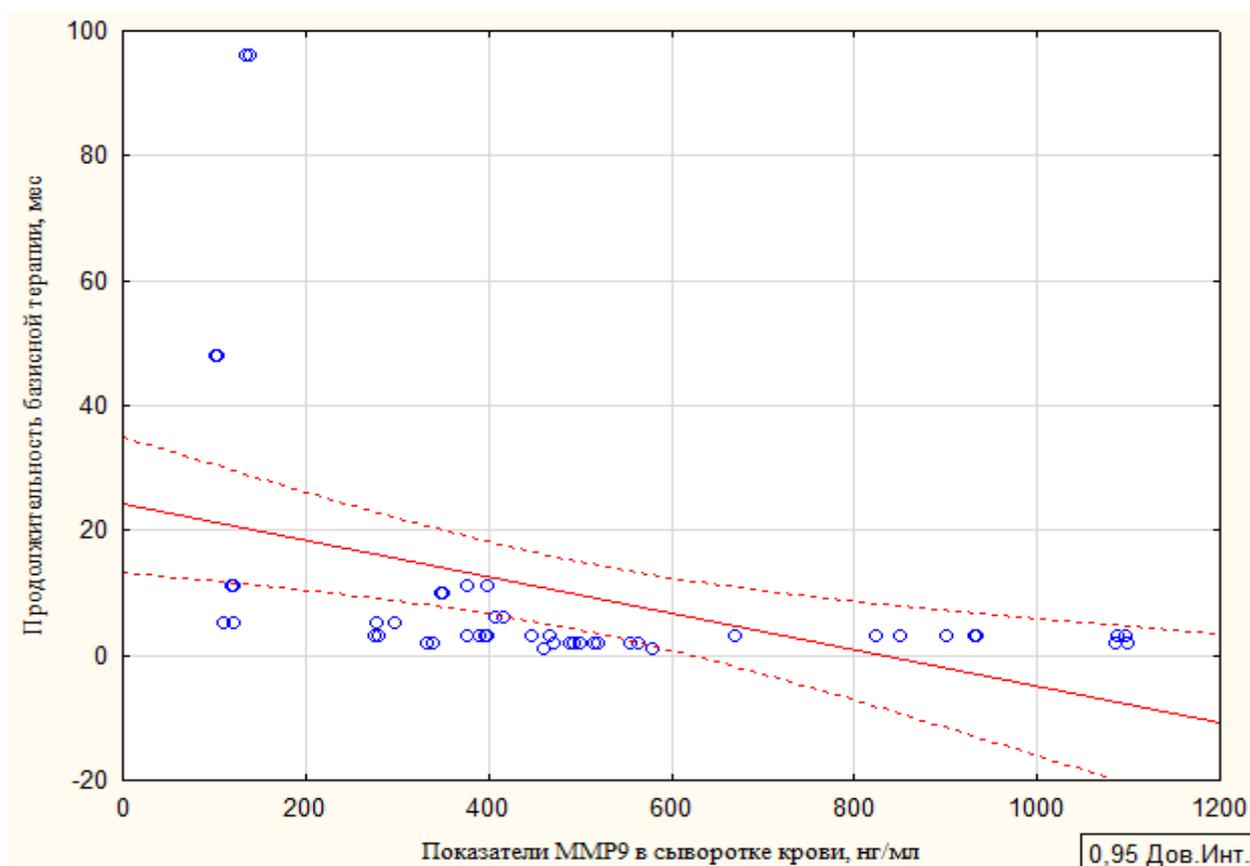


Рисунок 33. Линия регрессии и корреляционное поле точек концентрация ММР9 у больных БА в зависимости от продолжительности базисной терапии

Следует отметить, что изменения концентрации ММР9 сопряжены с нарушениями функции внешнего дыхания у больных, страдающих БА. У пациентов с низкими показателями ОФВ1 также отмечается снижение уровня ММР9 в сыворотке крови ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,004$ ). Возможно, это связано с тем, что процессы ремоделирования тканей у данных детей уже завершены и изменения структуры межклеточного матрикса, к сожалению, необратимы.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований, проведенными нашими зарубежными коллегами. Так, в работе Chaudhuri R. et al. (2014) было показано, что у больных-курильщиков с БА снижение концентрации MMP9 в мокроте сопровождается уменьшением ОФВ1 и соотношения ОФВ1/ФЖЕЛ и площади просвета сегментарных дыхательных путей [173]. А также установлена ассоциация низкой активности мокроты MMP9/TIMP-1 с персистирующей обструкцией воздушного потока и уменьшением площади просвета дыхательных путей, зарегистрированного по данным компьютерной томографии [181, 182, 228]. Данный факт еще раз показывает, что дисбаланс MMP9 способствует морфологическим структурным изменениям дыхательных путей у больных БА.

Однако, в связи с этим возникает вопрос – каково влияние атопии на процессы ремоделирования тканей? Проведенные нами исследования показали, что средние значения общего IgE в сыворотке крови обследованных нами пациентов составили 364,0 [115,0; 1129,0] МЕ/мл, что значительно превышает нормальные значения. Причем достоверно значимой зависимости между показателями общего IgE и степенью тяжести заболевания установлено не было ( $r = -0,173$ ;  $p = 0,176$ ). Хотя у больных с контролируемым течением заболевания его показатели выше (1065,0 [360,0; 1225,0] МЕ/мл), чем у пациентов, не достигших контроля (196,0 [104,50; 757,40] МЕ/мл) [ $p = 0,0015$ ]. Важно отметить, что между концентрацией MMP9 и значениями общего IgE отмечается обратная корреляционная зависимость ( $r = -0,338$ ;  $p = 0,038$ ). Этот факт еще раз подтверждает отсутствие значимой взаимосвязи между уровнем атопии и активностью процессов реструктурирования тканей при хроническом аллергическом воспалении у детей.

Кроме того, показано, что продукты расщепления внеклеточного матрикса могут сами обладать биологической активностью. Например, короткий пептид Pro-Gly-Pro, образующийся при специфической деградации коллагена, регулирует проницаемость эндотелия и участвует в индукции

воспалительного ответа. Помимо этого, ММП способны высвобождать цитокины и факторы роста из внеклеточного матрикса, который служит резервуаром для биологически активных молекул [28].

Высокой аффинностью к компонентам внеклеточного матрикса обладают фактор роста фибробластов и TGF $\beta$ . Проведенное нами исследование показало, что у больных с тяжелым течением заболевания отмечается снижение концентрации не только MMP9 в сыворотке крови, но и TGF $\beta$ , принимающего активное участие в реорганизации тканей и в регуляции иммунного ответа. Ведь именно TGF $\beta$  является хемоаттрактантом для фибробластов и способен стимулировать продукцию коллагена и фибронектина этими клетками, а кроме того он подавляет рост и активность Т-клеток, нейтрофилов, макрофагов, В-клеток и стимулирует продукцию иммуноглобулина А. По полученным нами результатам значения данного фактора роста у больных с легким (236,47 [2,93; 867,16] пг/мл) и среднетяжелым (2,34 [2,26; 277,62] пг/мл) течением БА также значительно превосходят показатели больных с тяжелой формой заболевания (2,15 [2,10; 2,47] пг/мл) [ $p = 0,0095$ ].

Если говорить о больных, имеющих только кожные проявления атопии, то следует отметить, что значения MMP9 у этих детей (385,24 [228,12; 639,96] нг/мл) также достоверно превышают показатели в группе контроля (251,80 [155,67; 352,79] нг/мл) [ $p < 0,0001$ ]. При этом отличий в зависимости от пола установлено не было: средние значения у девочек составили 385,24 [304,59; 639,96] нг/мл, тогда как у мальчиков – 366,55 [219,56; 852,91] нг/мл [ $p = 0,807$ ].

Анализ показателей в зависимости от степени тяжести заболевания позволил отметить, что у больных всех трех групп отмечается значительный разброс показателей MMP9 в сыворотке крови (табл. 24).

Сравнение показателей ММР9 у пациентов с АД в зависимости от тяжести течения заболевания, нг/мл

| № | Течение АД             | Концентрация ММР9, нг/мл<br>Me [Q25; Q75]                                     |
|---|------------------------|---|
| 1 | Легкое (n = 9)         | 385,24 [228,26; 555,41]   |
| 2 | Среднетяжелое (n = 18) | 341,65 [209,78; 1200,0]   |
| 3 | Тяжелое (n = 9)        | 583,98 [304,59; 624,51]   |
|   | P                      | $p_{123} = 0,538$<br>$p_{12} = 0,323$<br>$p_{23} = 0,994$<br>$p_{13} = 0,349$ |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий в трех группах;

$p_{12}$  значимость различий между легким и среднетяжелым течением БА;

$p_{13}$  значимость различий легким и тяжелым течением БА;

$p_{23}$  значимость различий среднетяжелым и тяжелым течением БА.

При этом достоверно значимых отличий в зависимости от степени тяжести зарегистрировано не было ( $p = 0,538$ ). Однако установлена четкая тенденция к увеличению концентрации ММР9 в сыворотке крови больных при изменении возрастных форм заболевания. Установлено, что максимальные значения ММР9 были зарегистрированы у детей с подростковой формой АД (1260,30 [1255,30; 1308,2] нг/мл), в то время как при детской средние значения составили 341,19 [227,96; 505,81] нг/мл, а при младенческой - 760,98 [387,60; 911,08] нг/мл [ $p < 0,0001$ ].

Полученные нами данные согласуются с клиническими проявлениями заболевания: так, наиболее выраженные изменения соединительной ткани, проявляющиеся участками лихенификации, преобладают именно при подростковой форме, в то время как у детей более раннего возраста чаще наблюдаются проявления АД в виде участков мокнутия и папулезной сыпи. Это объяснимо с точки зрения патогенеза ремоделирования тканей. ММР9

отвечает за процессы расщепления белков внеклеточного матрикса, способствуя тем самым его реорганизации. При этом деградация ламинина 5 и коллагена IV способствует высвобождению скрытых сайтов этих белков, а они, в свою очередь, активируют процессы клеточной миграции. Кроме того, в настоящее время установлено, что субстратная специфичность ММП отнюдь не ограничивается компонентами внеклеточного матрикса, они гидролизуют различные факторы роста, в том числе активируют латентные формы TGF- $\beta$  и процессируют VEGF, что в конечном итоге может способствовать значительному изменению не только структуры соединительной ткани в очаге поражения, но и реорганизации сосудистой системы. Также активация данных факторов модулирует различные аспекты иммунного ответа, апоптоза, клеточной пролиферации, дифференцировки и миграции, что обуславливает их участие в патогенезе аллергического воспаления при АД. Доказательством этому является значительное повышение концентрации ММР9 у больных с диффузными формами заболевания (897,45 [624,51; 924,71] нг/мл), по сравнению с ограниченным (322,09 [257,33; 423,47] нг/мл) и распространенным (555,41 [227,98; 656,12] нг/мл) поражением кожи ( $p = 0,046$ ) [ рис. 34].

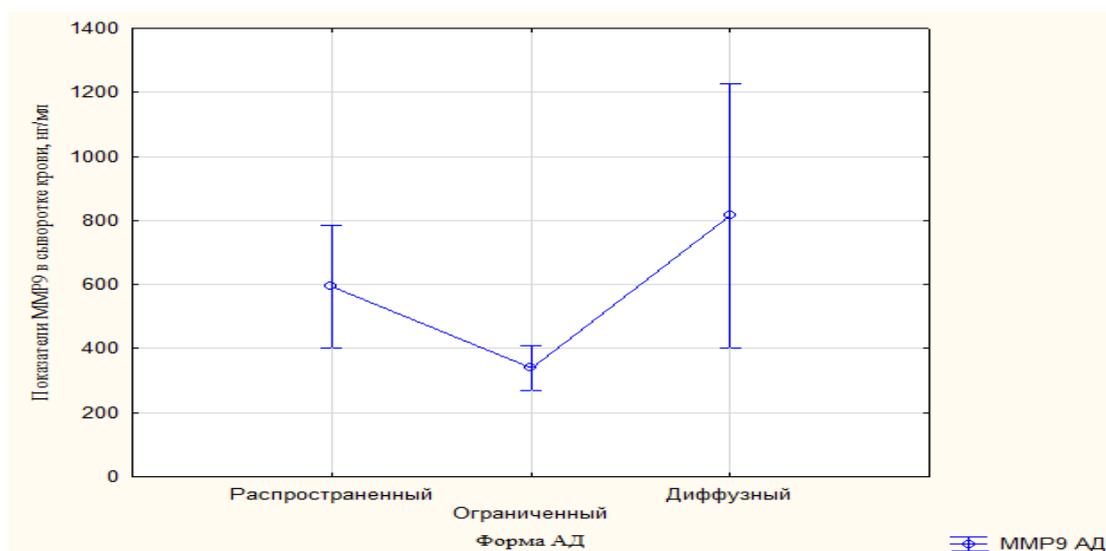


Рисунок 34. Показатели ММР9 в сыворотке крови больных с различной распространенностью АД

Важно отметить, что у больных с АД отмечается обратная корреляционная зависимость между показателями данной протеазы в сыворотке крови и частотой эпизодов ОРВИ, перенесенных в течение года ( $r = -0,459$ ;  $p = 0,005$ ).

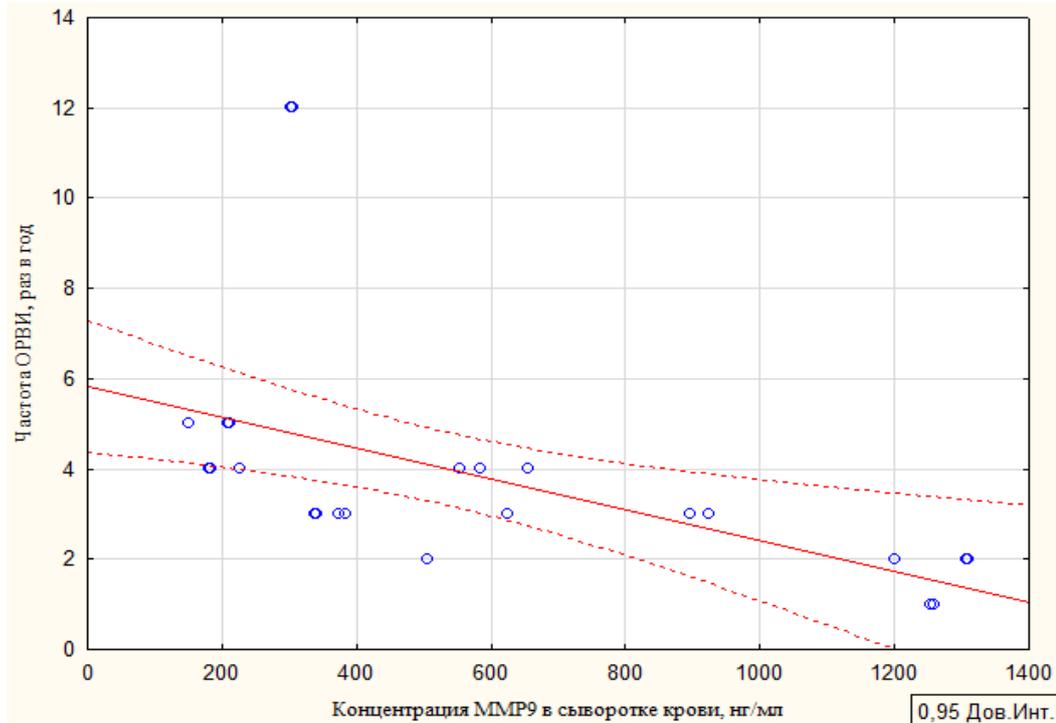


Рисунок 35. Линия регрессии и корреляционное поле точек связи между частотой острых респираторных инфекций и показателями MMP9 в сыворотке крови больных АД

Подробный анализ анамнестических данных установил, что большинство обследованных детей, страдающих АД, находились на искусственном вскармливании (44,45 %), тогда как 33,33 % на смешанном и 22,22 % на естественном. При этом достоверно значимые отличия по концентрации MMP9 в сыворотке крови у этих пациентов были зарегистрированы только между детьми, находящимися на естественном и смешанном вскармливании (табл. 25).

Показатели ММР9 у больных АД с различным видом вскармливания

| № | Вскармливание | Показатели ММР9 у больных АД, нг/мл,<br>Me [Q25; Q75]                                  |
|---|---------------|--|
| 1 | Естественное  | 583,98 [505,51; 919,65]  |
| 2 | Искусственное | 340,39 [257,33; 911,08]  |
| 3 | Смешанное     | 301,63 [205,29; 470,33]  |
|   | Р             | $p_{123} = 0,064$<br>$p_{12} = 0,270$<br>$p_{23} = 0,159$<br>$p_{13} = \mathbf{0,020}$ |

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий между тремя группами (по критерию Краскелла-Уолиса);

$p_{12}$  значимость различий между больными АД, находящимися на естественном и искусственном вскармливании;

$p_{13}$  значимость различий между больными АД, находящимися на смешанном и искусственном вскармливании;

$p_{23}$  значимость различий между больными АД, находящимися на естественном и смешанном вскармливании.

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Анализ данных, полученных в группе пациентов, страдающих БА и АД, установил, что у них так же отмечается значимое повышение показателей ММР9 в сыворотке крови (473,02 [339,33; 687,26] нг/мл) по сравнению с контрольной группой (251,80 [155,67; 352,79] нг/мл) [ $p = 0,003$ ]. При этом максимальные показатели были зарегистрированы у больных со среднетяжелым течением заболевания БА (табл. 26). Установлено, что у

детей с контролируемым (566,12 [424,94; 687,26] пг/мл) и неконтролируемым (376,55 [241,04; 815,64] пг/мл) течением заболевания значения ММР9 не имели статистически значимых отличий ( $p = 0,831$ ).

Таблица 26

Распределение показателей ММР9 в сыворотке крови больных с сочетанием БА и АД в зависимости от степени тяжести БА

| № | Течение БА             | Концентрация ММР9 в сыворотке крови, нг/мл, Me [Q25; Q75]   |
|---|------------------------|---|
| 1 | Легкое (n = 22)        | 472,08 [394,54; 598,46]   |
| 2 | Среднетяжелое (n = 16) | 638,52 [484,40; 926,08]   |
| 3 | Тяжелое (n = 14)       | 278,54 [235,87; 668,92]   |
|   | P                      | <p><b><math>p_{123} = 0,017</math></b></p> <p><b><math>p_{12} = 0,030</math></b></p> <p><b><math>p_{23} = 0,007</math></b></p> <p><math>p_{13} = 0,492</math></p> |

Примечание: в таблице величины представлены в виде  $M \pm SD$ , Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

$p_{123}$  значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса);

$p_{12}$  значимость различий между легким и среднетяжелым течением БА;

$p_{13}$  значимость различий легким и тяжелым течением БА;

$p_{23}$  значимость различий среднетяжелым и тяжелым течением БА

Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Однако у детей с поливалентной сенсibilизацией концентрация данной матриксной металлопротеиназы в сыворотке крови была несколько выше (473,95 [413,77; 687,26] пг/мл), чем у больных с моноаллергической этиологией заболевания (246,20 [234,24; 776,06]) [ $p = 0,161$ ].

Интересные данные были получены при анализе наследственной отягощенности. Оказалось, что наличие аллергических заболеваний у родителей пациентов, страдающих БА и АД одновременно, не оказывает

влияния на изменение параметров экспрессии ММР9 в сыворотке крови ( $p = 0,80$ ) [табл. 27]. Однако, средние значения данного цитокина в сыворотке крови больных, имеющих отягощенный аллергоанамнез по отцовской линии ( $867,47 \pm 721,58$  нг/мл), практически в два раза выше, чем у детей с благоприятным аллергоанамнезом ( $450,36 \pm 170,41$  нг/мл) [ $p = 0,019$ ]. Что свидетельствует о значимой роли генетической составляющей в поддержании уровня ММР9 у детей с сочетанием БА и АД.

Таблица 27

Распределение показателей ММР9 в сыворотке крови больных с сочетанием БА и АД в зависимости от отягощенности аллергоанамнеза

| № | Отягощенность аллергоанамнеза | Показатели ММР9, Me [Q25; Q75], нг/мл  |
|---|-------------------------------|--|
| 0 | Благоприятный                 | 424,32 [339,33; 577,22]  |
| 1 | По материнской линии          | 633,69 [555,02; 687,26]  |
| 2 | По отцовской линии            | 470,84 [424,94; 825,29]  |
| 3 | По обоим линиям родства       | 354, 91 [234,24; 1076,10]  |
|   | P                             | $p_{0123} = 0,080$<br>$p_{01} = 0,310$<br><b><math>p_{02} = 0,019</math></b><br>$p_{03} = 0,495$<br>$p_{12} = 0,137$<br>$p_{13} = 0,688$<br>$p_{23} = 0,075$ |

Примечание:

$p_{0123}$  значимость различий между всеми группами (по критерию Кораскелла-Уоллиса);

$p_{01}$  значимость различий между больными с благоприятным аллергоанамнезом и больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по материнской линии;

$p_{02}$  значимость различий между больными с благоприятным аллергоанамнезом и больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по отцовской линии;

$p_{03}$  значимость различий между с благоприятным аллергоанамнезом и больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по обоим линиям родства;

$p_{12}$  значимость различий между больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по материнской и отцовской линиям;

$p_{13}$  значимость различий между больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по материнской линии и обоим линиям родства;

$p_{23}$  значимость различий между больными, имеющими отягощенный аллергоанамнез по отцовской линии и обоим линиям родства.

Жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Принимая во внимание высокую значимость уровня экспрессии данной металлопротеиназы в патогенезе аллергических заболеваний у детей, методом ROC-анализа нами была найдена дифференциальная точка значений MMP9, повышающая риск развития сочетания БА и АД, при ее превышении. Для данного цитокина она составила 397 нг/мл. Следовательно, повышение значения MMP9 в сыворотке крови больных более 397 нг/мл ассоциировано с повышенным риском развития сочетания данных патологий у детей.

Площадь по ROC кривой составила  $0,767 \pm 0,08$ , что свидетельствует о хорошем качестве прогностической системы. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии была высокой и составила  $p = 0,0005$  ( $z = 3,456$ ).

Таким образом, установлено, что концентрация MMP9 в сыворотке крови больных с аллергическими заболеваниями оказывает значительное влияние на механизмы их развития. Принимая во внимание тот факт, что MMP9 участвует в деградации экстрацеллюлярного матрикса, способствуя тем самым ремоделированию тканей, можно предположить, что исследование ее уровня в сыворотке крови больных позволяет не только установить наличие хронизации процесса, но и произвести неинвазивный мониторинг процессов фиброобразования тканей у детей для выявления пациентов, требующих более пристального внимания и коррекции проводимой терапии.

Резюме:

1. Установлено, что у больных с аллергическими заболеваниями отмечается повышение концентрации VEGF A в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). При этом его показатели у пациентов с БА как в форме монопатологии, так и при сочетании с АД, были ниже, чем у детей,

страдающих только АД [ $p = 0,0004$ ].

2. Зарегистрировано, что у детей, страдающих как БА, так и БА + АД, отмечается прямая корреляционная зависимость между уровнем VEGF A в сыворотке крови и степенью тяжести заболевания ( $r = 0,802$ ;  $p < 0,0001$  и  $r = 0,38$ ;  $p = 0,025$  соответственно). Данный факт подтверждает высокую чувствительность этого цитокина как биологического маркера тяжести течения заболевания.
3. Установлена значимая роль VEGFA в процессах ремоделирования тканей, о чем свидетельствует обратная корреляционная связь между его концентрацией и приростом ОФВ1 после ингаляции бронхолитика у детей, страдающих БА и БА+АД ( $r = -0,438$ ;  $p = 0,022$  и  $r = -0,692$ ;  $p < 0,0001$  соответственно), а также зарегистрированная корреляционная зависимость между площадью поражения кожи у детей с АД и показателями данного цитокина ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,0001$ ). Так, у пациентов с ограниченной распространенностью АД его величина равна  $154,39 \pm 75,31$  пг/мл, тогда как при распространенном варианте –  $413,19 \pm 146,01$  пг/мл [ $p = 0,0001$ ].
4. Установлено, что концентрация TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови детей с аллергическими заболеваниями значительно превышает показатели контрольной группы ( $p < 0,005$ ). При этом достоверных отличий между группами обследованных больных отмечено не было ( $p > 0,05$ ).
5. Выявлена обратная корреляционная зависимость между степенью тяжести БА и концентрацией TGF $\beta$ 1 в сыворотке крови больных ( $r = -0,52$ ;  $p = 0,006$ ). Значительное снижение концентрации данного фактора у больных с тяжелой астмой может свидетельствовать о завершении процессов ремоделирования межклеточного матрикса. Доказательством этому также является прямая корреляционная зависимость между показателями TGF  $\beta$ 1 и динамикой прироста

ОФВ1 после пробы с бронхолитиком ( $r = 0,790$ ;  $p < 0001$ ). Следовательно, чем ниже значения данного фактора в сыворотке крови пациентов, тем ниже процент прироста скоростных показателей, т.е. тем больше вероятность формирования необратимых изменений в бронхолегочной системе.

6. Зарегистрирована прямая корреляционная зависимость между показателями TGF- $\beta$ 1 и динамикой прироста ОФВ1 после ингаляции сальбутамола ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,0001$ ) у больных с сочетанием БА и АД, что является свидетельством влияния данного фактора на процессы ремоделирования бронхов. Важно, что именно у этих пациентов отмечена низкая эффективность бронхолитической терапии ( $r = 0,392$ ;  $p = 0,22$ ).
7. Установлено, что уровень ММП9 у пациентов, страдающих аллергическими заболеваниями, достоверно выше, чем у детей контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Причем значимых отличий концентраций ММП9 между группами обследованных пациентов не выявлено ( $p \geq 0,05$ ).
8. Максимальные значения ММП9 зарегистрированы у детей со среднетяжелым течением БА (933,72 [902,51; 1088,50] нг/мл), тогда как при легком их величина составила 481,53 [384,20; 572,35] нг/мл, а при тяжелом – 349,87 [121,35; 408,15] нг/мл ( $p < 0,0001$ ).
9. Доказательством участия ММП9 в патогенезе АД является повышение ее концентрации у больных с диффузными формами заболевания (897,45 [624,51; 924,71] нг/мл), по сравнению с ограниченным (322,09 [257,33; 423,47] нг/мл) и распространенным (555,41 [227,98; 656,12] нг/мл) поражением кожи ( $p = 0,046$ ).
10. Методом ROC-анализа установлено, что повышение значений ММП9 более 397 нг/мл ассоциировано с повышенным риском развития сочетаний БА и АД у детей.

Проведенное нами исследование показало, насколько значимо определение уровней факторов роста (VEGF А, TGF β1) и металлопротеиназы 9 у больных с аллергическими заболеваниями. Однако, уровень экспрессии данных цитокинов зависит от ряда генетических факторов, определяющих предрасположенность к формированию не только формы, но и степени тяжести данной патологии у детей. Поэтому изучение молекулярно-генетических аспектов их наследования является предиктором персонализированного подхода к ведению данных пациентов.

## **ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗИ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА И МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ**

### **5.1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в генетическое исследование**

Несмотря на имеющиеся генетические исследования, позволившие идентифицировать более 150 генов, связанных с развитием атопии, многие аспекты наследования данной патологии остаются до сих пор неизвестными. При этом особого внимания заслуживает изучение совместного влияния генотипических и фенотипических факторов на формирование как отдельных клинических форм, так и сочетаний аллергических заболеваний у детей.

Патогенез аллергических реакций достаточно сложный и затрагивает не только провоспалительные механизмы, но и процессы ремоделирования вовлеченных тканей. По данным многих авторов, ремоделирование тканей при аллергических заболеваниях начинается уже в раннем возрасте, причем основную роль в этом процессе играют факторы роста и матриксные металлопротеиназы [154, 236, 241]. Такие цитокины, как  $TGF\beta_1$ , VEGFA, EGF и др., оказывают значительное влияние на процессы поддержания и угнетения воспаления в ходе аллергической реакции. А ММП не только обладают деградирующей способностью в отношении почти всех компонентов внеклеточного матрикса, встречающихся в соединительных тканях (коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов и др.), но и регулируют процессы морфогенеза, тканевой резорбции, ангиогенеза, апоптоза и многое другое. Поэтому изучение особенностей их наследования у детей с аллергическими заболеваниями представляет большой практический интерес.

В ходе данной работы был проведен подробный анализ ассоциации полиморфных локусов генов исследуемых факторов роста (-634G > C гена *VEGFA*, Arg25Pro гена *TGFβ<sub>1</sub>*, 2073A > T гена *EGFR*) и некоторых матриксных металлопротеиназ (-8202A > G гена *MMP9*, 320A > C гена *MMP20*, 837T > C гена *MMP20*).

Прежде чем приступить к проведению данного исследования, нами была произведена тщательная процедура контроля качества выборки. После исключения возможно значимых факторов (различий расовой и этнической принадлежности, наличия близкородственных браков, генетических мутаций) были отобраны пациенты, страдающие БА, АД, а также сочетанием БА и АД, относящиеся к русской этнической группе и проживающие на территории Ростовской области. Репрезентативность выборки рассчитывали с использованием калькулятора для определения равновесия Харди-Вайнберга, позволяющего рассчитать  $\chi^2$  <http://www.oege.org>.

Всего в данный раздел исследования было включено 152 пациента с аллергическими заболеваниями и 122 ребенка I и IIa групп здоровья в возрасте до 18 лет (табл. 28).

Таблица 28

## Распределение обследованных больных по группам

| Нозологии   | Количество больных | %    |
|---|--------------------|------|
| Бронхиальная астма                                      | 60                 | 21,9 |
| Атопический дерматит                                    | 26                 | 9,5  |
| Бронхиальная астма в сочетании с атопическим дерматитом | 66                 | 24,1 |
| Группа контроля   | 122                | 44,5 |
| Всего   | 274                | 100  |

Диагнозы всем больным были установлены на основании клинико-анамнестических данных, результатов объективного и лабораторно-функционального обследования. Особое внимание уделялось результатам исследования функции внешнего дыхания, иммунологических и биохимических исследований крови. Все полученные результаты были сопоставлены с количественными значениями факторов роста, полученными ранее.

Необходимо отметить, что анамнестические и клинико-лабораторные данные больных, включенных в данное исследование, не имели статистически значимых отличий от общей выборки обследованных пациентов ( $p \geq 0,05$ ). Средний возраст детей составил –  $10,3 \pm 3,5$  лет.

Среди пациентов, страдающих БА, легкое течение заболевания отмечалось у 36 детей (60 %), среднетяжелое – у 15 (25 %), тяжелое – у 9 (15 %) больных. Возраст манифестации заболевания варьировал от 2 до 11 лет. В данной группе основная масса больных получала базисную терапию (95,1 %), при этом чаще всего использовались ИГКС (59,0 %) и антилейкотриеновые препараты (49,2 %), комбинированные формы ИГКС+ДДБА применяли абс. число (36,1 %) человек.

В группу пациентов, страдающих атопическим дерматитом, также были включены дети в возрасте от 5 до 15 лет, девочек среди которых было 15 (57,7 %), мальчиков – 11 (42,3 %). Легкое течение заболевания зарегистрировано у 23,1 %, среднетяжелое у 61,5 % и тяжелое - у 19,2 % больных. В зависимости от объема поражения кожных покровов распределение было следующее: распространенный процесс отмечался у 73,1 %, ограниченный – у 23,1 %, диффузный – у 3,9 %. Средняя продолжительность заболевания составила  $5,5 \pm 4,1$  лет.

Если говорить о группе с сочетанием БА и АД, то следует отметить, что количество пациентов с тяжелым течением АД составило 12,1 %, со

среднетяжелым – 24,2 %, в то время как с легким – 63,6 %. Среди больных данной группы преобладали лица мужского пола - 46 человек (69,7 %), тогда как женского составили 20 (30,3 %).

Особое внимание уделялось подбору пациентов, включенных в контрольную группу. У всех детей данной группы тщательно анализировался аллергологический и генеалогический анамнезы. Пациенты, имеющие указание на перенесенные аллергические заболевания или наличие родственников, страдающих данной патологией, были исключены из исследования.

## **5.2. Исследование частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом**

С целью идентификации наиболее значимых факторов в развитии аллергических реакций нами проведен анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей отдельных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у больных с БА, АД, БА+АД и детей контрольной группы (табл. 29).

Таблица 29

Частота встречаемости генотипов и аллелей исследованных полиморфных вариантов генов больных с аллергическими заболеваниями

| Генотип,<br>Аллель                    | Больные | Группа<br>контроля | $\chi^2$ | <i>P</i> | <i>OR</i> |             |
|---------------------------------------|---------|--------------------|----------|----------|-----------|-------------|
|                                       | n = 152 | n = 122            |          |          | Знач.     | 95 % CI     |
| <i>-634G &gt; C</i> гена <i>VEGFA</i> |         |                    |          |          |           |             |
| Аллель <i>C</i>                       | 0.270   | 0.230              | 1.16     | 0.28     | 1.24      | 0.84 – 1.83 |
| Аллель <i>G</i>                       | 0.730   | 0.770              |          |          | 0.81      | 0.55 – 1.19 |

| Генотип,<br>Аллель  | Больные | Группа<br>контроля | $\chi^2$     | P                 | OR   |             |
|---|---------|--------------------|--------------|-------------------|------|-------------|
| Генотип C/C   | 0.066   | 0.082              | 3.76         | 0.15              | 0.79 | 0.32 – 1.96 |
| Генотип C/G   | 0.408   | 0.295              |              |                   | 1.65 | 0.99 – 2.73 |
| Генотип G/G   | 0.526   | 0.623              |              |                   | 0.67 | 0.41 – 1.09 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )                                       | 0.19    | 3.35               |              |                   |      |             |
| <i>Arg25Pro</i> гена <i>TGF<math>\beta</math><sub>1</sub></i> |         |                    |              |                   |      |             |
| Аллель Arg  | 0.901   | 0.660              | <b>44.85</b> | <b>p&lt;0,001</b> | 4.71 | 2.92 – 7.58 |
| Аллель Pro  | 0.099   | 0.340              |              |                   | 0.21 | 0.13 – 0.34 |
| Генотип Arg/Arg   | 0.816   | 0.460              | <b>38.67</b> | <b>p&lt;0,001</b> | 5.20 | 2.95 – 9.18 |
| Генотип Arg/Pro   | 0.171   | 0.400              |              |                   | 0.31 | 0.17 – 0.55 |
| Генотип Pro/Pro   | 0.013   | 0.140              |              |                   | 0.08 | 0.02 – 0.37 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )                                       | 0.22    | 1.18               |              |                   |      |             |
| <i>2073A &gt; T</i> гена <i>EGFR</i>                          |         |                    |              |                   |      |             |
| Аллель A  | 0.299   | 0.442              | <b>11.76</b> | <b>0.0006</b>     | 0.54 | 0.38 – 0.77 |
| Аллель T  | 0.701   | 0.558              |              |                   | 1.85 | 1.30 – 2.64 |
| Генотип A/A   | 0.099   | 0.150              | <b>15.26</b> | <b>0.0005</b>     | 0.62 | 0.30 – 1.29 |
| Генотип A/T   | 0.401   | 0.583              |              |                   | 0.48 | 0.29 – 0.78 |
| Генотип T/T   | 0.500   | 0.267              |              |                   | 2.75 | 1.64 – 4.60 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )                                       | 0.28    | 4.01               |              |                   |      |             |
| <i>320A &gt; C</i> гена <i>MMP20</i>                          |         |                    |              |                   |      |             |
| Аллель A  | 0.408   | 0.418              | 0.06         | 0.81              | 0.96 | 0.68 – 1.35 |
| Аллель C  | 0.592   | 0.582              |              |                   | 1.04 | 0.74 – 1.47 |
| Генотип A/A   | 0.230   | 0.164              | <b>6.57</b>  | <b>0.04</b>       | 1.53 | 0.83 – 2.81 |
| Генотип A/C   | 0.355   | 0.508              |              |                   | 0.53 | 0.33 – 0.87 |
| Генотип C/C   | 0.414   | 0.328              |              |                   | 1.45 | 0.88 – 2.39 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )                                       | 10.64   | 0.24               |              |                   |      |             |

| Генотип,<br>Аллель                    | Больные | Группа<br>контроля | $\chi^2$ | P    | OR    |             |
|---------------------------------------|---------|--------------------|----------|------|-------|-------------|
|                                       | n = 152 | n = 122            |          |      | Знач. | 95 % CI     |
| <i>837T &gt; C</i> гена <i>MMP20</i>  |         |                    |          |      |       |             |
| Аллель <i>T</i>                       | 0.602   | 0.525              | 3.30     | 0.07 | 1.37  | 0.98 – 1.93 |
| Аллель <i>C</i>                       | 0.398   | 0.475              |          |      | 0.73  | 0.52 – 1.03 |
| Генотип <i>T/T</i>                    | 0.349   | 0.246              | 3.78     | 0.15 | 1.64  | 0.97 – 2.79 |
| Генотип <i>T/C</i>                    | 0.507   | 0.557              |          |      | 0.82  | 0.51 – 1.32 |
| Генотип <i>C/C</i>                    | 0.145   | 0.197              |          |      | 0.69  | 0.37 – 1.30 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 0.5     | 1.68               |          |      |       |             |
| <i>-8202A &gt; G</i> гена <i>MMP9</i> |         |                    |          |      |       |             |
| Аллель <i>A</i>                       | 0.536   | 0.508              | 0.43     | 0.51 | 1.12  | 0.80 – 1.57 |
| Аллель <i>G</i>                       | 0.464   | 0.492              |          |      | 0.89  | 0.64 – 1.25 |
| Генотип <i>A/A</i>                    | 0.329   | 0.230              | 5.78     | 0.06 | 1.65  | 0.96 – 2.83 |
| Генотип <i>A/G</i>                    | 0.414   | 0.557              |          |      | 0.56  | 0.35 – 0.91 |
| Генотип <i>G/G</i>                    | 0.257   | 0.213              |          |      | 1.27  | 0.72 – 2.24 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 4.22    | 1.61               |          |      |       |             |

Примечание: *PXB* – равновесие Харди-Вайнберга,  
OR – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Проведенное исследование показало, что статистически значимые отличия по частоте встречаемости генотипов и аллелей среди пациентов с аллергическими заболеваниями и детей, входящих в контрольную группу, зарегистрированы только в отношении следующих однонуклеотидных замен: *25Pro* гена *TGF $\beta$ 1*, *2073A > T* гена *EGFR* и *320A > C* гена *MMP20* ( $p < 0,05$ ).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *-634G > C* гена *VEGFA* не установил наличие статистически значимых различий по сравнению с контролем ( $p \geq 0,05$ ). Однако у

пациентов с аллергическими заболеваниями частота встречаемости гетерозигот *C/G* была несколько выше (40,8 %), по сравнению со здоровыми детьми (29,5 %). А среди больных частота встречаемости *G*-аллеля была практически в 3 раза выше (73 %), чем *C*-аллеля (27 %), при этом среди детей, страдающих аллергическими заболеваниями, преобладали лица с гомозиготным *GG*-генотипом (52,6 %). Также следует отметить, что у пациентов с различными полиморфными вариантами данного гена концентрация фактора роста эндотелия сосудов имела достоверные отличия ( $p = 0,012$ ) [рис. 36].

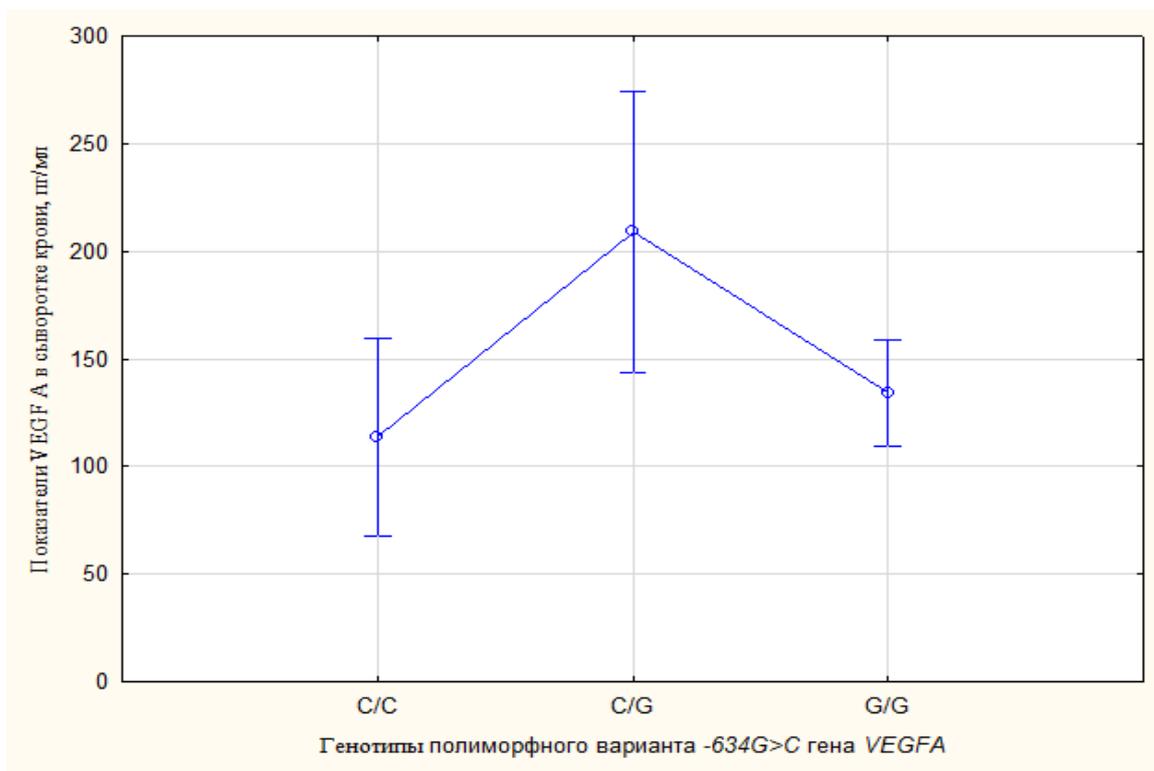


Рисунок 36. Распределение концентрации VEGFA в сыворотке крови больных с аллергическими заболеваниями в зависимости от генотипа по полиморфному варианту -634G > C гена VEGFA

При этом максимальные значения фактора роста эндотелия сосудов были зарегистрированы среди носителей *CG*-генотипа (табл. 30), в то время, как у гомозигот по *C*- и *G*- аллелям показатели были примерно равные ( $p = 0,552$ ).

Показатели VEGFA у больных с различными вариантами  
полиморфизма -634G > C гена VEGFA

| № | Генотип              | Концентрация VEGF A, пг/мл  |
|---|----------------------|---|
|   |                      | Me [Q25; Q75]   |
| 1 | Генотип C/C (n = 10) | 116,28 [35,71; 186,32]  |
| 2 | Генотип C/G (n = 22) | 185,25 [111,18; 239,60]   |
| 3 | Генотип G/G (n = 52) | 127,56 [66,95; 72,72]   |
|   | P                    | <p><b>p<sub>123</sub> = 0,012</b></p> <p><b>p<sub>12</sub> = 0,010</b></p> <p>p<sub>13</sub> = 0,552</p> <p><b>p<sub>23</sub> = 0,034</b></p> |

Примечание: p<sub>123</sub> значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

p<sub>12</sub> значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами C/C и C/G

p<sub>13</sub> значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами C/C и G/G

p<sub>23</sub> значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами G/G и C/G

При попарном сравнении p рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены p < 0,05.

Подробный анализ ассоциации полиморфного локуса *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* установил наличие статистически значимых различий по сравнению с контролем как по частоте встречаемости аллелей (p < 0,001), так и генотипов (p < 0,001). При этом носителей *Arg*-аллеля среди больных с аллергическими заболеваниями было в 1,4 раза больше по сравнению со здоровыми детьми. Анализ распределения генотипов в обследуемых группах выявил значительное преобладание гомозигот по аллели *Arg25* (81,6 %) среди пациентов первой группы, тогда как в группе контроля они составили всего 46%. Частота гетерозигот *Arg25Pro* среди детей, не страдающих аллергической патологией, была в 2 раза больше (40%) по сравнению с больными (17,1 %). Частота гомозигот по аллели *25Pro* в контрольной группе составила 14 %, а среди больных детей генотип *ProPro* был зарегистрирован лишь у 1,3 % обследованных. Следовательно, можно предположить, что генотип *ArgArg* гена *TGFβ<sub>1</sub>* является маркером повышенного риска развития

аллергических заболеваний у детей (*OR составил 5,20*), а *Pro*-аллель оказывает протективный эффект в отношении развития аллергии у детей.

Также следует отметить, что генотип *ArgArg* по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* сопряжен с повышенным синтезом белка *TGFβ<sub>1</sub>*. Проведенные нами исследования установили, что максимальная концентрация данного фактора отмечается у лиц с генотипом *ArgArg* (2,69 [2,26; 277,62] пг/мл), тогда как у детей, имеющих *ProPro*-генотип, его величина составила всего 2,25 [2,01; 2,47] пг/мл, однако при этом достоверных отличий данного показателя не выявлено.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей [204, 205, 20]. Так, ряд зарубежных ученых считает, что ген *TGF-β1* относится к генам, регулирующим врожденный иммунный ответ и иммунорегуляцию при развитии аллергической реакции. А принимая во внимание тот факт, что *TGF-β1* оказывает значительное влияние на рост и дифференцировку клеток во время воспалительного процесса, можно предположить, что его повышенная экспрессия, обусловленная наследованием определенного полиморфизма, может способствовать не только ремоделированию тканей, но и прогрессированию заболевания в целом.

Также результаты проведенных нами исследований показали, что еще одним значимым фактором в развитии аллергических заболеваний является эпителиальный фактор роста. Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма *2073A > T* гена его рецептора (*EGFR*) среди пациентов, страдающих аллергическими заболеваниями, имеет статистически значимые отличия от группы контроля ( $p < 0,001$ ). Среди больных детей 40,1 % лиц являются гетерозиготами по данному полиморфизму, 50 % - носители *TT*-генотипа, а гомозиготный *A/A*-вариант полиморфизма отмечен лишь у 9,9 % обследованных. В то время, как в группе контроля частота регистрации гомозигот *-2073A/A* гена *EGFR* составила 15 %, а гетерозигот – 58,3 %. При

этом установлено, что генотип *2073TT* гена *EGFR* ассоциирован с повышенным риском развития заболеваний у детей (*OR* составил 2,75), тогда, как аллель *A2073*, наоборот, оказывает протективный эффект (*OR* составил 0,54). Эпителиальный фактор роста не только является сильным митогеном для различных клеток эндодермального, эктодермального и мезодермального происхождения, но и контролирует и стимулирует пролиферацию фибробластов. Следовательно, можно предположить, что у детей с генотипом *2073TT* будут наблюдаться более быстрые и существенные изменения структуры эпителиальных тканей в ответ на действие аллергена, по сравнению с обладателями гетерозиготного генотипа гена *EGFR*.

Исследование частот аллелей и генотипов по полиморфизму генов металлопротеиназ установило наличие достоверно значимых отличий лишь по частоте встречаемости генотипов полиморфизма *320A > C* гена *MMP20* ( $p = 0,04$ ). Наиболее часто среди атопиков встречались гомозиготы по *C*-аллелю (41,4 %), в то время, как в группе контроля их частота составила всего 32,8 %. При этом количество носителей *A/C*-генотипа было гораздо больше среди пациентов контрольной группы (50,8%) по сравнению с больными (35,5 %). Проведенное генетическое исследование установило, что генотип *320AC* гена *MMP20* ассоциирован с низким риском развития аллергических заболеваний у детей (*OR* составил 0,53).

По полиморфизму *837T > C* гена *MMP20* статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей между группами обследованных нами детей обнаружено не было ( $p > 0,05$ ). Однако, преобладающим генотипом является гетерозиготный *T/C*-генотип, он зарегистрирован у 50,7 % в группе больных детей и 55,7 % в контрольной группе. При этом частота гомозигот *T/T* в группе пациентов с аллергическими заболеваниями в 1,42 раза выше, чем в группе здоровых детей, тогда как частота гомозигот по *C*-аллелю была несколько выше в контрольной группе (19,7 %) [среди больных эта цифра составила всего 14,5 %].

Также в ходе данной работы отмечено, что у больных, страдающих аллергическими заболеваниями, частота встречаемости генотипа *AA* (32,9 %) полиморфизма *-8202A > G* гена *MMP9* была выше, чем в контрольной группе (23 %), в то время как число гетерозигот *AG*, наоборот, преобладало – 55,7 % (среди пациентов первой группы эта цифра составила 41,4 %).

Значительная фенотипическая вариабельность клинической картины аллергических заболеваний у детей указывает на существование эффекта взаимодействия многих генов, что предполагает наличие определенных комбинаций генетических вариантов у больных. Поэтому для оценки сочетанного вклада различных аллельных вариантов генов в патогенез атопии нами был проведен анализ межгенных взаимодействий.

Для реализации поставленной задачи нами использовалась программа MDR. Модель межгенных взаимодействий считали валидной, если согласованность (Cross Validation Consistency) была не меньше 6/10. Полученные модели характеризовались коэффициентом перекрестной проверки CV (cross-validation) и степенью взаимодействия генов.

Нами проведен анализ межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных вариантов генов *TGFβ1*, *VEGFA*, *EGFR*, *MMP9* и *MMP20* у пациентов с аллергическими заболеваниями (рис. 37). В результате проделанной работы установлено наличие значительного синергизма между полиморфизмами *320A>C* гена *MMP20* и *Arg25Pro* гена *TGFβ* и *2073A>T* гена *EGFR*. А также выявлено наличие сильного дублирующего эффекта между генами *TGFβ* и *EGFR*, т.е. их вклад в генез аллергических заболеваний у детей при совместном рассмотрении сопоставим с индивидуальным эффектом.

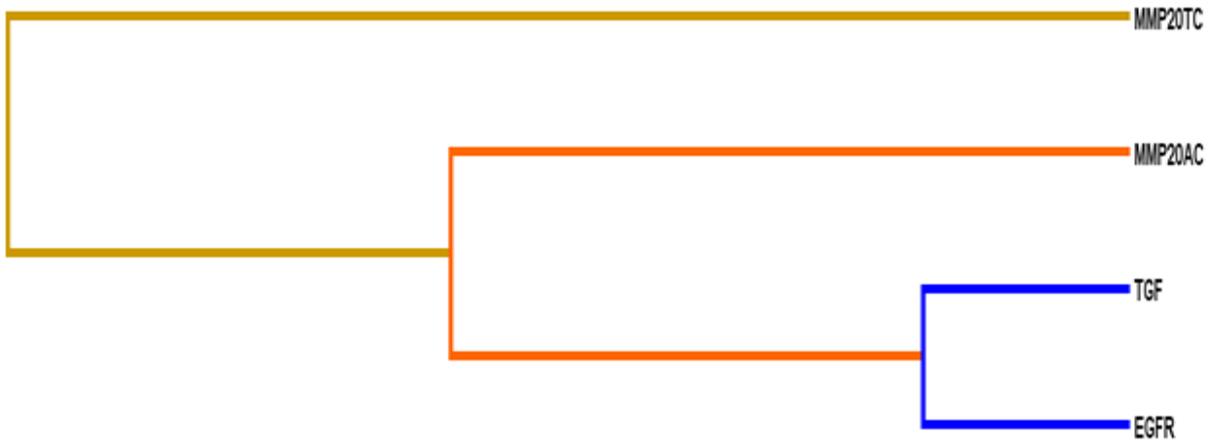


Рисунок 37. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных генов у пациентов с аллергопатологией.

Примечание: короткие линии указывают на сильное взаимодействие генных локусов, длинные – на слабую связь; красным цветом показан синергизм, т. е. взаимное усиление эффектов между локусами, синим – дублирование эффектов между локусами; коричневый цвет указывает на независимость эффектов отдельных локусов.

Дальнейший анализ ген-генного взаимодействия также выявил наличие сильного синергизма между рассматриваемыми генами (рис. 38).

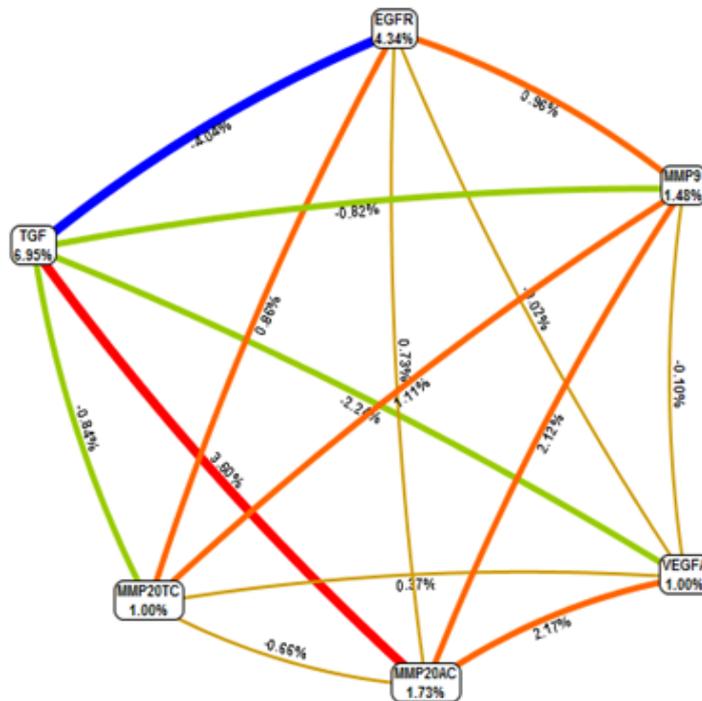


Рисунок 38. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *MMP20*, *VEGFA*, *EGFR*, *TGFβ* при аллергопатологии у детей.

Примечание. На вершинах шестигранника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным цветом обозначено наличие синергизма, зеленым и синим – отсутствие

В ходе данной работы было показано, что, несмотря на низкий процент вклада каждого полиморфного варианта гена [например, *TGFβ* (6,95 %) и *MMP20* (1,73 %)], риск формирования аллергических заболеваний у детей увеличивается при их взаимодействии.

На представленном рисунке видно, что наибольшей информационной ценностью обладает полиморфный вариант *Arg25Pro* гена *TGFβ* (6,95 %), а его взаимодействие с другими полиморфизмами не столь значимо в развитии аллергических заболеваний у детей.

При этом нами также установлено наличие синергизма между полиморфизмами:

- 837T>C гена *MMP20* и 8202A>G гена *MMP9* (1,11 %);
- 8202A>G гена *MMP9* и 2073A>T гена *EGFR* (0,96 %);
- 320A>C гена *MMP20* и 8202A>G гена *MMP9* (2,12 %);
- 320A>C гена *MMP20* и 634C>G гена *VEGFA* (2,17 %);
- 837T>C гена *MMP20* и 2073A>T гена *EGFR* (0,86 %).

Принимая во внимание результаты проведенных генетических исследований, можно предположить, что аллельные варианты генов *TGFβ* и *MMP20AC* вносят наиболее значимый вклад в развитие аллергических заболеваний у детей, а суммарная информационная ценность их полиморфизмов равна 12,28 %. Итак, проведенное нами исследование установило, что риск развития аллергических заболеваний значительно повышен у носителей мутантного *ArgArg*-генотипа гена *TGFβ<sub>1</sub>* и *2073TT*-генотипа гена *EGFR*, причем оба этих полиморфизма проявляют, хотя и в разной степени, синергизм с локусом 320A > C гена *MMP20*.

### **5.3. Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с бронхиальной астмой**

Согласно современным представлениям о генетической предрасположенности к БА, для развития данного заболевания необходимо

не только наличие неблагоприятных факторов внешней среды, но и определенного наследственного фона, характеризующегося сочетанием различных аллельных вариантов генов. Причем на сегодняшний день известно большое количество генов-кандидатов, полиморфизмы которых формируют сложную генную сеть, регулирующую процессы развития, как астмы, так и атопии в целом. В первую очередь - это гены цитокинов, интерлейкинов, факторов роста, ферментов, в том числе и матриксных металлопротеиназ и др. [38]. Поэтому исследование полиморфизмов данных цитокинов в совокупности с клинико-анамнестическими показателями позволит не только установить предрасполагающие генетические факторы, но и оценить их вклад в патогенез заболевания.

В ходе проведенных ранее исследований было показано, что наличие миссенс-мутации  $-634G > C$  гена *VEGFA* повышает экспрессию фактора роста эндотелия сосудов, а, следовательно, тем самым способствует активации неоангиогенеза [262]. В ходе данной работы нами также установлены статистически значимые различия в частотах аллелей между группой больных и контрольной группой ( $p = 0,01$ ) [табл. 31]. При этом частота встречаемости *C*-аллеля среди детей, страдающих БА, в 1,5 раза выше, чем в группе относительно здоровых лиц.

Установлено, что как в группе пациентов с БА, так и в контрольной группе преобладает аллель *G* (65 % и 77 % соответственно). Однако, среди здоровых детей наиболее часто регистрировались носители гомозиготного *G/G*-генотипа (62,3 %), тогда как среди больных гомозиготы по *G*-аллелю составили всего 40 %, а половина детей, страдающих от приступов БА, являлись гетерозиготами *C/G* по полиморфизму  $-634G > C$  гена *VEGFA* (50 %). При этом зарегистрированы статистически значимые различия в частотах генотипов между исследуемыми группами ( $p = 0,01$ ). Проведенное генетическое исследование показало, что у гетерозигот по локусу  $-634G > C$  гена *VEGFA* риск развития БА в 2 раза выше, по сравнению с носителями других генотипов (*OR* составил 2,39), а обладатели *G/G*-генотипа, напротив,

имеют наименьший риск развития данного заболевания (OR равно 0,40; 95 % CI – 0,21 – 0,76,  $p=0,01$ ).

Таблица 31

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму  
-634G > C гена VEGFA среди больных с бронхиальной астмой

| Генотип,<br>аллель              | Аллель C                 | Аллель G                 | Генотип<br>C/C           | Генотип<br>C/G           | Генотип<br>G/G           | PXB<br>( $\chi^2$ ) |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| Больные<br>БА<br>(n = 60)       | 0.350                    | 0.650                    | 0.100                    | 0.500                    | 0.400                    | 0.59                |
| Группа<br>контроля<br>(n = 122) | 0.230                    | 0.770                    | 0.082                    | 0.295                    | 0.623                    | 3.35                |
| $\chi^2$ (p)                    | <b>5.94 (0.01)</b>       |                          | <b>8.44 (0.01)</b>       |                          |                          |                     |
| OR<br>(95 %<br>CI)              | 1.81<br>(1.12 –<br>2.92) | 0.55<br>(0.34 –<br>0.89) | 1.24<br>(0.43 –<br>3.60) | 2.39<br>(1.26 –<br>4.52) | 0.40<br>(0.21 –<br>0.76) |                     |

Примечание: PXB – равновесие Харди-Вайнберга, OR – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Сравнение полученных данных с результатами зарубежных ученых показало, что аллель -634G гена VEGFA регистрируется в 2 раза чаще у детей, страдающих БА, проживающих в Российской Федерации [96, 99, 142].

Важно отметить, что у пациентов, носителей гетерозиготного генотипа содержание VEGFA в сыворотке крови значительно больше, чем у гомозигот по исследуемому полиморфизму (табл. 32). Таким образом, можно предположить, что гетерозиготный генотип (-634G > C) гена VEGFA связан с более высокой продукцией фактора роста эндотелия сосудов у детей с БА, а, следовательно, высоким риском активации неоангиогенеза, способствующего не только развитию отека бронхиальной стенки и формированию бронхообструкции, но и ремоделированию тканей.

Распределение концентрации VEGFA в сыворотке крови больных БА в зависимости от генотипа

| № | Генотип     | Концентрация VEGF A, пг/мл<br>Me [Q25; Q75]   |
|---|-------------|---|
| 1 | Генотип C/C | 111,02 [33,56; 190,02]  |
| 2 | Генотип C/G | 190,99 [169,40; 203,32]   |
| 3 | Генотип G/G | 80,64 [62,36; 150,90]   |
|   | P           | <p><b><math>p_{123} = 0,010</math></b></p> <p><b><math>p_{12} = 0,011</math></b></p> <p><math>p_{13} = 0,725</math></p> <p><b><math>p_{23} = 0,007</math></b></p> |

Примечание:

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

$p_{12}$  значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами C/C и C/G;

$p_{13}$  значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами C/C и G/G;

$p_{23}$  значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами G/G и C/G.

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Принимая во внимание тот факт, что значимую роль в формировании БА играет выраженность атопии, благодаря которой запускается и поддерживается целый каскад провоспалительных реакций, способствующих хронизации процесса, нами было изучено влияние полиморфного локуса - *634G > C* гена *VEGFA* на содержание IgE в сыворотке крови больных. Анализ полученных данных показал, что достоверно значимых различий уровня IgE у носителей разных генотипов не выявлено, что говорит об отсутствии существенного влияния данного полиморфизма на варьирование этого показателя (табл. 33).

Содержание общего IgE в сыворотке крови пациентов с различными генотипами по полиморфному локусу  $-634G > C$  гена *VEGFA*

| № | Генотип     | Концентрация общего IgE, МЕ/мл  |
|---|-------------|---|
|   |             | Me [Q25; Q75]   |
| 1 | Генотип C/C | 808,00 [234,0; 1478,0]  |
| 2 | Генотип C/G | 484,50 [105,0; 1065,0]  |
| 3 | Генотип G/G | 215,00 [90,0; 11,29]  |
|   | P           | $p_{123} = 0,265$<br>$p_{12} = 0,229$<br>$p_{13} = 0,098$<br>$p_{23} = 0,574$ |

Примечание:

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

$p_{12}$  значимость различий концентрации общего IgE у больных с генотипами C/C и C/G;

$p_{13}$  значимость различий концентрации общего IgE у больных с генотипами C/C и G/G;

$p_{23}$  значимость различий концентрации общего IgE у больных с генотипами G/G и C/G.

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни.

Однако, следует отметить, что у гетерозигот C/G по гену *VEGFA* достоверно чаще зарегистрировано среднетяжелое течение заболевания (60,0 %), в то время как у гомозигот по G-аллели преобладает легкое течение БА (66,67 %) [ $p = 0,018$ ].

Исследование влияния данного полиморфного варианта гена на восприимчивость к различным аллергенам обследованных больных показало, что поливалентная сенсibilизация гораздо чаще была зарегистрирована у гомозиготных носителей по G-аллели (41,67 %) и гетерозигот C/G по гену *VEGFA* (41,67 %), в то время, как гомозигот по C-аллелю лишь в 16,67 % случаев ( $p = 0,006$ ).

Еще одним фактором, играющим немаловажную роль в процессах реорганизации дыхательных путей, является TGF- $\beta$ 1. Данный цитокин не только стимулирует образование коллагена коллагенобластами, но и

обеспечивает превращение коллагенобластов в миофибробласты, их активацию, а также угнетение апоптоза.

Исследование частот аллелей и генотипов по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* установило наличие статистически значимых различий между пациентами, страдающими БА и детьми контрольной группы (табл. 34).

Таблица 34

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* среди больных с бронхиальной астмой

| Генотип, аллель           | Аллель <i>Arg</i>         | Аллель <i>Pro</i>  | Генотип <i>Arg/Arg</i>    | Генотип <i>Arg/Pro</i> | Генотип <i>Pro/Pro</i> | <i>PXB</i> ( $\chi^2$ ) |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Больные БА (n = 60)       | 0.950                     | 0.050              | 0.900                     | 0.100                  | 0.000                  | 0.17                    |
| Группа контроля (n = 100) | 0.660                     | 0.340              | 0.460                     | 0.400                  | 0.140                  | 1.18                    |
| $\chi^2$ (p)              | <b>35.48 (p&lt;0,001)</b> |                    | <b>31.76 (p&lt;0,001)</b> |                        |                        |                         |
| <i>OR</i> (95 % CI)       | 9.79 (4.09 – 23.40)       | 0.10 (0.04 – 0.24) | 10.57 (4.17 – 26.79)      | 0.17 (0.07 – 0.42)     | 0.05 (0.00 – 0.84)     |                         |

Примечание: *PXB* - равновесие Харди-Вайнберга, *OR* – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Из полученных данных следует, что преобладающим аллелем в обеих группах является аллель *Arg*. Генотип *Arg/Arg* в группе детей с БА составляет 90 %, тогда как в группе контроля лишь 46 %. Частота гетерозигот *Arg/Pro* среди астматиков в 4 раза меньше по сравнению с контрольной группой. А генотип *ProPro* среди детей, страдающих БА, не был выявлен, тогда как в группе контроля зарегистрировано 14 % пациентов гомозиготных по данной аллели. Важно отметить, что у детей с генотипом *ArgArg* риск развития

бронхиальной астмы значительно повышен (*OR* составил 10,57; 95 % *CI* – 4,17-26,79,  $p < 0,001$ ).

Исследование концентрации  $TGF\beta_1$  в сыворотке крови детей, страдающих от приступов удушья, показало, что максимальные цифры данного фактора роста отмечаются у носителей *Arg/Arg*-генотипа ( $205,9 \pm 316,65$  (2,69 [2,26; 277,62]) пг/мл). Принимая во внимание тот факт, что  $TGF\beta_1$  – это белок, который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток, повышение его концентрации в сыворотке крови может привести к развитию необратимых морфофункциональных изменений в бронхолегочной системе. А, следовательно, повышенный синтез данного фактора роста может быть обусловлен наследованием *ArgArg*-генотипа и может способствовать развитию ремоделирования бронхолегочной системы, а, значит, прогрессированию заболевания.

Большое значение в патогенезе БА играет эпителиальный фактор роста, именно он способствует гиперсекреции слизи, формированию субэпителиального фиброза, а также нарушению пролиферации эпителиальных клеток. Поэтому особый интерес представляет изучение особенностей наследования его рецептора (*EGFR*), так в исследованиях, проведенных ранее, было показано, что мутации в гене, отвечающем за синтез данного рецептора, способствуют изменению уровня экспрессии и повышению его активности в клетках мерцательного эпителия [111].

Анализ полученных нами результатов генетического исследования выявил наличие статистически значимых отличий по частоте встречаемости аллелей и генотипов по полиморфизму  $2073A > T$  гена *EGFR* среди больных БА и детей контрольной группы ( $p < 0,001$ ) [табл. 35].

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму  
2073A > T гена *EGFR* среди больных с бронхиальной астмой

| Генотип,<br>аллель              | Аллель<br>A                 | Аллель<br>T              | Генотип<br>A/A              | Генотип<br>A/T           | Генотип<br>T/T            | <i>PXB</i><br>( $\chi^2$ ) |
|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Больные<br>БА<br>(n = 60)       | 0.175                       | 0.825                    | 0.050                       | 0.250                    | 0.700                     | 1,08                       |
| Группа<br>контроля<br>(n = 120) | 0.442                       | 0.558                    | 0.150                       | 0.583                    | 0.267                     | 4.01                       |
| $\chi^2$ (p)                    | <b>24.92 (p &lt; 0,001)</b> |                          | <b>31.11 (p &lt; 0,001)</b> |                          |                           |                            |
| <i>OR</i><br>(95 % CI)          | 0.27<br>(0.16 –<br>0.46)    | 3.73<br>(2.18 –<br>6.37) | 0.30<br>(0.08 –<br>1.06)    | 0.24<br>(0.12 –<br>0.47) | 6.42<br>(3.24 –<br>12.72) |                            |

Примечание: *PXB* - равновесие Харди-Вайнберга, *OR* – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Установлено, что повышенная частота аллеля 2073T гена *EGFR* отмечается как в группе больных БА (82,5 %), так и в группе относительно здоровых детей (55,8 %). При этом в группе контроля преобладают гетерозиготы по исследуемому полиморфизму (58,3%), тогда как среди детей, страдающих БА носители *TT*-генотипа (70%). Однако, в выборке пациентов, входящих в группу контроля, величина коэффициента *PXB* равна 4,01, следовательно, не выполняется равновесие Харди-Вайнберга, что диктует необходимость продолжения исследования в данном научном направлении.

Исследование полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ у обследованных нами пациентов выявило значимые различия по частоте встречаемости генотипов полиморфных вариантов 320A > C и 837T > C гена *MMP20* (табл. 36).

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизмам генов матричных металлопротеиназ среди больных с бронхиальной астмой

| Генотип/<br>Аллель                    | Больные | Группа<br>контроля | $\chi^2$     | P            | OR    |             |
|---------------------------------------|---------|--------------------|--------------|--------------|-------|-------------|
|                                       | n = 60  | n = 122            |              |              | Знач. | 95 % CI     |
| <i>320A&gt;C</i> гена <i>MMP20</i>    |         |                    |              |              |       |             |
| Аллель А                              | 0.500   | 0.418              | 2.19         | 0.14         | 1.39  | 0.90 – 2.16 |
| Аллель С                              | 0.500   | 0.582              |              |              | 0.72  | 0.46 – 1.11 |
| Генотип А/А                           | 0.350   | 0.164              | <b>10.21</b> | <b>0.006</b> | 2.75  | 1.34 – 5.61 |
| Генотип А/С                           | 0.300   | 0.508              |              |              | 0.41  | 0.22 – 0.80 |
| Генотип С/С                           | 0.350   | 0.328              |              |              | 1.10  | 0.58 – 2.12 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 9.60    | 0.24               |              |              |       |             |
| <i>837T &gt; C</i> гена <i>MMP20</i>  |         |                    |              |              |       |             |
| Аллель Т                              | 0.625   | 0.525              | 3.29         | 0.07         | 1.51  | 0.97 – 2.36 |
| Аллель С                              | 0.375   | 0.475              |              |              | 0.66  | 0.42 – 1.04 |
| Генотип Т/Т                           | 0.450   | 0.246              | <b>8.89</b>  | <b>0.01</b>  | 2.51  | 1.30 – 4.83 |
| Генотип Т/С                           | 0.350   | 0.557              |              |              | 0.43  | 0.23 – 0.81 |
| Генотип С/С                           | 0.200   | 0.197              |              |              | 1.02  | 0.47 – 2.21 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 3.85    | 1.68               |              |              |       |             |
| <i>-8202A &gt; G</i> гена <i>MMP9</i> |         |                    |              |              |       |             |
| Аллель А                              | 0.425   | 0.508              | 2.23         | 0.14         | 0.72  | 0.46 – 1.11 |
| Аллель G                              | 0.575   | 0.492              |              |              | 1.40  | 0.90 – 2.17 |
| Генотип А/А                           | 0.200   | 0.230              | 3.97         | 0.14         | 0.84  | 0.39 – 1.80 |
| Генотип А/G                           | 0.450   | 0.557              |              |              | 0.65  | 0.35 – 1.21 |
| Генотип G/G                           | 0.350   | 0.213              |              |              | 1.99  | 1.00 – 3.94 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 0.38    | 0.81               |              |              |       |             |

Примечание: *PXB*–равновесие Харди-Вайнберга, OR–отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Стоит отметить, что среди детей, имеющих клинические проявления эпидермальной сенсibilизации, наиболее часто регистрировались лица с GG-генотипом (62,5 %), тогда как среди гомозигот по A-аллелю аллергическая реакция на эпидермальные аллергены отмечалась лишь в 37,5 % случаев ( $p = 0,0008$ ). А также было установлено, что среди больных, имеющих поливалентную сенсibilизацию, преобладают гетерозиготные и гомозиготные по A-аллели носители данного полиморфного локуса (табл. 37).

Таблица 37

Распределение генотипов по полиморфизму -8202A > G гена MMP9 у больных БА, имеющих поливалентную сенсibilизацию

| Генотипы                | Доля больных БА, не имеющих поливалентной сенсibilизации, % | Доля больных БА с поливалентной сенсibilизацией, % | P             |
|-------------------------|---|--|---------------|
| Генотип A/A<br>(n = 12) | 14,3%   | 85,7 %   | <b>0,04</b>   |
| Генотип A/G<br>(n = 30) | 5,9 %   | 94,1 %   | <b>0,0002</b> |
| Генотип G/G<br>(n = 18) | 57,1 %  | 42,9 %   | 0,56          |

При этом, среди гетерозигот по полиморфизму -8202A > G гена MMP9 только 57,14 % смогли достичь контроля над заболеванием на фоне терапии базисными противовоспалительными препаратами, тогда как среди носителей A/A-генотипа все 100 % ( $p = 0,057$ ).

Исследование концентрации MMP9 у больных БА в зависимости от генотипа по полиморфизму -8202A > G гена MMP9 показало, что достоверно значимых отличий среди изучаемых групп зарегистрировано не было (табл. 38).

Таблица 38

Концентрация MMP9 в сыворотке крови у больных БА, имеющих разные генотипы по полиморфизму -8202A > G гена MMP9

| № | Генотипы    | Концентрация MMP9, нг/мл,<br>Me [Q25; Q75]                                       |
|---|-------------|--|
| 1 | Генотип A/A | 595 [519,04; 669,94]   |
| 2 | Генотип A/G | 478,29 [368,20; 748,22]  |
| 3 | Генотип G/G | 794,25 [497,52; 1093,25]   |
|   | P           | $p_{123} = 0,317$<br>$p_{1,2} = 0,821$<br>$p_{1,3} = 0,234$<br>$p_{2,3} = 0,183$ |

Примечание:

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

$p_{12}$  значимость различий концентрации MMP9 у больных с генотипами A/A и A/G;

$p_{13}$  значимость различий концентрации MMP9 у больных с генотипами A/A и G/G;

$p_{23}$  значимость различий концентрации MMP9 у больных с генотипами G/G и A/G.

При попарном сравнении p рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

Бронхиальная астма является достаточно сложным с точки зрения патогенеза заболеванием, в развитии которого значительную роль играют не только отдельные аллели полиморфных вариантов генов, но и их «генетические ансамбли». Поэтому для выявления особенностей взаимодействия различных полиморфизмов исследуемых генов, нами проведен анализ межгенных взаимодействий (генов *MMP9*, *VEGFA*, и *MMP20*, *TGFβ1* и *EGFR*) у больных БА.

В результате проведенной работы была установлена статистически значимая двухлокусная модель «*EGFR (2073A > T) / MMP20 (320A > C)*» с воспроизводимостью – 7/10 и точностью предсказания – 71,98 % ( $p < 0,0001$ ) [табл. 39].

Таблица 39

## Значимая модель межгенных взаимодействий у больных БА

| Tr.Val.<br>Acc.                                  | Test.Val.<br>Acc. | p ( $\chi^2$ )        | Se.  | Sp.    | CVC  | Pre.   |
|--|-------------------|-----------------------|------|--------|------|--------|
| <i>EGFR (2073A &gt; T) / MMP20 (320A &gt; C)</i> |                   |                       |      |        |      |        |
| 0,7565   | 0,7198            | p < 0,0001<br>(41,17) | 0,85 | 0,6557 | 7/10 | 0,5484 |

Примечания. Данная модель рассчитана в программе MDR.

Se. – чувствительность, Sp. – специфичность, Pre. (precision) – точность модели.

Test. Val. Acc. – тестируемая сбалансированная точность,

Tr. Val. Acc. – тренировочная сбалансированная точность,

(p) – тест на значимость,

$\chi^2$  – критерий значимости различий групп по распределению частот генотипов.

Как видно из таблицы 39 данная модель характеризуется высокой воспроизводимостью, следовательно, они являются значимыми моделями межгенного взаимодействия.

Дальнейший анализ полиморфных вариантов генов *2073A > T EGFR* и *320A > C MMP20*, входящих в состав двухлокусной модели выявил 4 сочетания генотипов возможного повышенного риска развития БА и 5 сочетанных генотипов возможного пониженного риска развития заболевания (рис. 39).

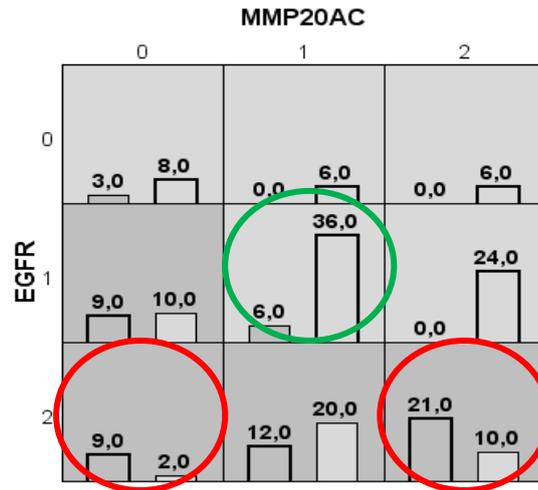


Рисунок 39. Распределение сочетаний генотипов в двухлокусной модели (*EGFR* / *MMP20*) в группе больных БА

Примечание. Тёмно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, серые ячейки – генотипы пониженного риска. Левые столбики в ячейках – дети с бронхиальной астмой, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1- гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2.

При рассмотрении данной модели было установлено, что генетическим профилем, приводящим к значительному возрастанию риска развития БА, являются:

1. Гомозигота по T-аллели гена *EGFR* и гомозигота по A-аллели гена *MMP20*. Относительный риск (*OR*) развития БА у детей с данным генотипом составляет 10,59 (2,21 – 50,75;  $p = 0,0013$ ).
2. Гомозигота по T-аллели гена *EGFR* и гомозиготы по A-аллели гена *MMP20*. Относительный риск (*OR*) развития БА у детей с данным генотипом составляет 6,03 (2,61 – 13,92;  $p < 0,0001$ ).

Генетическим профилем, приводящим к значительному снижению риска развития БА, является следующий: гетерозигота по обоим исследуемым SNP - относительный риск (*OR*) развития БА у детей с данным генотипом составляет 0,26 (0,1 – 0,67;  $p = 0,006$ ).

С помощью программы MDR нами также была построена дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных полиморфизмов генов у детей, страдающих БА (рис. 40). Данная модель

отражает силу взаимодействия между анализируемыми в рамках данной работы полиморфными локусами.



Рисунок 40. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных полиморфизмов генов у детей, страдающих бронхиальной астмой

Примечание: длинные линии указывают на слабое взаимодействие генных локусов, короткие – на сильную взаимосвязь.

Установлено, что в отношении полиморфизма генов *EGFR* и *MMP9* наблюдается ярко выраженный синергичный эффект, причем необходимо отметить, что суммарный патогенетический эффект данных локусов превосходит их вклад в развитие БА в отличие от отдельного влияния каждого полиморфного варианта.

Проведенный анализ ген-генных взаимодействий установил наличие синергизма между полиморфизмами  $837T > C$  гена *MMP20* и  $Arg25Pro$  гена *TGFβ* (2,13 %), а также полиморфизмами  $-8202A > G$  гена *MMP9* и  $2073A > T$  гена *EGFR* (3,19 %) (рис. 41).

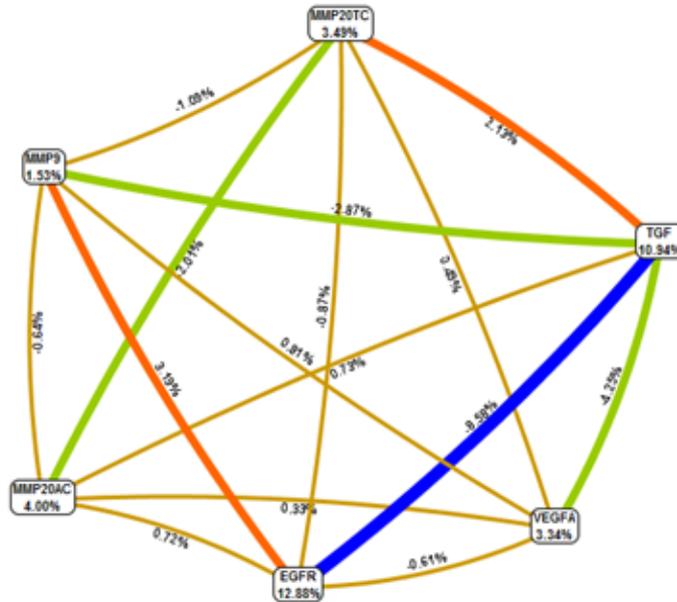


Рисунок 41. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *MMP20*, *VEGFA*, *EGFR*, *TGFβ* при бронхиальной астме у детей.

Примечание: на вершинах шестигранника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным цветом обозначено наличие синергизма, зеленым и синим – отсутствие синергизма

На представленном рисунке видно, что максимальная информационная значимость зарегистрирована в отношении взаимодействия генов *EGFR* и *MMP9* (17,6 %). Кроме того кумулятивный эффект отмечается в отношении генов *TGFβ* и *MMP20* (16,49 %). Важно отметить, что полиморфный вариант *-634G > C* гена *VEGFA*, также вносит определенный вклад в формирование БА (3,34 %) и это согласуется с результатами исследования отдельных аллелей и генотипов данного полиморфизма, представленных в таблице 33.

Итак, результаты проведенных нами исследований установили, что полиморфизмы генов *-634G > C* гена *VEGFA* и *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* ассоциированы с высоким риском развития БА у детей ( $p < 0,05$ ). Показана взаимосвязь *-634G > C* полиморфизма гена *VEGFA* и *Arg/Arg*-генотипа гена *TGFβ<sub>1</sub>* с более высокой продукцией данных факторов роста у больных. Важно отметить, что между полиморфизмами *837T > C* гена *MMP20* и

*Arg25Pro* гена *TGFβ*, а также полиморфизмами *-8202A > G* гена *MMP9* и *2073A > T* гена *EGFR* наблюдается выраженный синергичный эффект, а, следовательно, их взаимодействие повышает суммарный риск развития БА у детей.

#### 5.4. Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с атопическим дерматитом

В отличие от больных БА, анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму *-634G > C* гена *VEGFA* среди обследованных нами пациентов с АД не выявил достоверно значимых отличий от группы контроля ( $p \geq 0,05$ ) [табл. 40].

Таблица 40

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму *-634G > C* гена *VEGFA* среди больных атопическим дерматитом

| Генотип, аллель             | Аллель <i>C</i>    | Аллель <i>G</i>    | Генотип <i>C/C</i> | Генотип <i>C/G</i> | Генотип <i>G/G</i> | <i>PXB</i> ( $\chi^2$ ) |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| Больные БА (n = 26)         | 0.192              | 0.808              | 0.077              | 0.231              | 0.692              | 1,72                    |
| Группа контроля (n = 122)   | 0.230              | 0.770              | 0.082              | 0.295              | 0.623              | 3.35                    |
| $\chi^2$ (p)                | 0.34 (0.56)        |                    | 0,48 (0,79)        |                    |                    |                         |
| <i>OR</i> (95 % <i>CI</i> ) | 0.80 (0.38 – 1.69) | 1.25 (0.59 – 2.65) | 0.93 (0.19 – 4.54) | 0.72 (0.27 – 1.93) | 1.36 (0.55 – 3.38) |                         |

Примечание: *PXB* - равновесие Харди-Вайнберга, *OR* – отношение шансов, 95 % *CI* – доверительный интервал

При этом как среди больных АД, так и среди детей контрольной группы отмечается повышение частоты носителей гомозиготного *GG*-

генотипа (69,2 % и 62,23 % соответственно), при этом частота гетерозигот *C/G* несколько ниже – 23,1 % и 29,5 % соответственно. Однако, в группе пациентов с АД гомозиготный генотип *CC* встречается в 1,06 раз реже, чем среди детей, не имеющих указание на перенесенные аллергические заболевания в анамнезе.

Сопоставление полученных нами данных с результатами исследования содержания *VEGFA* в сыворотке крови больных показало, что наиболее высокие показатели данного фактора роста зарегистрированы у носителей гетерозиготного генотипа ( $325,94 \pm 99,97$  пг/мл), тогда как у гомозигот по *C*-аллели ( $116,28 \pm 1,24$  пг/мл) и *G*-аллели ( $188,61 \pm 21,71$  пг/мл) концентрация данного цитокина несколько ниже (табл. 41).

Таблица 41

Распределение концентрации *VEGFA* в сыворотке крови больных АД в зависимости от генотипа

| № | Генотип            | Концентрация VEGF A, пг/мл<br>(Me [Q25; Q75])                                 |
|---|--------------------|---|
| 1 | Генотип <i>C/C</i> | 115,17 [114,05; 116,28]   |
| 2 | Генотип <i>C/G</i> | 311,55 [59,94; 606,88]  |
| 3 | Генотип <i>G/G</i> | 204,00 [116,62; 303,60]   |
|   | P                  | $p_{123} = 0,112$<br>$p_{12} = 0,056$<br>$p_{13} = 0,427$<br>$p_{23} = 0,203$ |

Примечание:

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

$p_{12}$  значимость различий концентрации *VEGF A* у больных с генотипами *C/C* и *C/G*;

$p_{13}$  значимость различий концентрации *VEGF A* у больных с генотипами *C/C* и *G/G*;

$p_{23}$  значимость различий концентрации *VEGF A* у больных с генотипами *G/G* и *C/G*.

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

В отличие от БА, у пациентов с АД, не выявлено достоверно значимых отличий по частоте встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма *Arg25Pro* гена *TGFβ1* [табл. 42].

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму  
*Arg25Pro* гена *TGF β<sub>1</sub>* среди больных атопическим дерматитом

| Генотип,<br>аллель              | Аллель<br><i>Arg</i>     | Аллель<br><i>Pro</i>     | Генотип<br><i>Arg/Arg</i> | Генотип<br><i>Arg/Pro</i> | Генотип<br><i>Pro/Pro</i> | <i>PXB</i><br>( $\chi^2$ ) |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Больные<br>БА<br>(n = 26)       | 0.769                    | 0.231                    | 0.538                     | 0.462                     | 0.000                     | 2,34                       |
| Группа<br>контроля<br>(n = 100) | 0.660                    | 0.340                    | 0.460                     | 0.400                     | 0.140                     | 1.18                       |
| $\chi^2$ (p)                    | 2.27 (0.13)              |                          | 4.10 (0.13)               |                           |                           |                            |
| <i>OR</i><br>(95 %<br>CI)       | 1.72<br>(0.85 –<br>3.49) | 0.58<br>(0.29 –<br>1.18) | 1.37 (0.58<br>– 3.25)     | 1.29<br>(0.54 –<br>3.06)  | 0.11<br>(0.01 –<br>1.95)  |                            |

Примечание: *PXB* – равновесие Харди-Вайнберга, *OR* – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Однако, частота встречаемости *Arg/Arg*-генотипа (53,8 %) несколько выше, чем в группе контроля (46 %). А генотип *Arg/Pro* был зарегистрирован у 46,2 % детей, имеющих кожные проявления аллергии, в то время как гомозиготы по аллелю *25Pro* гена *TGF β<sub>1</sub>* в данной группе отсутствовали.

Как и при БА, у детей с АД, являющихся носителями *Arg/Arg*-генотипа, отмечается повышенное содержание *TGFβ<sub>1</sub>* в сыворотке крови (75,63 [66,30; 312,30] пг/мл), в то время как у гомозигот по *Pro*-аллели его величина несколько ниже (32,04 [25,31; 418,80] пг/мл). Также важно отметить, что у гомозигот по *Arg*-аллели концентрация общего IgE достоверно выше (200,0 [180,0; 450,10] МЕ/мл), чем у гетерозиготных носителей данного полиморфизма (69,98 [55,09; 143,20] МЕ/мл) ( $p = 0,004$ ). Следовательно, можно предположить, что носительство *Pro*-аллели снижает риск развития атопии, а значит и аллергических заболеваний (АД и БА) у детей. В то время как у обладателей *Arg*-аллели данного полиморфного локуса, напротив,

значительно повышена концентрация не только общего IgE, но и TGF  $\beta_1$  в сыворотке крови, что является прогностически неблагоприятным фактором, предрасполагающим к хронизации с активацией процессов реорганизации структуры поврежденных тканей.

Также нами не установлены статистически значимые различия в частотах генотипов и аллелей по полиморфизму  $2073A > T$  гена *EGFR* между группой контроля и больными АД (табл. 43). Частота встречаемости *A*-аллеля выше в группе детей с аллергическими заболеваниями (53,8 %), тогда как у детей контрольной группы ее величина составляет 44,2 %. И, напротив, в группе контроля чаще регистрируется *T*-аллель (55,8 %) по сравнению с пациентами, страдающими АД (46,2 %). При этом частота гомозигот *A/A* в группе детей с АД выше в 1,54 раза, чем в группе здоровых детей. Однако, в обеих группах исследуемых образцов преобладают гетерозиготы *A/T*.

Таблица 43

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму  $2073A > T$  гена *EGFR* среди больных атопическим дерматитом

| Генотип, аллель           | Аллель <i>A</i>    | Аллель <i>T</i>    | Генотип <i>A/A</i> | Генотип <i>A/T</i> | Генотип <i>T/T</i> | <i>PXB</i> ( $\chi^2$ ) |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| Больные БА (n = 26)       | 0.538              | 0.462              | 0.231              | 0.615              | 0.154              | 1,47                    |
| Группа контроля (n = 120) | 0.442              | 0.558              | 0.150              | 0.583              | 0.267              | 4.01                    |
| $\chi^2$ (p)              | 1.61 (0.2)         |                    | 1.99 (0.37)        |                    |                    |                         |
| <i>OR</i> (95 % CI)       | 1.47 (0.81 – 2.69) | 0.68 (0.37 – 1.24) | 1.70 (0.60 – 4.81) | 1.14 (0.48 – 2.73) | 0.50 (0.16 – 1.56) |                         |

Примечание: *PXB* - равновесие Харди-Вайнберга, *OR* – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Достоверно значимых отличий по клинической картине заболевания и результатам лабораторного исследования у больных с различными вариантами генотипа изучаемого полиморфного локуса выявлено не было.

Исследование частот генотипов и аллелей полиморфизмов генов металлопротеиназ установило, что выборки детей во всех обследованных нами группах соответствуют равновесию Харди-Вайнберга, однако достоверно значимые отличия были зарегистрированы только в отношении полиморфизма  $-8202A > G$  гена *MMP9* (табл. 44).

Таблица 44

Частота встречаемости генотипов и аллелей по исследуемым SNP генов металлопротеиназ среди больных атопическим дерматитом

| Генотип,<br>аллель                   | Больные | Здоровые | $\chi^2$    | P           | OR    |             |
|--------------------------------------|---------|----------|-------------|-------------|-------|-------------|
|                                      | n = 26  | n = 122  |             |             | Знач. | 95 % CI     |
| <i>837T &gt; C</i> гена <i>MMP20</i> |         |          |             |             |       |             |
| Аллель <i>T</i>                      | 0.500   | 0.525    | 0.10        | 0.75        | 0.91  | 0.50 – 1.65 |
| Аллель <i>C</i>                      | 0.500   | 0.475    |             |             | 1.10  | 0.61 – 2.01 |
| Генотип <i>T/T</i>                   | 0.231   | 0.246    | 0.16        | 0.92        | 0.92  | 0.34 – 2.50 |
| Генотип <i>T/C</i>                   | 0.538   | 0.557    |             |             | 0.93  | 0.40 – 2.17 |
| Генотип <i>C/C</i>                   | 0.231   | 0.197    |             |             | 1.23  | 0.44 – 3.38 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )              | 0.15    | 1.68     |             |             |       |             |
| <i>320A &gt; C</i> гена <i>MMP20</i> |         |          |             |             |       |             |
| Аллель <i>A</i>                      | 0.269   | 0.418    | <b>3.98</b> | <b>0.05</b> | 0.51  | 0.26 – 1.00 |
| Аллель <i>C</i>                      | 0.731   | 0.582    |             |             | 1.95  | 1.00 – 3.79 |
| Генотип <i>A/A</i>                   | 0.077   | 0.164    | 4.37        | 0.11        | 0.43  | 0.09 – 1.94 |
| Генотип <i>A/C</i>                   | 0.385   | 0.508    |             |             | 0.60  | 0.25 – 1.44 |
| Генотип <i>C/C</i>                   | 0.538   | 0.328    |             |             | 2.39  | 1.01 – 5.64 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )              | 0.01    | 0.24     |             |             |       |             |

| <i>-8202A &gt; G</i> гена <i>MMP9</i> |       |       |              |                   |      |              |
|---------------------------------------|-------|-------|--------------|-------------------|------|--------------|
| Аллель <i>A</i>                       | 0.846 | 0.508 | <b>19.95</b> | <b>p&lt;0,001</b> | 5.32 | 2.41 – 11.78 |
| Аллель <i>G</i>                       | 0.154 | 0.492 |              |                   | 0.19 | 0.08 – 0.42  |
| Генотип <i>A/A</i>                    | 0.692 | 0.230 | <b>22.91</b> | <b>p&lt;0,001</b> | 7.55 | 2.97 – 19.21 |
| Генотип <i>A/G</i>                    | 0.308 | 0.557 |              |                   | 0.35 | 0.14 – 0.87  |
| Генотип <i>G/G</i>                    | 0.000 | 0.213 |              |                   | 0.07 | 0.00 – 1.17  |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 0,86  | 1.61  |              |                   |      |              |

Примечание: *PXB* - равновесие Харди-Вайнберга, *OR* – отношение шансов, 95 % *CI* – доверительный интервал

Из представленных в таблице данных видно, что в группе контроля и среди детей, страдающих АД, в равной степени часто встречаются носители *T*- и *C*-аллеля гена *MMP20*, при этом преобладают гетерозиготные носители данного полиморфизма (53,8 % и 55,7 % соответственно). Однако у больных АД частота генотипа *C/C* в 1,2 раз выше, чем в группе контроля. Статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей между данными группами не выявлено.

При рассмотрении полиморфизма *320A > C* гена *MMP20* было установлено, что среди детей, страдающих АД, достоверно чаще регистрировалась аллель *C* (73,1 %), в то время как в группе контроля он встречался лишь у 58,2 %. Также следует отметить, что среди больных детей преобладали носители *C/C*-генотипа (53,8 %), гетерозигот (*A/C*) было 38,5 %, а гомозиготы по *A*-аллелю составили всего 7,7 %. При этом в группе контроля, наоборот доминировали лица с *A/C*-генотипом (50,8 %), а частота встречаемости гомозигот по *A*-аллелю была в 2 раза больше, по сравнению с больными АД (16,4 %).

Анализ распределения аллелей и генотипов по *-8202A > G* полиморфизму гена *MMP9* выявил достоверно значимые различия между группой контроля и пациентами, страдающими АД ( $p < 0,001$ ). При этом преобладающей аллелью в обеих группах является *A*-аллель (среди больных АД – 84,6 %, в группе контроля – 50,8 %). Установлено, что среди детей,

страдающих АД, преобладает *A/A*-генотип с частотой 69,2 %, тогда как в контрольной группе частота данного генотипа в 3 раза ниже ( $p < 0,001$ ). Гетерозиготный *A/G*-вариант зарегистрирован у 30,8 % больных АД, при этом в данной группе отсутствуют гомозиготы по *G*-аллели. В то время как в группе контроля преобладающим является *A/G*-генотип (55,7 %), а носителей *G/G*-генотипа в 2 раза меньше (21,3 %). Важно отметить, что у детей с генотипом *A/A* риск развития АД повышен в 7,55 раза ( $OR = 7,55 [95 \% CI - 2,97 - 19,21, p < 0,001]$ ), тогда как у детей с генотипом *G/G* выявлена тенденция к пониженному риску развития заболевания  $OR - 0,07$ .

Проведенное нами исследование концентрации ММР9 в сыворотке крови больных АД, имеющих различные генотипы, показало, что достоверных отличий между носителями гомо- и гетерозиготного генотипов установлено не было (табл. 45).

Таблица 45

Концентрация ММР9 в сыворотке крови больных АД, имеющих разные генотипы по полиморфизму  $-8202A > G$  гена *MMP9*

| № | Генотипы           | Концентрация ММР9, нг/мл,<br>Me [Q25; Q75]                                       |
|---|--------------------|--|
| 1 | Генотип <i>A/A</i> | 504,83 [209,78; 583,98]  |
| 2 | Генотип <i>A/G</i> | 430,00 [265,74; 790,42]  |
| 3 | Генотип <i>G/G</i> | 380,12 [375,00; 385,24]  |
|   | P                  | $p_{123} = 0,518$<br>$p_{1,2} = 0,446$<br>$p_{1,3} = 0,953$<br>$p_{2,3} = 0,437$ |

Примечание: При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни.

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

$p_{12}$  значимость различий концентрации ММР9 у больных с генотипами *A/A* и *A/G*;

$p_{13}$  значимость различий концентрации ММР9 у больных с генотипами *A/A* и *G/G*;

$p_{23}$  значимость различий концентрации ММР9 у больных с генотипами *G/G* и *A/G*.

Однако, важно отметить, что пациенты, являющиеся гомозиготами по

G-аллели, имели повышенный уровень общего IgE [ $p < 0,0001$ ] (табл. 46). Это позволяет предположить, что у данных пациентов имеется атопическая направленность заболевания. Следовательно, именно эти больные, более склонны к развитию «Атопического марша» в будущем и присоединению респираторных проявлений аллергической реакции.

Таблица 46

Концентрация общего IgE в сыворотке крови больных АД, имеющих разные генотипы по полиморфизму -8202A > G гена *MMP9*

| № | Генотипы    | Концентрация общего IgE, МЕ/мл   |
|---|-------------|--|
|   |             | Me [Q25; Q75]  |
| 1 | Генотип A/A | 113,08 [55,23; 192,50]   |
| 2 | Генотип A/G | 173,55 [123,02; 284,65]  |
| 3 | Генотип G/G | 859,95 [859,70; 860,20]  |
|   | P           | <p><b><math>p_{123} &lt; 0,0001</math></b></p> <p><math>p_{1,2} = 0,603</math></p> <p><b><math>p_{1,3} = 0,0001</math></b></p> <p><b><math>p_{2,3} = 0,0002</math></b></p> |

Примечание:

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

$p_{12}$  значимость различий концентрации общего IgE у больных с генотипами A/A и A/G;

$p_{13}$  значимость различий концентрации общего IgE у больных с генотипами A/A и G/G;

$p_{23}$  значимость различий концентрации общего IgE у больных с генотипами G/G и A/G.

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены  $p < 0,05$ .

В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов *MMP9*, *VEGFA*, *EGFR*, *MMP20* и *TGF $\beta$ 1* у больных, страдающих АД, рассчитанных с помощью программы MDR, были зарегистрированы две статистически значимые модели (табл. 47).

Значимые модели взаимодействия изучаемых генов у детей с атопическим дерматитом

|                                  |   |  |
|----------------------------------|---|--|
| Комбинации генов в модели        | <i>MMP20 (320A &gt; C)</i><br><i>MMP9 (-8202A &gt; G)</i> | <i>MMP20 (837 T &gt; C),</i><br><i>EGFR (2073 A &gt; T),</i><br><i>MMP9 (-8202A &gt; G),</i> |
| Тестируемое взаимодействие генов | 0,61  | 0,76   |
| Воспроизводимость модели         | 6/10  | 10/10  |
| $\chi^2$ (p)                     | 26,51<br>(p < 0,0001)                                     | 45,24<br>(p < 0,0001)  |
| OR<br>(95 % CI)                  | 9,244<br>(3,628-23,553)                                   | 40,286<br>(8,962-181,086)  |

Из представленной таблицы видно, что все полученные в ходе расчетов модели обладают высокой воспроизводимостью, следовательно, они являются значимыми моделями межгенного взаимодействия. Принимая во внимание тот факт, что наибольший показатель тестируемого взаимодействия генов был зарегистрирован в трехлокусной модели «*MMP20 (837 T > C) / EGFR (2073 A > T) / MMP9 (-8202A > G)*», нами проведен тщательный анализ распределения генотипов в данной модели (рис. 42).

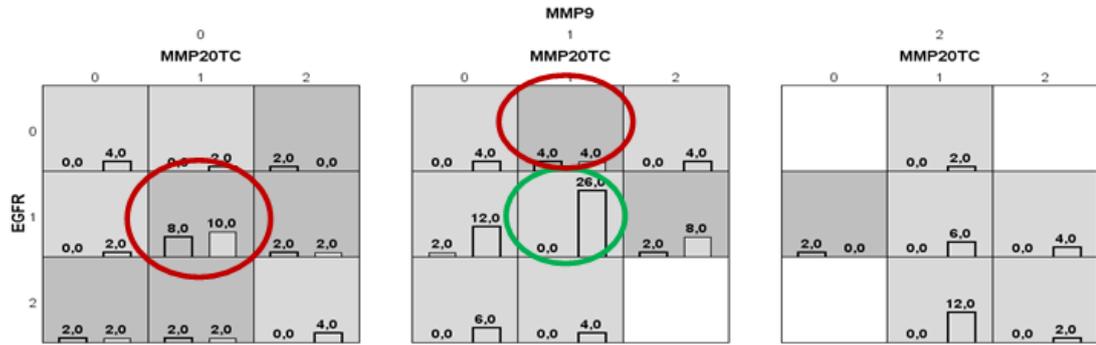


Рисунок 42. Трехлокусное распределение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *MMP20*, *EGFR*, *MMP9* в группе больных АД и в группе контроля

Примечание: темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – дети с атопическим дерматитом, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1-гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2)

Проведенное исследование показало, что в данной модели было обнаружено 8 сочетаний генотипов возможного повышенного риска развития АД и 15 сочетанных генотипов возможного пониженного риска (рис. 43). При этом наибольшей прогностической ценностью обладает следующая ассоциация генотипов:

Для зеленого круга – OR 0,069 (0,004 – 1,17;  $p = 0,021$ ).

Для красного круга в левом квадрате – OR 4,98 (1,73 – 14,29;  $p = 0,004$ ).

Для красного круга в центральном квадрате – OR 5,36 (1,25 – 23,07;  $p = 0,045$ ).

Построение модели межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных вариантов генов позволило выявить наиболее значимые пары генов, характеризующиеся выраженным синергизмом:  $320A > C$  гена *MMP20* и  $634G > C$  гена *VEGFA* – суммарный вклад данной пары составил (5,71 %), а также  $837T > C$  гена *MMP20* и  $-8202A > G$  гена *MMP9* (9,7 %) [рис. 43].

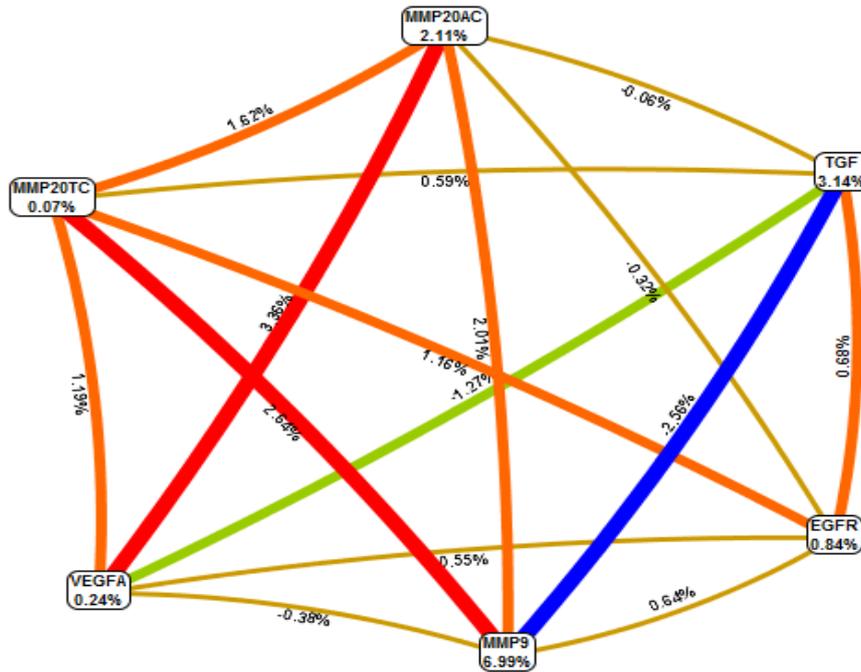


Рисунок 43. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *MMP20*, *VEGFA*, *EGFR*, *TGFβ* при атопическом дерматите у детей.

Примечание. На вершинах шестигранника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным и оранжевым обозначено наличие синергизма, зеленым – отсутствие.

Проведенный анализ установил наличие сопряженности между полиморфизмами  $320A > C$  гена *MMP20* и  $837T > C$  гена *MMP20* (1,62 %),  $837T > C$  гена *MMP20* и  $2073A > T$  гена *EGFR* (1,16 %),  $-8202A > G$  гена *MMP9* и  $320A > C$  гена *MMP20* (2,01 %) и  $2073A > T$ , гена *EGFR* и *Arg25Pro* гена *TGF β<sub>1</sub>* (0,68 %),  $837T > C$  гена *MMP20* и  $-634G > C$  гена *VEGFA* (1,19 %).

Однако, на представленном рисунке видно, что наибольшей информационной значимостью обладает полиморфный вариант  $-8202A > G$  гена *MMP9* – 6,99%. При этом анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов данного полиморфизма, проведенный у пациентов с АД, также показал наличие достоверных отличий по данному SNP в группах больных АД и контрольной группы ( $p < 0,001$ ) и высокий риск развития данного заболевания у носителей *A/A*-генотипа (более чем в 7 раз) [табл. 46].

Построение дендрограммы кластерной структуры взаимодействия данных полиморфизмов также показало наличие сильного синергичного эффекта между исследуемыми полиморфизмами генов металлопротеиназ (рис. 44).

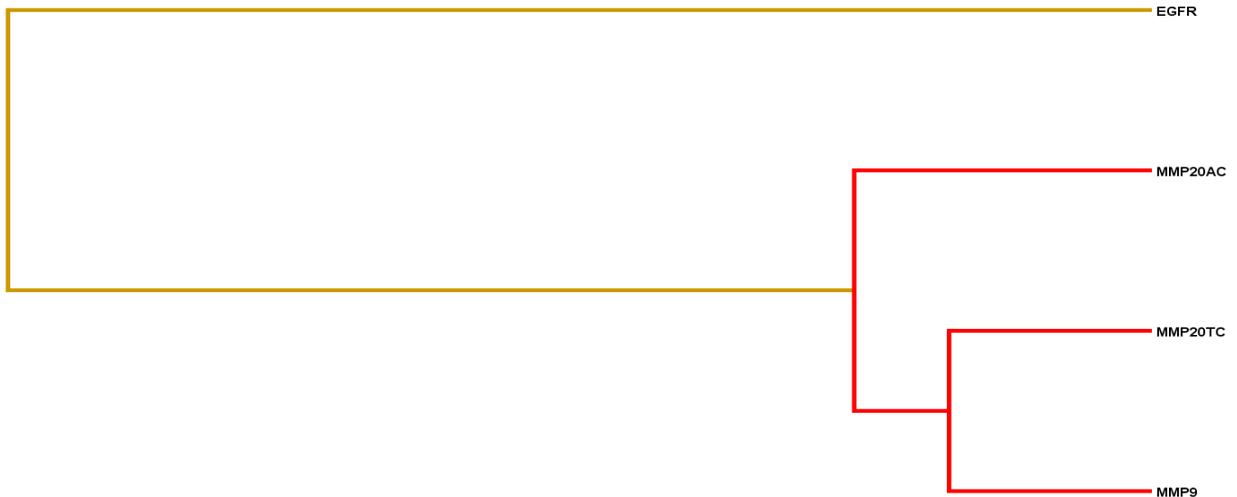


Рисунок 44. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных полиморфизмов генов у пациентов с атопическим дерматитом

Причем наиболее ярко выраженный синергизм был отмечен в отношении полиморфных локусов  $837T > C$  гена *MMP20* и  $8202A > G$  гена *MMP9*, несколько меньшая сила взаимодействия данных генов была установлена с  $320A > C$  полиморфным вариантом гена *MMP20* (как по силе, так и по дистанции между переменными – длина связи меньше).

Таким образом, можно предположить, что наиболее значимым полиморфизмом в патогенезе АД у детей является  $-8202A > G$  гена *MMP9*, а именно у гомозиготных по *A*-аллели лиц риск развития кожных проявлений аллергии повышен более чем в 7 раз. При этом установлено, что взаимодействие данного полиморфизма с полиморфными локусами  $837T > C$  гена *MMP 20* и  $320A > C$  гена *MMP20* оказывает наибольший вклад в суммарный риск развития АД у детей.

### 5.5. Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ у детей с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов факторов роста в выборке пациентов с сочетанием БА и АД выявил статистически значимые отличия по полиморфизмам *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и *2073A > T* гена *EGFR* (табл. 48). Причем важно отметить, что различия по частоте встречаемости генотипов *Arg25Pro*-полиморфизма гена *TGFβ<sub>1</sub>* характерны как для группы пациентов, страдающих БА, так и пациентов с аллергическими заболеваниями в целом. Среди больных с сочетанными проявлениями аллергии также преобладают носители *Arg*-аллели (90,9 %) и гомозиготного *Arg/Arg*-генотипа (84,8 %). Гетерозиготы среди больных составили всего 12,1 %, тогда как в группе контроля их в 3,3 раза больше. А пациентов, имеющих *Pro/Pro*-генотип, среди здоровых детей в 4,7 раз больше, чем среди больных. Результаты проведенных нами исследований показали, что аллельный *Arg/Arg*-вариант гена *TGFβ<sub>1</sub>* является сильным фактором риска развития сочетания БА и АД у детей (*OR* = 6,57 [95 % *CI* – 3.02 – 14.33, *p* < 0,001]).

Таблица 48

Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста среди больных с сочетанием БА и АД

| Генотип,<br>аллель          | Больные | Группа<br>контроля | $\chi^2$ | P    | OR    |             |
|-----------------------------|---------|--------------------|----------|------|-------|-------------|
|                             | n = 66  | n = 122            |          |      | Знач. | 95 % CI     |
| -634G > C гена <i>VEGFA</i> |         |                    |          |      |       |             |
| Аллель C                    | 0.227   | 0.230              | 0.00     | 0.96 | 0.99  | 0.60 – 1.64 |
| Аллель G                    | 0.773   | 0.770              |          |      | 1.01  | 0.61 – 1.68 |
| Генотип C/C                 | 0.030   | 0.082              | 3.22     | 0.2  | 0.35  | 0.07 – 1.65 |
| Генотип C/G                 | 0.394   | 0.295              |          |      | 1.55  | 0.83 – 2.91 |
| Генотип G/G                 | 0.576   | 0.623              |          |      | 0.82  | 0.45 – 1.51 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )     | 0.98    | 3.35               |          |      |       |             |

| <i>Arg25Pro</i> гена <i>TGFβ<sub>1</sub></i> |       |       |              |                   |      |                 |
|--|-------|-------|--------------|-------------------|------|-----------------|
| Аллель <i>Arg</i>                            | 0.909 | 0.660 | <b>26.98</b> | <b>p&lt;0,001</b> | 5.15 | 2.66 – 9.98     |
| Аллель <i>Pro</i>                            | 0.091 | 0.340 |              |                   | 0.19 | 0.10 – 0.38     |
| Генотип <i>Arg/Arg</i>                       | 0.848 | 0.460 | <b>25.42</b> | <b>p&lt;0,01</b>  | 6.57 | 3.02 –<br>14.33 |
| Генотип <i>Arg/Pro</i>                       | 0.121 | 0.400 |              |                   | 0.21 | 0.09 – 0.48     |
| Генотип <i>Pro/Pro</i>                       | 0.030 | 0.140 |              |                   | 0.19 | 0.04 – 0.87     |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )                      | 4.69  | 1.18  |              |                   |      |                 |
| <i>2073A &gt; T</i> гена <i>EGFR</i>         |       |       |              |                   |      |                 |
| Аллель <i>A</i>                              | 0.318 | 0.442 | <b>5.42</b>  | <b>0.02</b>       | 0.59 | 0.38 – 0.92     |
| Аллель <i>T</i>                              | 0.682 | 0.558 |              |                   | 1.70 | 1.08 – 2.65     |
| Генотип <i>A/A</i>                           | 0.091 | 0.150 | <b>6.98</b>  | <b>0.03</b>       | 0.57 | 0.21 – 1.51     |
| Генотип <i>A/T</i>                           | 0.455 | 0.583 |              |                   | 0.60 | 0.32 – 1.09     |
| Генотип <i>T/T</i>                           | 0.455 | 0.267 |              |                   | 2.29 | 1.22 – 4.31     |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )                      | 0.15  | 4.01  |              |                   |      |                 |

Примечание: *PXB* - равновесие Харди-Вайнберга, OR – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Полученные нами результаты исследований согласуются с данными зарубежных авторов [144, 258], которые считают, что ген *TGF-β1* относится к генам, регулирующим врожденный иммунный ответ и иммунорегуляцию при развитии аллергических заболеваний, а также имеет значение при росте и дифференцировке не только эпителиоцитов, но и клеток дыхательных путей во время развития воспалительного процесса, тем самым участвуя в патогенезе заболевания. Доказательством этому является повышение уровня *TGF-β1* в сыворотке крови больных-носителей *Arg/Arg*-генотипа ( $147,72 \pm 254,70$  (2,70 [2,31; 189,00] пг/мл).

Если говорить о *634C > G* полиморфизме гена *VEGFA*, то стоит отметить, что частота как аллелей, так и генотипов в группе пациентов с сочетанием БА и АД не имеет статистически значимых отличий от пациентов контрольной группы ( $p > 0,05$ ).

Преобладающим генотипом среди пациентов с атопией является *G/G*-генотип (57,6 %). Хотя среди больных детей несколько чаще встречаются носители гетерозиготного генотипа (39,4 %), по сравнению с группой контроля (29,5 %), в то время как гомозигот по *G*-аллели, наоборот, в 1,08 раз больше среди детей контрольной группы.

Исследование концентрации VEGFA в сыворотке крови больных показало, что достоверных отличий по концентрации данного цитокина у детей-носителей различных генотипов зарегистрировано не было ( $p = 0,507$ ), однако, максимальные значения данного фактора роста отмечаются у пациентов с гетерозиготным состоянием полиморфизма данного гена ( $151,86 \pm 58,88$  пг/мл), тогда как у гомозигот по *C*-аллели ( $116,28 \pm 0,01$  пг/мл) и *G*-аллели ( $114,48 \pm 94,49$  пг/мл) эта величина несколько меньше (табл. 49).

Таблица 49

Распределение концентрации VEGFA в сыворотке крови больных с сочетанием БА и АД в зависимости от генотипа

| № | Генотип     | Концентрация VEGF A, пг/мл<br>Me [Q25; Q75]                                   |
|---|-------------|---|
| 1 | Генотип C/C | 116,28 [0,00; 116,28]   |
| 2 | Генотип C/G | 133,40 [111,18; 190,00]   |
| 3 | Генотип G/G | 124,00 [27,04; 144,62]  |
|   | P           | $p_{123} = 0,507$<br>$p_{12} = 0,523$<br>$p_{13} = 0,974$<br>$p_{23} = 0,529$ |

Примечание:

$p_{123}$  значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

$p_{12}$  значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами C/C и C/G;

$p_{13}$  значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами C/C и G/G;

$p_{23}$  значимость различий концентрации VEGF A у больных с генотипами G/G и C/G.

При попарном сравнении  $p$  рассчитывали по критерию Манна-Уитни.

В ходе данного исследования было установлено, что T-аллель 2073A > T полиморфизма гена *EGFR* также ассоциирован с риском развития сочетания БА и АД у детей ( $p = 0,02$ ). При этом частота его встречаемости в группе больных в 1,22 раза больше, чем в контроле. А при рассмотрении генотипов установлено, что среди больных, страдающих бронхиальной астмой и атопическим дерматитом одновременно, преобладают носители T/T- (45,5 %) и A/T-генотипов (45,5 %), в то время как в контрольной группе чаще встречаются гетерозиготные варианты данного полиморфизма (58,3 %). Важно отметить, что именно у носителей T/T-генотипа риск развития сочетания БА и АД повышен в 2,29 раз (95 % CI – 3.02 – 14.33,  $p < 0,001$ ).

Распределение частот полиморфных вариантов генов металлопротеиназ у пациентов данной группы несколько отличается от больных с монопатологией (табл. 50).

Таблица 50

Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов металлопротеиназ среди больных с сочетанием БА и АД

| Генотип/<br>Аллель                   | Больные | Группа<br>контроля | $\chi^2$ | P    | OR    |             |
|--------------------------------------|---------|--------------------|----------|------|-------|-------------|
|                                      | n = 66  | n = 122            |          |      | Знач. | 95 % CI     |
| <i>320A &gt; C</i> гена <i>MMP20</i> |         |                    |          |      |       |             |
| Аллель A                             | 0.379   | 0.418              | 0.55     | 0.46 | 0.85  | 0.55 – 1.31 |
| Аллель C                             | 0.621   | 0.582              |          |      | 1.18  | 0.76 – 1.82 |
| Генотип A/A                          | 0.182   | 0.164              | 2.37     | 0.31 | 1.13  | 0.52 – 2.49 |
| Генотип A/C                          | 0.394   | 0.508              |          |      | 0.63  | 0.34 – 1.16 |
| Генотип C/C                          | 0.424   | 0.328              |          |      | 1.51  | 0.81 – 2.80 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )              | 1.17    | 0.24               |          |      |       |             |

| <i>837T &gt; C</i> гена <i>MMP20</i>  |       |       |             |             |      |             |
|---------------------------------------|-------|-------|-------------|-------------|------|-------------|
| Аллель <i>T</i>                       | 0.621 | 0.525 | 3.24        | 0.07        | 1.49 | 0.96 – 2.29 |
| Аллель <i>C</i>                       | 0.379 | 0.475 |             |             | 0.67 | 0.44 – 1.04 |
| Генотип <i>T/T</i>                    | 0.303 | 0.246 | <b>6.31</b> | <b>0.04</b> | 1.33 | 0.68 – 2.60 |
| Генотип <i>T/C</i>                    | 0.636 | 0.557 |             |             | 1.39 | 0.75 – 2.57 |
| Генотип <i>C/C</i>                    | 0.061 | 0.197 |             |             | 0.26 | 0.09 – 0.80 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 8.19  | 1.68  |             |             |      |             |
| <i>-8202A &gt; G</i> гена <i>MMP9</i> |       |       |             |             |      |             |
| Аллель <i>A</i>                       | 0.515 | 0.508 | 0.02        | 0.9         | 1.03 | 0.67 – 1.57 |
| Аллель <i>G</i>                       | 0.485 | 0.492 |             |             | 0.97 | 0.64 – 1.49 |
| Генотип <i>A/A</i>                    | 0.303 | 0.230 | 3.04        | 0.22        | 1.46 | 0.74 – 2.86 |
| Генотип <i>A/G</i>                    | 0.424 | 0.557 |             |             | 0.59 | 0.32 – 1.07 |
| Генотип <i>G/G</i>                    | 0.273 | 0.213 |             |             | 1.38 | 0.69 – 2.77 |
| <i>PXB</i> ( $\chi^2$ )               | 1.50  | 1.61  |             |             |      |             |

Примечание: *PXB* - равновесие Харди-Вайнберга, OR – отношение шансов, 95 % CI – доверительный интервал

Так, в ходе проведенных нами исследований установлено, что достоверно значимые отличия по частоте встречаемости аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов генов металлопротеиназ отмечаются только в отношении *837T > C* полиморфного варианта гена *MMP20*. Однако, выборка пациентов, входящих в группу больных, у которых проводилось изучение данного полиморфизма, не соответствует равновесию Харди-Вайнберга, следовательно, необходимо проведение дальнейшего генетического исследования.

Достоверно значимых отличий по частоте встречаемости генотипов и аллелей полиморфного варианта *-8202A > G* гена *MMP9* установлено не было, однако анализ содержания *MMP9* в сыворотке крови носителей

различных состояний данного полиморфизма показал, что максимальные концентрации данной протеазы отмечаются у гетерозигот (табл. 51).

Таблица 51

Концентрация MMP9 в сыворотке крови у больных с сочетанием БА и АД, имеющих разные генотипы по полиморфизму -8202A > G гена MMP9

| № | Генотип     | Концентрация MMP9, нг/мл,<br>Me [Q25; Q75]  |
|---|-------------|---|
| 1 | Генотип A/A | 598,46 [424,94; 776,06]   |
| 2 | Генотип A/G | 687,26 [472,08; 962,36]   |
| 3 | Генотип G/G | 308,94 [234,24; 470,84]   |
|   | P           | <p><b>p<sub>123</sub> = 0,005</b></p> <p>p<sub>1,2</sub> = 0,154</p> <p>p<sub>1,3</sub> = 0,053</p> <p><b>p<sub>2,3</sub> = 0,002</b></p> |

Примечание:

p<sub>123</sub> значимость различий между пациентами всех трех групп (по критерию Краскелла-Уоллиса);

p<sub>12</sub> значимость различий концентрации MMP9 у больных с генотипами A/A и A/G;

p<sub>13</sub> значимость различий концентрации MMP9 у больных с генотипами A/A и G/G;

p<sub>23</sub> значимость различий концентрации MMP9 у больных с генотипами G/G и A/G.

При попарном сравнении p рассчитывали по критерию Манна-Уитни, жирным шрифтом выделены p < 0,05.

Однако, стоит отметить, что у больных, гомозиготных по A-8202 аллели показатели MMP9 достоверно отличаются от гомозигот по -8202G-аллели (p = 0,002).

Проведенный анализ показал, что наиболее часто среднетяжелое течение бронхиальной астмы в данной группе больных отмечается у носителей A/G генотипа (p = 0,01) [табл. 52].

Таблица 52

Частота встречаемости генотипов исследуемых полиморфизмов генов у больных с различным вариантом течения БА у детей с сочетанием БА+АД

| Течение БА                        | Генотип <i>A/A</i> |      | Генотип <i>A/G</i> |      | Генотип <i>G/G</i> |      | $P_{123}$    |
|-----------------------------------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------|
|                                   | (n = 20)           |      | (n = 28)           |      | (n = 18)           |      |              |
|                                   | Абс.               | %    | Абс.               | %    | Абс.               | %    |              |
|                                   | 1                  | 1'   | 2                  | 2'   | 3                  | 3'   |              |
| Легкое течение БА (n = 42)        | 16                 | 38,1 | 14                 | 33,3 | 12                 | 28,6 | 0,65         |
| Среднетяжелое течение БА (n = 16) | 2                  | 12,5 | 12                 | 75,0 | 2                  | 12,5 | <b>0,001</b> |
| Тяжелое течением БА (n = 8)       | 2                  | 25,0 | 2                  | 25,0 | 4                  | 50,0 | 0,47         |

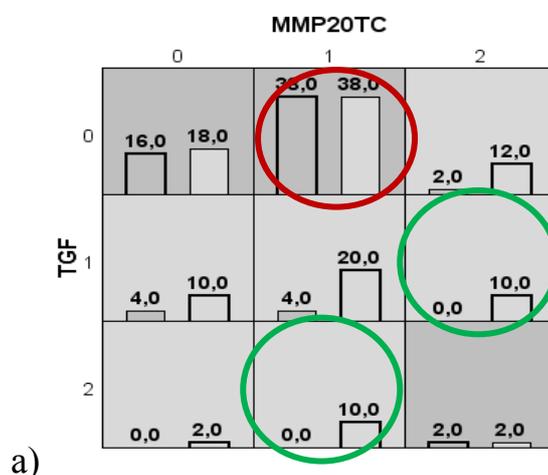
На следующем этапе исследования нами проведен анализ межгенных взаимодействий генов, с помощью которого были установлены наиболее значимые мультилокусные модели (табл. 53). Все представленные n-локусные модели имели наименьшую ошибку предсказания (наибольшую точность) и наивысшую воспроизводимость.

Таблица 53

Значимые модели взаимодействия изучаемых генов у детей с сочетанием БА и АД

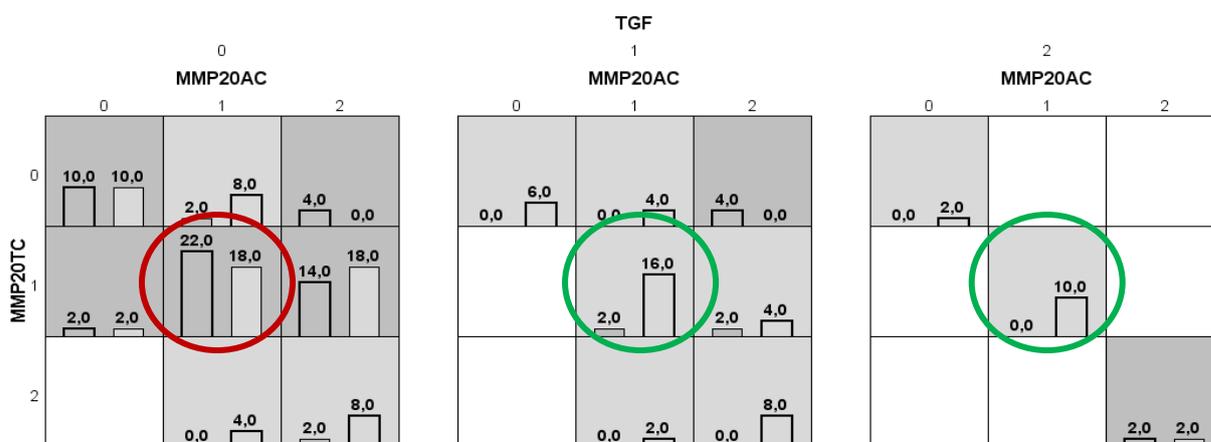
| Комбинации генов в модели        | <i>MMP20 (837T&gt;C)</i><br><i>TGFβ<sub>1</sub> (Arg25Pro)</i> | <i>MMP20 (320A&gt;C)</i><br><i>MMP20 (837T&gt;C)</i><br><i>TGFβ<sub>1</sub> (Arg25Pro)</i> |
|----------------------------------|--|--|
| Тестируемое взаимодействие генов | 0,68   | 0,61   |
| Воспроизводимость модели         | 10/10  | 6/10   |
| $\chi^2$ (p)                     | 24,98<br>(p < 0,0001)  | 38,53<br>(p < 0,0001)  |
| <i>OR</i><br>(95 % CI)           | 6,179<br>(2,887 -13,225)                                       | 10,44<br>(4,586 -23,765)   |

Для определения наиболее значимых сочетаний генотипов повышенного и пониженного рисков развития аллергических заболеваний нами проведено попарное сравнение частот встречаемости взаимодействующих генов в каждой модели (рис. 45).



Для зеленого круга – OR 0,08 (0,005 – 1,39;  $p = 0,04$ )

Для красного круга – OR 3 (1,62 – 5,58;  $p = 0,0008$ )



Для зеленого круга в третьем квадрате – OR 0,08 (0,005 – 1,39;  $p = 0,04$ )

Для зеленого круга в центральном квадрате – OR 0,21 (0,046 – 0,93;  $p = 0,047$ )

Для красного круга – OR 2,89 (1,41 – 5,91;  $p = 0,0054$ )

Рисунок 45. Модели межгенных взаимодействий генов-кандидатов предрасположенности к развитию сочетаний БА и АД (MDR): а – двухлокусная; б - трехлокусная модели

Примечание: темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – дети с крапивницей, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1- гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2; а – пример генотипов повышенного риска, б – пример генотипа пониженного риска.

Также с помощью программы MDR нами была сконструирована модель межгенных взаимодействий, демонстрирующая выраженность связей между исследуемыми полиморфизмами генов (рис. 46).

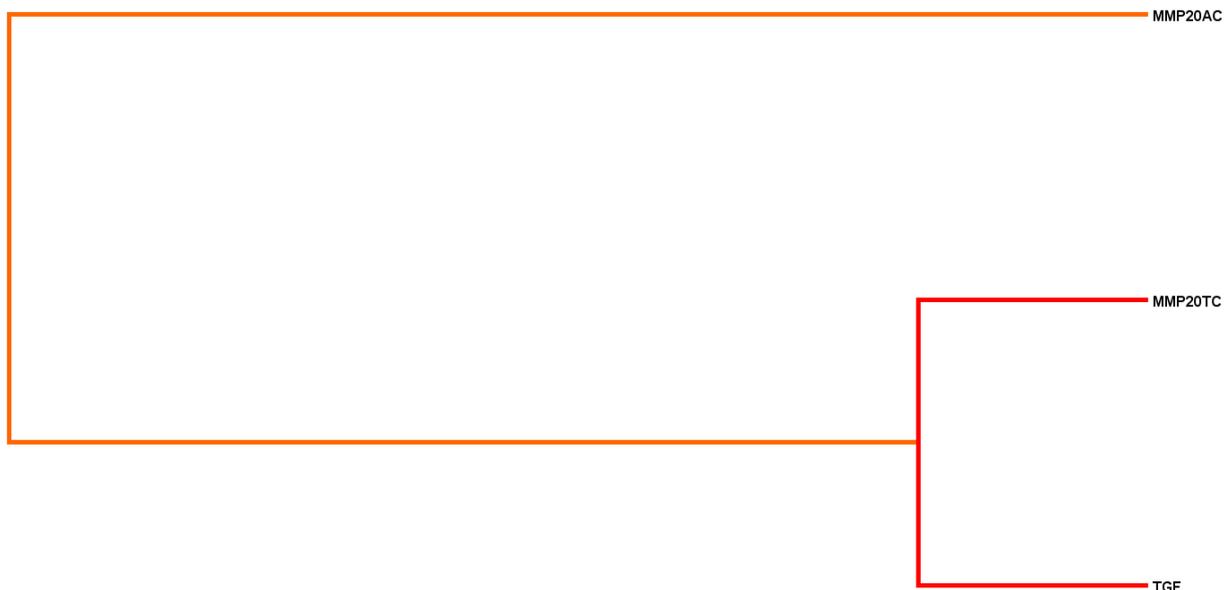


Рисунок 46. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных полиморфизмов генов у детей с сочетанием БА и АД

Примечание: длинные линии указывают на слабое взаимодействие генных локусов, короткие – на сильную взаимосвязь

На представленной дендрограмме видно, что наиболее сильное взаимодействие отмечается между полиморфными локусами  $837T > C$  гена *MMP20* и *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>*. Немного более слабая связь отмечается в отношении данных полиморфизмов и  $320A > C$  гена *MMP20*. Стоит отметить, что столь сильная связь между изучаемыми полиморфизмами характерна также и для пациентов, страдающих только бронхиальной астмой.

Проведенный анализ взаимодействия указанных полиморфных вариантов генов позволил выявить наличие связи между изучаемыми генами, оказалось, что наиболее выраженный синергизм был зарегистрирован в парах  $-8202A > G$  гена *MMP9* и  $320A > C$  гена *MMP20* (2,31 %), а также между  $-8202A > G$  гена *MMP9* и  $2073A > T$  гена *EGFR* (1,59 %), причем совместный

вклад в формирование сочетаний БА и АД в первой паре составил 4,39%, а во второй - 5,65%. Поэтому наличие данных сочетаний полиморфизмов у ребенка значительно повышает риск развития заболевания [рис. 47].

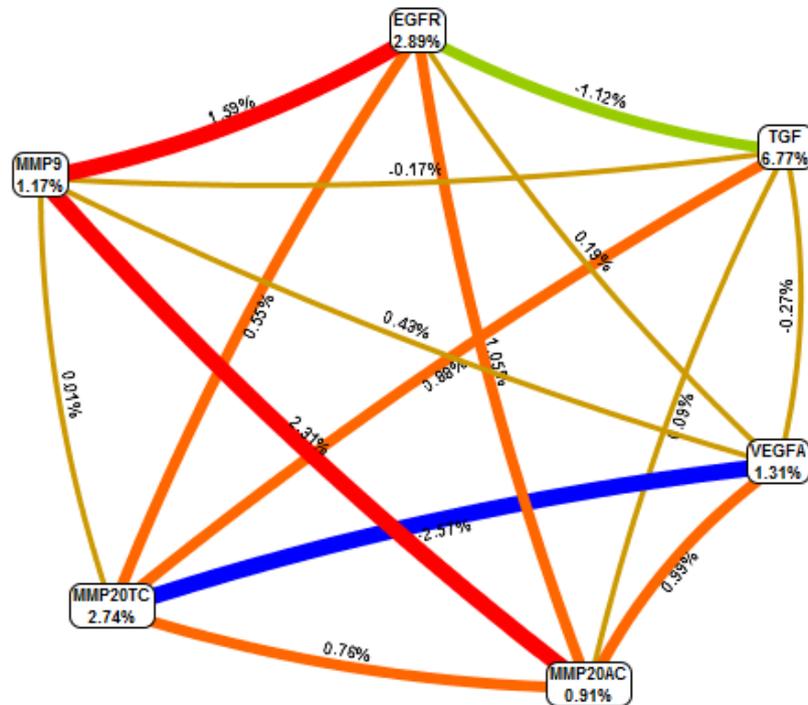


Рисунок 47. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *MMP20*, *VEGFA*, *EGFR*, *TGFβ* при сочетании бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей.

Примечание. На вершинах шестигранника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным и оранжевым обозначено наличие синергизма, зеленым – отсутствие, синим – дублирование эффектов между локусами; коричневый - указывает на независимость эффектов отдельных локусов.

Анализ уровня энтропии показал, что наиболее весомыми факторами риска развития сочетанных форм данной патологии у детей являются полиморфизмы *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* (6,77 %), *2073A > T* гена *EGFR* (2,89 %) и *837T > C* гена *MMP20* (2,74 %). При этом между полиморфизмами - *8202A > G* гена *MMP9* и *2073A > T* гена *EGFR* также выявлен значительный синергизм, усиливающий эффект функционирования кодируемых белков на 1,59 %.

Тщательный анализ полученных результатов генетического исследования установил наличие содружественных связей между полиморфизмами  $837T > C$  гена *MMP20* и  $2073A > T$  гена *EGFR* (0,55 %),  $837T > C$  гена *MMP20* и *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* (0,88 %),  $-634G > C$  гена *VEGFA* и  $320A > C$  гена *MMP20* (0,99 %),  $837T > C$  гена *MMP20* и  $320A > C$  гена *MMP20* (0,76 %),  $320A > C$  гена *MMP20* и  $2073A > T$  гена *EGFR* (1,05 %). При этом интересно отметить, что локусы  $-634G > C$  гена *VEGFA* и *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* дублируют эффекты друг друга.

Исходя из полученных данных видно, что наиболее значимыми в развитии сочетания БА и АД у детей является полиморфизмы *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и  $2073A > T$  гена *EGFR*. При этом установлено, что наиболее высокий риск развития этих заболеваний имеют носители гомозиготных *Arg/Arg*- и *TT*-генотипов изучаемых генов. Однако, следует отметить, что взаимодействие полиморфных локусов *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* (6,77 %),  $2073A > T$  гена *EGFR* (2,89 %) и  $837T > C$  гена *MMP20* у одного пациента значительно повышает риск развития сочетания БА и АД.

#### **5.6. Модели межгенного взаимодействия полиморфизмов генов *VEGFA*, *TGFβ<sub>1</sub>*, *MMP9*, рассчитанные с помощью программы MDR у больных, страдающих бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и сочетанием данных патологий**

Результаты проведенных нами исследований показали, что значимую роль в патогенезе аллергических заболеваний играют такие факторы роста, как *VEGFA* и *TGFβ<sub>1</sub>*, а также *MMP9*, поэтому для изучения генетических особенностей наследования полиморфных вариантов данных цитокинов у детей нами проведен анализ межгенного взаимодействия  $-634G > C$  гена *VEGFA*, *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и  $-8202A > G$  гена *MMP9*.

В группе больных, страдающих БА, анализ результатов генетического исследования позволил выявить две статистически значимые модели (табл. 54).

Таблица 54

Значимые модели взаимодействия изучаемых генов у детей с  
бронхиальной астмой

|                                  |   |   |
|----------------------------------|---|---|
| Комбинации генов в модели        | <i>TGF <math>\beta_1</math> (Arg25Pro),<br/>VEGFA (634G&gt;C)</i> | <i>TGF <math>\beta_1</math> (Arg25Pro),<br/>VEGFA (634G &gt; C),<br/>MMP9 (-8202A &gt; G)</i> |
| Тестируемое взаимодействие генов | 0,65  | 0,66  |
| Воспроизводимость модели         | 10/10   | 10/10   |
| $\chi^2$ (p)                     | 27,82<br>(p < 0,0001)   | 34,27<br>(p < 0,0001)   |
| OR<br>(95 % CI)                  | 6,473<br>(3,126-13,404)   | 7,98<br>(3,826 - 16,646)  |

Из представленной таблицы видно, что все полученные в ходе расчетов модели обладают высокой воспроизводимостью, следовательно, они являются значимыми моделями межгенного взаимодействия.

Принимая во внимание тот факт, что наибольший показатель тестируемого взаимодействия генов был зарегистрирован в трехлокусной модели «*TGF  $\beta_1$  (Arg25Pro) / VEGFA (634G > C) / MMP9 (-8202A > G)*», нами проведен тщательный анализ распределения генотипов в данной модели (рис. 48).

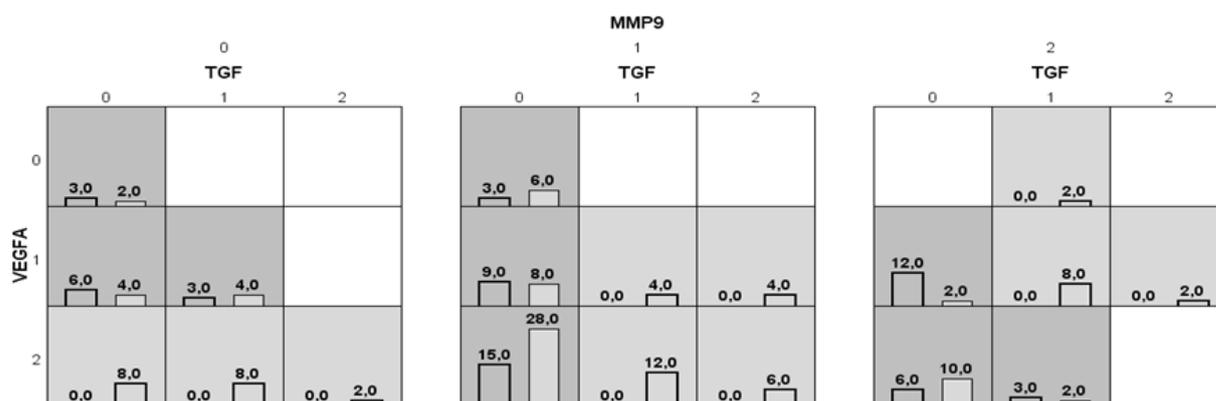


Рисунок 48. Трехлокусное распределение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *TGF β<sub>1</sub>*, *VEGFA*, *MMP9* в группе больных БА и в группе контроля

Примечание: темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – дети с атопическим дерматитом, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1-гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2

Анализ сочетаний генотипов в представленной модели позволил выявить 9 значимых взаимодействий, предрасполагающих к высокому риску развития БА, и 10 сочетанных генотипов возможного пониженного риска (рис. 48).

Дальнейшее изучение взаимосвязи между полиморфными вариантами -  $8202A > G$  гена *MMP9* и  $634G > C$  гена *VEGFA* позволило выявить выраженный синергизм между данными полиморфизмами (рис. 49).

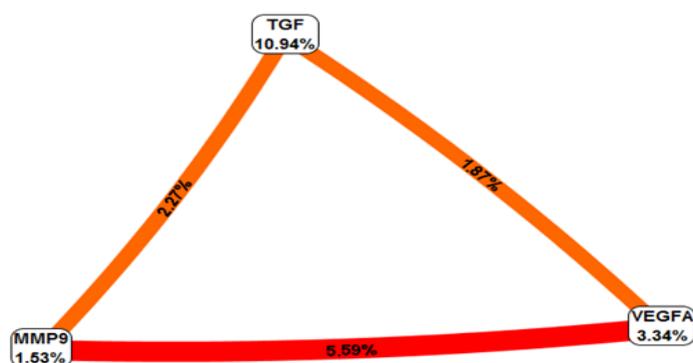


Рисунок 49. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *VEGFA* и *TGFβ* при бронхиальной астме у детей.

Примечание. На вершинах треугольника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным и оранжевым обозначено наличие синергизма

Как видно на представленном рисунке, максимальный вклад в развитие БА вносит полиморфизм *Arg25Pro* гена *TGF  $\beta_1$*  (10,94 %). Этот факт подтверждается данными, полученными в результате анализа частот аллелей и генотипов индивидуальных SNP у больных данной группы. Однако, несмотря на низкую информационную ценность генов *MMP9* (1,53 %) и *VEGFA* (3,34 %), их синергический эффект приводит к усилению взаимодействия и совместный вклад этих генов равен 5,59 %.

Построение дендрограммы кластерной структуры взаимодействия данных полиморфизмов также показало наличие связи между ними (рис. 50). Причем наиболее ярко выраженный синергизм был отмечен в отношении полиморфных локусов *-8202A > G* гена *MMP9* и *634G > C* гена *VEGFA*.

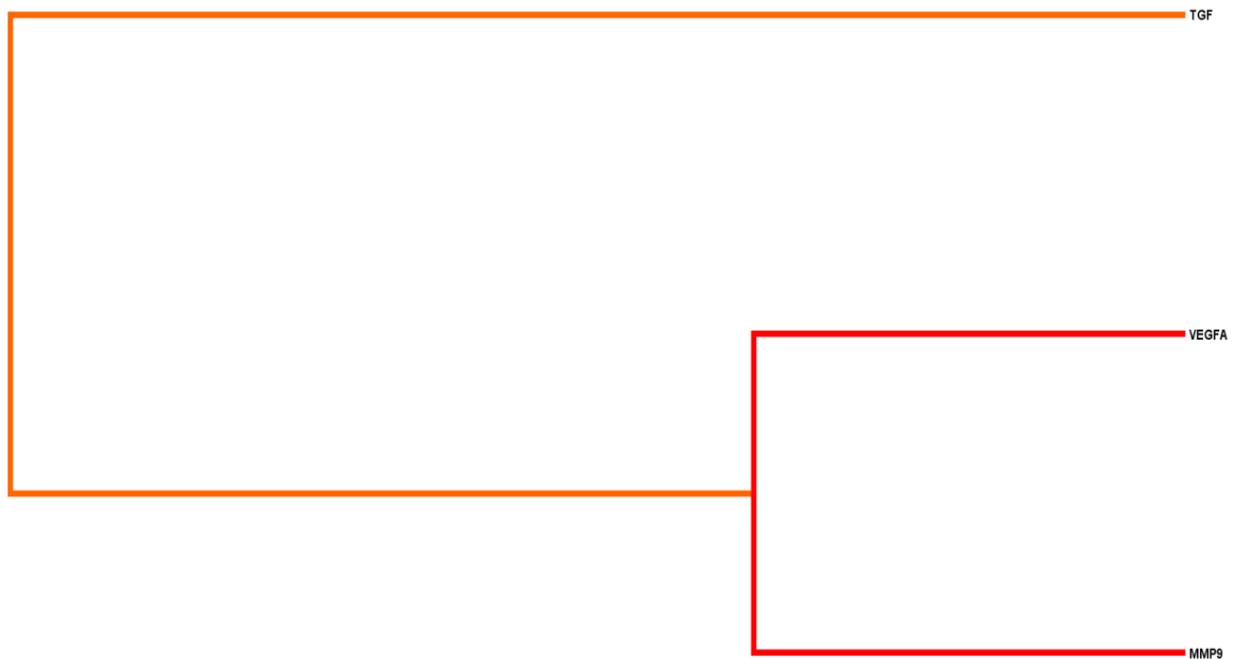


Рисунок 50. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных полиморфизмов генов у пациентов с бронхиальной астмой  
Примечание: длинные линии указывают на слабое взаимодействие генных локусов, короткие – на сильную взаимосвязь

Таким образом, можно предположить, что наиболее значимым полиморфизмом в патогенезе БА у детей является *Arg25Pro* гена *TGF  $\beta_1$* , а именно у носителей *ArgArg*-генотипа риск развития данного заболевания

повышен более чем в 10 раз. При этом его взаимодействие с полиморфными локусами  $-8202A>G$  гена *MMP9* и  $634G>C$  гена *VEGFA* оказывает наибольшее влияние на развитие заболевания у детей.

Анализ межгенного взаимодействия полиморфных локусов  $-634G > C$  гена *VEGFA*, *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и  $-8202A > G$  гена *MMP9*, проведенный у детей, страдающих АД, позволил также выявить две статистически значимые модели (табл. 55).

Таблица 55

Значимые модели взаимодействия изучаемых генов у детей с атопическим дерматитом

|                                  |  |  |
|----------------------------------|--|--|
| Комбинации генов в модели        | <i>TGF β<sub>1</sub> (Arg25Pro),<br/>MMP9 (-8202A &gt;G)</i> | <i>TGF β<sub>1</sub> (Arg25Pro),<br/>VEGFA (634G &gt;C),<br/>MMP9 (-8202A &gt;G)</i> |
| Тестируемое взаимодействие генов | 0,68   | 0,59   |
| Воспроизводимость модели         | 10/10  | 10/10  |
| χ <sup>2</sup> (p)               | 17,064<br>(p < 0,0001)                                       | 5,908<br>(2,399- 14,547)   |
| OR<br>(95 % CI)                  | 19,49<br>(p < 0,0001)  | 6,9<br>(2,725-17,474)  |

Из представленной таблицы видно, что все полученные в ходе расчетов модели обладают высокой воспроизводимостью, следовательно, они являются значимыми моделями межгенного взаимодействия. Анализ

распределения генотипов в данных моделях позволил выявить 7 сочетаний генотипов возможного повышенного риска развития АД (рис. 51).

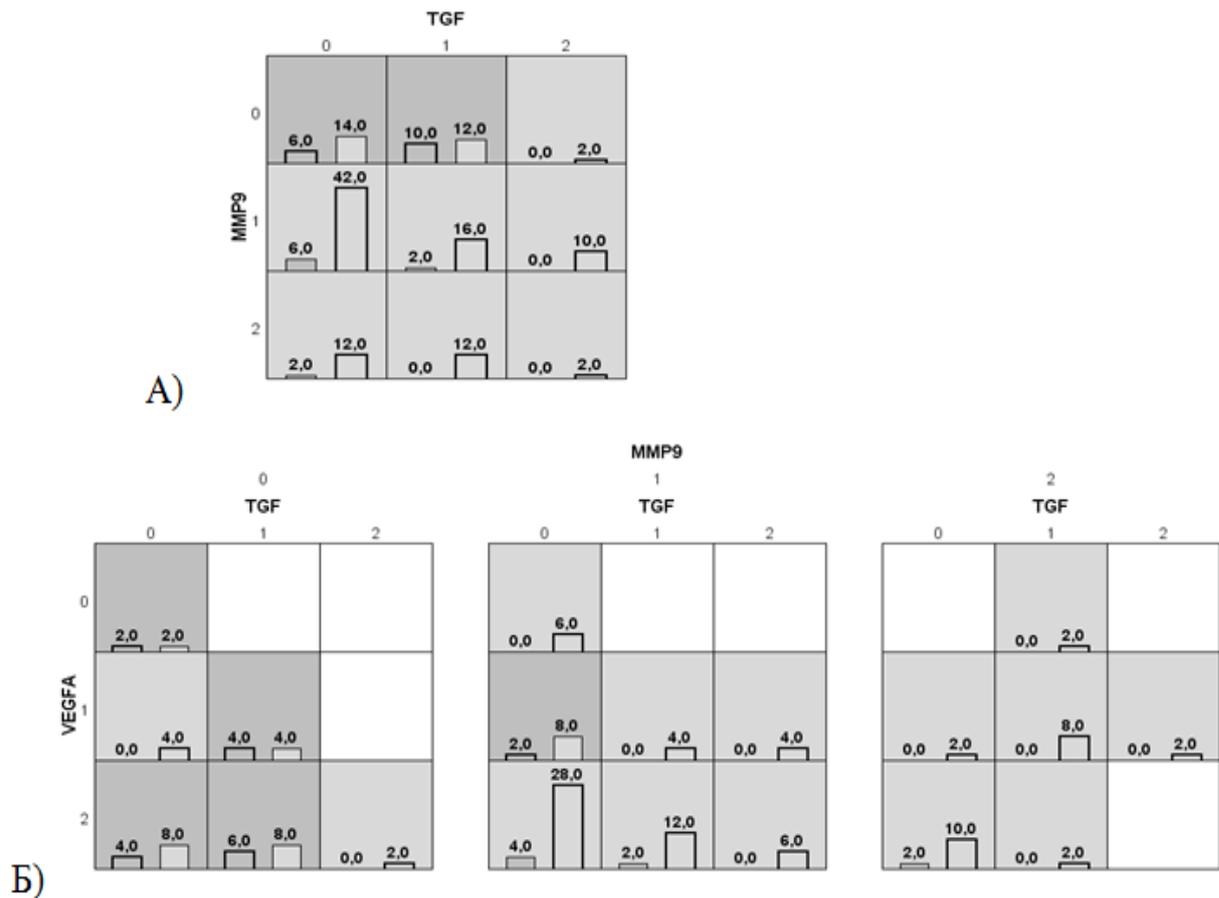


Рисунок 51 - Распределение генотипов в двухлокусной (А) и трехлокусной (Б) моделях межгенного взаимодействия генов *TGF β<sub>1</sub>*, *VEGFA*, *MMP9* в группе больных АД и в группе контроля.

Примечание: темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – дети с атопическим дерматитом, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1- гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2

Дальнейший анализ вклада каждого полиморфизма позволил установить, что максимальное влияние на патогенез АД оказывает полиморфный вариант  $-8202A>G$  гена *MMP9*, его вклад в развитие заболевания составил 6,99% (рис. 52).

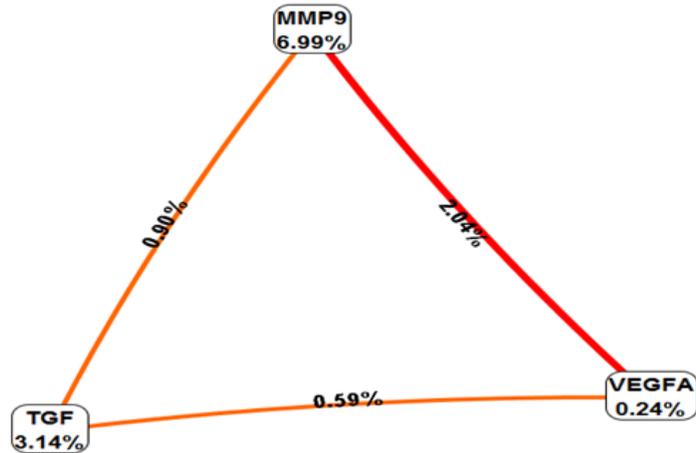


Рисунок 52. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *VEGFA* и *TGFβ* при АД у детей.

Примечание. На вершинах треугольника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным и оранжевым обозначено наличие синергизма

Однако, при этом установлен выраженный синергизм между полиморфизмом генов *MMP9* (6,99 %) и *VEGFA* (0,24 %), их синергетический эффект составляет 2,04 %.

Построение дендрограммы кластерной структуры взаимодействия данных полиморфизмов подтверждает приведенные выше данные (рис. 53).

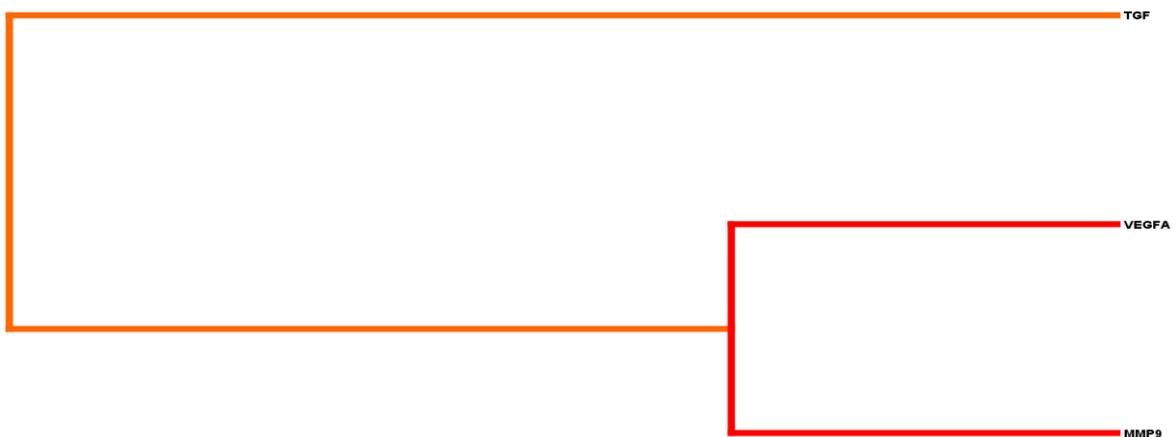


Рисунок 53. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных полиморфизмов генов у пациентов с атопическим дерматитом

Примечание: длинные линии указывают на слабое взаимодействие генных локусов, короткие – на сильную взаимосвязь

Полученные нами данные позволяют предположить, что наибольший вклад в патогенезе АД вносит полиморфизм  $-8202A > G$  гена *MMP9*, при этом данный полиморфный локус обладает синергичным эффектом с  $634G > C$  гена *VEGFA*. А его взаимодействие с полиморфизмом *Arg25Pro* гена *TGF  $\beta_1$*  значительно повышает риск развития заболевания (11,03 %).

Результаты анализов, полученных у пациентов, страдающих и БА и АД, также позволили построить две статистически значимые модели (табл. 56).

Таблица 56

Значимые модели взаимодействия изучаемых генов у детей с сочетанием БА и АД

| Комбинации генов в модели        | <i>TGF <math>\beta_1</math></i> ( <i>Arg25Pro</i> ),<br><i>VEGFA</i> ( $634G > C$ ) | <i>TGF <math>\beta_1</math></i> ( <i>Arg25Pro</i> ),<br><i>VEGFA</i> ( $634G > C$ ),<br><i>MMP9</i> ( $-8202A > G$ ) |
|----------------------------------|---|--|
| Тестируемое взаимодействие генов | 0,65  | 0,63   |
| Воспроизводимость модели         | 9/10  | 10/10  |
| $\chi^2$ (p)                     | 19,11<br>(p < 0,0001)   | 28,13<br>(p < 0,0001)  |
| OR<br>(95 % CI)                  | 4,65<br>(2,265-9,546)   | 5,494<br>(2,859-10,561)  |

Полученные в ходе расчетов модели обладают высокой воспроизводимостью, следовательно, они являются значимыми моделями межгенного взаимодействия.

Далее нами проведен анализ распределения генотипов в исследуемых моделях (рис. 54).

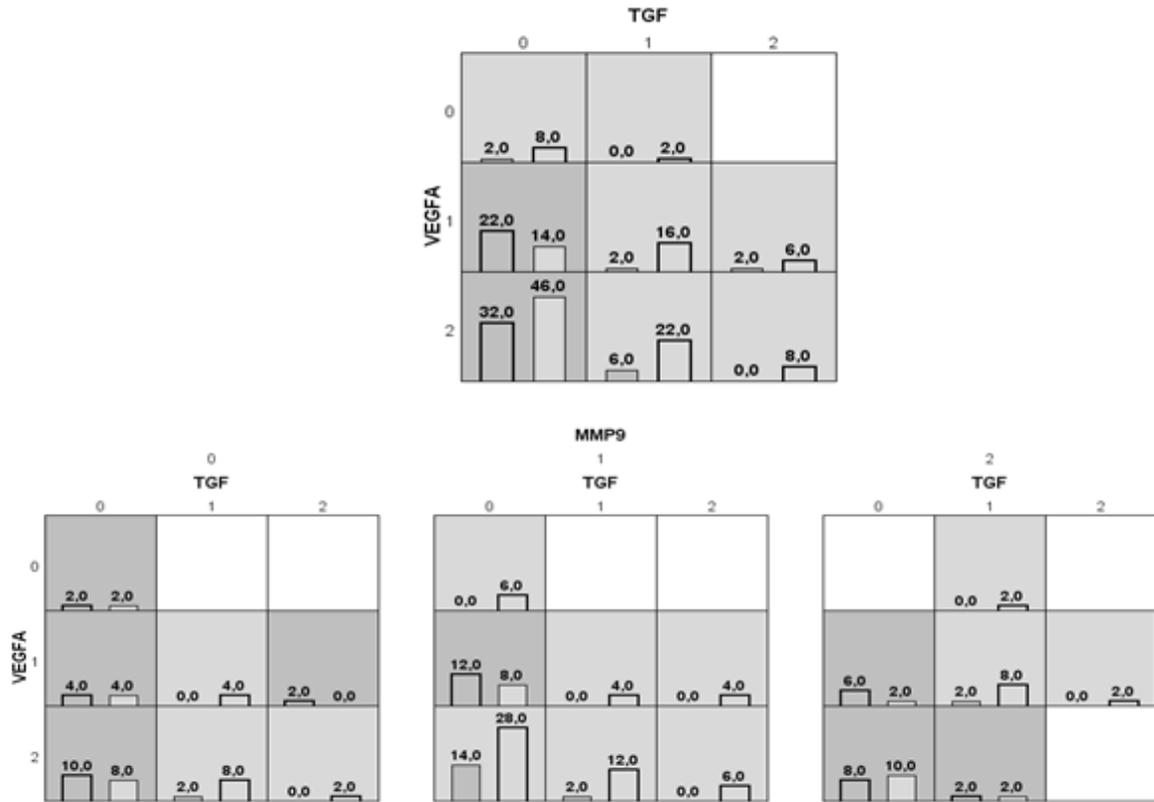


Рисунок 54. Двухлокусное и трехлокусное распределение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *TGFβ1*, *VEGFA*, *MMP9* в группе больных с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита и в группе контроля

Примечание: темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – дети с атопическим дерматитом, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1 – гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2

Как видно на представленном рисунке в ходе анализа было обнаружено 10 сочетаний генотипов возможного повышенного риска развития сочетания БА и АД (рис. 54).

При этом установлено, что между всеми исследуемыми полиморфными вариантами генов отмечается выраженный синергизм (рис. 55).

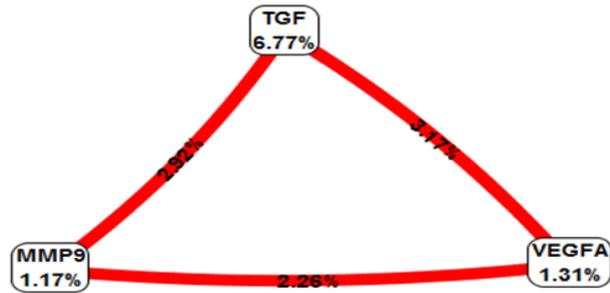


Рисунок 55. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *VEGFA* и *TGFβ* при бронхиальной астме у детей.

Примечание. На вершинах треугольника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным обозначено наличие синергизма

Как и среди пациентов, страдающих только БА, в данной когорте больных максимальный вклад в развитие заболеваний вносит полиморфизм *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* (6,77 %). Однако, при этом сила взаимодействия его с другими исследуемыми полиморфными локусами суммарно повышает риск развития сочетания БА и АД на 17,6 %.

Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия данных полиморфизмов также отражает наличие выраженного синергизма среди всех исследуемых локусов генов (рис. 56). Причем сила связи имеет примерно равные значения среди всех генов.

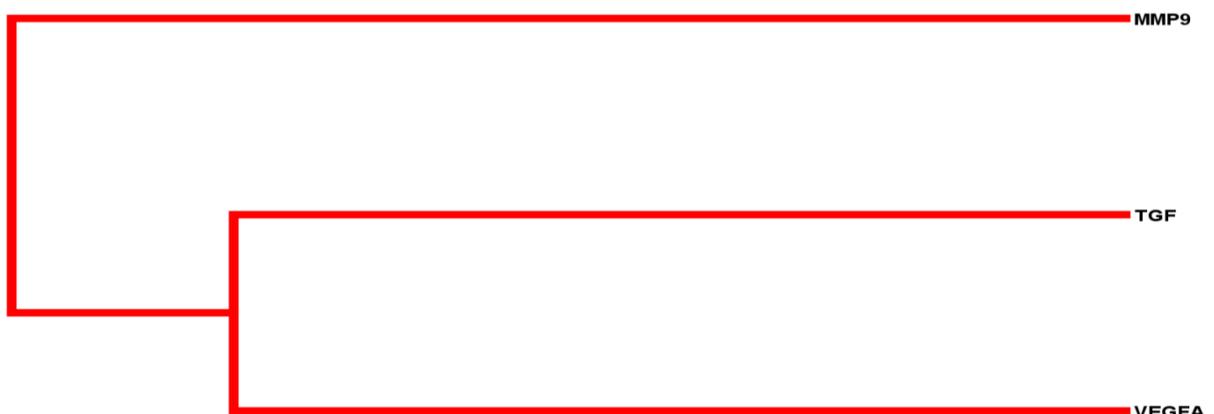


Рисунок 56. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных полиморфизмов генов у пациентов с бронхиальной астмой

Примечание: длинные линии указывают на слабое взаимодействие генных локусов, короткие – на сильную взаимосвязь

Следовательно, можно предположить, что все три полиморфизма играют значимую роль в развитии сочетанного варианта данной патологии. И идентификация данных мутаций позволяет спрогнозировать дальнейшее течение аллергических заболеваний у детей.

Резюме:

1. Выявлены статистически значимые отличия частоты встречаемости генотипов и аллелей среди пациентов с аллергическими заболеваниями и детей контрольной группы в отношении следующих однонуклеотидных замен: *Arg25Pro* гена *TGF-β1* и *320A > C* гена *MMP20* ( $p < 0,05$ ). При этом установлено, что взаимодействие данных полиморфных вариантов значительно повышает риск развития аллергических заболеваний у детей.
2. Зарегистрированы статистически значимые различия частот аллелей и генотипов по полиморфизму *-634G > C* гена *VEGFA* между группой больных БА и детьми контрольной группой ( $p = 0,01$ ). Доказано, что у гетерозигот по данному полиморфному локусу риск развития БА в 2 раза выше по сравнению с носителями других генотипов (*OR составил 2,39*). При этом у пациентов-гетерозигот по исследуемому полиморфизму также содержание *VEGFA* в сыворотке крови значительно выше, чем у гомозигот ( $p = 0,010$ ).
3. Установлено, что у детей, являющихся носителями *ArgArg*-генотипа по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* риск развития бронхиальной астмы значительно повышен (*OR составил 10,57; 95 % CI – 4,17-26,79, p < 0,001*). При этом носительство данного полиморфного варианта сопряжено с повышением экспрессии трансформирующего фактора роста β (2,69 [2,26; 277,62] пг/мл).
4. Выявлено наличие синергизма между полиморфизмами *837T > C* гена *MMP20* и *Arg25Pro* гена *TGFβ* (2,13 %), а также

полиморфизмами  $-8202A > G$  гена *MMP9* и  $2073A > T$  гена *EGFR* (3,19 %).

5. Отмечены достоверно значимые различия распределения аллелей и генотипов по  $-8202A > G$  полиморфизму гена *MMP9* между группой контроля и пациентами, страдающими АД ( $p < 0,001$ ). При этом установлено, что у детей с генотипом *A/A* риск развития АД повышен в 7,55 раза ( $OR = 7,55 [95 \% CI - 2,97 - 19,21, p < 0,001]$ ) и сопряжен с повышенной экспрессией данной протеазы (504,83 [209,78; 583,98] нг/мл) по сравнению с носителями гетерозиготного состояния полиморфизма (480,00 [266,43; 955,36] нг/мл).
6. Показано наличие сильного синергизма полиморфных локусов  $837T > C$  гена *MMP20* и  $8202A > G$  гена *MMP9* путем построения дендрограммы кластерной структуры взаимодействия исследуемых полиморфизмов у детей с АД.
7. Установлены статистически значимые отличия частоты встречаемости аллелей и генотипов по полиморфизмам *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* у больных с сочетанием БА и АД ( $p = 0,01$ ). Выявлено, что аллельный *Arg/Arg*-вариант гена *TGFβ<sub>1</sub>* является фактором риска развития сочетаний данных патологий у детей ( $OR = 6,57 [95 \% CI - 3.02 - 14.33, p < 0,001]$ ).
8. Достоверно значимых отличий по частоте встречаемости генотипов и аллелей полиморфного варианта  $-8202A > G$  гена *MMP9* у больных с сочетанием БА и АД установлено не было, в то же время максимальные концентрации данной протеазы отмечены у гетерозигот *AG* - 687,26 [472,08; 962,36] ( $p = 0,005$ ).
9. Установлено, что взаимодействие полиморфных локусов *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>*,  $2073A > T$  гена *EGFR* и  $837T > C$  гена *MMP20* у одного пациента значительно повышает риск развития сочетаний БА и АД у

детей. При этом важно отметить, что локусы *-634G > C* гена *VEGFA* и *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* дублируют эффекты друг друга.

10. Анализ межгенного взаимодействия полиморфных вариантов *634G > C* гена *VEGFA*, *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и *-8202A > G* гена *MMP9* позволил построить статистически значимые модели межгенного взаимодействия для пациентов трех обследованных групп больных. Во всех моделях установлены сильные синергичные связи между исследуемыми полиморфными локусами, способствующие повышению риска развития аллергических заболеваний у детей.

Полученные нами результаты генетических исследований показали насколько важно изучение вклада не только отдельных полиморфизмов, но и сочетаний аллелей в патогенез БА и АД у детей. Впервые проанализировано влияние полиморфных локусов факторов роста и металлопротеиназы 9 на экспрессию кодируемых ими цитокинов. Установлены предположительные генетические маркеры, которые возможно в скором будущем позволят проводить скрининг для прогнозирования развития различных вариантов аллергических заболеваний у детей.

## **ГЛАВА 6. МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ**

Патогенез аллергических заболеваний достаточно сложен и многогранен. Проведенные нами исследования показали, что как БА, так и АД являются результатом взаимодействия как эндогенных, так и экзогенных факторов. При этом особую роль играют цитокины и полиморфные варианты генов, отвечающие за их экспрессию. Изучение изменений их концентрации в сыворотке крови позволяет раскрыть многофакторную природу каждого аллергического заболевания в отдельности и определить общие механизмы патогенеза атопии. Однако важное практическое значение имеет разработка программ прогнозирования течения заболевания для самых тяжелых больных – пациентов, имеющих клинические проявления как БА, так и АД одновременно. Поэтому особое внимание при разработке моделей уделялось именно им. Разработанные программы позволяют оптимизировать тактику ведения пациентов с данной патологией и предотвратить развитие тяжелых осложнений у детей.

### **6.1. Модель прогнозирования неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей, страдающих атопическим дерматитом**

При разработке модели прогноза неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом были сопоставлены результаты клинических, анамнестических и генетических исследований.

Катамнестический анализ полученных данных позволил разделить всех обследованных нами пациентов в зависимости от ответа на проводимую им терапию на две основные подгруппы: больные с неконтролируемым течением заболевания (им был присвоен ранг «1») и пациенты с контролируемой и частично контролируемой БА (ранг «0»). Далее с помощью пошагового дискриминантного анализа нами были отобраны

показатели, которые в совокупности обладали высокой дискриминантной мощностью и позволили разделить пациентов на две подгруппы - с контролируемым и неконтролируемым течением БА.

В этот комплекс факторов вошли:

- возраст детей в годах,
- тяжесть течения заболевания (1 балл легкое, 2 балла – среднетяжелое и 3 балла тяжелое течение),
- особенности аллергоанамнеза (0 – неотягощенный аллергоанамнез; 1 – аллергоанамнез, отягощенный по материнской линии; 2 – аллергоанамнез, отягощенный по отцовской линии, 3 – по обеим линиям родства),
- результаты генетического анализа на определение полиморфизма *A-8202G* гена *MMP9* (в случае наличия *8202G*-аллели - 1 балл, при его отсутствии - 0 баллов).

Для определения риска развития неконтролируемого течения БА у больных с сочетанием БА и АД методом дискриминантного анализа были найдены коэффициенты и определены математические выражения для двух дискриминантных функций ( $F_1$  и  $F_2$ ), организованные в модель. При этом  $F_1$  соответствует заключению об отсутствии риска неконтролируемого течения БА;  $F_2$  – заключению о высоком риске неконтролируемого течения БА.

Полученные математические выражения для двух дискриминантных функций  $F_1$  и  $F_2$  имели следующий вид:

$$F_1 = 1,14 * X_1 + 2,9 * X_2 + 1,44 * X_3 + 2,3 * X_4 - 9,45,$$

$$F_2 = 1,43 * X_1 + 4,3 * X_2 + 2,1 * X_3 + 3,5 * X_4 - 16,99,$$

где  $F_1$  – значение функции, соответствующее заключению о контролируемом течении БА,

$F_2$  – значение функции, соответствующее заключению о высоком риске неконтролируемого течения БА,

$X_1$  – возраст пациента в годах,

$X_2$  – тяжесть течения заболевания (1 балл – легкое течение БА, 2 балла – среднетяжелое и 3 балла тяжелое течение заболевания),

X3 – особенности аллергоанамнеза (0 – неотягощенный аллергоанамнез; 1 – аллергоанамнез, отягощенный по материнской линии; 2 – аллергоанамнез, отягощенный по отцовской линии, 3 – по обеим линиям родства),

X4 - результаты генетического анализа на определение полиморфизма A-8202G гена *MMP9* (в случае наличия 8202G-аллели - 1 балл, при его отсутствии - 0 баллов).

Для определения риска неконтролируемого течения заболевания с помощью данной модели значения показателей, полученных у пациента, либо рангов больного вносят в каждое из двух уравнений для функций F1 и F2, рассчитывают два значения F1 и F2, делают вывод в пользу той функции и соответствующего заключения, значение которой выше. Если  $F2 > F1$ , то риск неконтролируемого течения БА высокий, а если  $F1 > F2$ , то низкий.

Соответствующий каждому показателю критерий F превышал критическое значение и имеют высокую достоверную значимость p ( $p < 0,05$ ) [табл. 57]. Все показатели, включенные в модель, имеют высокое значение Wilks' Lambda (лямбды Уилкса).

Таблица 57

Параметры дискриминантной мощности показателей, включенные в модель

| Показатели    | Возраст | Тяжесть течения БА | Аллергоанамнез | -8202G аллель полиморфизма гена <i>MMP9</i> |
|---------------|---------|--------------------|----------------|---|
| Wilks' Lambda | 0,716   | 0,741              | 5,372          | 0,036                                       |
| F-remove      | 3,595   | 0,697              | 3,750          | 0,047                                       |
| P             | 0,048   | 0,669              | 4,125          | 0,041                                       |

Наибольшей дискриминантной значимостью по F-критерию при разделении больных на две группы при прогнозе риска неконтролируемого течения, обладал ранг тяжести заболевания.

Общее значение Wilks' Lambda для всей комплексной модели составило 1,648, статистическая значимость  $p < 0,012$  определялась по критерию F, составившему 3,92.

Разработанная нами модель позволяет достаточно быстро определить прогноз неконтролируемого течения БА у ребенка с atopическим дерматитом. Для облегчения работы врача нами создана компьютерная программа, позволяющая после внесения данных пациента в течение нескольких секунд автоматически рассчитать значения F1 и F2 (рис. 57).

|    | A | B | C | D  | E  | F    | G    | H     | I      | J | K | L | M | N | O | P |  |
|----|---|---|---|--|----|------|------|-------|--------|---|---|---|---|---|---|---|--|
| 1  |   |   |   | Внесите показатели больного в желтую область             |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 2  |   |   |   |  |    |      |      | F1    | F2     |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 3  |   |   |   | Возраст, годы  | 10 | 1,14 | 1,43 | 11,4  | 14,3   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 4  |   |   |   | 1 - легкое, 2 - среднетяжелое, 3 - тяжелое               | 2  | 2,9  | 4,3  | 5,8   | 8,6    |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 5  |   |   |   | 0 - нет, 1 - по матери, 2 - по отцу, 3 - по обоим линиям | 3  | 1,44 | 2,1  | 4,32  | 6,3    |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 6  |   |   |   | 0 - нет, 1 - есть  | 1  | 2,3  | 3,5  | 2,3   | 3,5    |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 7  |   |   |   | Constant   |    |      |      | -9,45 | -16,99 |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 8  |   |   |   |  |    |      |      | 14,4  | 15,71  |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 9  |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 10 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 11 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 12 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 13 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 14 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 15 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 16 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 17 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 18 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 19 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 20 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 21 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 22 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 23 |   |   |   |  |    |      |      |       |        |   |   |   |   |   |   |   |  |

Рисунок 57. Окно автоматического расчета риска неконтролируемого течения БА у детей с atopическим дерматитом

**Клинический пример 7.** Пациент П., 9 лет, поступил для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, atopическая форма, легкое течение, период обострения. Сопутствующий диагноз: atopический дерматит, детская форма, ограниченный, легкое течение, период ремиссии.

При поступлении отмечались жалобы на одышку, сухой кашель. Из анамнеза известно, что впервые обструктивный синдром развился в возрасте 5 лет на фоне острого респираторного заболевания. У папы бронхиальная астма. Базисной терапии ребенок не получал. Отмечалась аллергическая реакция на пыльцевые аллергены. Атопическим дерматитом страдает с 10 месяцев жизни. В семье никто не курит. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы сухие, в локтевых ямках и подколенных сгибах гипопигментированы. Отмечается экспираторная одышка, частота дыхания 24 дыхательных движений в минуту. Над легкими перкуторно определяется коробочный звук, аускультативно – на фоне ослабленного дыхания рассеянные сухие свистящие хрипы на выдохе. Тоны сердца отчетливые, ритм учащен: ЧСС – 92 удара в минуту, артериальное давление – 100/70 мм.рт.ст.

Для диагностики контроля бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом было проведено исследование согласно представленному выше методу.

По данным опроса родителей было установлено, что ребенку на момент исследования 9 полных лет, т.е.  $X_1 = 9$ .

Оценили степень тяжести течения заболевания, так как у нашего больного имеет место легкое течение БА,  $X_2 = 1$ .

На основании данных опроса родителей было установлено, что отец мальчика страдает БА, т.к. аллергоанамнез отягощен по отцовской линии, величине  $X_3$  присвоили числовое значение «2», т.е.  $X_3 = 2$ .

Наличие аллеля  $-8202G$  по полиморфному варианту  $A-8202G$  гена *MMP9* (A4) определяли по методике, описанной выше. Произвели забор венозной крови больного, после чего с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, Россия) из лейкоцитов пациента термокоагуляционным методом выделили образцы ДНК, затем методом аллель-специфичной

полимеразной цепной реакции с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия) провели определение полиморфных вариантов *A-8202G* гена *MMP9*. Так как у больного наличие *-8202G*-аллели полиморфного варианта *A-8202G* гена *MMP9* не было зарегистрировано, значению *A4* присвоили числовое значение, равное «0».

Затем вычислили значения коэффициентов *F1* и *F2* по формулам:

$$F1=1,14*9+2,9*1+1,44*2+2,3*0-9,45=6,59,$$

$$F2=1,43*9+4,3*1+2,1*2+3,5*0-16,99=4,38.$$

Поскольку  $F1 > F2$ , формируем заключение о низком риске неконтролируемого течения БА.

Расчеты с помощью автоматизированного окна (рис. 58), подтверждают сделанное заключение.

| D  | E | F    | G    | H  | I      | J | K | L | M | N | O | P |
|--|---|------|------|--|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| Внесите показатели больного в желтую область |   |      |      |  |        |   |   |   |   |   |   |   |
|  |   |      |      | F1                                       | F2     |   |   |   |   |   |   |   |
| Возраст, годы                                | 9 | 1,14 | 1,43 | 10,26                                    | 12,87  |   |   |   |   |   |   |   |
| Тяжесть течения                              | 1 | 2,9  | 4,3  | 2,9                                      | 4,3    |   |   |   |   |   |   |   |
| Отягощенный аллергоанамнез                   | 2 | 1,44 | 2,1  | 2,88                                     | 4,2    |   |   |   |   |   |   |   |
| MMP9 A-8202G, аллель 2                       | 0 | 2,3  | 3,5  | 0  | 0      |   |   |   |   |   |   |   |
| Constant                                     |   |      |      | -9,45                                    | -16,99 |   |   |   |   |   |   |   |
|  |   |      |      | 6,59                                     | 4,38   |   |   |   |   |   |   |   |
| Заключение →                                 |   |      |      | Риск неконтролируемого течения БА низкий |        |   |   |   |   |   |   |   |

Рисунок 58. Окно автоматизированного расчета значений двух дискриминантных функций у больного С.

Пациенту назначена монотерапия низкими дозами ИГКС, позволившая в течение месяца достигнуть контроля над заболеванием.

**Клинический пример 8.** Пациентка М., 9 лет. Поступила для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, среднетяжелое течение, период обострения. Сопутствующий диагноз: Атопический дерматит, детская форма, диффузный, период обострения. При поступлении имели место жалобы на одышку, кашель, заложенность в груди. Из анамнеза известно, что впервые обструктивный синдром развился в

возрасте 3 лет после контакта с пыльцевыми аллергенами. В последующем четыре-шесть раз в год ребенок переносил обструктивные бронхиты, в половине случаев не сопровождающиеся повышением температуры тела. В течение последних 12 месяцев в качестве противовоспалительной терапии получает ингаляционные глюкокортикостероиды. Отмечалась аллергическая реакция на пыльцевые и бытовые аллергены. Атопическим дерматитом страдает с 1 года жизни. Из анамнеза известно, что у матери аллергический ринит, у бабушки по отцовской линии бронхиальная астма. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы сухие, с множественными элементами эскориаций и лихенификаций. Выраженная экспираторная одышка, частота дыхания 28 дыхательных движений в минуту. Над легкими перкуторно определяется звук с коробочным оттенком, аускультативно – рассеянные сухие свистящие хрипы на выдохе. Тоны сердца громкие, ритм учащен: ЧСС – 93 удара в минуту, артериальное давление – 90/60 мм.рт.ст.

Для оценки риска развития неконтролируемого течения бронхиальной астмы у ребенка, одновременно страдающего бронхиальной астмой и атопическим дерматитом, было проведено исследование согласно представленной выше модели.

По данным опроса родителей было установлено, что ребенку на момент исследования 9 полных лет, т.е.  $X_1 = 9$ .

Оценили степень тяжести течения заболевания, так как у нашей больной имеет место среднетяжелое течение БА,  $X_2 = 2$ .

На основании данных опроса родителей было установлено, что у матери аллергический ринит, у бабушки по отцовской линии бронхиальная астма, следовательно, аллергоанамнез отягощен по материнской и отцовской линиям, величине  $X_3$  присвоили значение «3»,  $X_3=3$ .

Наличие аллеля  $-8202G$  по полиморфному варианту  $A-8202G$  гена  $MMP9$  (A4) определяли по методике, описанной выше. Произвели забор венозной крови больного, после чего с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, Россия) из лейкоцитов пациента термокоагуляционным методом выделили образцы ДНК, затем методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия) провели определение полиморфных вариантов  $A-8202G$  гена  $MMP9$ . Так как у больного было зарегистрировано наличие  $-8202G$ -аллели полиморфного варианта  $A-8202G$  гена  $MMP9$ , значению X4 присвоили числовое значение, равное «1».

Затем вычислили значения коэффициентов F1 и F2 по формулам:

$$F1 = 1,14 * 10 + 2,9 * 2 + 1,44 * 3 + 2,3 * 1 - 9,45 = 14,4$$

$$F2 = 1,43 * 10 + 4,3 * 2 + 2,1 * 3 + 3,5 * 1 - 16,99 = 15,71$$

Поскольку было выполнено условие  $F1 < F2$ , диагностировано отсутствие контроля над бронхиальной астмой у ребенка с атопическим дерматитом.

Расчеты с помощью автоматизированного окна (рис. 59), подтверждают сделанное заключение.

| D  | E  | F    | G    | H   | I      | J | K | L | M | N | O | P |
|--|----|------|------|---|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| Внесите показатели больного в желтую область |    |      |      |   |        |   |   |   |   |   |   |   |
|  |    |      |      | F1  | F2     |   |   |   |   |   |   |   |
| Возраст, годы                                | 10 | 1,14 | 1,43 | 11,4                                      | 14,3   |   |   |   |   |   |   |   |
| Тяжесть течения                              | 2  | 2,9  | 4,3  | 5,8                                       | 8,6    |   |   |   |   |   |   |   |
| Отягощенный аллергоанамнез                   | 3  | 1,44 | 2,1  | 4,32                                      | 6,3    |   |   |   |   |   |   |   |
| MMP9 A-8202G, аллель 2                       | 1  | 2,3  | 3,5  | 2,3                                       | 3,5    |   |   |   |   |   |   |   |
| Constant                                     |    |      |      | -9,45                                     | -16,99 |   |   |   |   |   |   |   |
|  |    |      |      | 14,4                                      | 15,71  |   |   |   |   |   |   |   |
| Заключение →                                 |    |      |      | Риск неконтролируемого течения БА высокий |        |   |   |   |   |   |   |   |

Рисунок 59. Окно автоматизированного расчета значений двух дискриминантных функций у больной М.

Больной была назначена комбинированная терапия ингаляционными глюкокортикостероидами и длительно действующими  $\beta_2$ -агонистами в сочетании с антилейкотриеновыми препаратами, однако жалобы на периодические приступы бронхиальной обструкции сохранялись и требовали проведения коррекции назначенного лечения. Отсутствие контроля БА у данного ребенка подтверждает достоверность заявленного способа диагностики. Результаты лечения пациентки С. подтверждают достоверность поставленного диагноза.

С помощью данного способа было обследовано 26 детей, страдающих бронхиальной астмой с атопическим дерматитом. Согласно критериям, приведенным в рекомендательных документах [GINA (2020) и Национальной программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2017)] у 18 детей было диагностировано неконтролируемое течение БА, а у 8 детей контролируемое течение. Применение разработанной нами модели показало, что у 17 больных был получен положительный прогноз в отношении риска развития неконтролируемого течения БА. Следовательно, диагностическая чувствительность составила 94,4%. Из 8 больных с контролируемым течением заболевания, используя модель, у 7 пациентов был установлен прогноз отсутствия риска неконтролируемого течения заболевания. Следовательно, диагностическая специфичность составила 87,5%. Диагностическая эффективность модели составила 92,3%.

## 6.2. Модель прогнозирования тяжелого течения БА у детей, страдающих атопическим дерматитом

Тщательный анализ полученных данных позволил разработать программу прогнозирования риска развития тяжелой БА у детей с атопическим дерматитом.

В данном случае риск тяжелой степени БА (1 – риск максимальный, 0 – минимальный) определяется по математическому выражению

$$K = \frac{\exp(-2,05 - 13,83 * x + 0,037 * y)}{1 + \exp(-2,05 - 13,83 * x + 0,037 * y)}$$

где K – коэффициент риска,

x - концентрация в сыворотке крови TGF- $\beta$  в нг/мл,

y - концентрация в сыворотке крови VEGFA в пг/мл,

-2,05 – постоянная константа (определялась экспериментально методом логит-регрессии),

-13,83 и 0,037 – коэффициенты перед факторами роста (определены экспериментально методом логит-регрессии).

Если  $K \geq 0,25$ , то риск высокий ( $p = 0,0013$ ), если  $K < 0,25$ , то риск низкий.

Данная математическая модель получена методом логистической регрессии при анализе концентрации факторов роста у детей, страдающих бронхиальной астмой и атопическим дерматитом одновременно, и анализа последующего течения БА. Для этого в качестве группирующей переменной выступал ранг тяжести БА (1- тяжелая БА, 0 – легкая или среднетяжелая БА), а в качестве зависимой переменной выступали величины концентрации в сыворотке крови TGF- $\beta$  в нг/мл и VEGFA в пг/мл.

Зависимость между тяжестью течения БА и концентрацией факторов роста в сыворотке крови иллюстрирована на рисунке 60.

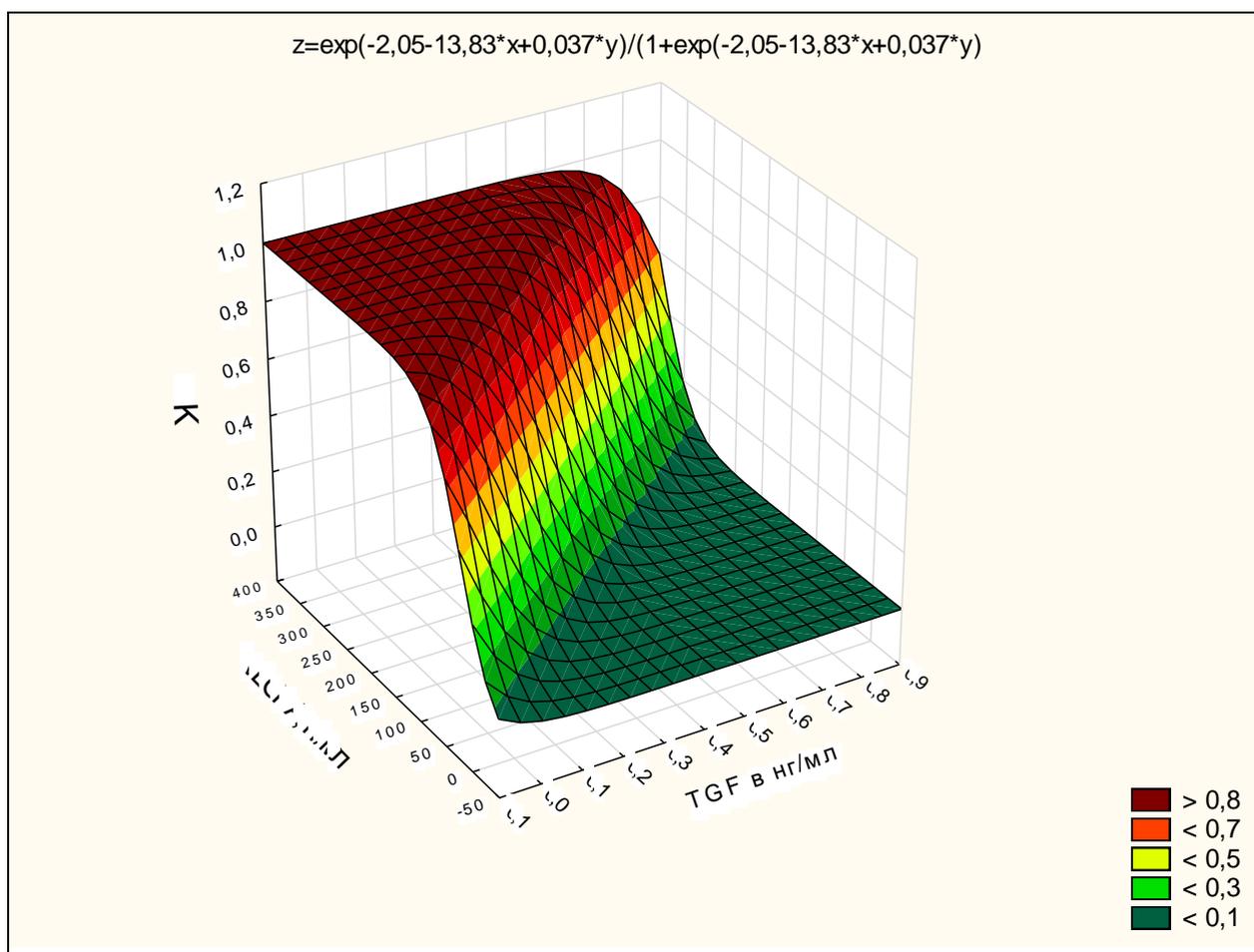


Рисунок 60. Кривая логит-регрессии для расчета риска тяжелой степени БА при сочетании с АД у детей

Разработанная модель имеет высокую статистическую значимость: критерий Хи квадрат составил 13,284 при  $p = 0,001$ .

Для автоматизированного расчета величины коэффициента прогноза создан файл на основе табличного процессора Excel, в котором с помощью разработанной нами формулы рассчитывается коэффициент и формируется заключение о прогнозе тяжести БА. Концентрация факторов риска вводится в область данных больных, маркированную желтым цветом и после нажатия Enter автоматически появляется значение К, выделенное красным цветом шрифта и заключение.

**Клинический пример 9.** Больная А., 11 лет, поступила для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, легкое течение, период обострения. Сопутствующий диагноз: атопический

дерматит, детская форма, ограниченный, легкое течение, период ремиссии. При поступлении отмечались жалобы на одышку, периодический влажный кашель. Из анамнеза известно, что впервые обструктивный синдром развился в возрасте 2 лет на фоне острого респираторного заболевания. У мамы аллергический ринит. Базисной терапии ребенок не получал. Отмечалась аллергическая реакция на бытовые и пыльцевые аллергены. В семье папа курит. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы сухие, без патологических элементов. Отмечается экспираторная одышка, частота дыхания 22 дыхательных движения в минуту. Над легкими перкуторно определяется коробочный звук, аускультативно – рассеянные сухие свистящие хрипы с обеих сторон. Тоны сердца громкие, ритм учащен: ЧСС – 96 ударов в минуту, артериальное давление – 90/55 мм.рт.ст.

При обследовании ребенка было установлено, что концентрация TGF- $\beta$  в сыворотке крови составила 0,7995 нг/мл, а содержание VEGFA было 85,12 пг/мл. Вводим данные пациента в желтую область. Рассчитанное значение К соответствовало 0,000047 (рис. 61).

| A   | B              | C     | D                  | E           | F | G        |
|---|----------------|-------|--------------------|-------------|---|----------|
| <b>Вносить данные пациента только в желтую область</b>                              |                |       |                    |             |   |          |
|   | Параметры      |       | TGF- $\beta$ нг/мл | VEGFA пг/мл |   |          |
|   | Коэффициенты   |       | -13,83             | 0,037       |   |          |
|   | Данные больных |       | 0,7995             | 85,12       |   | $\Sigma$ |
|   | const          | -2,05 | -11,057            | 3,149       |   | -10,0    |
|   | exp            | 0,0   | 0,000047           |             |   |          |
|  |                |       |                    |             |   |          |
| <b>Расчетное значение коэффициента прогноза тяжести БА "К"</b>                      |                |       |                    |             |   |          |
| <b>Заключение</b>   |                |       | <b>Риск низкий</b> |             |   |          |
|   |                |       |                    |             |   |          |
|   |                |       |                    |             |   |          |

Рисунок 61. Пример расчета коэффициента прогноза К тяжести течения БА для пациента А.

Поскольку  $K < 0,25$ , то риск тяжелого течения БА низкий. Наблюдение за больным в течение 12 мес. показало, что тяжесть БА оставалась легкой в течение всего период наблюдения (обострения заболевания в течение года отсутствовали).

**Клинический пример 10.** Больной Б., 9 лет, поступил для обследования и лечения в педиатрическое отделение клиники РостГМУ. Предварительный диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, легкое течение, период обострения. Сопутствующий диагноз: Атопический дерматит, детская форма, очаговый, период ремиссии. При поступлении жалобы на периодическую одышку и кашель. Из анамнеза известно, что впервые обструктивный синдром развился в возрасте 3 года после контакта с кошкой. Базисную терапию за последний год не получал. У родственников аллергические реакции не отмечались. При объективном обследовании ребенка: состояние средней степени тяжести. Кожные покровы сухие. Экспираторная одышка, частота дыхания 24 дыхательных движения в минуту. Над легкими перкуторно определяется звук с коробочным оттенком, аускультативно – рассеянные сухие свистящие хрипы на выдохе. Тоны сердца громкие, ритм учащен: ЧСС – 113 ударов в минуту, артериальное давление – 90/60 мм.рт.ст.

Концентрация TGF- $\beta$  в сыворотке крови составила 0,0027 нг/мл, а содержание VEGFA было 132,86 пг/мл. Вводим данные пациента в желтую область. Рассчитанное значение K соответствовало 0,94 (рис. 62).

| A  | B     | C                              | D     | E           | F   | G        |
|--|-------|--------------------------------|-------|-------------|-----|----------|
| <b>Вносить данные пациента только в желтую область</b>         |       |                                |       |             |     |          |
| Параметры  |       | TGF- $\beta$ нг/мл             |       | VEGFA пг/мл |     |          |
| Коэффициенты   |       | -13,83                         |       | 0,037       |     |          |
| Данные больных   |       | 0,0027                         |       | 132,86      |     | $\Sigma$ |
| const  | -2,05 | -0,037                         | 4,916 |             | 2,8 |          |
| exp  | 16,9  | 0,944196                       |       |             |     |          |
| <b>Расчетное значение коэффициента прогноза тяжести БА "K"</b> |       |                                |       |             |     |          |
| <b>Заключение</b>  |       | <b>Риск тяжелой БА высокий</b> |       |             |     |          |

Рисунок 62. Пример расчета коэффициента прогноза K тяжести течения БА для пациента Б.

Поскольку  $K > 0,25$ , то риск тяжелого течения БА высокий. Наблюдение за больным в течение 12 мес. показало, что у пациента в течение года отмечались ежедневные приступы обострения заболевания, сопровождающиеся снижением уровня ПСВ до 54 %, что характерно для тяжелого течения БА.

Для оценки чувствительности и специфичности данной модели проведено обследование 29 детей, страдающих бронхиальной астмой с атопическим дерматитом. Согласно критериям, приведенным в рекомендательных документах [GINA (2020) и Национальной программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2017)] у 23 детей было диагностировано тяжелое течение БА, а у 6 детей легкое и среднетяжелое течение. Применение разработанной нами модели показало, что у 20 больных был получен положительный прогноз в отношении риска развития тяжелого течения БА. Следовательно, диагностическая чувствительность составила 87%. Из 6 больных с легким и среднетяжелым течением заболевания, используя модель, у 5 пациентов был установлен прогноз отсутствия риска тяжелого течения заболевания. Следовательно, диагностическая специфичность составила 83,3%. Диагностическая эффективность модели составила 86,2%.

Разработанные нами прогностические модели являются высокоинформативными инструментами, использование которых в практической деятельности врачей позволит не только рассчитать риск развития тяжелого течения БА, но и вовремя откорректировать проводимую терапию для предотвращения развития осложнений в будущем.

## **ГЛАВА 7. ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМНОГО СПЕКТРА СЫВОРОТКИ КРОВИ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ (ДАННЫЕ ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)**

Протеомный анализ сыворотки крови является одним из наиболее перспективных методов диагностики, позволяющим не только на молекулярном уровне раскрыть особенности патогенеза заболеваний, но и идентифицировать белки-маркеры различных патологических процессов. Проведение протеомных исследований у больных с аллергическими заболеваниями позволяет выявить наиболее значимые белковые молекулы, играющие ключевую роль в формировании хронического аллергического воспаления как кожи, так и бронхов у детей.

Принимая во внимание высокую стоимость данного метода исследования и невозможность его применения у широкого круга пациентов, для проведения данного исследования нами были отобраны только больные с тяжелыми проявлениями заболевания и невыраженным ответом на проводимую стандартную терапию.

В данную выборку были включены 8 больных с тяжелым неконтролируемым течением БА, 5 пациентов с установленным диагнозом атопический дерматит, диффузный, тяжелое течение, 4 ребенка с сочетанной патологией (БА+АД). Особое внимание было уделено подбору детей в группу контроля – для каждого больного с аллергическим заболеванием был выбран в пару идентичный по полу, возрасту ребенок I группы здоровья, не имеющий отягощенного личного и семейного аллергоанамнеза.

В рамках протеомного исследования для каждого биообразца с помощью программы PDQuest были проанализированы двумерные электрофореграммы, на которых отображаются в виде пятен обнаруженные белки на геле, иными словами «белковые портреты» сыворотки крови больных. Каждому пятну при обработке программа автоматически присваивает уникальный номер – SSP (standart spot number).

Анализ полученных двумерных электрофореграмм белков сыворотки крови больных, страдающих БА, АД и их сочетанием, при окраске флуоресцентным красителем Flamingo позволил выявить различия в протеомном спектре в диапазоне молекулярных масс 25-59 кДа по сравнению со здоровыми детьми.

Оценка интенсивности пятен на протеинограммах, коррелирующая с содержанием белка в пробе, в различных группах позволила выявить общие изменения в протеоме сыворотки, характерные для всех больных с аллергическими заболеваниями, а также установить характерные особенности в белковых спектрах между отдельными нозологиями и контрольной группой (табл. 58).

Таблица 58

Распределение средней интенсивности пятен белков на основании протеомного анализа сыворотки крови в группах обследованных пациентов

| SSP<br>(№ на геле) | Mr, кДа | pI  | Контроль<br>(n = 8) | БА<br>(n = 8) | АД<br>(n = 5) | БА+АД<br>(n = 4) |
|--------------------|---------|-----|---------------------|---------------|---------------|------------------|
| 2104               | 25.86   | 4,3 | 681.7               | 482.7         | 175.1         | 391.7            |
| 2310               | 39.70   | 4,3 | 1525.2              | 228.7         | 760.7         | 0                |
| 2313               | 39.94   | 4,4 | 319.0               | 277.6         | 0             | 0                |
| 3302               | 38.37   | 4,5 | 348.1               | 586.9         | 0             | 0                |
| 3303               | 40.98   | 4,6 | 584.4               | 119.3         | 646.3         | 0                |
| 4103               | 25.85   | 5,2 | 3267.9              | 1443.7        | 0             | 0                |
| 4110               | 25.80   | 5,6 | 336.5               | 210.4         | 546.5         | 151.2            |
| 4208               | 30.17   | 5,4 | 168.9               | 268.8         | 0             | 0                |
| 4209               | 33.00   | 5,4 | 2420.6              | 353.8         | 0             | 159.0            |
| 4405               | 45.83   | 5,3 | 749.1               | 710.1         | 658.2         | 682.8            |
| 5202               | 31.38   | 5,6 | 63.9                | 60.4          | 0             | 61.8             |
| 5203               | 33.95   | 5,8 | 102.0               | 76.8          | 38.4          | 39.1             |

| SSP<br>(№ на геле) | Mr, кДа | pI  | Контроль<br>(n = 8) | БА<br>(n = 8) | АД<br>(n = 5) | БА+АД<br>(n = 4) |
|--------------------|---------|-----|---------------------|---------------|---------------|------------------|
| 5205               | 34.85   | 5,8 | 69.1                | 46.9          | 37.5          | 42.3             |
| 5311               | 40.20   | 5,9 | 422.2               | 319.1         | 208.2         | 180.6            |
| 5407               | 58.59   | 5,7 | 531.4               | 216.1         | 75.5          | 91.7             |
| 6101               | 25.71   | 6,1 | 119.7               | 197.1         | 1922.2        | 0                |
| 6102               | 25.71   | 6,2 | 114.5               | 113.2         | 0             | 760.2            |
| 6204               | 32.98   | 6,1 | 145.5               | 117.0         | 93.3          | 76.6             |
| 6208               | 32.60   | 6,4 | 520.1               | 435.5         | 221.8         | 364.0            |
| 6412               | 46.61   | 6,1 | 160.5               | 100.6         | 0             | 130.8            |
| 7203               | 26.20   | 6,5 | 995,1               | 760,7         | 539.4         | 1136.6           |
| 8206               | 32.25   | 8,0 | 109.1               | 144.1         | 0             | 128.1            |
| 8301               | 41.22   | 7,8 | 94.8                | 94.4          | 0             | 0                |

Подробный анализ протеинограмм в каждой группе обследованных пациентов позволил выявить следующие отличия. Так, у детей, страдающих БА, отмечено, что продукция 16 белков снижалась (диапазон Mr = 25-59 кДа) и 4 – повышалась (диапазон Mr = 25-39 кДа) в сыворотке крови относительно группы контроля (табл. 59, рис. 63).

Таблица 59

Процентное изменение средней интенсивности пятна в группе по отношению к контрольной группе.

| SSP                 | Mr,<br>кДа | pI  | БА<br>(n = 8) | БА+АД<br>(n = 4) | АД<br>(n = 5) |
|---------------------|------------|-----|---------------|------------------|---------------|
| 4209<br><b>ТТНУ</b> | 33.0       | 5.4 | ↓ 85.4 %      | ↓ 93.4 %         | ↓ 100 %       |
| 6208<br><b>СО4b</b> | 32.6       | 6.4 | ↓ 16.3 %      | ↓ 30.1 %         | ↓ 42.5 %      |

| SSP                 | Mr,<br>кДа | pI  | БА<br>(n = 8)   | БА+АД<br>(n = 4) | АД<br>(n = 5)   |
|---------------------|------------|-----|-----------------|------------------|-----------------|
| 2104                | 25.9       | 4.3 | ↓ 29.1 %        | ↓ 42.5 %         | ↓ 74.3 %        |
| 2310                | 39.7       | 4.3 | ↓ 85.0 %        | ↓ 100 %          | ↓ 50.1 %        |
| 2313                | 39.9       | 4.4 | ↓ 13.0 %        | ↓ 100 %          | ↓ 100 %         |
| 4103                | 25.9       | 5.2 | ↓ 55.8 %        | ↓ 100 %          | ↓ 100 %         |
| 5202                | 31.38      | 5,6 | –               | –                | ↓ 100 %         |
| 5203                | 34.0       | 5.8 | ↓ 24.7 %        | ↓ 61.7 %         | ↓ 62.4 %        |
| 5205                | 34.9       | 5.8 | ↓ 32.1 %        | ↓ 38.9 %         | ↓ 45.7 %        |
| 5311                | 40.2       | 5.9 | ↓ 24.4 %        | ↓ 57.2 %         | ↓ 507 %         |
| 5407                | 58.6       | 5.7 | ↓ 59.3 %        | ↓ 82.7 %         | ↓ 85.8 %        |
| 6412                | 46.6       | 6.1 | ↓ 37.3 %        | ↓ 18.5 %         | ↓ 100 %         |
| 6204                | 33.0       | 6.1 | ↓ 19.6 %        | ↓ 47.4 %         | ↓ 35.9 %        |
| 4110<br><b>GPX3</b> | 25.8       | 5.6 | ↓ 37.5 %        | ↓ 55.1 %         | ↑ 62.4 %        |
| 7203 <b>СОЗ</b>     | 26.2       | 6.5 | ↓ 23.6 %        | ↑ <b>14.2 %</b>  | ↓ 45.8 %        |
| 3303                | 41.0       | 4.6 | ↓ 79.6 %        | ↓ 100 %          | ↑ <b>10.6 %</b> |
| 8206                | 32.3       | 8.0 | ↑ 32.1 %        | ↑ 17.4 %         | ↓ <b>100 %</b>  |
| 6101                | 25.7       | 6.1 | ↑ 64.7 %        | ↓ <b>100 %</b>   | ↑ 1505.8 %      |
| 3302                | 38.4       | 4.5 | ↑ <b>68.6 %</b> | ↓ 100 %          | ↓ 100 %         |
| 4208                | 30.2       | 5.4 | ↑ <b>59.1 %</b> | ↓ 100 %          | ↓ 100 %         |
| 6102                | 25.7       | 6.2 | –               | ↑ 563.9 %        | ↓ 100 %         |
| 8301                | 41.2       | 7.8 | –               | ↓ 100 %          | ↓ 100 %         |

Как видно из представленных таблиц, при сравнительном анализе протеомных спектров детей контрольной группы и больных, страдающих

изучаемыми аллергическими заболеваниями, было установлено для 12 белков (SSP 2104,2310,2313,4103, 4209, 5203, 5205, 5311, 5407, 6412, 6204, 6208) снижение содержание (или даже полное отсутствие) при всех патологиях.

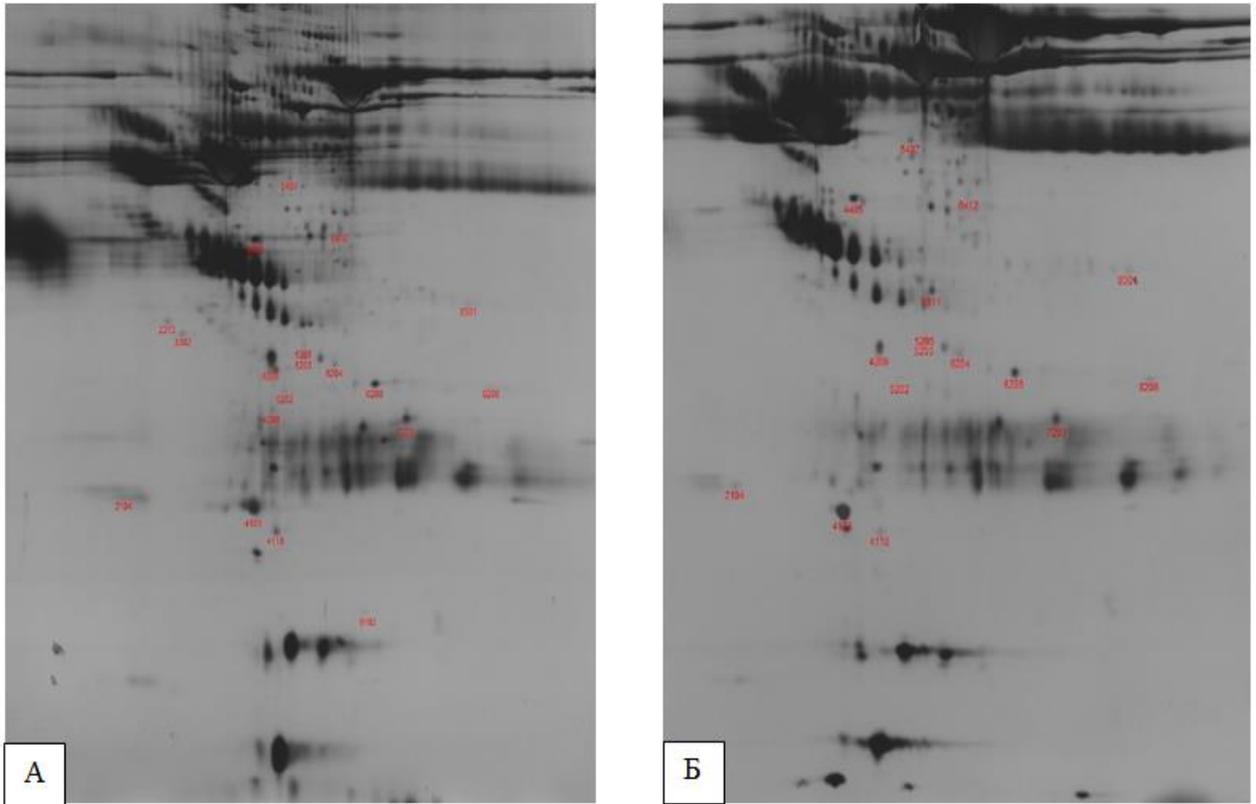


Рисунок 63. Протеомные карты сыворотки крови ребенка контрольной группы (А) и больного БА (Б)

Сравнение двумерных белковых профилей сыворотки крови больных atopическим дерматитом и детей контрольной группы также выявило ряд отличий (рис. 64), а именно, повышение экспрессии 3 белков (SSP 3303, 4110, 6101) и подавление 19 белков при АД, из которых 10 белковых пятен (SSP 2313, 3302, 4103, 4208, 4209, 5202, 6102, 6412, 8206, 8301) полностью отсутствовали на протеинограммах. Особенно следует отметить белковое пятно SSP 6101, интенсивность которого была выше на 1505.8%, и белковое пятно SSP 5311 была ниже на 507% по сравнению с группой контроля.

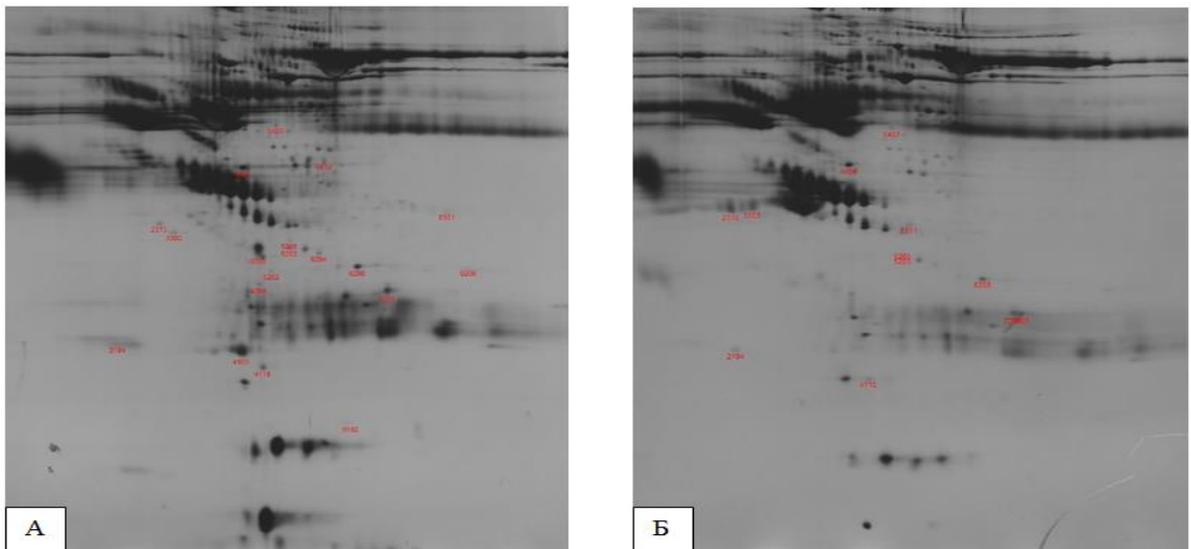


Рисунок 64. Протеомные карты сыворотки крови ребенка контрольной группы (А) и больного атопическим дерматитом (Б)

В группе больных с сочетанием БА и АД также зарегистрированы значимые отличия относительно контрольной группы: выявлено повышение содержания 3 протеинов (SSP 6102, 7203, 8206) в сыворотке крови и уменьшение количества 18 белков, из них 8 пятен (SSP 2310, 2333, 3302, 3303, 4103, 4208, 6101, 8301) полностью отсутствовали на двумерных картах (табл. 61, рис. 65).

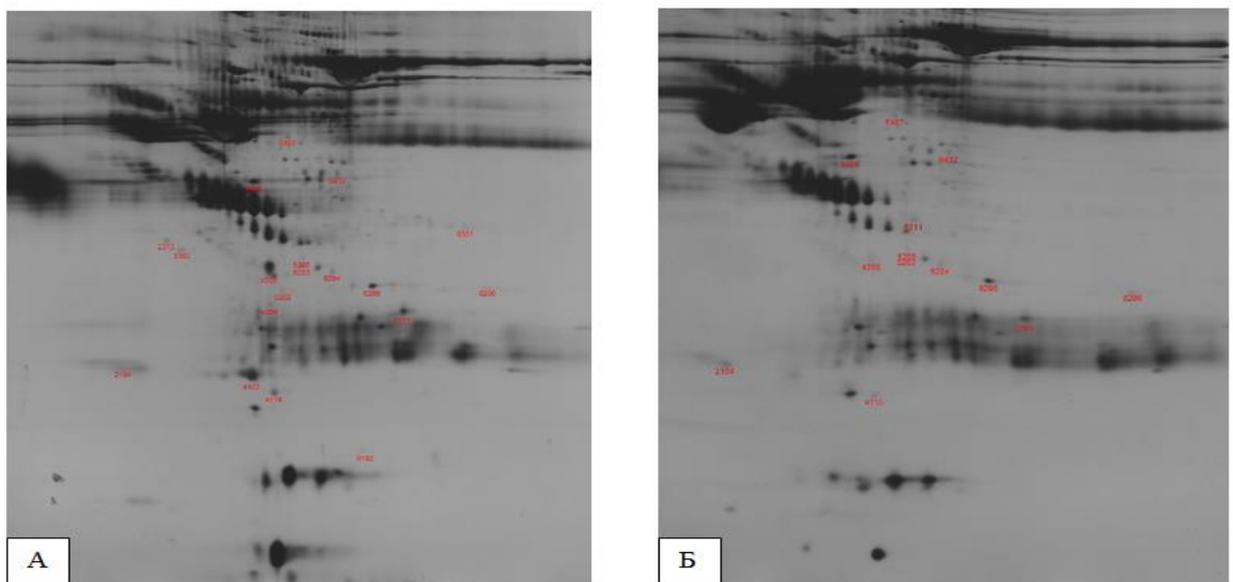


Рисунок 65. Протеомные карты сыворотки крови ребенка контрольной группы (А) и больного с сочетанием БА и АД (Б)

Следует отметить, что в протеомном спектре сыворотки больных как с кожными проявлениями атопии, так и с сочетанием АД+БА, отмечаются схожие особенности: для 10 белков (SSP 2104, 2310, 4209, 5203, 5205, 5311, 5407, 6412, 6204, 6208) и 5 белков отсутствовали (SSP 8301, 4208, 4103, 3302, 2313) относительно нормального спектра. Наличие данных изменений протеомного спектра может свидетельствовать об общности патогенетических процессов данных нозологий.

Далее нами была проведена идентификация белков методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с использованием программы BioTools версии 3.2 («Bruker», Германия) с поиском соответствующих кандидатов в базе данных Swiss-Prot (2013\_12) с использованием локальной версии программы Mascot Search 2.4.1 («Matrix Science», США). Среди всех представленных в таблице 58 белков удалось идентифицировать четыре молекулы: SPP 4209 – транстиретин (ТТНУ); SPP 6208 – фрагмент компонента комплимента 4b (C4b); SPP 4110 – глутатионпероксидаза 3 (GPX3); SPP 7203 – фрагмент компонента комплимента 3 (C3) (табл. 60).

Таблица 60

Белки, идентифицированные методом протеомного анализа сыворотки крови обследованных пациентов.

| Названия белка (ID)           | № в базе Swiss-Prot | Mm, кДа | pI  | Score | Sequence coverage | Число пептидов, вошедших в идентификацию | Биологический процесс  |
|-------------------------------|---------------------|---------|-----|-------|-------------------|--|------------------------|
| Глутатионпероксидаза 3 (GPX3) | P22352              | 25,8    | 9,1 | 67,3% | 37,6              | 9  | Антиоксидантная защита |
| Транстиретин (ТТНУ)           | P02766              | 16      | 5,4 | 68,7% | 129               | 8  | Транспорт лигандов     |

## Продолжение таблицы 60

|   |            |      |     |      |      |    |                                     |
|---|------------|------|-----|------|------|----|-------------------------------------|
| Компонент<br>комплемента<br>C4-B (C4-B) | P0C0L<br>5 | 32,6 | 6,4 | 74,1 | 67,2 | 10 | Активация<br>системы<br>комплемента |
| Компонент<br>комплемента<br>C3 (C3)     | P01024     | 21,6 | 6,1 | 113  | 15,4 | 12 | Активация<br>системы<br>комплемента |

Примечание. Mг – молекулярная масса белков; pI – изоэлектрическая точка белков; Score – индексом достоверности идентификации белка; sequence coverage – процент покрытия аминокислотной последовательности белка по базам данных совпадающими пептидами.

У больных, страдающих БА, отмечено значимое снижение экспрессии всех идентифицированных молекул. В то время как у пациентов с АД зарегистрировано снижение интенсивности пятен ТТНУ, С4b, С3, сопряженное с повышением концентрации GPX3 в сыворотке крови. Если же говорить о пациентах с сочетанием БА и АД, то у них также выявлено снижение экспрессии ТТНУ, С4b, GPX3, как и у больных БА, однако при этом на 14,2% повышена интенсивность пятна С3 на двумерных протеинограммах. Стоит отметить, что у идентифицированных нами белков различна не только цитогенетическая локация, но и функция, которую они выполняют в организме (табл. 61).

Таблица 61

Дифференциально-экспрессирующие белки сыворотки крови,  
идентифицированные у детей с аллергическими заболеваниями

| Название<br>белка | № в<br>Swiss-<br>Prot | Mm<br>,<br>кДа | Назва<br>-ние<br>гена | Цитогене<br>-тическая<br>локация | Локали<br>-зация        | Молеку-<br>лярная<br>функция     | Биологи-<br>ческий процесс                       |
|-------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|--|
| GPX3              | P2235<br>2            | 25,8           | GPX3                  | 5q33.1                           | Секре-<br>тируе-<br>мый | Перокси-<br>дазная<br>активность | Клеточный<br>ответ на<br>окислительный<br>стресс |

Продолжение таблицы 61

|      |            |      |     |         |                         |                               |                                     |
|------|------------|------|-----|---------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| ТТНУ | P0276<br>6 | 16   | TTR | 18q12.1 | Секре-<br>тиру-<br>емый | Белок-<br>перенос-<br>чик     | Обмен/ перенос<br>лигандов          |
| С4-В | P0C0<br>L5 | 32,6 | С4В | 6p21.33 | Секрет<br>ируем<br>ый   | Компонент<br>компле-<br>мента | Активация<br>системы<br>комплемента |
| С3   | P0102<br>4 | 23   | С3  | 19p13.3 | Секрет<br>ируем<br>ый   | Компонент<br>комплемен<br>та  | Активация<br>системы<br>комплемента |

Оценив основные функции идентифицированных дифференциально-экспрессирующихся белков, можно составить определенное представление об их роли в патогенезе аллергических заболеваний у детей.

**Глутатионпероксидаза 3 (GPx3) или плазматическая глутатионпероксидаза** – внеклеточный тетрамерный Se-содержащий фермент. GPx3 восстанавливает перекись водорода до воды путем окисления глутатиона [116]. Особое значение изменение экспрессии данного фермента играет в патогенезе БА, т.к. на долю GPx3 приходится почти 50 % от активности всех глутатионпероксидаз в лёгочной ткани и бронхах [17], что особенно важно, так как дыхательная система в силу своих структурных и физиологических особенностей подвергается множеству внутренних и внешних воздействий, приводящих к избыточной генерации активных форм кислорода [43]. Легочная ткань богата насыщенными жирными кислотами, являющимися основой для перекисного окисления липидов. А образующиеся в ходе реакции активные формы кислорода у больных БА восстанавливаются с образованием перекиси водорода и липопероксидов [43]. Глутатионпероксидаза, в свою очередь, катализирует восстановление перекисей липидов в соответствующие спирты

и восстановление пероксида водорода до воды, способствуя тем самым предотвращению развития оксидативного стресса и его осложнений (рис. 66).

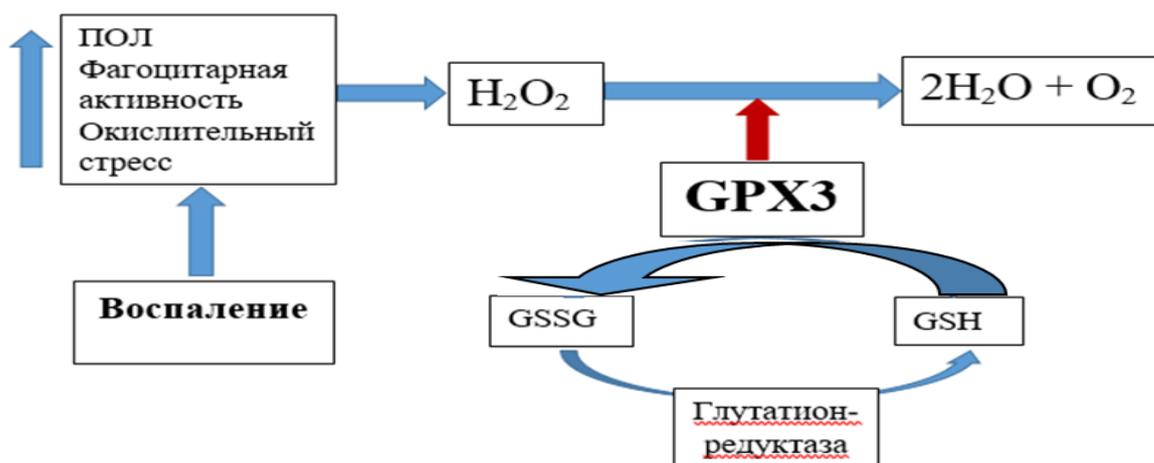


Рисунок 66. Схема участия глутатионпероксидазы в предотвращении развития оксидативного стресса

В отличие от каталазы, действие которой она дополняет, GPx3 способна обезвреживать также органические гидропероксиды, а именно перекиси липидов, образующиеся в результате воздействия свободных радикалов на полиненасыщенные липидные мембраны и продукты реакции, катализируемой липооксигеназой [116].

Проведенный протеомный анализ показал, что у всех больных БА и сочетанием БА и АД отмечается снижение содержания глутатионпероксидазы 3 в сыворотке крови по сравнению со здоровыми детьми (на 37,5 % и 55,1 % соответственно). Это, очевидно, свидетельствует об истощении антиоксидантной защиты, что создает условия для дисбаланса в системе «оксиданты-антиоксиданты» и инициирует развитие окислительного стресса – одного из ключевых механизмов возникновения БА, а также может приводить к вторичным патологическим изменениям дыхательных путей и лёгочной ткани на фоне уже сформировавшегося заболевания.

Кроме того, важно понимать, что супергенерация свободных радикалов, наблюдающаяся при БА, не только предопределяет развитие

хронического воспалительного процесса респираторного тракта, но и индуцирует продукцию различных провоспалительных медиаторов, способствуя тем самым развитию гиперреактивности бронхов, прогрессированию бронхоспазма, а также усилению секреции муцина [1].

Косубстратом в реакциях детоксикации пероксидов, катализируемых глутатионпероксидазой, является глутатион – основной компонент редокс-буфера клетки. Именно он обеспечивает устойчивое поддержание тиол-дисульфидного равновесия и антиоксидантной защиты внутри клетки. Глутатион играет важную роль во множестве клеточных процессов, включая дифференцировку клеток, пролиферацию и апоптоз. Для функционирования GPX3 необходимо поддержание концентрации восстановленной формы глутатиона (GSH). Баланс между восстановленным и окисленным глутатионом – важное условие жизнеспособности клетки, а нарушение этого соотношения может указывать на нарушение редокс-статуса и приводить к прогрессированию ряда заболеваний человека (муковисцидоз, сердечно-сосудистые, воспалительные, иммунные, метаболические и нейродегенеративные заболевания) [147]. В исследованиях, проведенных Seki K. и соавт., было показано, что FcεRI-опосредованное высвобождение лейкотриенов (LTC<sub>4</sub>) из тучных клеток в основном регулируется количеством внутриклеточного GSH. А именно, воздействие на тучные клетки перекиси водорода и др. веществ при окислительном стрессе сопровождается увеличением содержания GSH внутри клетки в поздней фазе аллергической реакции (т. е. через 24 или 48 ч после воздействия), приводя в конечном итоге к увеличению высвобождения LTC<sub>4</sub> [193]. Полное или частичное снижение активности GPX3 может повлечь за собой изменение баланса между GSH и GSSG, и, таким образом, нарушить рецептор-индуцированную и опосредованную активными формами кислорода передачу сигналов, контролирующую иммунные реакции, что может иметь важное значение в развитии БА [193].

Полученные нами результаты согласуются с данным зарубежных исследователей. Так, в работе Youness E.R. и соавт. было показано, что у больных БА отмечается значимое снижение уровня GPX3 в сыворотке крови. При этом у больных с тяжелым течением ее значения гораздо меньше, чем у пациентов со среднетяжелым и легким течением [148, 177, 238, 247]. В исследованиях, проведенных у пациентов с БА, проживающих в Тунисе, также было показано значительное снижение уровня GPX3 активности в сыворотке крови [87]. Аналогичные данные получены у больных БА, проживающих в Египте [247]. Причем показано, что чем тяжелее течение заболевания, тем ниже концентрация данного фермента в сыворотке крови: при легкой БА -  $27.95 \pm 4.77$  mU/mL, тогда как при среднетяжелом течении заболевания -  $6.03 \pm 0.90$  mU/mL.

Еще одним ко-субстратом для глутатионпероксидазы, как было показано, является S-нитрозоглутатион (GSNO), в результате распада которого происходит высвобождение оксида азота (NO) [116]. GSNO является эндогенным бронходилататором [225], который защищает от вызванной метахолином гиперреактивности дыхательных путей [206, 226] и активации фактора NF-κB во время аллергического воспаления дыхательных путей [186].

Снижение концентрации GPX3 в сыворотке крови больных БА может быть сопряжено с модификацией процессов S-нитрозилирования (взаимодействия с SH-группой белков и полипептидов), приводящих к посттрансляционной модификации, изменяющей активность различных белков. GSNO способствует S-нитрозилированию ионных каналов и рецепторов миоцитов, что, вероятно, объясняет наличие прямой зависимости между уровнем GSNO и частотой биения ресничек бронхиального дерева, а также высокую частоту затяжных эпизодов бронхообструкции с длительно сохраняющимся нарушением отделения мокроты, характерными для БА и наблюдающимися у обследованных нами детей, имеющих низкий уровень экспрессии GPX3 в сыворотке крови. Кроме того, S-нитрозилирование таких

белков как каспаза-3 [184], NF-κB [208], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [227], JNK [214], опосредует антиапоптотический эффект, что в свою очередь, ведет к ремоделированию бронхов [169].

Полученные нами результаты исследования еще раз подтвердили тот факт, что патогенез БА многогранен и включает в себя как воспаление дыхательных путей, так и окислительно-антиоксидантный дисбаланс. Причем немаловажное значение в данном процессе принадлежит GPX3, снижение экспрессии которой, является фактором риска в развитии целого ряда негативных реакций, лежащих в основе клинической картины данного заболевания.

В результатах проведенного нами исследования установлено, что у обследованных нами больных АД, напротив, отмечено повышение экспрессии GPX3 в сыворотке крови по сравнению с группой контроля на 62,4 %. Возможно, у этих пациентов более высокое содержание, и как следствие, более высокая активность может отражать физиологический ответ на увеличение гидропероксидной «нагрузки» в период обострения заболевания.

Аналогичные данные были установлены M. R. Namazi и соавт. [189]. Учеными было показано, что при обострении АД отмечается повышение активности GPX3 в сыворотке крови. Это еще раз доказывает значительную роль данного фермента в антиоксидантной защите клеток эпителия при хроническом аллергическом воспалении. А также диктует необходимость наряду с кортикостероидами и иммуносупрессантами, которые используются при лечении АД, применять в плане терапии данных пациентов антиоксиданты.

Однако, когда эта «нагрузка» является серьезной или хронически устойчивой, функциональная полезность этого фермента может быть исчерпана вследствие нарушения баланса окисленной и восстановленной форм глутатиона [212]. Данный ход развития событий как раз и наблюдается

как при сочетании БА и АД, так и при монозаболевании БА, при которых, по данным наших протемных исследований, установлено снижение GPX3.

Также в ходе протеомного анализа сыворотки крови детей с аллергическими заболеваниями зарегистрировано снижение, по сравнению с группой контроля, уровня **транстиретина** в сыворотке крови. Так, у пациентов, страдающих БА, снижение экспрессии было более чем на 85,4 %, а у детей с сочетанием БА+АД – на 93,4 %. При этом у больных АД данный белок не обнаруживался на двумерных электрофореограммах, что может быть связано с предельно низкой концентрацией этого фермента в сыворотке крови указанной категории больных, значение которой находится за пределами чувствительности при использовании флуорисцентного красителя Flamingo.

Идентифицированный нами **транстиретин (ТТНУ)** – это тетрамерный белок, с молекулярной массой 16 кДА, осуществляющий транспорт молекул тироксина и ретинола, полиароматических углеводов и флавоноидов. Синтезируется транстиретин преимущественно в печени, сосудистом сплетении желудочков мозга и в пигментном эпителии сетчатки глаза. Транстиретин является одним из главных белков, транспортирующих ретинол, поэтому снижение его концентрации может привести к формированию метаболических нарушений. Кроме того, транстиретин обеспечивает также транспорт тиреоидных гормонов, которые играют важную роль в обеспечении нормального роста и развития ребенка, дифференциации органов и тканей, регуляции метаболических процессов и формировании адаптивных реакций [251]. Помимо своей транспортной активности, установлено, что транстиретин является протеазой [251].

Особенно важна способность транстиретина перемещать ретинол в организме человека. Около 40 % плазменного транстиретина циркулирует в плотном белково-белковом комплексе с ретинол-связывающим белком плазмы (РСБ). Связывание с транстиретином стабилизирует комплекс

ретинола с РСБ, тем самым уменьшая почечную фильтрацию последнего и обеспечивая его рециркуляцию [171].

Важно понимать, что накопление ретинола в легочной ткани и формирование тем самым избытка биологически активных форм витамина А в легочной паренхиме может способствовать образованию ретиноидных метаболитов (ретиноидов), способных вызывать развитие ряда негативных реакций [73, 183]. Поэтому своевременное его удаление с помощью транстиретиона предотвращает развитие ряда негативных реакций.

Избыток ретиноидов (в особенности ретинолфосфата) приводит не только к ускорению процессов гликозилирования в клетках, но и изменению генной экспрессии. На субклеточном уровне это сопровождается гипертрофией цитоплазматической сети и пластинчатого комплекса, обогащением гликокаликса олигосахаридными цепями, изменением биологических свойств мембран и структуры межклеточных контактов. Также они способствуют дифференцировке эпителиальных клеток по мукоидному типу, а образующиеся в результате этого мукоциты интенсивнее секретируют слизь, что клинически проявляется значительным нарушением бронхиальной проходимости у больных БА и является одним из компонентов бронхиальной обструкции [73].

Установлено, что мембраноповреждающим действием обладает как ретинол, так и его эфиры, если они появляются в крови в несвязанном с белком-переносчиком состоянии, и способствуют усилению разобщенности клеток, следовательно, возрастают клеточные потери и активируются процессы пролиферации и регенерации эпителиальных тканей, приводящие к ремоделированию бронхов у пациентов, страдающих БА, а также кожи у больных АД. В экспериментах было показано, что накопление ретинола в клетках эпидермиса и трансформированных фибробластов приводит к изменению синтеза маннозосодержащих гликопротеинов мембран и цитолеммы, с которыми связаны многочисленные функции клеток. Так, например, энуклеированные фибробласты под действием ретиноидов

увеличивают выделение на свою поверхность фибронектин-гликопротеина, с помощью которого клетки соединяются между собой, а, следовательно, способствуют реорганизации соединительной ткани. Важно отметить, что кроме фибробластов выраженной чувствительностью к повышенным дозам ретинола и ретиноидов обладают макрофаги. Накопление значительного количества данных веществ в паренхиме легких способствует не только изменению общего количества клеток, но и их локальному перераспределению. В эксперименте на мышах было показано, что длительное введение повышенных доз транс-метилретиноата на кожу и внутрибрюшинно, а также 13-цис-ретиноевой кислоты перорально приводит к увеличению содержания и фагоцитарной активности макрофагов, наиболее отчетливо выраженному в легочной ткани [73].

Снижение экспрессии ТТНУ также может приводить к значительным изменениям в системе клеточного иммунитета. Накопление ретиноидов в легочной паренхиме приводит к возрастанию в крови содержания аутоантигенов, усиливается фагоцитоз и межклеточные кооперации, пролиферация и функциональная активность лимфоцитов и полиморфонуклеаров, кроме того активируется хемотаксис и фагоцитарная активность нейтрофильных лейкоцитов, а также выброс ими лизосомных ферментов. Небольшие дозы ретиноидов играют роль фактора, поддерживающего продукцию Т-лимфоцитов в физиологических условиях, однако при повышении поступления этих веществ в организм способны стимулировать киллерную активность и пролиферацию Т-лимфоцитов, изменяя субпопуляционные соотношения этих клеток в сторону преобладания Т-хелперов.

В результате проведенного нами протеомного анализа сыворотки крови пациентов было установлено снижение концентрации данного белка у больных, страдающих аллергическими заболеваниями, по сравнению с контрольной группой. Аналогичные результаты были получены в рамках зарубежных исследований [223]. Причем снижение уровня ТТНУ также было

зарегистрировано в жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже, у больных с легкой, среднетяжелой и тяжелой БА [108]. Интересно отметить, что изменение концентрации данного белка коррелирует с нарушениями функции внешнего дыхания у пациентов с БА. Так, исследования бронхоальвеолярной жидкости и смывов из носа у больных БА показали, что уровень ТТНУ значительно снижается у пациентов, испытывающих приступ удушья после воздействия химических веществ (курения) [172]. Следовательно, можно предположить, что определение уровня транстиретаина позволяет мониторировать нарушения функции внешнего дыхания на молекулярном уровне.

Витамин А и производные ретиноидов играют ключевую роль в физиологии кожи и различных кожных придатков [191]. Биоактивные ретиноевые кислоты также влияют на различные аспекты аллергического воспаления кожи (обеспечивают системный сдвиг Th1/Th2, а также способствуют поддержанию местного аллергического воспаления кожи) [191]. В работах ряда ученых было показано, что у больных, страдающих АД, отмечается снижение уровня витамина А в сыворотке крови [92, 213]. При этом установлено, что тяжесть течения заболевания коррелирует с уровнем витамина А в сыворотке крови.

Кроме того, транстиретин является белком острой фазы, однако проявляет себя как "негативный" острофазовый белок, т.е. его содержание снижается при развитии воспалительного процесса. Так, по данным зарубежных исследований отмечено снижение уровня ТТНУ у больных БА в сыворотке крови [223]. Причем в работах ученых также отмечено снижение концентрации 4-й фракции комплемента у обследованных больных. В этой работе впервые была показана роль тироксина, ретинола, холестерина, а также транспортирующих белков и медиаторов в патогенезе астмы.

Патофизиология аллергических заболеваний неразрывно связана с цитокиновой системой, которая представляет собой достаточно сложно организованный механизм, включающий ряд клеточных и молекулярных

механизмов. Особую роль в этой системе играет каскад комплемента, состоящий из целого ряда белков, которые последовательно активируются, способствуя тем самым гуморальной защите организма от действия чужеродных агентов, т.е. реализации иммунного ответа организма человека [188]. Важное место в патогенезе аллергических заболеваний занимают **C3 и C4 фракции** – это белки острой фазы, их концентрация значительно изменяется в сыворотке крови во время воспаления и повреждения тканей. C4a высвобождается из C4 по классическому пути активации комплемента. C3a генерируется не только классическими или альтернативными путями активации комплемента, но также может быть активирована непосредственно нейтральной триптазой, высвобождаемой из тучных клеток и легочных макрофагов [78, 192]. Показано, что компонент C3 может синтезироваться локально в легких клетками альвеолярного типа II [263]. При этом уровень C3 повышается, способствуя тем самым подавлению воспалительной реакции, а концентрация C4 изменяется синусоидальным образом, что является результатом процессов синтеза и его потребления в ходе защитной реакции организма [151, 196].

Исследования различных моделей животных показали, что C3 и C4 могут способствовать развитию многих патогенетических особенностей бронхиальной астмы. Помимо их хемотаксической роли, они вызывают сокращение гладкой мускулатуры, повышают гиперреактивность дыхательных путей и проницаемость сосудов, а также регулируют расширение сосудов в легких [120]. Данные компоненты комплемента стимулируют высвобождение гистамина из базофилов и тучных клеток, а также регулируют синтез эозинофильного катионного белка и адгезию эозинофилов к эндотелиальным клеткам. Исследования *in vivo* показали, что концентрация C3a и C5A в бронхоальвеолярной лаважной жидкости значительно изменяется после воздействия аллергена на организм больного БА [120].

Наиболее значимым компонентом комплемента, принимающим участие не только в формировании ключевых C3- и C5-конвертаз, но и участвующим на всех путях активации, является C3. Именно его содержание максимально в сыворотке крови (до 70% от всех белков системы комплемента) и именно он выступает в качестве важнейшего звена противомикробной защиты и играет роль белка острой фазы воспаления. Причем концентрация C3 в сыворотке крови напрямую зависит от состояния печени, лимфоидной ткани, кожи, макрофагов и фибробластов, которые отвечают за его продукцию и поэтому при формировании патологических процессов в данных органах происходит значительное изменение его содержания.

В настоящее время доказано, что C3 играет ключевое значение в формировании аутоиммунных, аллергических, онкологических заболеваний, да и воспаления в целом. Так, например, благодаря активации C3 происходит образование анафилатоксина C3a, а, как известно, именно он отвечает за усиление проницаемости стенок сосудов, выделение гистамина из тучных клеток и тромбоцитов и сокращение гладкой мускулатуры. Кроме того, C3a обеспечивает хемотаксис лейкоцитов и дальнейший фагоцитоз за счет присоединения к мишени фрагмента C3b. Поэтому можно предположить, что чем выраженнее защитная реакция в организме, тем больше активация системы комплемента и тем выше потребление C3, а, следовательно, в итоге ниже его концентрация в сыворотке крови.

Не менее важным компонентом, принимающим участие в классическом и лектиновом путях активации системы комплемента, является C4. Данная фракция синтезируется в костях и легких человека и представлена гликопротеином. В результате активации компонента C4 образуется крупный опсонизирующий фрагмент C4b, непосредственно присоединяющийся к мембране клетки-мишени или антителу [61]. Установлено, что биодоступность компонента C4b может ограничиваться C4b-связывающим белком, который лимитирует его функцию [131].

Первые предположения о сочетании аллергических заболеваний и иммунодефицитных состояний были высказаны еще в 1970 году [166]. Установлено, что у больных с атопией уровень иммуноглобулинов (за исключением IgE) ниже, чем в выборке пациентов в группе контроля, а, следовательно, это свидетельствует о возможности формирования иммунодефицита у больных с АД.

Исследования уровня C3 в сыворотке крови больных показали достаточно противоречивые результаты, в одних работах было установлено, что содержание данной фракции комплемента у больных значительно ниже, чем в группе контроля, в то время как другими учеными получены совершенно обратные данные – величина C3 либо была повышена, либо не выходила за пределы нормы [163, 164, 199]. Например, при АД и псориазе показатели C3, C4 и C1 ингибитора были значительно повышены [164]. Доказательством участия C3a в генерировании медиаторов воспаления является установленная тенденция к повышению уровня данного компонента у обследованных больных. Важно отметить, что в аналогичных исследованиях было установлено значимое повышение уровня C4 и C5b9 у больных с АД, что также говорит об участии указанных фракций в патогенезе аллергических заболеваний [174].

Совершенно обратные данные были получены Ю.В. Сергеевым, Ю.П. Резниковым и соавторами [60]. Они описали снижение концентрации C4 у больных с АД, сопряженное с повышением уровней C1 ингибитора, а также продуктов расщепления C3 и C4. Вышеуказанные изменения, по мнению авторов, свидетельствуют об активации системы комплемента и роли анафилатоксина C4a в поддержании воспалительных реакций. Также существует ряд работ, описывающих аналогичное снижение концентрации компонента C4 системы комплемента у детей, страдающих аллергическими заболеваниями (БА и АД) [264].

Интересно отметить, что при изучении биоптатов кожи больных АД, проводимых с использованием иммунофлуоресцентного метода, были

установлены не только отложения C3 компонента комплемента, но и некоторых видов иммуноглобулинов (за исключением IgE) в области дермоэпидермального соединения, а также вокруг поверхностных кровеносных сосудов. А в ряде исследований было высказано предположение, что образование комплексов антиген-антитело в организме больного или ускоренный катаболизм различных фракций комплемента могут явиться причиной снижения его концентрации в сыворотке крови [163].

В исследовании, проведенном Dane S. Erdem T., V. Ertuns, L. Dane [222], была установлена обратная корреляционная зависимость между выраженностью клинической симптоматики и уровнем C3 в сыворотке крови больных, однако, при этом отмечалась положительная корреляционная зависимость с содержанием C4. Тем не менее, причины возникновения прямой зависимости между выраженностью клинической симптоматики и уровнем содержания C4 пока не выяснены и требуют дальнейшего изучения [63].

Особое значение в регуляции иммунного ответа также принадлежит рецепторам к данным анафилотоксинам, активация которых оказывает влияние на развитие Th2-ответа и эффекторные реакции. Комплемент C3a анафилатоксин и его рецептор регулируют большую часть воспалительных процессов в бронхолегочной системе, которые происходят при аллергических заболеваниях легких. Предполагают, что C3a при связывании C3aR может играть значительную роль в преодолении врожденных и адаптивных Th2 иммунных ответов при бронхиальной астме. Кроме того, анафилотоксины являются иммуномодуляторами, т.е. они выступают в роли регуляторов иммунного ответа, при этом C3a является иммуносупрессором (т.е. подавляет иммунный ответ).

Значимую роль данных компонентов комплемента в патогенезе БА доказывает ряд исследований, проведенных нашими зарубежными коллегами. В работе Tang Wei-hong и соавт. (2014) показано, что у больных,

страдающих БА, уровень белка С3 в сыворотке крови был значительно выше, чем в группе контроля. Что еще раз говорит о высокой значимости данного фактора, и повышение его уровня указывает на развитие защитной реакции организма, необходимой для подавления воспалительного процесса [196]. В исследовании Mohammed Abdel Fattah и соавт. также было установлено, что больные, находящиеся в обострении заболевания, имеют более высокий уровень С3 в сыворотке крови, в то время как уровень С4 был в пределах нормы. У пациентов в ремиссии БА фактические уровни данных фракций комплемента не имели достоверных отличий от контроля. Важно отметить, что чем тяжелее было состояние обследованных пациентов, тем выше показатели С3 были зарегистрированы у больных [119]. Solomon и соавт. также было показано наличие положительной корреляции между уровнем С3а и тяжестью астмы ( $p = 0,03$ ) [119]. Данный факт объясним с точки зрения патофизиологии данного заболевания. С увеличением тяжести БА системные воспалительные медиаторы, такие как фактор некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкин-1, могут оказывать стимулирующее действие на печень с образованием большего количества С3, что, в свою очередь, может усиливать тяжесть астмы. Ван де Грааф и его коллеги обнаружили повышенный уровень С3а в бронхоальвеолярной жидкости у больных БА по сравнению с контрольной группой [120].

Проведенные нами протеомные исследования сыворотки крови больных БА, напротив, выявили снижение синтеза данных фракций комплемента. Нами установлено значительное снижение экспрессии фрагмента комплемента С4 (UniProtKB - P0C0L5) с молекулярной массой 24 кДа, а также фрагмента комплемента С3 (UniProtKB - P01024) с молекулярной массой 23 кДа. Возможно, это связано с истощением защитных функций организма ребенка, страдающего БА.

Причем результаты наших исследований согласуются с данными проведенных ранее обследований пациентов, страдающих БА. Так Schifferli et al наблюдали более низкий уровень С3 с низким С4 у больных астмой, и

сделали предположение о том, что у людей с данной патологией отмечается большее участие классического пути по сравнению с альтернативным путем каскада активации комплемента [119]. Данное высказывание имело подтверждение в работе Ejaz S и соавт., показавших наличие снижения концентрации 4-й фракции комплемента у обследованных больных [223].

В работе Solomon и соавт., наоборот, не было выявлено достоверной разницы между уровнем C4 в сыворотке крови у детей с астмой и контрольной группой ( $41,30 \pm 48,80$  мг/дл против  $44,60 \pm 39,70$  мг/дл соответственно,  $p = 0,69$ ). И также было показано отсутствие корреляции между уровнями C4 и тяжестью астмы [119]. Отсутствие существенной разницы в концентрации C3a между пациентами с астмой и здоровыми людьми описано в работе Mateja M. и соавт. Однако, авторы связывают это тем, что пациенты, включенные в исследование, в момент забора крови находились в периоде ремиссии заболевания [120].

Наличие столь разноречивых результатов исследования данных фракций комплемента у больных БА, а также отсутствие достаточных данных в литературе, касающихся связи между периферическими уровнями C3, C4 и астмой, диктует необходимость продолжения исследований в данном научном направлении.

Проведенный нами протеомный анализ сыворотки крови больных, страдающих АД, также позволил выявить снижение экспрессии C03 и C04b компонентов системы комплемента (на 42,5 % и 45,8 % соответственно).

Принимая во внимание тот факт, что компонент комплемента C3 синтезируется преимущественно кератиноцитами и активируется его синтез после повреждения кожи, можно предположить, что снижение экспрессии данной фракции может быть обусловлено истощением пула данных факторов, вызванного хроническим аллергическим воспалением при АД у детей [240]. Кроме того следует помнить, что каскад комплемента является важной частью врожденной иммунной системы, состоящей из последовательно активирующихся проэнзимов, которые в итоге

обеспечивают процессы опсонизации, активации фагоцитов и лизиса клеток-мишеней. Стержневой молекулой в этом каскаде является С3. На первом этапе С3 расщепляется до С3а и С3b, а затем С3b расщепляется до iС3b и С3dg. Каждый из этих пептидов действует как лиганд для специфических рецепторов, опосредующих классические С3-зависимые функции, такие как опсонизация, хемотаксис лейкоцитов и сокращение гладкомышечных клеток. Экспрессия рецепторов С3 на антигенпредставляющих клетках, Т- и В-клетках позволяет предположить, что С3 и продукты его распада играют важную роль в гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных реакциях. С3d, связывающийся со своим рецептором на В-лимфоцитах, снижает порог активации В-клеток, в то время как С3а способствует дифференцировке Th1, повышая синтез IL-12 в очаге воспаления. Поэтому контроль содержания данных фракций комплемента в сыворотке крови позволит не только более точно оценить состояние больного, но и вовремя разработать комплекс мер для предотвращения хронизации процесса.

Резюме:

1. Установлено, что у больных с аллергическими заболеваниями отмечаются различия в продукции 23 белков в диапазоне молекулярных масс 25-46 кДа по сравнению с контрольной группой.
2. Показано, что у больных, страдающих БА, определяются все белки, зафиксированные в группе контроля, в то время как у детей с АД отсутствовали 10 белков, а среди больных с сочетанием АД и БА не были выделены 8 молекул, присутствующих в сыворотке крови детей контрольной группы.
3. Отмечено, что 5 белков отсутствуют как в группе больных АД, так и при сочетании АД+БА (SSP 8301, 4208, 4103, 3302, 2313), что свидетельствует об общности патогенетических процессов данных нозологий.
4. Зафиксировано снижение экспрессии 16 и повышение синтеза 4 белковых молекул у больных БА относительно группы контроля.

5. Установлено, что у детей с АД отмечается выраженное снижение экспрессии 10 молекул, сопряженное с повышением интенсивности пятен 3 протеинов.
6. В группе больных с сочетанием АД и БА зарегистрировано снижение экспрессии 19 молекул и повышение концентрации 3 белков.
7. Проведенный протеомный анализ сыворотки крови больных с аллергическими заболеваниями позволил среди всех 23 белков-отличий идентифицировать четыре молекулы - глутатионпероксидазу 3, транстретин, компоненты комплемента 3 и 4b. Причем у детей, страдающих БА, отмечено значимое снижение экспрессии всех представленных выше белков; у больных с АД зарегистрировано снижение интенсивности пятен ТТНУ, СО4b, СО3, сопряженное с повышением концентрации GPX3; среди пациентов с сочетанным вариантом БА+АД - снижение экспрессии ТТНУ, СО4b, GPX3 и повышение интенсивности пятна СО3 на двумерных протеинограммах.

Таким образом, проведенный протеомный анализ сыворотки крови больных с аллергическими заболеваниями позволил выявить несколько дифференцированно выраженных белков по сравнению с контрольной группой. Модификация продукции данных белков свидетельствует о наличии повреждений на молекулярном уровне, приводящих к метаболическим и функциональным нарушениям в организме больного. Установленные в ходе данного исследования особенности протеомного спектра у детей с аллергическими заболеваниями расширяют наши представления о молекулярных аспектах патогенеза БА и АД, что обеспечивает новые возможности для диагностики и терапии этих заболеваний у детей.

Полученные результаты, безусловно, являются предварительными и необходимо дальнейшее проведение исследований на большей выборке пациентов с углубленной сравнительной идентификацией протеинов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия распространенность аллергических заболеваний во всем мире значительно возросла [102]. В Российской Федерации распространенность БА среди взрослых составляет 6,9 % [13], а среди детей и подростков – около 10 % [40], а АД поражает около 13 % детей и примерно 7 % взрослых. При этом важно отметить, что аллергические заболевания - это хронические патологические процессы, которые не только снижают качество жизни детей, но и могут прогрессировать, приводя к формированию опасных для жизни состояний. Однако, несмотря на значительный рост аллергических заболеваний в течение последних десятилетий, до конца еще не изучены и не раскрыты механизмы формирования данной патологии, а также не определены факторы, предрасполагающие к тяжелому течению данных заболеваний. Поэтому целью исследования явилось усовершенствовать методы комплексной диагностики аллергических заболеваний у детей путем изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза для уточнения прогноза и тяжести течения бронхиальной астмы, атопического дерматита и сочетания данных патологий

Исследование проводилось в несколько этапов. Прежде чем приступить к исследованию, был проведен мониторинг обращений пациентов, страдающих БА и АД, за стационарной помощью в детскую городскую больницу №2 г. Ростова-на-Дону (специализированную для приема детей с аллергическими заболеваниями со всего города) за 2017-2019 гг.

Установлено, что общий объем обращений детей с данной патологией составил 1656 человек за три года. При этом выявлено, что наиболее часто госпитализация в стационар требовалась пациентам с БА (75,3 %), тогда как доля больных с АД составила 24,7%. Максимальная частота обострений БА отмечается преимущественно с марта по октябрь и снижается в зимние

месяцы, что совпадает с периодами поллинии растений. Тогда как среди детей, страдающих АД, установлено значительное повышение частоты обращений за стационарной помощью в начале года с последующим снижением количества заболевших в осенне-зимний период.

Принимая во внимание высокую частоту обострений БА и АД среди поступающих в течение года больных с аллергическими заболеваниями, на первом этапе нашего исследования был проведен анализ клинико-анамнестических и лабораторных показателей для определения факторов, предрасполагающих к развитию данных нозологий, а также определения факторов риска неблагоприятного прогноза течения данных видов патологии у детей. На данном этапе были обследованы 627 больных с аллергическими заболеваниями (213 детей, страдающих БА, 209 детей с установленным диагнозом АД и 205 человек с сочетанием БА и АД).

Установлено, что у больных с БА, имеющих указание в анамнезе на перенесенный ранее АД, отмечается более тяжелое течение заболевания по сравнению с пациентами, имеющими монопатологию ( $p = 0,05$ ). При этом у 71,2 % детей данной группы отмечается отягощенный аллергоанамнез, в то время как в группе больных, страдающих только БА, этот показатель составил 59,2 %, а в группе детей с АД - 44,0 %.

Лабораторное обследование пациентов позволило установить, что среди всех обследованных больных с аллергическими заболеваниями повышенные уровни общего IgE зарегистрированы только в 39,8 % случаев, в то время как данный показатель находился в пределах референтных значений у 60,2 % больных. При этом у больных, страдающих БА, показатели общего IgE не коррелировали с уровнем контроля над заболеванием, а также показателями функции внешнего дыхания и степенью тяжести ДН, зафиксированной при поступлении в стационар ( $p > 0,05$ ).

Проведенный анализ уровня специфических IgE у обследованных нами детей показал, что пищевые аллергены значимы для пациентов всех трех групп. Причем на первом месте по частоте встречаемости среди детей с аллергическими заболеваниями стоят такие пищевые аллергены как молоко, пшеничная мука, гречка и томаты – более чем у трети обследованных больных были зарегистрированы специфические IgE к данным молекулам. Большинство из бытовых аллергенов (*D.pteronissimus*, *D.farinae*, библиотечная и домашняя пыль) играет ключевую роль в патогенезе БА, в то время как в когорте больных с АД частота встречаемости данных веществ в несколько раз ниже, а в группе пациентов с БА+АД наиболее часто встречается аллергическая реакция на молекулы домашней пыли. Среди пыльцевых аллергенов наиболее значимой являлась пыльца сорных и луговых трав (таких как тимофеевка, амброзия, костер, полевица), пыльца деревьев (преимущественно бузины).

На основании полученных данных выявлены наиболее значимые факторы, определяющие тяжесть течения заболевания в каждой группе обследованных детей, а также разработаны программы прогнозирования степени тяжести течения БА, АД и сочетания БА и АД. Так, среди больных, страдающих БА, к данным факторам относятся такие, как возраст ребенка (В, лет); степень дыхательной недостаточности (ДН); величина пиковой скорости выдоха (ПСВ, %); продолжительность заболевания (ПР, лет); связь обострений заболевания с переменной погоды (ПП, 1 – есть, 0 – нет); связь обострений заболевания с физической нагрузкой (ФН, 1 – есть, 0 – нет).

Установлено, что между включенными в данное уравнение факторами отмечается статистически значимая зависимость с риском развития тяжелого течения заболевания ( $\chi^2 = 19,97$ ,  $p = 0,0028$ ). Методом ROC анализа было установлено, что при превышении значения Y величины 0,189 риск тяжелого течения БА повышался с диагностической чувствительностью 81,5 % и специфичностью 65,7 %. Площадь по ROC кривой составила  $0,748 \pm 0,057$ ,

что свидетельствовало о хорошем качестве прогностической системы. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии была высокой и составила  $p < 0,0001 (z = 4,32)$ . По величине площади под ROC кривой (AUC), соответствующей диапазону 0,7-0,8, способность модели определять риск тяжелого течения БА интерпретировали как удовлетворительную с высокой статистической значимостью.

Среди больных, страдающих и БА и АД, наиболее значимыми факторами, включенными в модель прогнозирования тяжести течения БА, оказались возраст (В, лет); возраст манифестации БА (ВМ, лет); степень дыхательной недостаточности (ДН); продолжительность базисной терапии (ПБТ, мес.); связь обострений заболевания с физической нагрузкой (ФН, при наличии связи показателю ФН присваивается значение равное «1», при отсутствии связи – «0»); пиковая экспираторная скорость потока (ПОС, л/сек); показатель уровня эритроцитов в сыворотке крови больного (Эри,  $10^{12}/л$ ). Следует обратить внимание, что в отдельности каждый из включенных в данную модель факторов риска не отражает тяжести клинических проявлений заболевания, однако, суммарный эффект данных параметров позволяет с высокой степенью вероятности говорить о повышенном риске развития тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА+АД.

Достоверность полученных нами результатов подтверждает статистически значимая зависимость между включенными в данную модель факторами ( $\chi^2 = 24,1, p = 0,001$ ). Методом ROC анализа была найдена дифференциальная точка разделения для Y, при превышении его значений величины 0,269 риск тяжелого течения заболевания повышается с диагностической чувствительностью 87,5 % и специфичностью 95 %. Стоит отметить, что площадь под ROC кривой составила  $0,937 \pm 0,048$ , что свидетельствует о хорошем качестве прогностической системы. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии

высокая и составила  $p < 0,0001 (z = 9,056)$ . По величине площади под ROC кривой (AUC), соответствующей диапазону 0,9-1,0, способность модели определять риск тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА+АД интерпретировали как отличную с высокой статистической значимостью.

В группе больных с АД все включенные в данное исследование пациенты были ранжированы на две группы: в первую вошли дети с тяжелым и среднетяжелым течением АД (им был присвоен ранг «1»), во вторую – с легкими проявлениями заболевания (ранг «0»). Наиболее значимыми факторами в данной выборке оказались возраст больного (В, лет); возраст манифестации заболевания (ВМ, до 6 мес – 1; от 6 мес до 1 года - 2, от 1 года до 3 лет – 3; старше 3 лет – 4); индекс SCORAD (S, баллы); распространенность повреждения кожи (Р, ограниченный - 1, распространенный - 2, диффузный – 3); наличие патологии печени и/или желчевыводящих путей (ПП, при наличии патологии – 1, при отсутствии – 0). Методом логит-регрессии была дана характеристика нелинейной связи между риском тяжелого течения АД и комплексом данных показателей ( $\chi^2 = 35,3, p = 0,000$ ), что в дальнейшем позволило провести ROC-анализ и найти дифференциальную точку разделения для Y.

Установлено, что при превышении значения Y величины 0,386 риск тяжелого течения АД повышался с диагностической чувствительностью 94,4 % и специфичностью 91,3 %. Площадь под ROC кривой составила  $0,954 \pm 0,0325$ , что свидетельствовало о высоком качестве прогностической системы. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии была высокой и составила  $p < 0,0001 (z = 13,98)$ . По величине площади под ROC кривой (AUC), соответствующей диапазону 0,9-1,0, способность модели определять риск тяжелого течения АД интерпретировали как удовлетворительную с высокой статистической значимостью.

Принимая во внимание сложность вычислительных манипуляций, которые необходимо провести специалисту для расчета коэффициентов  $Y$ , позволяющих определить прогноз течения аллергических заболеваний у детей, нами были разработаны программы, позволяющие автоматически в течение нескольких секунд после внесения данных о конкретном пациенте, получить заключение о прогнозе течения заболевания у ребенка.

Однако, несмотря на комплексный подход к диагностике и прогнозированию течения этих аллергических заболеваний, до сих пор остаются неизвестными некоторые звенья патогенеза. Известно, что в основе данной патологии лежит повышенный синтез IgE, однако более чем у 60,2 % обследованных нами детей, имеющих клинические проявления атопии, показатели общего IgE были в пределах нормы.

Для дальнейшего определения роли цитокинов в поддержании хронического аллергического воспаления на следующем этапе исследования нами проведено изучение содержания факторов роста (трансформирующего фактора роста  $\beta$  и фактора роста эндотелия сосудов) и уровня металлопротеиназы 9 в сыворотке крови больных с различными аллергическими заболеваниями ( $n = 205$ ), а также детей контрольной группы ( $n = 35$ ).

Анализ результатов данного этапа исследования показал, что у больных с данным видом патологии отмечается повышение концентрации VEGF A в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Причем значимость данного фактора установлена для всех трех нозологии (БА, АД и сочетанного варианта). Важно отметить, что как у детей, страдающих БА, так и с сочетанием БА+АД, отмечается прямая корреляционная зависимость между уровнем VEGF A в сыворотке крови и степенью тяжести заболевания ( $r = 0,802$ ;  $p < 0,0001$  и  $r = 0,38$ ;  $p = 0,025$ ) соответственно). Данный факт является подтверждением высокой

чувствительности данного цитокина как биологического маркера тяжести состояния больного ребенка.

Стоит отметить, что VEGF A не только является индуктором неоангиогенеза и мощным митогеном клеток эндотелия сосудов, но и принимает активное участие в ремоделировании тканей. Доказательством этому является обратная корреляционная зависимость, установленная между приростом ОФВ1 после ингаляции бронхолитика и концентрацией VEGFA в сыворотке крови детей, страдающих БА и сочетанием БА+АД ( $r = -0,438$ ;  $p = 0,022$  и  $r = -0,692$ ;  $p < 0,0001$  соответственно). У пациентов с АД зарегистрирована прямая зависимость между объемом поражения кожных покровов и показателями данного фактора роста ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,0001$ ). Так, у пациентов с ограниченной формой его величина равна 116,64 [94,18; 204,0] пг/мл, тогда как при распространенном АД – 320,40 [312,10; 606,88] пг/мл [ $p = 0,0001$ ].

Далее проведено исследование уровня еще одного фактора роста, ответственного за ремоделирование тканей и регуляцию иммунного ответа – трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ . Установлено, что показатели TGF $\beta 1$  в сыворотке крови у детей, страдающих аллергическим заболеванием, значительно превышают показатели контрольной группы ( $p < 0,005$ ). При этом достоверных отличий между группами обследованных больных установлено не было ( $p > 0,05$ ).

Изучение показателей уровня TGF $\beta 1$  в сыворотке крови больных бронхиальной астмой в зависимости от тяжести течения заболевания выявило достоверно значимые отличия концентрации данного цитокина среди пациентов с легким и тяжелым течением БА ( $p = 0,005$ ). Еще одним фактором, свидетельствующим о значимости данного цитокина в патогенезе БА, говорит выявленная обратная корреляционная зависимость между степенью тяжести данного заболевания и концентрацией TGF $\beta 1$  в сыворотке крови больных ( $r = -0,52$ ;  $p = 0,006$ ). При этом стоит отметить, что значения

данного показателя у больных с тяжелым течением БА (2,15 [2,10;2,47] пг/мл) приближаются к данным, полученным у детей в группе контроля (2,54 [2,34; 3,02] пг/мл). Столь значимое снижение концентрации данного фактора может свидетельствовать о завершении процессов ремоделирования межклеточного матрикса у больных с тяжелым течением заболевания. Доказательством данному факту является прямая корреляционная зависимость, установленная между показателями TGF  $\beta$ 1 в сыворотке крови больных и динамикой прироста ОФВ1 после пробы с бронхолитиками ( $r = 0,790$ ;  $p < 0001$ ).

Также следует отметить, что у пациентов, имеющих в анамнезе указания на наличие аллергических заболеваний у родственников по материнской линии, концентрация TGF  $\beta$ 1 в сыворотке крови значительно выше (280,59 [250,88; 867,16] пг/мл), чем у детей без отягощенного аллергоанамнеза (2,24 [2,08; 2,69] пг/мл) [ $p = 0,0003$ ]. Это еще раз подтверждает высокую значимость наследственной предрасположенности у детей с аллергическими заболеваниями и диктует необходимость проведения генетических исследований для прогнозирования риска развития и тяжести их течения.

Далее был проведен анализ данного показателя у детей, страдающих atopическим дерматитом. В ходе исследования было установлено, что концентрация TGF  $\beta$ 1 в сыворотке крови детей с АД значительно больше (66,30 [25,50; 417,90] пг/мл), чем у детей контрольной группы (2,54 [2,34; 3,02] пг/мл) [ $p < 0,0001$ ]. При этом установлено, что у пациентов с легким течением заболевания величина TGF  $\beta$ 1 в сыворотке крови меньше, чем у больных с тяжелым и особенно со среднетяжелым АД ( $p = 0,016$ ).

Изучение уровня TGF- $\beta$ 1 в группе больных с сочетанием БА+АД позволило также выявить прямую корреляционную зависимость между данным показателем и динамикой прироста значений ОФВ1 после ингаляции сальбутамола ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,0001$ ), что является свидетельством влияния

данного фактора на процессы ремоделирования бронхов. Доказательством этому является низкий ответ на проводимую бронхолитическую терапию, установленный у больных, страдающих БА и АД ( $r = 0,392$ ;  $p = 0,22$ ).

Также нами изучена роль одного из главных факторов, ответственных за деградацию компонентов внеклеточного матрикса и гидролиз ряда регуляторных белков, обеспечивающего поддержание архитектоники и гомеостаза – металлопротеиназы 9 у больных с аллергическими заболеваниями. В ходе проделанной работы было установлено, что уровень MMP9 у детей, страдающих аллергическими заболеваниями, достоверно выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). Причем значимых отличий количественных значений данного показателя между группами обследованных пациентов также отмечено не было ( $p \geq 0,05$ ). Доказательством участия данного фермента в патогенезе БА является повышение его концентрации в сыворотке крови больных со среднетяжелым течением (933,72 [902,51; 1088,50] нг/мл), тогда как с легким их величина составила 481,53 [384,20; 572,35] нг/мл. У больных, страдающих АД, также зарегистрировано повышение концентрации MMP9 при диффузных формах заболевания (897,45 [624,51; 924,71] нг/мл) по сравнению с ограниченным (322,09 [257,33; 423,47] нг/мл) и распространенным (555,41 [227,98; 656,12] нг/мл) поражением кожи ( $p = 0,046$ ). Анализ данных, полученных в группе пациентов, страдающих сочетанием БА+АД, установил, что у них также отмечается значимое повышение показателей MMP9 в сыворотке крови (473,02 [339,33; 687,26] нг/мл) по сравнению с контрольной группой (251,80 [155,67; 352,79] нг/мл) [ $p = 0,003$ ]. При этом методом ROC-анализа было установлено, что повышение значений MMP9 более 397 нг/мл ассоциировано с повышенным риском развития сочетания БА+АД у детей.

Таким образом, проведенное нами исследование показало насколько значимо влияние факторов роста (VEGF A, TGF  $\beta$ 1) и металлопротеиназы 9 на течение аллергических заболеваний у детей. Это позволило сделать следующий шаг на пути к пониманию данной проблемы и провести комплекс

генетических исследований, посвященных изучению особенностей наследования данных факторов.

На данном этапе исследования проведен подробный анализ ассоциации полиморфных локусов генов исследуемых факторов роста ( $-634G > C$  гена *VEGFA*, *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>*,  $2073A > T$  гена *EGFR*) и некоторых матриксных металлопротеиназ ( $-8202A > G$  гена *MMP9*,  $320A > C$  гена *MMP20*,  $837T > C$  гена *MMP20*) с риском развития БА, АД и сочетанного варианта БА+АД у детей. Всего в данный раздел исследования было включено 152 пациента с аллергическими заболеваниями и 122 ребенка I и II групп здоровья в возрасте до 18 лет.

Статистический анализ полученных данных позволил выявить значимые отличия по частоте встречаемости генотипов и аллелей среди пациентов с аллергическими заболеваниями и детей, входящих в контрольную группу, в отношении следующих однонуклеотидных замен: *25Pro* гена *TGF-β1* и  $320A > C$  гена *MMP20* ( $p < 0,05$ ). При этом установлено, что взаимодействие данных полиморфных вариантов значительно повышает риск развития аллергических заболеваний у детей.

При этом зарегистрированы статистически значимые различия частот аллелей и генотипов по полиморфизму  $-634G > C$  гена *VEGFA* между группой больных БА и контрольной группой ( $p = 0,01$ ). Проведенное генетическое исследование показало, что у гетерозигот по данному полиморфному локусу риск развития БА в 2 раза выше по сравнению с носителями других генотипов (OR составил 2,39).

Важно отметить, что данный полиморфизм определяет уровень экспрессии фактора роста эндотелия сосудов, доказательством этому является значительное повышение концентрации *VEGFA* в сыворотке крови носителей гетерозиготного генотипа по сравнению с гомозиготами ( $p = 0,010$ ).

Установлено, что у детей, страдающих БА, являющихся носителями *ArgArg*-генотипа по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* риск развития бронхиальной астмы значительно повышен (OR составил 10,57; 95 % CI – 4,17-26,79,  $p < 0,001$ ). При этом носительство данного полиморфного варианта сопряжено с повышением экспрессии трансформирующего фактора роста  $\beta$  у детей (2,69 [2,26; 277,62] пг/мл). Проведенный анализ ген-генных взаимодействий установил наличие синергизма между полиморфизмами *837T > C* гена *MMP20* и *Arg25Pro* гена *TGFβ* (2,13 %), а также полиморфизмами *-8202A > G* гена *MMP9* и *2073A > T* гена *EGFR* (3,19 %).

В группе пациентов, страдающих АД, в отличие от больных БА, проведенный анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей по исследуемым полиморфизмам позволил выявить достоверные отличия только в отношении *8202A > G* полиморфизма гена *MMP9*. При этом установлено, что у детей с генотипом *A/A* риск развития АД повышен в 7,55 раза ( $OR = 7,55 [95 \% CI - 2,97 - 19,21, p < 0,001]$ ) и сопряжен с повышенной экспрессией данной протеазы (504,83 [209,78; 583,98] нг/мл) по сравнению с носителями гетерозиготного состояния полиморфизма (480,00 [266,43; 955,36] нг/мл).

Дальнейший анализ ген-генных взаимодействий у пациентов, страдающих АД, установил наличие выраженного синергизма между полиморфизмами *320A > C* гена *MMP20* и *-634G > C* гена *VEGFA* (3,36 %). Несмотря на низкую информационную ценность каждого гена (*MMP20* – 2,11 % и *VEGFA* – 0,24 %), вносимый совместный вклад данных генов в развитие АД в большей степени усиливается их взаимодействием и равен 12,19 %. Между полиморфизмами *837T > C* гена *MMP20* и *-8202A > G* гена *MMP9* также отмечен значительный синергизм (2,64 %). Однако наиболее значимым в развитии АД у детей является полиморфизм *-8202A > G* гена *MMP9*, его информационная значимость составила 6,99 %, а также этот факт

подтверждается данными, полученными в результате анализа частот аллелей и генотипов индивидуальных SNP при АД.

В группе больных с сочетанием БА и АД анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов выявил статистически значимые отличия по полиморфизмам *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и *2073A > T* гена *EGFR*. Причем важно отметить, что различия по частоте встречаемости генотипов *Arg25Pro*-полиморфизма гена *TGFβ<sub>1</sub>* характерны как для группы пациентов, страдающих БА, так и пациентов с аллергическими заболеваниями в целом. Установлено, что аллельный *Arg/Arg*-вариант гена *TGFβ<sub>1</sub>* является сильным фактором риска развития сочетаний БА+АД у детей ( $OR = 6,57 [95 \% CI - 3.02 - 14.33, p < 0,001]$ ). Однако, при этом, в отличие от пациентов, страдающих кожными проявлениями аллергии, достоверно значимых отличий по частоте встречаемости генотипов и аллелей полиморфного варианта *-8202A > G* гена *MMP9* у больных с сочетанием БА и АД установлено не было ( $p > 0,05$ ). Анализ содержания MMP9 в сыворотке крови носителей различных состояний данного полиморфизма показал, что максимальные концентрации данной протеазы отмечаются у гетерозигот *AG* -  $687,26 [472,08; 962,36]$  ( $p_{123} = 0,005$ ).

Значительная фенотипическая вариабельность клинической картины аллергических заболеваний у детей указывает на существование эффекта взаимодействия многих генов, что предполагает наличие определенных комбинаций генетических вариантов у больных. Поэтому для оценки сочетанного вклада различных аллельных вариантов генов в патогенез атопии нами был проведен анализ межгенных взаимодействий.

Установлено, что наиболее сильное взаимодействие отмечается между полиморфными локусами *837T > C* гена *MMP20* и *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>*. Более слабая связь отмечается в отношении данных полиморфизмов и *320A > C* гена *MMP20*. Дальнейший анализ ген-генных взаимодействий при сочетании БА и АД у детей позволил выявить наличие значительного

синергизма между полиморфизмами  $320A > C$  гена *MMP20* и  $-8202A > G$  гена *MMP9* (2,31 %). Несмотря на то, что информационная ценность каждого отдельного локуса незначительна ( $320A > C$  гена *MMP20* – 0,91 % и  $-8202A > G$  гена *MMP9* – 1,17 %), их взаимодействие значительно увеличивает риск развития сочетания БА+АД (4, 39 %). При этом важно отметить, что локусы  $634G > C$  гена *VEGFA* и *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* дублируют эффекты друг друга.

Принимая во внимание высокую значимость в патогенезе аллергических заболеваний таких факторов роста, как *VEGFA* и *TGFβ<sub>1</sub>*, а также *MMP9*, для изучения генетических особенностей наследования полиморфных вариантов данных цитокинов нами проведен дополнительный анализ межгенного взаимодействия  $-634G > C$  гена *VEGFA*, *Arg25Pro* гена *TGFβ<sub>1</sub>* и  $-8202A > G$  гена *MMP9* у больных всех трех групп.

Показано, что в группе больных БА максимальный вклад в развитие БА вносит полиморфизм *Arg25Pro* гена *TGF β<sub>1</sub>* (10,94 %). Однако, несмотря на низкую информационную ценность генов *MMP9* (1,53 %) и *VEGFA* (3,34 %), их синергический эффект приводит к усилению взаимодействия и совместный вклад этих генов равен 5,59 %.

Установлено, что в группе больных АД максимальное влияние на патогенез заболевания оказывает полиморфный вариант  $-8202A > G$  гена *MMP9*, его вклад в развитие заболевания составил 6,99 % , при этом данный полиморфный локус обладает синергичным эффектом с  $634G > C$  гена *VEGFA*. А его взаимодействие с полиморфизмом *Arg25Pro* гена *TGF β<sub>1</sub>* значительно повышает риск развития заболевания (11,03 %).

В когорте больных с сочетанием БА и АД, также как в первой группе, выявлено максимально влияние полиморфного варианта *Arg25Pro* гена *TGF β<sub>1</sub>* (6,77 %). Однако при этом сила взаимодействия его с другими исследуемыми полиморфными локусами суммарно повышает риск развития сочетания БА+АД на 17,6 %. Еще одним доказательством наличия

взаимодействия данных полиморфизмов показала дендрограмма кластерной структуры, причем сила связи имеет примерно равные значения среди всех генов.

Полученные нами результаты генетических исследований еще раз показали, насколько важно изучение вклада не только отдельных полиморфизмов, но и сочетаний аллелей в патогенез аллергических заболеваний у детей. А анализ результатов ген-генного взаимодействия позволил выявить ряд клинически значимых взаимодействий исследуемых полиморфных вариантов, предрасполагающих к формированию аллергических заболеваний. Полученные данные по изучению аспектов наследования и уровня экспрессии данных факторов роста и металлопротеиназ позволили разработать программы прогнозирования течения заболевания для самых тяжелых больных – пациентов, имеющих клинические проявления как БА, так и АД одновременно.

В ходе данной работы на основании результатов клинических, анамнестических и генетических исследований была разработана модель прогноза неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей, одновременно страдающих бронхиальной астмой и атопическим дерматитом.

Прежде чем приступить к разработке данной модели, все обследованные нами пациенты в зависимости от ответа на проводимую им терапию были разделены на две основные подгруппы: больные с неконтролируемым течением заболевания (им был присвоен ранг «1») и пациенты с контролируемой и частично контролируемой БА (ранг «0»). Далее с помощью пошагового дискриминантного анализа нами были отобраны показатели, которые в совокупности обладали высокой дискриминантной мощностью и позволили разделить обследованных нами пациентов на две подгруппы - с контролируемым и неконтролируемым течением БА. В этот комплекс факторов вошли: возраст детей в годах, тяжесть течения заболевания (1 балл легкое, 2 балла – среднетяжелое и 3 балла тяжелое течение), особенности аллергоанамнеза (0 – неотягощенный

аллергоанамнез; 1 – аллергоанамнез, отягощенный по материнской линии; 2 – аллергоанамнез, отягощенный по отцовской линии, 3 – по обеим линиям родства); результаты генетического анализа на определение полиморфизма *A-8202G* гена *MMP9* (в случае наличия *8202G*-аллели - 1 балл, при его отсутствии - 0 баллов).

Для определения риска развития неконтролируемого течения БА у больных с сочетанием БА и АД методом дискриминантного анализа были найдены коэффициенты и определены математические выражения для двух дискриминантных функций ( $F_1$  и  $F_2$ ), организованные в модель. При этом  $F_1$  соответствует заключению об отсутствии риска неконтролируемого течения БА;  $F_2$  – заключению о высоком риске неконтролируемого течения БА.

При использовании модели для определения риска неконтролируемого течения заболевания индивидуальные значения показателей пациента либо рангов больного вносят в каждое из двух уравнений для функций  $F_1$  и  $F_2$ , рассчитывают два значения  $F_1$  и  $F_2$ , делают вывод в пользу той функции и соответствующего заключения, значение которой выше. Если  $F_2 > F_1$ , то риск неконтролируемого течения БА высокий, а если  $F_1 > F_2$ , то низкий.

Все показатели, включенные в модель, имеют высокое значение Wilks' Lambda (лямбды Уилкса). Соответствующий каждому показателю критерий  $F$  превышал критическое значение и имел высокую доверительную значимость  $p$  ( $p < 0,05$ ). Наибольшей дискриминантной значимостью по  $F$ -критерию при разделении больных на две группы при прогнозе риска неконтролируемого течения, обладал ранг тяжести заболевания.

Общее значение Wilks' Lambda для всей комплексной модели составило 1,648, статистическая значимость  $p < 0,012$  определялась по критерию  $F$ , составившему 3,92.

Разработанная нами модель позволяет достаточно быстро определить прогноз неконтролируемого течения БА у ребенка с сочетанием БА+АД. Для облегчения работы врача нами создана компьютерная программа,

позволяющая после внесения данных пациента в течение нескольких секунд автоматически рассчитать значения F1 и F2.

С помощью данного способа было обследовано 26 детей, страдающих бронхиальной астмой с атопическим дерматитом. Согласно критериям, приведенным в рекомендательных документах [GINA (2020) и Национальной программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2017)] у 18 детей было диагностировано неконтролируемое течение БА, а у 8 детей контролируемое течение. Применение разработанной нами модели показало, что у 17 больных был получен положительный прогноз в отношении риска развития неконтролируемого течения БА. Следовательно, диагностическая чувствительность составила 94,4%. Из 8 больных с контролируемым течением заболевания, используя модель, у 7 пациентов был установлен прогноз отсутствия риска неконтролируемого течения заболевания. Следовательно, диагностическая специфичность составила 87,5%. Диагностическая эффективность модели составила 92,3%.

Также нами была создана модель прогнозирования тяжелой БА у детей, имеющих сочетанием БА и АД. Прежде чем приступить к ее разработке, все обследованные нами пациенты были рандомизированы на две группы: 1 – риск тяжелой степени БА максимальный, 0 – минимальный. Данная модель основывается на показателях TGF- $\beta$  и VEGFA в сыворотке крови больных. Разработанная модель имеет высокую статистическую значимость: критерий Хи квадрат составил 13,284 при  $p = 0,001$ .

Для автоматизированного расчета величины коэффициента прогноза создан файл на основе табличного процессора Excel, в котором с помощью разработанной нами формулы рассчитывается коэффициент и формируется заключение о прогнозе тяжести БА. Концентрация факторов риска вводится в область данных больных, маркированную желтым цветом и после нажатия Enter автоматически появляется значение K, выделенное красным цветом шрифта и заключение.

Для оценки чувствительности и специфичности данной модели проведено обследование 29 детей, страдающих бронхиальной астмой с атопическим дерматитом. Согласно критериям, приведенным в рекомендательных документах [GINA (2020) и Национальной программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2017)] у 23 детей было диагностировано тяжелое течение БА, а у 6 детей легкое и среднее течение. Применение разработанной нами модели показало, что у 20 больных был получен положительный прогноз в отношении риска развития тяжелого течения БА. Следовательно, диагностическая чувствительность составила 87%. Из 6 больных с легким и средним течением заболевания, используя модель, у 5 пациентов был установлен прогноз отсутствия риска тяжелого течения заболевания. Следовательно, диагностическая специфичность составила 83,3%. Диагностическая эффективность модели составила 86,2%.

Разработанные нами модели и программы не только являются высокоинформативными инструментами для прогнозирования течения заболевания у детей, но и позволяют оптимизировать тактику ведения пациентов с данной патологией и предотвратить развитие тяжелых осложнений у детей.

Однако, если говорить о больных с тяжелыми клиническими проявлениями заболевания, стоит отметить, что у большинства из них отмечались достаточно низкие показатели как TGF  $\beta$ 1, так и MMP9 в сыворотке крови, что диктует необходимость не только выявления данных пациентов с использованием рутинных методов диагностики, но и более углубленного подхода к изучению патогенетических основ данных нозологических форм. Исследование молекулярных особенностей патогенеза аллергических заболеваний у данных пациентов позволяет не только выявить белки-отличия, но и изучить механизмы формирования хронического

аллергического воспаления как кожи, так и бронхов у детей на уровне протеома.

На данном этапе исследования нами были отобраны только больные с тяжелыми проявлениями заболевания и невыраженным ответом на проводимую стандартную терапию. Полученные от данных пациентов биообразцы были изучены с помощью программы PDQuest. Результатом проделанной работы стали двумерные электрофореграммы, на которых отображаются в виде пятен обнаруженные белки на геле, иными словами «белковые портреты» сыворотки крови больных. Каждому пятну при обработке программа автоматически присваивает уникальный номер – SSP (standart spot number). Анализ полученных двумерных электрофореграмм белков сыворотки крови больных, страдающих БА, АД и сочетанием БА+АД, при окраске флуоресцентным красителем Flamingo позволил выявить различия в протеомном спектре в диапазоне молекулярных масс 25-59 кДа по сравнению со здоровыми детьми.

А также на основании оценки интенсивности пятен на протеинограммах нами были установлены общие изменения в протеоме сыворотки, характерные для всех больных с аллергическими заболеваниями, а также характерные отличия белковых спектров отдельных нозологий и контрольной группы.

При сравнительном анализе протеомных спектров детей контрольной группы и больных, страдающих БА, АД и сочетанием БА+АД, было установлено для 12 белков (SSP 2104,2310,2313,4103, 4209, 5203, 5205, 5311, 5407, 6412, 6204, 6208) отмечается снижение их содержания (или даже полное отсутствие) при различных патологиях.

Подробный анализ протеинограмм в каждой группе обследованных пациентов позволил выявить следующие отличия. Так, у детей, страдающих БА, отмечено, что продукция 16 белков снижалась (диапазон Mr = 25-59 кДа) и 4 – повышалась (диапазон Mr = 25-39 кДа) в сыворотке крови

относительно группы контроля. В то время как среди больных атопическим дерматитом отмечено повышение экспрессии 3 белков (SSP 3303, 4110, 6101) и подавление – 19 белков, из которых 10 белковых пятен (SSP 2313, 3302, 4103, 4208, 4209, 5202, 6102, 6412, 8206, 8301) полностью отсутствовали на протеинограммах. Особенно следует отметить белковое пятно SSP 6101, интенсивность которого была выше на 1505.8 % и белковое пятно SSP 5311, интенсивность которого была ниже на 507 % по сравнению с группой контроля.

В группе больных с сочетанием БА и АД также зарегистрированы значимые отличия относительно контрольной группы: выявлено повышение содержания 3 протеинов (SSP 6102, 7203, 8206) в сыворотке крови и уменьшение – 18 белков, из них 8 пятен (SSP 2310, 2333, 3302, 3303, 4103, 4208, 6101, 8301) полностью отсутствовали на двумерных картах.

Следует отметить, что в протеомном спектре сыворотки больных как с кожными проявлениями атопии, так и с сочетанием АД+БА, отмечаются схожие особенности: 10 белков (SSP 2104, 2310, 4209, 5203, 5205, 5311, 5407, 6412, 6204, 6208) и 5 белков (SSP 8301, 4208, 4103, 3302, 2313) отсутствовали относительно нормального спектра. Наличие данных изменений протеомного спектра может свидетельствовать об общности патогенетических процессов данных нозологий.

На следующем этапе исследования нами проведена идентификация белков методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с использованием программы BioTools версии 3.2 («Bruker», Германия) с поиском соответствующих кандидатов в базе данных Swiss-Prot (2013\_12) с использованием локальной версии программы Mascot Search 2.4.1 («Matrix Science», США). Среди всех представленных в таблице белков удалось идентифицировать четыре белка: SPP 4209 – транстиретин (TTHY); SPP 6208 – фрагмент компонента комплемента 4b (C4b); SPP 4110 – глутатионпероксидаза 3 (GPX3); SPP 7203 – фрагмент компонента комплемента 3 (C3).

При этом установлено, что у больных, страдающих БА, отмечено значимое снижение экспрессии всех идентифицированных молекул. В то время как у пациентов с АД зарегистрировано снижение интенсивности пятен ТТНУ, СО4b, СО3, сопряженное с повышением концентрации GPX3 в сыворотке крови. Если же говорить о пациентах с сочетанием БА и АД, то у них также выявлено снижение экспрессии ТТНУ, СО4b, GPX3, как и у больных БА, однако при этом на 14,2 % повышена интенсивность пятна СО3 на двумерных протеинограммах.

Стоит отметить, что идентифицированные нами белки выполняют ряд важных функций в организме человека и изменение их экспрессии позволяет составить определенное представление об их роли в патогенезе аллергических заболеваний у детей.

Так, например, глутатионпероксидаза является одним из главнейших ферментов, отвечающих за поддержание кислотно-основного состояния в клетках и нивелирующего негативное влияние гидропероксидной «нагрузки» в период обострения заболевания и оксидативного стресса в целом. Но кроме того, что GPX3 является ключевым ферментом в антиоксидантной защите клеток эпителия при хроническом аллергическом воспалении, она также участвует в ряде других патогенетических механизмов при аллергических заболеваниях у детей (рис. 67).

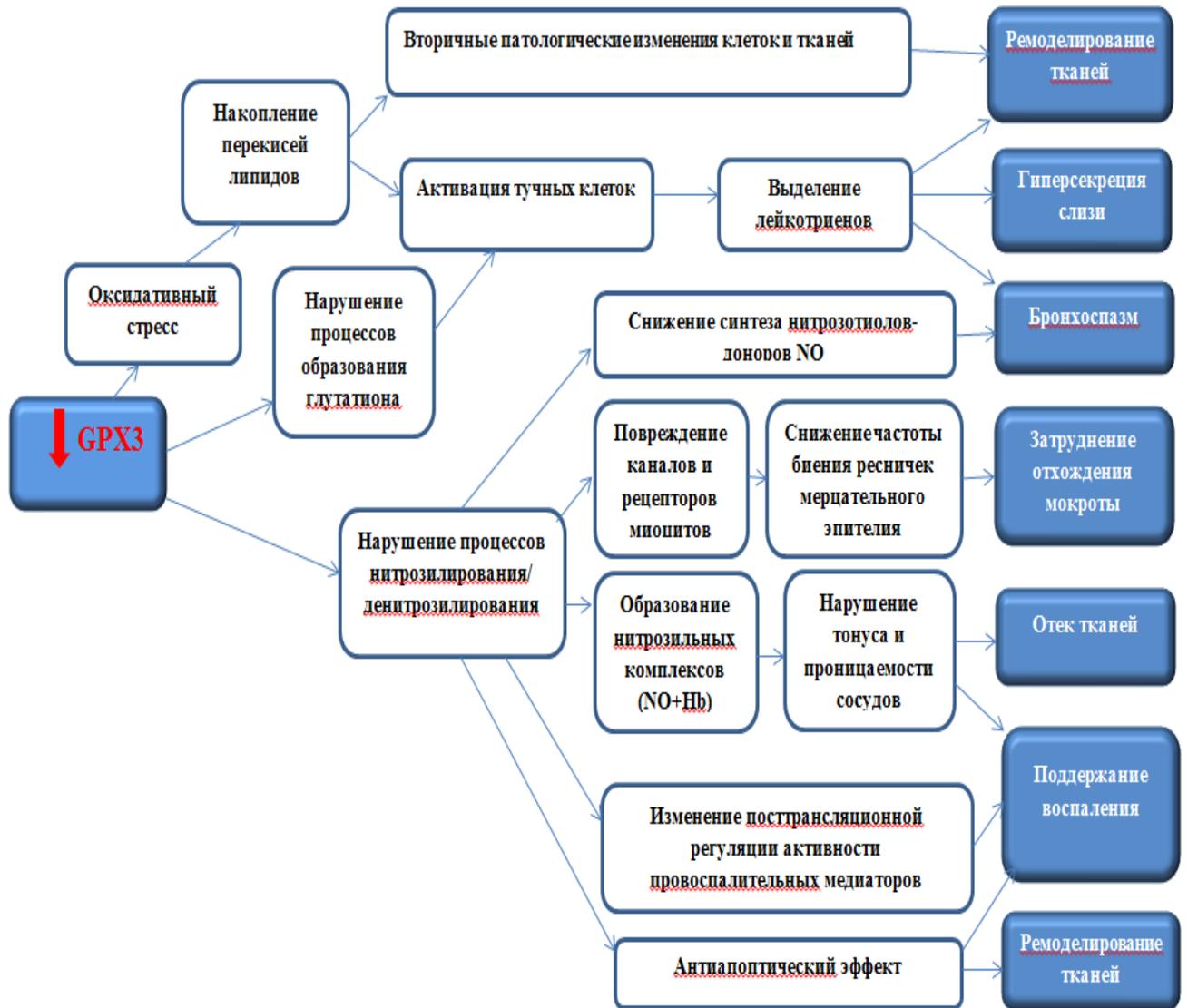


Рисунок 67. Роль снижения экспрессии глутатионпероксидазы в патогенезе аллергического воспаления

Если говорить о транстретине, то стоит отметить, что он является одним из основных переносчиков ретинола и тироксина в организме. Благодаря ТТНУ происходит своевременное удаление ретинола из тканей, что предотвращает образование ретиноидных метаболитов (ретиноидов), способных вызывать развитие ряда негативных реакций (рис. 68).

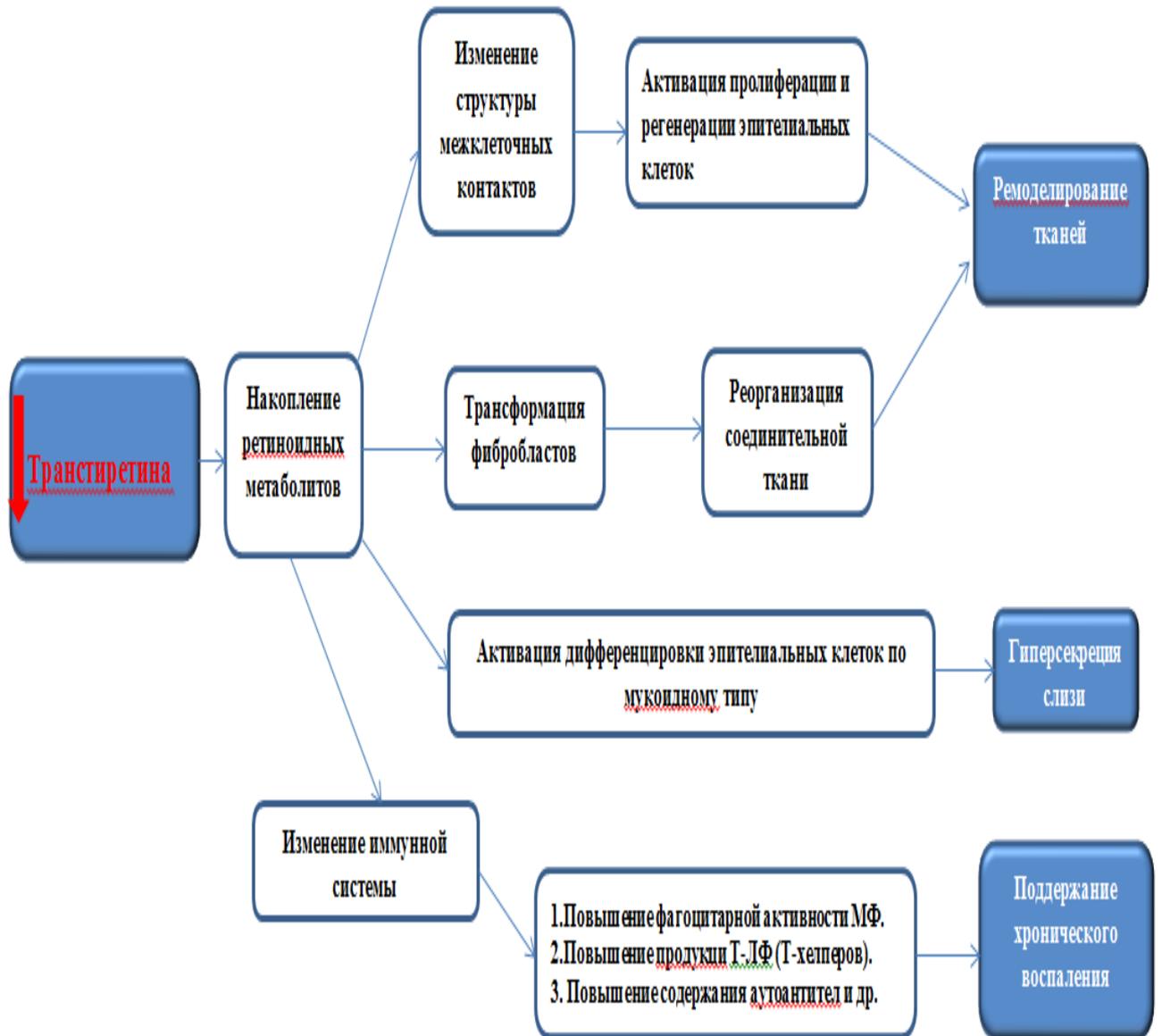


Рисунок 68. Роль снижения экспрессии транстретина в патогенезе аллергических заболеваний

Витамин А и производные ретиноидов играют ключевую роль в физиологии кожи и кожных придатков. Биоактивные ретиноевые кислоты также влияют на различные аспекты аллергического воспаления кожи (обеспечивают системный сдвиг Th1/Th2 [9,17,18], а также способствуют поддержанию местного аллергического воспаления кожи.

Важное место в патогенезе аллергических заболеваний занимают C3 и C4 фракции системы комплемента – это белки острой фазы, их концентрация значительно изменяется в сыворотке крови во время воспаления и повреждения тканей. Проведенные нами протеомные исследования сыворотки крови больных БА, АД и имеющих сочетание данных патологий, напротив, выявили снижение синтеза данных фракций комплемента. Нами установлено значительное снижение экспрессии фрагмента комплемента C4 (UniProtKB - P0C0L5) с молекулярной массой 24 кДа, а также фрагмента комплемента C3 (UniProtKB - P01024) с молекулярной массой 23 кДа. Снижение уровня данных молекул в сыворотке крови больных детей, страдающих аллергическими заболеваниями, может быть следствием хронического воспаления и истощения компенсаторных возможностей организма (рис. 69).



Рисунок 69. Роль C3 и C4 фракций системы комплемента в патогенезе аллергических заболеваний

Проведенный протеомный анализ сыворотки крови больных с аллергическими заболеваниями позволил выявить несколько дифференцированно выраженных белков по сравнению с контрольной группой. Модификация продукции данных белков свидетельствует о наличии повреждений на молекулярном уровне, приводящих к метаболическим и

функциональным нарушениям в организме больного. Установленные в ходе данного исследования особенности протеомного спектра у детей с аллергическими заболеваниями расширяют наши представления о молекулярных аспектах патогенеза БА и АД, что обеспечивает новые возможности для диагностики и терапии их у детей.

На основании полученных в ходе проведенного исследования данных можно предположить, что невоспалительные факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов, трансформирующий фактор роста  $\beta 1$ , металлопротеиназа 9, а также полиморфные варианты генов, ответственных за их экспрессию играют важную роль в формировании БА, АД, а также их сочетания. Кроме того, важны трансформации, происходящие на молекулярном уровне, а именно изменение уровня транстиретина, глутатионпероксидазы и С4В и С3 компонентов системы комплимента, которые запускают различные патогенетических механизмы в организме больного ребенка. Сформированная на основании полученных данных новая концепция патогенеза БА и АД, отличающаяся включением невоспалительных молекулярно-генетических факторов, позволяет сделать еще один шаг вперед на пути к персонифицированной медицине, к ранней диагностике и подбору адекватной терапии ребенку с учетом его индивидуальных молекулярно-генотипических особенностей.

А полученные в ходе научного исследования результаты востребованы как в научной среде, так и в практическом здравоохранении, т.к. аллергические заболевания считаются серьезной проблемой общественного здоровья. Применение современных, неинвазивных методов позволило разработать комплексный подход не только к диагностике, но и прогнозированию течения БА, АД и сочетанием этих нозологий у детей. А выявление факторов, предрасполагающих к их тяжелому течению у растущего ребенка, является ключевым аспектом профилактических мероприятий.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что у больных, страдающих БА в сочетании с АД, отмечается более тяжелое течение заболевания по сравнению с пациентами с монопатологией ( $p = 0,05$ ), и большинство из них имеют отягощенный аллергоанамнез (71,2 %). При этом среди всех обследованных детей с БА повышенные уровни общего IgE зарегистрированы только в 39,8 % случаев и не коррелируют с уровнем контроля над заболеванием, а также показателями функции внешнего дыхания и степенью тяжести ДН, зафиксированной при поступлении в стационар ( $p > 0,05$ ).
2. Показано, что у больных с бронхиальной астмой, атопическим дерматитом и сочетанием данных нозологий отмечается повышение концентрации VEGFA, TGF $\beta$ , MMP9 в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), а выявленная корреляционная зависимость между степенью тяжести БА и показателями VEGFA и TGF $\beta$  в сыворотке крови больных свидетельствует о значимой роли этих факторов в генезе данного заболевания.
3. Зарегистрированы статистически значимые различия частот аллелей и генотипов по полиморфизмам -634G > C гена VEGFA и Arg25Pro гена TGF $\beta_1$  между группой больных БА и детьми контрольной группы ( $p = 0,01$ ), по полиморфному варианту -8202A > G гена MMP9 у детей с АД и группой контроля ( $p < 0,001$ ), а также по полиморфизму Arg25Pro гена TGF $\beta_1$  у больных с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита ( $p = 0,01$ ).
4. Установлено, что у детей, являющихся носителями ArgArg-генотипа по полиморфизму Arg25Pro гена TGF $\beta_1$ , значительно повышен риск развития как бронхиальной астмы (OR составил

10,57; 95 % CI – 4,17-26,79,  $p < 0,001$ ), так и сочетания бронхиальной астмы и атопического дерматита ( $OR = 6,57$  [95 % CI – 3.02 – 14.33,  $p < 0,001$ ]). Выявлено, что у носителей аллельного A/A-варианта полиморфизма -8202A > G гена *MMP9* риск развития АД повышен в 7,55 раза ( $OR = 7,55$  [95 % CI – 2,97 – 19,21,  $p < 0,001$ ]).

5. Разработаны статистически значимые модели межгенного взаимодействия полиморфных вариантов 634G > C гена *VEGFA*, Arg25Pro гена *TGFβ<sub>1</sub>* и -8202A > G гена *MMP9* для всех трех групп обследованных пациентов. Во всех моделях установлены сильные синергичные связи между исследуемыми полиморфными локусами, способствующие повышению риска развития БА и АД у детей.
6. Установлено, что у детей, страдающих бронхиальной астмой, атопическим дерматитом, а также их сочетанием отмечаются различия в протеомном спектре сыворотки крови в диапазоне молекулярных масс 25-59 кДа по сравнению с контрольной группой. Среди идентифицированных молекул у больных БА отмечено значимое снижение экспрессии по таким белкам, как глутатионпероксидаза 3, транстретин, а также C4B и C3 компонентам системы комплемента. В то время как у пациентов с АД зарегистрировано снижение интенсивности пятен ТТНУ, СО4b, СО3, сопряженное с повышением концентрации GPX3 в сыворотке крови. У пациентов с сочетанием бронхиальной астмы и атопического дерматита выявлено снижение экспрессии ТТНУ, СО4b, GPX3, как и у больных БА, однако при этом на 14,2 % повышена интенсивность пятна СО3 на двумерных протеинограммах. Модификация продукции данных белков свидетельствует о наличии повреждений на молекулярном уровне.

7. Разработанные на основании анамнестических данных и результатов молекулярно-генетического обследования пациентов модели прогнозирования течения БА, АД и их сочетания у детей позволяют оптимизировать подходы к диагностике, прогнозированию течения и лечению больных.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовать использование программ расчета коэффициента риска развития тяжелого течения БА, АД и сочетания БА и АД у детей специалистам первичного звена здравоохранения для проведения коррекции терапии у пациентов.
2. Необходимо для прогнозирования тяжести течения аллергического заболевания у ребенка определение уровня *VEGFA*, *TGFβ1* и *MMP9* в сыворотке крови.
3. У больных с БА или АД необходимо проводить определение полиморфных вариантов *-634G > C* гена *VEGFA* и *Arg25Pro* гена *TGFβ1* для дальнейшей оптимизации тактики ведения данных пациентов. В случае выявления *ArgArg*-генотипа или гетерозиготного варианта *-634G > C* гена *VEGFA* осуществлять регулярный диспансерный контроль за состоянием ребенка и рекомендовать перейти на более высокую степень терапии.
4. Рекомендовать использование моделей и программ прогнозирования течения заболеваний у детей, одновременно страдающих и БА и АД, построенных на основании генетических и биологических результатов обследования пациентов.
5. Полученные в ходе исследования данные о роли фактора роста эндотелия сосудов, трансформирующего фактора роста, металлопротеиназы 9 и особенностях их наследования в патогенезе БА, АД и сочетания данных патологий у детей могут быть рекомендованы к использованию в учебном процессе при изучении разделов педиатрии, касающихся диагностики и лечения больных, страдающих аллергическими заболеваниями.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БА – бронхиальная астма

АД – атопический дерматит

TGF – трансформирующий фактор роста

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

EGFR – рецептор эпителиального фактора роста

MMP - металлопротеиназа

ОФВ1 – объем формированного выдоха за 1 секунду

ФЖЕЛ – функциональная жизненная емкость легких

IL – интерлейкины

HIF - гипоксия-индуцирующий фактор

IgE - иммуноглобулин E

SCORAD – шкала для оценки степени тяжести АД

ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь

ТШХ - тест с 6-минутной ходьбой

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПСВ - пиковая скорость выдоха

ИФА - иммуноферментный анализ

MDR - (Multifactor Dimensionality Reduction) алгоритм снижения размерности

ОРВИ – острые респираторно-вирусные инфекции

ТИМП – тканевой ингибитор металлопротеиназ

GPX3 - глутатионпероксидаза 3

ТТНУ - транстиретин

С4-В - компонент комплемента С4-В

С3 - компонент комплемента С3

GSH - глутатиона

LTC4 - лейкотриены

GSNO - S-нитрозоглутатион

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абатуров, А.Е. Нозоспецифические особенности редокс-процессов при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких / А.Е. Абатуров, А.П. Волосовец, Т.П. Борисова // Здоров'я дитини. – 2017. – Т. 12, № 6. – С.728-735.
2. Анализ полиморфных маркеров иммунного ответа и ремоделирования ткани при профессиональном хроническом бронхите / Л.З. Ахмадишина, Г.Ф. Корытина, О.В. Кочетова [и др.] // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 11. – С. 1363–1373.
3. Арчаков, А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика – науки о жизни XXI столетия / А.И. Арчаков // Вопросы медицинской химии. – 2000. – №1. – С. 4-7.
4. Ассоциация полиморфизма 6986A>G гена Сур3а5 с эффективностью противовоспалительной терапии у детей с бронхиальной астмой / А.К. Застрожина, И.Н. Захарова, Д.А. Сычев и др. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 73-77.
5. Атопический дерматит у детей. Союз педиатров России / под ред. А.А. Баранова, Л.С. Намазовой-Барановой, Р.Х. Хаитова и др. – М.: ПедиатрЪ, 2020. – 92 с.
6. Атопический дерматит у детей: клинические рекомендации / МЗ РФ. – М., 2016. – 60 с. – URL: <https://www.pediatr-russia.ru/information/klin-rek/deystvuyushchie-klinicheskie-rekomendatsii/АтД%20дети%20СПР.v2.pdf> (12.08.2020).
7. Атопический дерматит у детей: современные клинические рекомендации по диагностике и терапии / Л.С. Намазова-Баранова, А.А. Баранов, А.А. Кубанова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 279-294.

8. Атопический дерматит, современная стратегия в терапии / В.А. Ревякина, А.В. Таганов, Е.Д. Кувшинова [и др.] // Лечащий врач. 2019. № 5. С. 32.
9. Балаболкин, И.И. Атопический дерматит у детей: современный взгляд на развитие и тенденции в терапии / И.И. Балаболкин // Российский педиатрический журнал. – 2020. – Т. 23, № 4. – С. 265-270.
10. Балаболкин, И.И. Современный взгляд на развитие и подходы к терапии атопического дерматита у детей / И.И. Балаболкин, В.А. Булгакова, Т.И. Елисеева // Фарматека. – 2020. – Т. 27, № 1. – С. 20-27.
11. Бережанский, П.В. Значение микроциркуляторных нарушений в патогенезе респираторной аллергии / П.В. Бережанский, И.М. Мельникова, Ю.Л. Мизерницкий // Вестник СурГУ. Медицина. – 2012. – № 13. – С. 6-14.
12. Блинчикова, М.С. Влияние концентрации показателей цитокинового профиля крови на степень тяжести бронхиальной астмы / М.С. Блинчикова // Инновации и инвестиции. – 2013. – №7. – С.173-175.
13. Бронхиальная астма: клинические рекомендации / МЗ РФ. – М., 2019. – 97 с. – URL: [https://spulmo.ru/upload/kr\\_bronhastma\\_2019.pdf](https://spulmo.ru/upload/kr_bronhastma_2019.pdf) (12.08.2020).
14. Бронхиальная астма: рук-во для врачей. Сер. 17. Болезни детского возраста от А до Я / Н.И. Ильина, О.М. Курбачева, Г.А. Новик [и др.]; Союз педиатров России; Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов. – 4-е изд., испр. и доп. – М., 2020. – 82 с.
15. Взаимосвязь цитокинового статуса и эозинофилии у детей с аллергическими бронхолегочными заболеваниями / Е.А. Ружицкая, Т. А. Миненкова, Ю.Л. Мизерницкий [и др.] // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10, Вып. 4. – С. 89-94.

16. Ганусевич, И.И. Роль матриксных металлопротеаз (ММП) при злокачественных новообразованиях / И.И. Ганусевич // Онкология. – 2010. – Т. 1, №1. – С. 10–16.
17. Генетико-биохимические механизмы вовлеченности ферментов антиоксидантной системы в развитие бронхиальной астмы / А.В. Полоников, В.П. Иванов, А.Д. Богомазов, М.А. Солодилова // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 4. – С. 427-439.
18. Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей, больных атопическим дерматитом / Л.М. Огородова, О.С. Федорова, Е.Ю. Брагина [и др.] // Пульмонология. – 2007. – № 4. – С. 37-40.
19. Говорун, В.М. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях / В.М. Говорун, В.Т. Иванов // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37, № 2. – С. 199-215.
20. Диагностика и терапия бронхиальной астмы у детей дошкольного возраста. Место небулизированных ингаляционных глюкокортикостероидов в терапии бронхиальной астмы и крупа (консенсус по результатам совета экспертов педиатрического респираторного общества) / Н.А. Геппе, Н.Г. Колосова, О.В. Зайцева [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 124-132.
21. Диагностическое значение исследования фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови / Н.Б. Захарова, Д.А. Дурнов, В.Ю. Михайлов [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 11. – С. 215-220.
22. Зависимость активности ММП в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса / М.В. Протасов, Л.В. Смагина, О.В. Галибин [и др.] // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 10. – С. 882–886.

23. Иванов, О.Л. Атопический дерматит: современные представления / О.Л. Иванов, А.Н. Львов, А.В. Миченко // Дерматология. – 2007. – Т. 15, № 19. – С. 1362-1366.
24. Изменение показателей врожденного иммунитета при тяжелой бронхиальной астме у детей / Л.В. Ганковская, Л.С. Намазова-Баранова, Г.В. Порядин [и др.] // Медицинская иммунология. 2019. №1. URL:
25. Изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов RS1800470 гена трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  (TGFB1) и RS231775 гена цитотоксического т-лимфоцит-связанного иммуноглобулина 4 (CTLA4) с риском развития бронхиальной астмы / А.В. Разводовская, И.И. Черкашина, С.Ю. Никулина [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – Вып. 54. – С. 24–29.
26. Ильченко, С.И. Значение уровня сывороточного трансформирующего фактора роста в ремоделировании бронхов у подростков–курильщиков / С.И. Ильченко, А.А. Фиалковская, С.Г. Иванусь // Медицинские науки. Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). – 2015. – № 10(19). – С. 78–81.
27. Иммунитет и атопия. Особенности у детей / О.П. Гурина, А.Е. Блинов, О.Н. Варламова [и др.] // Медицина: теория и практика. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 233–240.
28. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии / А.С. Шадрина, Я.З. Плиева, Д.Н. Кушлинский [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2017. – Т. 45, № 4. – С. 266–279.
29. Клеточное звено и цитокинный профиль лаважной жидкости при тяжелых формах бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко [и др.] // Медицина Кузбасса. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 4–9.

30. Клименко, В.А. Прогнозирование тяжелого течения бронхиальной астмы у детей / В.А. Клименко, О.С. Кожина // Здоровье ребенка. – 2019. – Т. 14, № 5. – С. 307–311.
31. Клинико–генетические факторы, способствующие развитию атопического дерматита у детей в республике Башкортостан / С.В. Левашева, Э.И. Эткина, А.С. Карунас [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 26–29.
32. Клишо, Е.В. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе / Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов // Сибирский онкологический журнал. – 2003. – № 2. – С. 62–67.
33. Кочергин, С.А. Возможности протеомного анализа глазных жидкостей и тканей при некоторых заболеваниях органа зрения / С.А. Кочергин, И.Б. Алексеев, Н.И. Самохина // Офтальмологические ведомости. – 2016. – Т. 9, № 1. – С. 29–37.
34. Курабекова, Р.М. Трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  при трансплантации печени / Р.М. Курабекова, О.П. Шевченко, О.М. Цирульникова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 76–82.
35. Матриксные металлопротеиназы и клинико–функциональный статус курильщиков с персистирующей бронхиальной астмой / В.В. Гноевых, Т.П. Генинг, Ю.А. Портнова [и др.] // Терапевтический архив. – 2014. – № 8. – С. 29–34.
36. Матриксные металлопротеиназы их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал / Е.В. Маркелова, В.В. Здор, А.Л. Романчук, О.Н. Бирко // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2016. – № 2. – С. 11–22.
37. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) / Л.Н. Рогова, Н.В. Шестернина, Т.В. Замечник, И.А. Фастова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, № 2. – С. 86–89.

- 38.Миронова, Ж.А. Аллельные варианты R130Q гена интерлейкина 13, C590T гена интерлейкина 4, C3435T гена множественной лекарственной устойчивости – маркеры развития риска и степени тяжести бронхиальной астмы / Ж.А. Миронова // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2011. – № 6. – С. 54–57.
- 39.Намазова, Л.С. Современные возможности иммунотерапии часто болеющих детей с аллергией / Л.С. Намазова, В.В. Ботвиньева, Н.И. Вознесенская // Педиатрическая фармакология. – 2007. – Т. 4, № 1. – С. 27–32.
- 40.Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». – 5–е изд., перераб. и доп. – М.: Оригинал-макет, 2017. – 160 с.
- 41.Невзорова, В.А. Матриксные металлопротеиназы в патогенезе воспалительного ремоделирования дыхательных путей и среднего уха / В.А. Невзорова, Е.А. Гилицанов // Российская оториноларингология. – 2010. – №5 (48). – С. 92–97.
- 42.Невзорова, В.А. Роль матриксных металлопротеиназ в формировании морфофункционального дисбаланса воздухоносных путей при хронической обструктивной болезни легких / В.А. Невзорова, Т.В. Тилик, Е.А. Гилицанов [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 9–13.
- 43.Никитин, А.В. Роль ферментативной активности в формировании окислительного стресса у больных бронхиальной астмой. (Обзор литературы) / А.В. Никитин, М.А. Золотарева // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 165–169.
- 44.Овсянников, Д.Ю. Бронхиальная астма у детей / Д.Ю. Овсянников, Е.Г. Фурман, Т.И. Елисеева. – М.: Изд-во РУДН, 2019. – 211 с.
- 45.Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.

46. Перспективы изучения патогенеза воспаления и зуда при atopическом дерматите и псориазе / А.Н. Львов, О.Р. Катунина, Л.Ф. Знаменская [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 2012. – № 3. – С. 22–29.
47. Подростковый возраст у пациента с тяжелым течением бронхиальной астмы: известные риски и новые возможности контроля / Н.А. Геппе, А.В. Камаев, Е.Г. Кондюрина [и др.] // Вопросы практической педиатрии. – 2019. – Т. 14, № 6. – С. 63–70.
48. Поиск потенциальных биомаркеров хронических дерматозов с помощью протеомного анализа / Е.В. Братцева, С.А. Мошковский, Л.Ф. Знаменская [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 2010. – № 2. – С. 13–19.
49. Полиморфизм генов ростовых факторов при atopической бронхиальной астме / Н.Л. Потапова, И.Н. Гаймоленко, Н.Н. Страмбовская // Педиатрия им. Сперанского. – 2020. – Т. 99, № 2. – С. 199–205.
50. Потапова, Н.Л. Анализ значимых факторов при тяжелой бронхиальной астме у детей / Н.Л. Потапова, И.Н. Гаймоленко, Ю.Н. Смоляков // Вопросы практической педиатрии. – 2020. – Т. 15, № 1. – С. 35–41.
51. Потеряева, О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) / О.Н. Потеряева // Сибирский медицинский вестник. – 2010. – №5. – С. 7.
52. Приходько, А.Г. Гиперреактивность дыхательных путей / А.Г. Приходько, Ю.М. Перельман, В.П. Колосов. – Владивосток, Дальнаука, 2011. – 204 с.
53. Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии / С.В. Сучков, Д.А. Гнатенко, Д.С. Костюшев [и др.] // Вестник РАМН. – 2013. – № 1. – С. 65–71.

54. Пыцкий, В.И. Ремоделирование органов – типовой патологический процесс / В.И. Пыцкий // Астма. – 2010. – Т. 11, № 2. – С. 65–74.
55. Распространенность аллергической и неаллергической бронхиальной астмы и спектр сенсибилизации среди детей дошкольного возраста, проживающих в городских условиях Алтайского края: популяционное одномоментное исследование / Н.В. Шахова, Е.М. Камалтынова, Ю.Ф. Лобанов, Т.С. Кашинская // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 88–93.
56. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза / В. П. Чехонин С.А. Шеин, А.А. Корчагина, О.И. Гурина // Вестник РАМН. – 2012. – Т. 67, № 2. – С. 23–34.
57. Роль трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  в структурных изменениях бронхиальной стенки при различных вариантах воспаления в бронхах / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2012. – Т. 32, № 5. – С. 28–32.
58. Россия в международном проекте "протеом человека": первые итоги и перспективы / Е.А. Пономаренко, В.Г. Згода, А.Т. Копылов [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 2. – С. 169–175.
59. Светозарский, Н.Л. Фактор роста эндотелия сосудов: биологические свойства и практическое значение (обзор литературы) / Н. Л. Светозарский, А. А. Артифексова, С. Н. Светозарский // Медицина и образование Сибири. – 2015. – № 5. – С. 24–37.
60. Сергеев, Ю.В. Атопический дерматит. Состояние комплементарных блоков и патогенетическая роль анафилатоксинов C4a, C3a и C5a / Ю.В. Сергеев, Ю.П. Резников, Е.В. Лобанова, Н.С. Пименова // Вестник дерматологии и венерологии. – 1989. – № 4. – С. 4–7.
61. Сердобинцев, К.В. Система комплимента. Часть 1 / К.В. Сердобинцев // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2016. – № 2(45). – С. 41–48.

62. Сизонов, В.В. Трансформирующий фактор роста  $\beta$  – роль в диагностике гидронефроза на фоне обструкции пиелoureтерального сегмента у детей / В.В. Сизонов, М.И. Коган // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2012. – № 1. – С. 101–103.
63. Система комплемента при осложненном течении atopического дерматита у детей / О.В. Логунов, О.А. Башкина, Л.В. Козлов, Н.И. Стемповская // Астраханский медицинский журнал. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 18–22.
64. Смольникова, М.В. Полиморфизм генов цитокинов при atopической бронхиальной астме / М.В. Смольникова, С.В. Смирнова, О.С. Тютинина // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – № 2. – С. 290–332.
65. Соболев, С.С. Матриксные металлопротеиназы и цитокины при хронических формах бронхолегочной патологии у детей / С.С. Соболев, И.Е. Смирнов, А.Г. Кучеренко [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2010. – № 3. – С. 59–60.
66. Современные представления о роли эпидермального барьера в развитии atopического фенотипа у детей / Н.Н. Мурашкин, А.А. Савелова, Р.А. Иванов [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2019. – Т. 18, № 5. – С. 386–392.
67. Современные эпидемиологические и теоретические аспекты atopического дерматита у детей / В.А. Ревякина, А.В. Таганов, Т.Н. Короткова [и др.] // Педиатрия им. Сперанского. – 2019. – Т. 98 № 3. – С. 202–207.
68. Современный взгляд на иммунопатогенез atopического дерматита / Е.И. Погорелова, А.В. Почивалов, О.А. Панина [и др.] // Медицина: теория и практика. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 157–163.
69. Соловьева, Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции / Н.И. Соловьева // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 245–255.

70. Сучков, С.В. Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии / С.В. Сучков, Д.А. Гнатенко, Д.С. Костюшев [и др.] // Вестник РАМН. – 2013. – № 1. – С. 65–71.
71. Трошин, И.Ю. Дисплазия соединительной ткани, магниевые и нуклеотидные полиморфизмы / И.Ю. Трошин, О.А. Громова // Кардиология. – 2008. – № 10. – С. 14–21.
72. Уровень трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  в плазме крови детей–реципиентов печени и его связь с функцией трансплантата / О.П. Шевченко, О.М. Цирульникова, Р.М. Курабекова [и др.] // Иммунология. – 2015. – № 6. – С. 343–347.
73. Фармакологические свойства биологически активных форм витамина А / В.И. Ноздрин, Ю.Т. Волков, П.З. Хасигов, О.В. Подобед // Биохимия. – 2001. – Т. 66, Вып. 2. – С. 167–179.
74. Фисенко, В. Ремоделирование при бронхиальной астме: принципы формирования и возможности фармакологического воздействия / В. Фисенко, Н. Чичкова // Врач. – 2006. – № 12. – С. 14–20.
75. Хасигов, П.З. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека / П.З. Хасигов, О.В. Подобед // Биохимия. – 2001. – Т. 66, Вып. 2. – С. 167–179.
76. Чернышева, О.Е. Маркеры ремоделирования дыхательных путей / Чернышева О.Е. // Здоровье ребенка. – 2014. – №7 (58). – С. 80–83.
77. Ярмолинская, М.И. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия / М.И. Ярмолинская, А.С. Молотков, В.М. Денисова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. 61, № 1. – С. 113–125.
78. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region / S.W. Kang, S.H. Kim, N. Lee [et al.] // J. Immunol. – 2012. – Vol. 188, N 11. – P. 5276–82.

- 79.2020 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. – GINA, 2020. – 211 p. – URL: <https://ginasthma.org/gina-reports/> (23.06.2020)
- 80.A comparison of airway and serum matrix metalloproteinase–9 activity among normal subjects, asthmatic patients, and patients with asthmatic mucus hypersecretion / F.W. Ko, C. Diba, M. Roth [et al.] // *Chest*. – 2005. – Vol. 127, N 6. – P. 1919–1927.
- 81.A functional polymorphism in MMP–9 is associated with childhood atopic asthma / K. Nakashima, T. Hirota, K. Obara [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 344, N 1. – P. 300–307.
- 82.A new approach to study exhaled proteins as potential biomarkers for asthma / K. Bloemen, R. Van Den Heuvel, E. Govarts [et al.] // *Clin. Exp. Allergy*. – 2011. – Vol. 41, N 3. P. 346–356.
- 83.A role for mitogen kinase kinase 3 in pulmonary inflammation validated from a proteomic approach / T. Holand, Y. Riffo–Vasquez, D. Spina [et al.] // *Pulm. Pharmacol. Ther.* – 2014. – Vol. 27, N 2. – P. 156–163.
- 84.A study of matrix metalloproteinase expression and activity in atopic dermatitis using a novel skin wash sampling assay for functional biomarker analysis / J.I. Harper, H. Godwin, A. Green [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 162. – P. 397–403.
- 85.A worldwide charter for all children with asthma / S.J. Szefler, D.A. Fitzgerald, Y. Adachi [et al.] // *Pediatr. Pulmonol.* – 2020. – Vol. 55, N 5. – P. 1282–1292.
- 86.Absence of the complement anaphylatoxin C3a receptor suppresses Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy / S.M. Drouin, D.B. Corry, T.J. Hollman [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169, N 10. – P. 5926–5933.
- 87.Alteration in systemic markers of oxidative and antioxidative status in Tunisian patients with asthma: relationships with clinical severity and

- airflow limitation / A. Ben Anes, H. Ben Nasr, H. Fetoui [et al.] // *J. Asthma*. – 2016. – Vol. 53, N 3. – P. 227–237.
88. Analysis of growth factors in serum and induced sputum from patients with asthma / H. Zou, Q.H. Fang, Y.M. Ma, X.Y. Wang // *Exp. Ther. Med.* – 2014. – Vol. 8, N 2. – P. 573–578.
89. Andreeva, A.V. A ubiquitous membrane fusion protein alpha SNAP: a potential therapeutic target for cancer, diabetes and neurological disorders? / A.V. Andreeva, M.A. Kutuzov, T.A. Voyno–Yasenetskaya // *Expert. Opin. Ther. Targets*. – 2006. – Vol. 10. – P. 723–733.
90. Angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory skin disorders / G. Varricchi, F. Granata, S. Loffredo [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2015. – Vol. 73, N 1. – P. 144–153.
91. Angiogenesis, lymphangiogenesis and atopic dermatitis / A. Genovese, A. Detoraki, F. Granata [et al.] // *Chem. Immunol. Allergy*. – 2012. – Vol. 96. – P. 50–60.
92. Antioxidant nutrient intakes and corresponding biomarkers associated with the risk of atopic dermatitis in young children / S–Y. Oh, J. Chung, M–K. Kim [et al.] // *Eur. J. Clin. Nut.* – 2010. – Vol. 64. – P. 245–252.
93. Association between family management and asthma control in children with asthma / Li Han, Jing Shangguan, Guiling Yu [et al.] // *J. Spec. Pediatr. Nurs.* – 2020. – Vol. 25, N 2. – P. e12285.
94. Association between the –1154 G/A promoter polymorphism of the vascular endothelial growth factor gene and atopic dermatitis / M. Zablotna, M. Sobjanek, J. Glen [et al.] // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2010. – Vol. 24, N 1. – P. 91–92.
95. Association of inadequately controlled disease and disease severity with patient–reported disease burden in adults with atopic dermatitis / E.L. Simpson, E. Guttman–Yassky, D.J. Margolis [et al.] // *JAMA Dermatol.* – 2018. – Vol. 154. – P. 903–912.

96. Association of Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms with Asthma in Tunisian Children / L. Jihene, H. Chelbi, I.B. Dhifallah [et al.] // Gene Regul. Systems Biol. – 2008. – Vol. 2. – P. 89–96.
97. Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with asthma in Tunisian children / J. Lachheb, H. Chelbi, I. Ben Dhifallah [et al.] // Gene Regul. Syst. Bio. – 2008. – Vol. 2. – P. 89–96.
98. Association of VEGF polymorphisms with childhood asthma, lung function and airway responsiveness / S. Sharma, A.J. Murphy, M.E. Soto–Quiros [et al.] // Eur. Respir. J. – 2009. – Vol. 33, N 6. – P. 1287–1294.
99. Asthma treatment outcome in children is associated with vascular endothelial growth factor A (VEGFA) polymorphisms / M. Balantic, M. Rijavec, M. Skerbinjek Kavalar [et al.] // Mol. Diagn. Ther. – 2012. – Vol. 16, N 3. – P. 173–180.
100. Atopic and nonatopic eczema in adolescence: is there a difference? / E.K. Johansson, N. Ballardini, A. Bergström [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2015. – Vol. 1739. – P. 62–68.
101. Atopic dermatitis is associated with a low–producer transforming growth factor beta(1) cytokine genotype / P.D. Arkwright, J.M. Chase, S. Babbage [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2001. – Vol. 108, N 2. P. 281–284.
102. Atopic March: Collegium Internationale Allergologicum Update 2020 / M. Aw, J. Penn, G.M. Gauvrea [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2020. – Vol. 181, N 1. – P. 1–10.
103. Bathing Effects of Various Seawaters on Allergic (Atopic) Dermatitis–Like Skin Lesions Induced by 2,4–Dinitrochlorobenzene in Hairless Mice / C.G. Kim, M. Kang, Y.H. Lee [et al.] // Evid Based Complement Alternat Med. – 2015. – Vol. 2015. – P. 179185.
104. Best of 2019 / G.D. Marshall, A. Ellis, M. Grayson [et al.] // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2020. – Vol. 124, N 2. – P. 111–115.

105. Biomarkers to predict asthma in wheezing preschool children / M.A. Bannier, K.D. van de Kant, Q. Jöbsis, E. Dompeling // Clin. Exp. Allergy. – 2015. – Vol. 45, N 6. – P. 1040–1050.
106. Border, W.A. Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis / W.A. Border, N.A. Noble // N. Eng. J. Med. – 1994. – Vol. 331. – P. 1286–1292.
107. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
108. Bronchoalveolar lavage fluid proteomic patterns of sulfur mustard–exposed patients / H. Mehrani, M. Ghanei, J. Aslani, L. Golmanesh // Proteomics Clin. Appl. – 2009. – Vol. 3, N 10. – P. 1191–1200.
109. Burden of atopic dermatitis in the United States: analysis of healthcare claims data in the commercial. Medicare and Medi–Cal databases / S. Shrestha, R. Miao, L. Wang [et al.] // Adv. Ther. – 2017. – Vol. 34, N 8. – P. 1989–2006.
110. Canadian Healthy Infant Longitudinal Development Study investigators. Predicting the atopic march: Results from the Canadian Healthy Infant Longitudinal Development Study / M.M. Tran, D.L. Lefebvre, C. Dharma [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2018. – Vol. 141, N 2. – P. 601–607.e8.
111. Cappuzzo, F. The Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) Family: Structure and Function / F. Cappuzzo // Guide to Targeted Therapies: EGFR mutations in NSCLC. – Adis, Cham: Springer, 2014. – P. 7–17.
112. Chung, H. Increased release of matrix metalloproteinase–9 and transforming growth factor– $\beta$ 1 in the plasma of children with persistent asthma / H. Chung, S. Kim // J. Allergy Clin. Immunol. – 2004. –| Vol. 113, IS.2, Suppl. – P. S195.

113. Chung H.L. Asthma in childhood: A complex, heterogeneous disease / H.L. Chung // *Korean. J. Pediatr.* – 2011. – Vol. 54, N 1. – P 1–5.
114. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in young male asthma patients / Hea Yon Lee, Kyung Hoon Min, Sang Min Lee [et al.] // *Korean J. Intern. Med.* – 2017. – Vol. 32. – P. 295–301.
115. Clinically Meaningful Responses to Dupilumab in Adolescents with Uncontrolled Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: Post-hoc Analyses from a Randomized Clinical Trial / A.S. Paller, A. Bansal, E.L. Simpson [et al.] // *Am. J. Clin. Dermatol.* – 2020. – Vol. 21, N 1. – P. 119–131.
116. Comhair, S.A. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities / S.A. Comhair, S.C. Erzurum // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12, N 1. – P. 93–124.
117. Comparative proteomic analysis of peripheral blood eosinophils from healthy donors and atopic dermatitis patients with eosinophilia / s.w. Yoon, T.Y. Kim, M.H. Sung [et al.] // *Proteomics.* – 2005. – Vol. 5. – P. 1987–1995.
118. Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease / A. Kleniewska, J. Walusiak–Skorupa, W. Piotrowski [et al.] // *J. Occup. Health.* – 2016. – Vol. 58, N 4. – P. 333–339.
119. Complement Components (C3, C4) as Inflammatory Markers in Asthma / Mohammed Abdel Fattah, Mohammed El Baz, Ashraf Sherif, Alia Adel // *Indian J. Pediatr.* – 2010. – Vol. 77. – P. 771–773.
120. Complement Factors C3a, C4a, and C5a in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma / Mateja M. Marc, Peter Korosec, Mitja Kosnik [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 31. – P. 216–219.
121. Conrotto, P. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications / P. Conrotto, S. Souchelnytskyi // *Exp. Oncol.* 2008. – Vol. 30, N 3. – P. 171–180.

122. Content of vascular endothelial growth factor in stratum corneum well correlates to local severity of acute inflammation in patients with atopic dermatitis / T. Amarbayasgalan, H. Takahashi, I. Dekio, E. Morita // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2012. – Vol. 157, N 3. – P. 251–258.
123. de la O–Escamilla, N.O. Atopic Dermatitis: Update on Pathogenesis and Therapy / N.O. de la O–Escamilla, R. Sidbury // *Pediatr. Ann.* – 2020. – Vol. 49, N 3. – P. e140–e146.
124. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD / S. Isajevs, I. Taivans, G. Strazda [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2009. – Vol. 33. – P. 61–67.
125. Dichotomous role of TGF- $\beta$  controls inducible regulatory T-cell fate in allergic airway disease through Smad3 and TGF- $\beta$ -activated kinase 1 / A. Joetham, M. Schedel, F. Ning [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2020. – Vol. 145, N 3. – P. 933–946.
126. Dompeling, E. Proteomics of exhaled breath condensate: a realistic approach in children with asthma? / E. Dompeling, Q. Jöbsis // *Clin. Exp. Allergy.* – 2011. – Vol. 41, N 3. – P. 299–301.
127. Douchi (fermented *Glycine max* Merr.) alleviates atopic dermatitis-like skin lesion in NC/Nga mice by regulation of PKC and IL-4 / A–Ram Jung, Sang–hyun Ahn, In–Sik Park [et al.] // *BMC Complementary and Alternative Medicine.* – 2016. – Vol. 16. – P. 416.
128. Earlyonset atopic dermatitis in children: which are the phenotypes at risk of asthma? Results from the ORCA cohort / F. Amat, P. Saint–Pierre, E. Bourrat [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 6. – P. e0131369.
129. Egeblad, M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression / M. Egeblad, Z. Werb // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2, N 3. – P. 61–74.
130. Elevated levels of plasma matrix metalloproteinase–9 in patients with atopic dermatitis: a pilot study / A.C.A. Devillers, A.W. Van

- Toorenenbergen, G.J. Klein Heerenbrink [et al.] // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2007. – Vol.32, N 3. – P. 311–313.
131. Ermert, D. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend / D. Ermert, A.M. Blom // *Immunol. Lett.* – 2016. – 169. – P. 82–92.
132. Evaluation of circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in patients suffering from persistent allergic rhinitis / E. Koczy-Baron, A. Grzanka, J. Jochem [et al.] // *Allergy Asthma Clin. Immunol.* – 2016. – Vol. 12. – P. 17.
133. Exhaled breath condensate MMP-9 level and its relationship with asthma severity and interleukin-4/10 levels in children. / G.B. Karakoc, A. Yukselen, M. Yilmaz [et al.] // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2012. – Vol. 108, N 5. – P. 300–304.
134. Exhaled matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in different biological phenotypes of asthma / M.P. Barbaro, A. Spanevello, G.P. Palladino [et al.] // *Eur. J. Intern Med.* – 2014. – Vol. 25, N 1. – P. 92–96.
135. Exploration of early-life candidate biomarkers for childhood asthma using antibody arrays / H. Xu, T. Radabaugh, Z. Lu [et al.] // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2016. – Vol. 27, N 7. – P. 696–701.
136. Expression of vascular endothelial growth factor and other cytokines in atopic dermatitis, and correlation with clinical features / Z. Samochocki, J. Bogaczewicz, A. Sysa-Jędrzejowska [et al.] // *Int. J. Dermatol.* – 2016. – Vol. 55, N 3. – P. e141–6.
137. Family quality of life among families of children with atopic dermatitis / H.J. Jang, S. Hwang, Y. Ahn [et al.] // *Asia Pac Allergy.* – 2016. – Vol. 6. – P. 213–219.
138. Ferrara, N. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells / N. Ferrara, W. J. Henzel // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. – Vol. 161, N 2. – P. 851–858.

139. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress / N. Ferrara // *Endocr. Rev.* – 2004. – Vol. 25. – P. 581–611.
140. Ferrara, N. VEGF–A: a critical regulator of blood vessel growth / N. Ferrara // *Eur. Cytokine Netw.* – 2009. – Vol. 20, N 4. – P. 158–163.
141. Gene polymorphisms of 22 cytokines in Macedonian children with atopic dermatitis / K. Stavric, S. Peova, D. Trajkov, M. Spiroski M. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* – 2012. – Vol. 11, N 1. – P. 37–50.
142. Genetic polymorphisms and risk of recurrent wheezing in pediatric age / S. Esposito, V. Ierardi, C. Daleno [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2009. – Vol. 33, N 6. – P. 1287–1294.
143. Genetic polymorphisms and risk of recurrent wheezing in pediatric age / S. Esposito, V. Ierardi, C. Daleno [et al.] // *Pulm. Med.* – 2014. – Vol. 14. – P. 162.
144. Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta–1 (TGFB1) and childhood asthma and atopy / H. Li, H. Wu, J.J. Sienna–Monge [et al.] // *Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 121, N 5. – P. 529–538.
145. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy / S. Hoffjan, I. Ostrovnaja, D. Nicolae [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 113, N 3. – P. 511–518.
146. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three / J.A. Odhiambo, H.C. Williams, T.O. Clayton [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2009. – Vol. 124, N 6. – P. 1251–8.e23.
147. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S.M. Krance, S. Notenboom [et al.] // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 390, N 3. – P. 191–214.
148. Glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in intrinsic asthmatic patients / D. Qujeq, B. Hidari, K. Bijani, H. Shirdel // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2003. – Vol. 41, N 2. – P. 200–202.

149. Ha, J. Ten-Year trends and prevalence of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis among the Korean population, 2008–2017 / J. Ha, S.W. Lee, D.K. Yon // *Exp. Pediatr.* – 2020. – Vol. 63, N 7. – P. 278–283.
150. Hagimoto N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen / N. Hagimoto, K. Kuwano, H. Miyazaki // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 17. – P. 272.
151. Hargreave, F.E. The definition and diagnosis of asthma / F.E. Hargreave, P. Nair // *Clin. Exp. Allergy.* – 2009. – Vol. 39, N 11. – P. 1652–1658.
152. Hoch, H. Challenges in managing difficult-to-treat asthma in children: Stop, look, and listen / H. Hoch, M. Kattan, S.J. Szefler // *Pediatr. Pulmonol.* – 2020. – Vol. 55, N 3. – P. 791–794.
153. Hoshino, M. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis / M. Hoshino, M. Takahashi, N. Aoike // *J. Allergy. Clin. Immunol.* – 2001. – Vol. 107. – P. 295–301.
154. IL–5, IL–8 and MMP –9 levels in exhaled breath condensate of atopic and nonatopic asthmatic children / A. Turkeli, O. Yilmaz, F. Taneli [et al.] // *Respir. Med.* – 2015. – Vol. 109, N 6. – P. 680–688.
155. IL–9 induces VEGF secretion from human mast cells and IL–9/IL–9 receptor genes are overexpressed in atopic dermatitis / N. Sismanopoulos, D.A. Delivanis, K.D. Alysandratos [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 3. – P. e33271.
156. Impact of atopic dermatitis on the quality of life of children and their families / M. Ražnatović Đurović, J. Janković, A. Ćirković [et al.] // *G. Ital. Dermatol. Venereol.* – 2020. – Feb. 5. Epub ahead of print.
157. Impaired CD23 and CD62L expression and tissue inhibitors of metalloproteinases secretion by eosinophils in adults with atopic dermatitis / T. de Oliveira Titz, R.L. Orfali, C. de Lollo [et al.] // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2016. – Vol. 30, N 12. – P. 2072–2076.

158. In vitro model for penetration of sensory nerve fibres on a Matrigel basement membrane: implications for possible application to intractable pruritus / M. Tominaga, A. Kamo, S. Tenggara [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2009. – Vol. 161. – P. 1028–1037.
159. Increased angiogenic factors in exhaled breath condensate of children with severe asthma e New markers of disease progression? / K. Grzela, M. Litwiniuk, A. Krejner [et al.] // *Respiratory Medicine.* – 2016. – Vol. 118. – P. 119–121.
160. Increased production of vascular endothelial growth factor in the lesions of atopic dermatitis / Y. Zhang, H. Matsuo, E. Morita // *Arch. Dermatol. Res.* – 2006. – Vol. 297, N 9. – P. 425–429.
161. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase One and Three Study Groups. Is eczema really on the increase worldwide? / H. Williams, A. Stewart, E. von Mutius [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121, N 4. – P. 947–54.e15.
162. Intrinsic alterations of pro-inflammatory mediators in unstimulated and TLR-2 stimulated keratinocytes from atopic dermatitis patients / M. Niebuhr, A. Heratizadeh, K. Wichmann [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2011. – Vol. 20, N 6. – P. 468–472.
163. Kapp, A. Involvement of complement in atopic dermatitis / A. Kapp, E. Shopf // *Acta Dermatol. Venerol.* – 1985. – Suppl. 114. – P. 152–154.
164. Kapp, A. Involvement of complement in psoriasis and atopic dermatitis – measurement of C3a and C5a, C3, C4 and C1 inactivator / A. Kapp, H. Wokalek, E. Schöpf // *Arch. Dermatol. Res.* – 1985. – Vol. 277. – P. 359–361.
165. Kasperska-Zajac, A. Etiopathogenesis of atopic dermatitis / A. Kasperska-Zajac, E. Koczy-Baron // *Inflamm Res.* – 2012. – Vol. 61, N 12. – P. 1405–1409.
166. Kaufman, H.S. Immunoglobulin deficiencies in atopic population / H.S. Kaufman, J.R. Hobbs // *Lancet.* – 1970. – Vol. 296. – P. 1061–1063.

167. Khor, Y.H. Increased vascular permeability precedes cellular inflammation as asthma control deteriorates / Y.H. Khor, A.K. Teoh, S.M. Lam // *Clin. Exp. Allergy*. – 2009. – Vol. 39, N 11. – P. 1659–1667.
168. Koczy–Baron, E. Increased plasma concentration of vascular endothelial growth factor in patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and platelet activation / E. Koczy–Baron, J. Jochem, A. Kasperska–Zajac // *Inflamm. Res*. – 2012. – Vol. 61, N 12. – P. 1405–1409.
169. Kuwano, K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling / K. Kuwano // *Cell Mol. Immunol*. – 2007. – Vol. 4, N 6. – P. 419–429.
170. Lee, C.G. Early Growth Response Gene 1–mediated Apoptosis Is Essential for Transforming Growth Factor b 1–induced Pulmonary Fibrosis / C.G. Lee, S.J. Cho, M.J. Kang // *J. Exp. Med*. – 2004. – Vol. 3. – P. 377–389.
171. Li, Y. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism / Y. Li, N. Wongsiriroj, W.S. Blaner // *Hepatobiliary Surg. Nutr*. – 2014. – Vol. 3, N 3. – P. 126–139.
172. Lindahl M. Newly identified proteins in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids: potential biomedical and clinical applications / M. Lindahl, B. Ståhlbom, C. Tagesson // *Electrophoresis*. – 1999. – Vol. 20, N 18. – P. 3670–3676.
173. Low sputum MMP–9/TIMP ratio is associated with airway narrowing in smokers with asthma / R. Chaudhuri, C. McSharry, J. Brady [et al.] // *Eur. Respir. J*. – 2014. – Vol. 44, N 4. – P. 895–904.
174. Lugović L. Values of complement, T– and B–lymphocytes and immune complexes in patients with skin allergies / L. Lugović, J. Lipozencić // *Acta Med. Croatica*. – 1998. – Vol. 52. – P. 203–208.
175. Lung Function, Dietary Intake, and Weight Status in Children with Persistent Asthma from Low–Income, Urban Communities / E. Whitney

- Evans, Daphne Koinis–Mitchell, Sheryl J. Kopel, Elissa Jelalian // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – P. 2943.
176. Major comorbidities of atopic dermatitis: beyond allergic disorders / A. Paller, J.C. Jaworski, E.L. Simpson [et al.] // *Am. J. Clin. Dermatol.* – 2018. – Vol. 19. – P. 821–838.
177. Malonaldehyde and erythrocyte antioxidant status in children with controlled asthma / R. Petlevski, I. Zuntar, S. Dodig [et al.] // *Coll. Antropol.* – 2009. – Vol. 33, N 4. – P. 1251–1254.
178. Marciniak J. Quality of life of parents of children with atopic dermatitis / J. Marciniak, A. Reich, J.C. Szepietowski // *Acta Derm. Venereol.* – 2017. – Vol. 97. – P. 711–714.
179. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels / A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann // *Anal. Chem.* – 1996. – Vol. 68. – P. 850–858.
180. Maternal dietary inflammatory potential and quality are associated with offspring asthma risk over 10–year follow–up: the Lifeways Cross–Generation Cohort Study / Ling–Wei Chen, Becky Lyons, Pilar Navarro [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2019. – Vol.111, N 1. – P. 1–8.
181. Matrix metalloproteinase activation by free neutrophil elastase contributes to bronchiectasis progression in early cystic fibrosis / L.W. Garratt, E.N. Sutanto, K.M. Ling [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2015. – Vol. 46, N 2. – P. 384–394.
182. Matrix metalloproteinases vary with airway microbiota composition and lung function in non–cystic fibrosis bronchiectasis / S.L. Taylor, G.B. Rogers, A.C. Chen [et al.] // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2015. – Vol. 12, N 5. – P. 701–707.
183. Mawson, A.R. Could bronchial asthma be an endogenous, pulmonary expression of retinoid intoxication? / A.R. Mawson // *Front. Biosci.* – 2001. – Vol. 6. – P. D973–85.

184. Mitchell, D.A. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine / D.A. Mitchell, M.A. Marletta // *Nat. Chem. Biol.* – 2005. – Vol. 1. – P. 154–158.
185. MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children / L.A. Pinto, M. Depner, N. Klopp [et al.] // *Respir. Res.* – 2010. – Vol. 11, N 1. – P. 23.
186. Modulation of NF-kappaB and hypoxia-inducible factor-1 by S-nitrosoglutathione does not alter allergic airway inflammation in mice / N. Olson, D.I. Kasahara, M. Hristova [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 44. – P. 813–823.
187. Na, C.H. Quality of Life and Disease Impact of Atopic Dermatitis and Psoriasis on Children and Their Families / C.H. Na, J. Chung, E.L Simpson // *Children (Basel)*. – 2019. – Vol. 6, N 12. – P. 133.
188. Najam, F.I. Complement components (C3, C4) in childhood asthma. Indian / Najam FI, Giasuddin AS, Shembesh AH. // *J Pediatr.* – 2005. – Vol. 72, N 9. – P. 745–749.
189. Namazi, M.R. Increased oxidative activity from hydrogen peroxide may be the cause of the predisposition to cataracts among patients with atopic dermatitis / M.R. Namazi, M. Amirahmadi, F. Handjani // *Medical Hypotheses*. – 2006. – Vol. 66, N 4. – P. 863–864.
190. Network analysis of quantitative proteomics on asthmatic bronchi: effects of inhaled glucocorticoid treatment / S.E. O'Neil, B. Sitkauskiene, A. Babusyte [et al.] // *Respir. Res.* – 2011. – Vol. 12, N 1. – P. 124.
191. Oliveira, L.M. Impact of retinoic acid on immune cells and inflammatory diseases / L.M. Oliveira, F.M.E. Teixeira, M.N. Sato // *Mediators Inflamm.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 3067126.
192. Oxidative and nitrosative events in asthma / A.A. Andreadis, S.L. Hazen, S.A. Comhair, S.C. Erzurum // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, N 3. – P. 213–225.

193. Oxidative stress potentially enhances FcεRI-mediated leukotriene C4 release dependent on the late-phase increase of intracellular glutathione in mast cells / K. Seki, T. Hisada, T. Kawata [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 439, N 3. – P. 357–362.
194. Park, Y.D. Detection of down-regulated acetaldehyde dehydrogenase 1 in atopic dermatitis patients by two-dimensional electrophoresis / Y.D. Park, Y.J. Lyou, J.M. Yang // *Exp. Dermatol.* – 2007. – Vol. 16. – P. 130–134.
195. Pharmacogenetics of Pediatric Asthma: Current Perspectives / J. Perez-Garcia, A. Espuela-Ortiz, F. Lorenzo-Diaz, M. Pino-Yanes // *Pharmgenomics Pers. Med.* – 2020. – Vol. 13. – P. 89–103.
196. Pharmacological and pharmacokinetic studies with vitamin D-loaded nanoemulsions in asthma model / T. Wei-hong, G. Min-chang, X. Zhen, S. Jie // *Inflammation.* – 2014. – Vol. 37, N 3. – P. 723–728.
197. Piesiak, P, Brzecka A, Kosacka M, Passowicz-Muszyńska E, Dyla T, Jankowska R. Concentrations of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Pol Merkur Lekarski.* 2011 Nov;31(185):270–3.
198. Pisi, G. The airway neurogenic inflammation: clinical and pharmacological implications / Pisi G, Olivieri D, Chetta A. // *Inflamm. Allergy Drug Targets.* – 2009. – Vol. 8, N 3. – P. 176–118.
199. Plasma complement and histamine changes in atopic dermatitis / J. Ring, T. Senter, R.T. Cornell [et al.] // *Br. J. Derm.* – 1979. – Vol. 100. – P. 521–530.
200. Plasma protein profiles in early asthmatic responses to inhalation allergen challenge / T. Rhim, Y.-S. Choi, B.-Y. Nam [et al.] // *Allergy.* – 2009. – Vol. 64, N 1. – P. 47–54.
201. Polymorphisms in metalloproteinase-9 are associated with the risk for asthma in Mexican pediatric patients / S. Jiménez-Morales, N. Martínez-

- Aguilar, R. Gamboa–Becerra [et al.] // *Hum. Immunol.* – 2013. – Vol. 74, N 8. – P. 998–1002.
202. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene associated with asthma / H.Y. Lu, G.L. Zhao, M.F. Fu // *Genet. Mol. Res.* – 2016. – Vol.15, N 2.
203. Potential therapeutic target discovery by 2D–DIGE proteomic analysis in mouse models of asthma / F. Quesada Calvo, M Fillet, J. Renaut [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2011. – Vol. 10, N 9. – P. 4291–301.
204. Prevalence and Predictors of Uncontrolled Asthma in Children Referred for Asthma and Other Atopic Diseases / H.M. Kansen, T.M. Le, C. Uiterwaal [et al.] // *J. Asthma Allergy.* – 2020. – Vol. 13. – P. 67–75.
205. Profiling the dysregulated genes of keratinocytes in atopic dermatitis patients: cDNA microarray and interactomic analyses / Z.R. Lü, D. Park, K.A. Lee [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2009. – Vol. 54, N 2. – P. 126–129.
206. Protection from experimental asthma by an endogenous bronchodilator / L.G. Que, L. Liu, Y. Yan [et al.] // *Science.* – 2005. – Vol. 308. – P. 1618–1621.
207. Protein profiles of CCL5, HPGDS, and NPSR1 in plasma reveal association with childhood asthma / C. Hamsten, A. Häggmark, J. Grundström [et al.] // *Allergy* – 2016. – Vol. 71, N 9. – P. 1357–1361.
208. Protein S–nitrosylation: purview and parameters / D.T. Hess, A. Matsumoto, S.O. Kim [et al.] // *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 150–166.
209. Proteomic Analysis of Anti–inflammatory Effects of a Kampo (Japanese Herbal) Medicine "Shoseiryuto (Xiao–Qing–Long–Tang)" on Airway Inflammation in a Mouse Model / T. Nagai, M. Nakao, Y. Shimizu [et al.] // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 604196.

210. Proteomic analysis of peripheral T-lymphocytes in patients with asthma / H.C. Jeong, S.Y. Lee, E.J. Lee [et al.] // *Chest*. – 2007. – Vol. 132, N 2). – P. 489–496.
211. Proteomic analysis of sputum reveals novel biomarkers for various presentations of asthma / Chao Cao, Wen Li, Wen Hua [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 15. – P. 171–180.
212. Rahman, I. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases / I. Rahman, S.K. Biswas, A. Kode // *Eur. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 533. – P. 222–239.
213. Reduced Carotenoid and Retinoid Concentrations and Altered Lycopene Isomer Ratio in Plasma of Atopic Dermatitis Patients / R. Lucas, J. Mihály, G.M. Lowe [et al.] // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10, N 10. – P. 1390.
214. Regulation of eosinophil apoptosis by nitric oxide: Role of c-Jun-N-terminal kinase and signal transducer and activator of transcription 5 / X. Zhang, E. Moilanen, A. Lahti [et al.] // *J. Allergy. Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 112. – P. 93–101.
215. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma / P.E. Taylor, R.C. Flagan, R. Valenta, M.M. Glovsky // *J. Allergy Clin Immunol.* – 2002. – Vol. 109, N 1. – P. 51–56.
216. Richarz, N.A. Angiogenesis in Dermatology – Insights of Molecular Mechanisms and Latest Developments / N.A. Richarz, A. Boada, J.M. Carrascosa // *Actas Dermosifiliogr.* – 2017. – Vol. 108, N 6. – P. 515–523.
217. Risk factors related to persistent airflow obstruction in severe asthma in Chinese Han population / Lanlan Zhang, Wenjuan Yang, Qiao Zhou [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 7, N 12. – P. 5403–5411.
218. Roberts, A.B. Molecular and cell biology of TGF-beta / A.B. Roberts // *Miner. Electrolyte Metab.* – 1998. – Vol. 24. – P. 111–119.

219. Roberts, A.B. Handbook of experimental pharmacology / A.B. Roberts. – New York : Springer–Verlag, 1990. – 472 p.
220. Serum Cytokine Profiles in Infants with Atopic Dermatitis / A. Gürkan, A.A. Yücel, C. Sönmez [et al.] // Acta Dermatovenerol. Croat. – 2016. – Vol. 24, N 4. – P. 268–273.
221. Serum IL–8 and VEGFA are Two Promising Diagnostic Biomarkers of Asthma–COPD Overlap Syndrome / Q. Ding, S. Sun, Y. Zhang [et al.] // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2020. – Vol. 15. – P. 357–365.
222. Serum immunoglobulins and complement levels in patients with atopic dermatitis / S. Dane, T. Erdem, V. Ertuns, L. Dane // Turgut. Ozal. Tip. Merkezi Degrizi. – 1998. – Vol. 5. – P. 162–164.
223. Serum Proteome Profiling to Identify Proteins Promoting Pathogenesis of Non–atopic Asthma / S. Ejaz, F.U. Nasim, M. Ashraf, S. Ahmad // Protein Pept. Lett. – 2018. – Vol. 25, N 10. – P. 933–942.
224. Severe asthma during childhood and adolescence: A longitudinal study / K.R. Ross, R. Gupta, M.D. DeBoer [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2020. – Vol. 145, N 1. – P. 140–146.e9.
225. S–nitrosoglutathione breakdown prevents airway smooth muscle relaxation in the guinea pig / K. Fang, R. Johns, T. Macdonald [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2000. – Vol. 279, N 4. – P. L716–21.
226. S–nitrosoglutathione supplementation to ovalbumin–sensitized and –challenged mice ameliorates methacholine–induced bronchoconstriction / M.W. Foster, Z. Yang, E.N. Potts [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 2011. – Vol. 301. – P. L739–L744.
227. S–Nitrosylated GAP–DH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding / M.R. Hara, N. Agrawal, S.F. Kim [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2005. – Vol. 7. – P. 665–674.
228. Sputum matrix metalloproteinase–9, tissue inhibitor of metalloproteinase–1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy

- subjects / K.M. Beeh, J. Beier, O. Kornmann, R. Buhl // *Respir. Med.* – 2003. – Vol. 97. – P. 634–639.
229. Stern, J. Asthma epidemiology and risk factors / J. Stern, J. Pier, A.A. Litonjua // *Semin. Immunopathol.* – 2020. – Vol. 42, N 1. – P. 5–15.
230. Sternlicht, M.D. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior M.D. Sternlicht, Z. Werb // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2001. – Vol. 17. – P. 463–516.
231. Structure–function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling / F.S. Grünwald, A.E. Prota, A. Giese, K. Ballmer–Hofer // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2010. – Vol. 1804, N 3. – P. 567–580.
232. Tectorigenin inhibits inflammation and pulmonary fibrosis in allergic asthma model of ovalbumin–sensitized guinea pigs / Youpeng Wang, Weichao Jing, Wanying Qu [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 72, N 7. – P. 956–968.
233. TGF–beta/Smad signaling inhibits IFN–gamma and TNF–alpha–induced TARC (CCL17) production in HaCaT cells / K. Sumiyoshi, A. Nakao, Y. Setoguchi [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2003. – Vol. 31, N 1. – P. 53–58.
234. TGF–beta1–mediated regulation of thymus and activation–regulated chemokine (TARC/CCL17) synthesis and secretion by HaCaT cells co–stimulated with TNF–alpha and IFN–gamma / X. Zheng, K. Nakamura, M. Tojo [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2002. – Vol. 30, N 2. – P. 154–160.
235. TGFβ receptor mutations impose a strong predisposition for human allergic disease / P.A. Frischmeyer–Guerrerio, A.L. Guerrerio, G. Oswald [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2013. – Vol. 5, N 195. – P. 195ra94.
236. TGF–β secreted by human umbilical cord blood–derived mesenchymal stem cells ameliorates atopic dermatitis by inhibiting secretion of TNF–α and IgE / H.H. Park, S. Lee, Y. Yu [et al.] // *Stem Cells.* – 2020. – Apr 11. Epub ahead of print.

237. Th17 cells and tissue remodeling in atopic and contact dermatitis / D. Simon, C. Aeberhard, Y. Erdemoglu, H.U. Simon // *Allergy*. – 2014. – Vol. 69, N 1. – P. 125–131.
238. The beneficial effects of physical exercise on antioxidant status in asthmatic children / E. Onur, C. Kabaroglu, O. Günay [et al.] // *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. – 2011. – Vol. 39, N 2. – P. 90–95.
239. The COL5A3 and MMP9 genes interact in eczema susceptibility / J.P. Margaritte-Jeannin, M.C. Babron, C. Laprise [et al.] // *Clin. Exp. Allergy*. – 2018. – Vol. 48, N 3. – P. 297–305.
240. The complement component C3 plays a critical role in both Th1 and Th2 responses to antigen / A. Yalcindag, R. He, D. Laouini [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 117, N 6. – P. 1455–1461.
241. The differential effects of commercial specialized media on cell growth and transforming growth factor beta 1-induced epithelial–mesenchymal transition in bronchial epithelial cells / N.A.H.M. Hasan, H.H. Harith, D.A. Israf, C.L. Tham // *Mol. Biol. Rep.* – 2020. – Vol. 47, N 5. – P. 3511–3519.
242. The effect of maternal asthma on placental and cord blood protein profiles / V.E. Murphy, R.F. Johnson, Y.C. Wang [et al.] // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 2005. – Vol. 12, N 5. – P. 349–355.
243. The epidermal growth factor / J. Boonstra, P. Rijken, B. Humbel [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 1995. – Vol. 19, N 5. – P. 413–430.
244. The human proteome project: current state and future direction / P. Legrain, R. Aebersold, A. Archakov [et al.] // *Mol. Cell Proteomics*. – 2011. – Vol. 10, N 7. – P. M111.009993.
245. The possibility of component diagnostics in clarifying the structure of sensitization in patients with bronchial asthma and allergic rhinitis living in the south of Russia / E. Churyukina, E. Filippov, N. Kolesnikova [et al.] // *Second Moscow Molecular Allergology Meeting (MMAM 2019), 19 Nov.* – M.: Sechenov University (MSMU), 2019. – P. 8.

246. The role of mast cells in ige-independent lung diseases / Daniel Elieh Ali Komi, Esmaeil Mortaz, Saeede Amani [et al.] // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2020. – Vol. 58, N 3. – P. 377–387.
247. The role of serum nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in childhood bronchial asthma / E.R. Youness, M. Shady, M.S. Nassar [et al.] // *J. Asthma.* – 2020. Vol. 57, N 4. – P. 347–352.
248. Towards a proteomic analysis of atopic dermatitis: a two-dimensional-polyacrylamide gel electro-phoresis/mass spectrometric analysis of cultured patient-derived fibroblasts / Y.D. Park, S.Y. Kim, H.S. Jang [et al.] // *Proteomics.* – 2004. – Vol. 4. – P. 3446–3455.
249. Transcriptomic Analysis Links Eosinophilic Esophagitis and Atopic Dermatitis / R. Doucet-Ladevèze, S. Holvoet, F. Raymond [et al.] // *Front. Pediatr.* – 2019. – Vol. 7. – P. 467.
250. Transforming growth factor-beta1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice / K. Sumiyoshi, A. Nakao, H. Ushio [et al.] // *Clin. Exp. Allergy.* – 2002. – Vol. 32, N 2. – P. 309–314.
251. Transthyretin, a new cryptic protease / M.A. Liz, C.J. Faro, M.J. Saraiva, M.M. Sousa // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 20. – P. 21431–21438.
252. Tsang, M.S. The Role of New IL-1 Family Members (IL-36 and IL-38) in Atopic Dermatitis, Allergic Asthma, and Allergic Rhinitis / M.S. Tsang, X. Sun, C.K. Wong [et al.] // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2020. – Vol. 20, N 8. – P. 40.
253. Tsujimoto, Y. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis / Y. Tsujimoto, S. Shimizu // *Biochimie.* – 2002. – Vol. 84. – P. 187–193.
254. Turco, L. The matrix tetrameric code: hormones, cytokines, neuropeptides, melatonin / L. Turco // *Physiologic regulating medicine.* – 2006. – N 1. – P. 35–39.

255. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems / A. Görg, G. Boguth, C. Obermaier [et al.] // *Electrophoresis*. – 1995. – Vol.16. – P.1079–1086.
256. Update in Pediatric Asthma: Selected Issues / R. Azmeh, D.E. Greydanus, M.G. Agana [et al.] // *Dis. Mon.* – 2020. – Vol. 66, N 4. – P. 100886.
257. Update on Atopic Dermatitis: Diagnosis, Severity Assessment, and Treatment Selection / A.B. Fishbein, J.I. Silverberg, E.J. Wilson, P.Y. Ong // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* – 2020. – Vol. 8, N 1. – P. 91–101.
258. Variants in TGFB1, dust mite exposure, and disease severity in children with asthma / S. Sharma, B.A. Raby, G.M. Hunninghake [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. CareMed.* – 2009. – Vol. 179. – P. 356–362.
259. Variations in risk of asthma and seasonal allergies between early and late-onset pediatric atopic dermatitis: A cohort study / J. Wan, N. Mitra, O.J. Hoffstad [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2017. – Vol. 77, N 4. – P. 634–640.
260. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen / D.W. Leung, G. Cachianes, W.J. Kuang [et al.] // *Science*. – 1989. – Vol. 246, N 4935. – P. 1306–1309.
261. Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma / K.S. Lee, K.H. Min, S.R. Kim [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 174, N 2. – P. 161–70.
262. VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis / S.W. Han, G.W. Kim, J.S. Seo [et al.] // *Rheumatology*. – 2004. – Vol. 43. – P. 1173–1177.

263. Vitamin D and inflammation / X. Guillot, L. Semerano, N. Saidenberg-Kermanac'h [et al.] // *Joint Bone Spine*. – 2010. – Vol. 77, N 6. – P. 552–557.
264. Weemaes, C.M. Inactivation of haemolytic complement by house dust allergen in the serum of children with atopic diseases / C.M. Weemaes, J.W. Stoop, L. Berrens // *Clin. Allergy*. – 1977. – Vol. 7. – P. 75–82.
265. Yamada, Y. House Dust Mites Induce Production of Endothelin-1 and Matrix Metalloproteinase-9 in Keratinocytes via Proteinase-Activated Receptor-2 Activation / Y. Yamada, T. Matsumoto // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2017. – Vol. 173, N 2. – P. 84–92.
266. Zraggen, S. An important role of blood and lymphatic vessels in inflammation and allergy / S. Zraggen, A.M. Ochsenbein, M. Detmar // *J. Allergy (Cairo)*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 672381.