

СЕМЕРНИК ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

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

14.01.08 – педиатрия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Пермь – 2021

Работа выполнена на кафедре детских болезней №2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Лебеденко Александр Анатольевич

Официальные оппоненты:

Пампура Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел аллергологии и клинической иммунологии, руководитель отдела

Ильенкова Наталья Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра детских болезней с курсом последипломного образования, заведующая кафедрой

Мещеряков Виталий Витальевич, доктор медицинских наук, профессор, бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа - Югры «Сургутский государственный университет», кафедра детских болезней, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « » _____ 2021 г. в ____ час. ____ мин. на заседании диссертационного совета Д 208.067.02 при ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России по адресу: 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26, с авторефератом – на сайтах <http://www.psma.ru/> и <http://www.vak.minobrнауки.gov.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Карпунина Наталья Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В течение последних десятилетий во всем мире отмечается значительный рост аллергических заболеваний [J. Stern, J. Pier, A.A. Litonjua, 2020; A.B. Fishbein, J.I. Silverberg, E.J. Wilson, P.Y. Ong, 2020]. 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 [R. Doucet–Ladevèzeetal., 2019], 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 % [S.J. Szeffleretal., 2020;K.R. Rossetal., 2020;J. Stern, J. Pier, A.A. Litonjua, 2020; R. Azmehetal., 2020]. Распространенность атопического дерматита (АД) значительно варьирует в географическом отношении, но в некоторых странах может затрагивать до 20 % детей [R. Doucet–Ladevèzeetal., 2019; N.O. delaO–Escamilla, 2020]. В Российской Федерации распространенность БА среди взрослых составляет 6,9 %, а среди детей и подростков – около 8-10 % [Авдеев С.Н. и др., 2018]. Распространенность симптомов АтД в различных регионах Российской Федерации колеблется от 6,2 до 15,5 % [В.Н. Дроздов и др., 2021].

Аллергические заболевания - это хронические патологические процессы, которые не только снижают качество жизни детей, но и могут прогрессировать, приводя к формированию опасных для жизни состояний [H. Hoch, M. Kattan, S.J. Szeffler, 2020; H.M. Kansenet al., 2020]. При этом 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 [Li Hanet al., 2020; M. Ražnatović Đurovićet al., 2020]. 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 [N.O. de l aO–Escamilla, R. Sidbury, 2020; R. Azmehetal., 2020]. 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 [Youpeng Wang et al., 2020; H.H. Park et al., 2020;

N.A.H.M. Hasan, H.H. Harith, D.A. Israf, C.L. Tham, 2020]. При этом особое влияние оказывают цитокины, такие как факторы роста (фактор роста эндотелия сосудов [VEGFA], трансформирующий фактор роста β [TGF β]), ферменты, участвующие в реорганизации тканей (металлопротеиназы [MMP]), 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, 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 результаты дают 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 персонализированной медицине, к своевременному выявлению факторов, способствующих формированию тяжелого течения заболевания, ранней диагностике и подбору адекватной терапии с учетом индивидуальных молекулярно-генотипических особенностей 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, atopического 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, atopического 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, atopическим дерматитом, сочетанием данных патологий и детей контрольной группы.
4. Изучить ассоциации полиморфных вариантов генов фактора роста эндотелия сосудов (*C634G* гена *VEGFA*), трансформирующего фактора роста β (*Arg25Pro* гена *TGF β ₁*), 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, atopическим 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, atopическим 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 β 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 БА и АД. Показано, что у детей, являющихся носителями *ArgArg*-генотипа по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGF β ₁*, значительно повышен риск развития БА (*OR* = 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 *TGFβ₁* и *-8202A>G* гена *MMP9* отмечаются сильные синергичные связи, способствующие повышению риска развития БА и АД 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 БА и АД 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 БА и АД 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.

Методология и методы 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 БА и АД. Набор материала осуществляли сплошным методом (рис. 1).

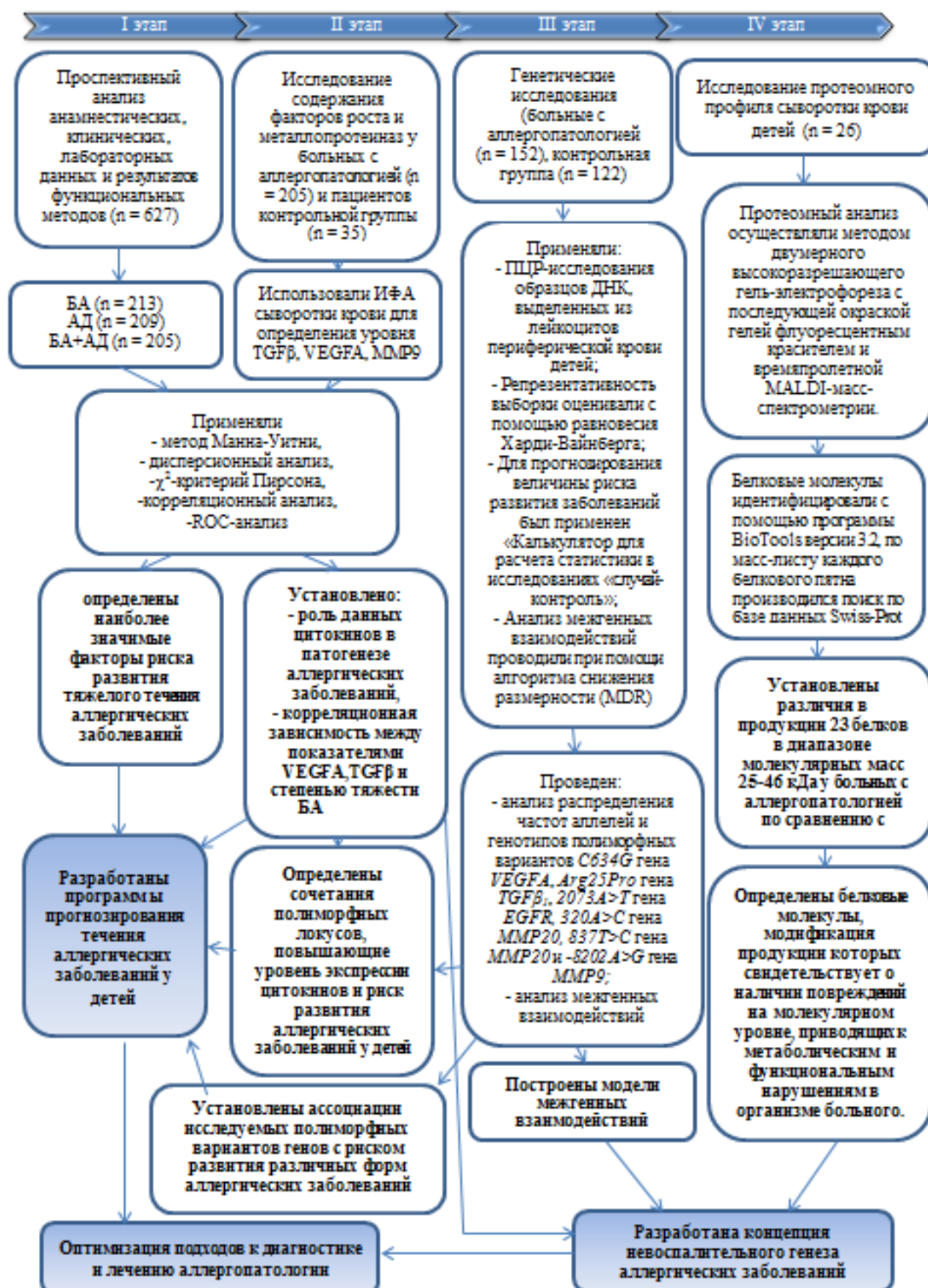


Рисунок 1. Дизайн исследования.

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 клинико-anamnestических данных, а также результатов дополнительных методов исследования в соответствии с действующими клиническими рекомендациями. 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 и ОФВ1, соответствующие определенной степени тяжести. 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. Причем критерии включения и исключения, приведенные выше, также учитывались при формировании данной выборки больных.

Всем детям было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. На основании полученных данных определены наиболее значимые клинико-anamnestические 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 БА и АД из пациентов представленных выше были отобраны 205 больных (84 ребенка, страдающих БА,

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 имеющие 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 TGF β и VEGFA и уровня MMP9 в сыворотке методом 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 β (Arg25Pro гена TGF β 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 (60 детей, страдающих БА, 26 пациентов с АД и 66 больных, имеющих сочетание БА и АД). Контрольную группу составили 122 ребенка I и IIa групп здоровья, 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). 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, их клиническими формами, тяжестью течения, возрастом манифестации, а также провести анализ межгенных взаимодействий, предрасполагающих к развитию различных клинко-патогенетических вариантов течения аллергических заболеваний.

На четвертом этапе с целью углубленного изучения невоспалительного генеза БА и АД 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 FisherScientific, США) в пропорции 1:99, аликвотировали и

подвергали консервации в низкотемпературном холодильнике при -86°C до подбора идентичного по полу, возрасту и массо-ростовым параметрам ребенка, относящегося к I и IIa 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 выполнена разработка программ прогнозирования неконтролируемого и тяжелого течения БА, АД, а также сочетания БА и АД, основанных на анамнестических данных и результатах молекулярно-генетического обследования. Полученные программы позволяют не только прогнозировать тяжесть течения заболевания у детей, но и корректировать терапевтическую тактику, оптимизировать подходы к диагностике и лечению больных.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 10.0. фирмы Stat Soft. Inc.) и Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp.). Использовались параметрические и непараметрические параметры и критерии. Для построения моделей прогнозирования степени тяжести аллергических заболеваний использовался ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic curve) с построением кривых и определением коэффициента площади кривой (AUC). Оценка диагностической (прогностической) значимости гипотезы осуществлялась на основании показателя AUC. Репрезентативность выборки больных, включенных в генетическое исследование, оценивали с помощью равновесия Харди-Вайнберга. Ожидаемые частоты аллелей и генотипов определяли с помощью расчета χ^2 на калькуляторе равновесия Харди-Вайнберга, включающий анализ погрешности определения <http://www.oege.org>. Оценку различий в распределении полиморфных вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 при помощи программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль». О риске развития БА судили по отношению шансов OR, которое вычисляли при помощи программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль». OR указан 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.

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 β ₁* имеют повышенный риск развития БА.
3. Повышение концентрации металлопротеиназы 9 играет важную роль в патогенезе БА и АД, 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 *TGF β ₁* 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 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) 2018-2019 гг.; 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 ЕААСI (Лиссабон, Португалия), 2019, (Лондон, Великобритания), 2020; XIII Всемирном конгрессе по астме, аллергии и иммунопатологии, III Международном конгрессе 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 20.10.2020 г.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Прогнозирование течения бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей

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 %).

В рамках данного исследования обследовано 213 детей, страдающих БА различной степени тяжести. 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 больных БА 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 детей, показали, что средние значения индекса массы тела составили 18 [15; 21], тогда как 6,6 % детей, страдающих БА, имели избыточную массу тела, 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 крапивница – 16,9 %, острый ринофарингит зарегистрирован у 4,7 %, искривление носовой перегородки у 7 детей (3,3 %), одинаково часто встречался сальпингоотит, гиперплазия лимфоидного кольца и нарушения пуринового обмена – 2,3 %. И только 13 пациентов (6,1 %) не имели сопутствующей патологии. Большинство больных БА получали препараты базисной терапии (67,1 %).

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. Отягощенную наследственность по аллергическим заболеваниям имели 126 (59,2 %) пациентов. Наиболее часто аллергические заболевания отмечались по материнской линии (25,4 %), тогда как по отцовской в 15,0 % случаев, а по обеим линиям родства заболевания имели 18,8 % пациентов.

В рамках данного исследования было обследовано 209 детей, страдающих АД. 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 %)]. 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 патогномичными 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.

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 инструментального 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, 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 %). 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 отмечены у 29 (13,9 %), респираторные – у 57 (27,3 %), в то время как крапивница и отек Квинке лишь у 4 родственников.

В группу детей с сочетанием БА и АД 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 легкое течение отмечено у 141 (61,4 %) больного. Анализ массовых показателей позволил установить, что лишь у 9 (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 лимфоглоточного 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 ($p > 0,05$). 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 %. Процент детей, имеющихотягощенную наследственность в данной группе, значительно выше, чем в предыдущих выборках (71,2 %).

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 в 39,8 % случаев, в то время как данный показатель находился в пределах референтных значений в 60,2 % случаев.

Причем обращает на себя внимание, что среди больных, имеющих БА, более чем у половины детей значения общего IgE не превышали 100 МЕ/мл. 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 ($p > 0,05$).

Исследование уровня аллергенспецифических IgE позволило не только проанализировать спектр сенсибилизации, но и установить наиболее значимые аллергены.

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 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. Среди пылевых аллергенов наиболее значимой являлась пыльца сорных и луговых трав (таких как тимopheевка, амброзия, костер, полевица), пыльца деревьев (преимущественно бузины). 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. Изучение спектра сенсibilизации к эпидермальным аллергенам показало, что для больных 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, часто выявлялись специфические IgE к шерсти овцы (15,2 %).

Проведенное комплексное обследование когорты пациентов с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом позволило выявить наиболее значимые факторы, предрасполагающие к более тяжелому течению заболевания, и разработать на основе комбинации различных параметров, программы прогнозирования риска их тяжелого течения.

Прежде чем приступить к анализу полученных нами данных, все включенные в данное исследование больные, страдающие АД, 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. Зависимость между всеми описанными выше факторами описывает математическое выражение: $y = \exp z / (1 + \exp z)$, при $z = 22,7 + 0,49 * B - 0,32 * BM - 0,55 * S - 4,5 * P - 1,1 * PPP$, 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); PPP – 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. 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. 2).

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	4,9
SCORAD, баллы	40	-0,55	-1,28
Распространенность повреждения кожи (ограниченный - 1, распространенный - 2, диффузный – 3);	2	0,096	-22
Наличие патологии печени и/или желчевыводящих путей (при наличии патологии – 1, при отсутствии – 0)	1	1,09	0,192
			5,602
Расчетное значение коэффициента "У"			270,9678
			0,996
Заключение		Риск тяжелого течения АД высокий	

Рисунок 2. Окно автоматического расчета риска тяжелого течения АД у детей

Методом логит-регрессии также был проведен статистический анализ клинико-лабораторных параметров, позволивший выявить ряд факторов, повышающих вероятность развития тяжелого течения БА у детей. Прежде чем перейти к анализу из обследованных нами больных БА 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 тяжелого течения БА и целым комплексом клинико-функциональных показателей. Зависимость между всем комплексом параметров описывает математическое выражение: $y = \exp z / (1 + \exp z)$, при $z = -4,99 + 0,135 \cdot B$

$0,009*ДН+0,004*ПСВ+0,096*ПР+1,09*ПП+0,64*ФН$, где В – 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. 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. 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 противовоспалительной терапии.

Проведенный методом логит-регрессии статистический анализ полученных данных позволил дать характеристику нелинейной связи между риском тяжелого течения БА на фоне АД и целым комплексом показателей аналогичных тем, которые изучались при монопатологии. Однако, наличие нелинейной связи между риском тяжелого течения БА на фоне АД было установлено только в отношении нескольких показателей, зависимость между которыми описывает математическое выражение: $y = \exp z / (1 + \exp z)$, при $z = -29,6 + 0,44*В - 0,006*ВМ + 2,06*ДН - 0,07*ПБТ - 0,56*ФН - 0,05*ПОС + 4,7*Эри$, где В – возраст, лет; ВМ – возраст манифестации БА, лет; ДН – степень дыхательной недостаточности; ПБТ – продолжительность базисной терапии, мес.; ФН – связь обострений заболевания с физической нагрузкой; ПОС – пиковая экспираторная скорость потока, л/сек; Эри – показатель уровня эритроцитов в крови больного, $10^{12}/л$. Следует отметить, что 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») - с легкой формой БА. Достоверность полученных результатов подтверждает статистически значимая зависимость между включенными в данную модель факторами ($\chi^2 = 24,1$, $p = 0,001$). Далее методом ROC анализа была найдена дифференциальная точка разделения для Y, повышающая риск тяжелого течения БА у больных с сочетанием БА и АД. Установлено, что при превышении значения Y величины 0,269 риск тяжелого течения БА повышался с 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 также была создана компьютерная программа, позволяющая автоматически рассчитать риск развития тяжелого течения БА у детей с сочетанием БА и АД.

Роль факторов роста и металлопротеиназы 9 в патогенезе 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 формированию функциональных нарушений микроциркуляции, сопровождающихся повышенной проницаемостью сосудов. Проведенное нами исследование показало, что концентрация данного цитокина у пациентов с БА и АД намного превышает значения у детей, включенных в группу контроля (табл. 1). Анализ полученных данных показал, что среди детей, страдающих БА, установлены достоверно значимые отличия концентрации фактора роста эндотелия сосудов в зависимости от тяжести течения заболевания ($p < 0,0001$). Следовательно, показатель VEGF в сыворотке крови больных БА может быть биологическим маркером, отражающим тяжесть клинического течения заболевания. Доказательством данному факту является установленная значимая корреляционная зависимость между значением VEGFA и течением БА ($r = 0,802$; $p < 0,0001$). 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 с моновалентной сенсibilизацией (80,64 [79,36; 84,97] пг/мл).

Таблица 1

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	p₀₁ < 0,0001 p₀₂ < 0,0001 p₀₃ = 0,0036 p₀₁₂₃ < 0,0001

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль]. p₀₁₂₃ - значимость различий в трех группах (по критерию Краскелла-Уолиса); p₀₁ - значимость различий между группой контроля и больными БА; p₀₂ - значимость различий между группой контроля и больными АД; p₀₃ - 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 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 значение 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 VEGFA в сыворотке крови пациентов и приростом ОФВ1 после ингаляции бронхолитика отмечается обратная корреляционная зависимость (r = -0,438; p = 0,022). 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.

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 VEGFA 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 ($p > 0,05$).

Установлено, 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]. 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, 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 не 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 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.

Выявлено наличие прямой корреляционной зависимости между значениями VEGFA и возрастом манифестации АД ($r = 0,50$; $p = 0,002$). 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, значит, у них выше вероятность активации процессов ремоделирования тканей и развития тяжелых клинических проявлений 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 ($p = 0,015$). 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 заболевания как у детей, страдающих только БА, так и при сочетании БА и АД. Установлено, что аналогично данным, полученным у больных с монопатологией (БА), в группе пациентов, страдающих БА и АД одновременно, дети, не отвечающие на противовоспалительную терапию, имели показатели VEGFA (133,13 [127,56; 214,80]) пг/мл в два раза выше, чем у больных, достигших контроля (85,12 [27,04; 116,28]) пг/мл [$p = 0,002$]. При этом 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 ($r = -0,692$; $p < 0,0001$), что свидетельствует о значительном влиянии VEGFA на процессы ремоделирования бронхолегочной системы.

Таким образом, результаты проведенного исследования подчеркивают значимость VEGF в патогенезе БА и АД, его роль в поддержании воспаления, ремоделировании тканей, а также развитии зуда.

TGF β 1 является одним из важнейших цитокинов, принимающих участие в регуляции процессов аллергического воспаления и ремоделирования тканей. Проведенное нами исследование показало, что его концентрация в сыворотке крови у детей, страдающих БА и АД, значительно превышает показатели контрольной группы (табл. 2). 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. Стоит отметить, что достоверных отличий между группами обследованных нами больных, страдающих БА, АД и их сочетанием, установлено не было ($p > 0,05$).

Таблица 2

Показатели TGFβ1 в группах обследованных пациентов, пг/мл

№	Диагноз	Концентрация TGF β1, 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]
	Р	p₀₁ = 0,002 p₀₂ < 0,0001 p₀₃ = 0,003

Примечание: в таблице величины представлены в виде Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль]. p₀₁ значимость различий между группой контроля и больными БА; p₀₂ значимость различий между группой контроля и больными АД; p₀₃ значимость различий между группой контроля и больными БА+АД. При попарном сравнении p рассчитывали по критерию Манна-Уитни. Жирным шрифтом выделены p < 0,05.

Анализ показателей уровня TGFβ1 в сыворотке крови больных БА в зависимости от тяжести течения заболевания выявил достоверно значимые отличия концентрации данного цитокина среди пациентов с легким и тяжелым течением заболевания (p = 0,005). При этом установлена обратная корреляционная зависимость между степенью тяжести БА и концентрацией TGFβ1 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 провоспалительных 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 TGFβ1 (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 TGFβ1 в сыворотке крови больных и динамикой прироста ОФВ1 после пробы с бронхолитиками (r = 0,790; p < 0,001). 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 TGFβ1 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 TGFβ1 в процессах, регулирующих изменение соотношения Т-лимфоцитов, и приводящее не только к трансформации цитокинового профиля, но и к высокой продукции IgE.

Также следует отметить, что у пациентов, имеющих указания на наличие аллергических заболеваний у родственников по материнской линии, концентрация TGFβ1 в сыворотке крови значительно выше (280,59 [250,88; 867,16] пг/мл), чем у детей безотягощенного аллергоанамнеза (2,24 [2,08; 2,69] пг/мл) [$p = 0,0003$]. Это подтверждает высокую значимость наследственной предрасположенности и диктует необходимость проведения генетических исследований для прогнозирования риска развития и тяжести течения заболевания.

Также нами проведено сравнение уровней TGFβ1 в зависимости от выраженности ответа на проводимую противовоспалительную терапию. Оказалось, что среди больных БА, имеющих положительную реакцию на базисную терапию, значения TGFβ1 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 реакции, требующие детального изучения и индивидуального подхода при подборе базисной терапии ребенку. При этом установлена прямая корреляционная зависимость между показателями ОФВ1 и уровнем TGF-β1 ($r = 0,439$; $p = 0,022$), 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 при тяжелой БА они варьировали в диапазоне $8,21 \pm 4,44$ л/мин ($p < 0,0001$). Причем между показателями TGF- β 1 и динамикой прироста значений ОФВ1 после ингаляции сальбутамола выявлена прямая корреляционная зависимость ($r = 0,79$; $p < 0,0001$).

В ходе исследования было установлено, что концентрация TGF β 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) [$p < 0,0001$]. Принимая во внимание тот факт, что TGF β 1 оказывает профиброзные эффекты на ткани, проявляющиеся усилением пролиферации, дифференцировки и функциональной активности фибробластов по выработке коллагена, значительное увеличение его концентрации, зарегистрированное у больных с АД, свидетельствует об интенсивности формирования фиброза. 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 β 1 в сыворотке крови значительно меньше, чем у больных с тяжелым и среднетяжелым АД ($p < 0,05$). 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 β 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 [$p = 0,320$].

Для оценки влияния TGF β 1 при сочетанном течении БА и АД также важным представляется анализ его концентрации в зависимости от степени тяжести заболевания. В целом, в отличие от группы с монопатологией, у пациентов, страдающих и БА и АД, отсутствуют достоверно значимые отличия концентрации TGF β 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). Подробный анализ результатов функциональных методов исследования

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

Результаты проведенных нами исследований показали, что у всех детей, имеющих клинические проявления БА или АД, концентрация ММР9 в сыворотке крови была достоверно выше, чем в группе контроля (табл. 3).

Таблица 3

Показатели ММР9 у обследованных пациентов, нг/мл

№	Группа	Показатели ММР9 в сыворотке крови, нг/мл, Ме [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	$p_{01} = 0,002$ $p_{02} < 0,0001$ $p_{03} = 0,003$ $p_{0123} = 0,001$

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 ($p \geq 0,05$). 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. 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 ($p < 0,0001$).

Установлено, 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 ($r = -0,414$; $p = 0,003$).

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.

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 БА 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 ММР9 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.

Проведенное нами исследование показало, что у больных с тяжелым течением БА отмечается снижение концентрации не только ММР9 в сыворотке крови, но и TGF β , принимающего активное участие в реорганизации тканей. Ведь именно TGF β 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 и др. Согласно 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 с АД, то следует отметить, что значения ММР9 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 ММР9 в сыворотке крови. При этом достоверных отличий в зависимости от степени тяжести зарегистрировано не было ($p = 0,538$). Однако установлена четкая тенденция к увеличению концентрации ММР9 в сыворотке крови с возрастом больных. 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. 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 ($p = 0,046$). У больных с АД отмечается обратная корреляционная зависимость между показателями данной протеазы в сыворотке крови и частотой эпизодов ОРВИ, перенесенных в течение года ($r = -0,459$; $p = 0,005$).

Установлено, 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 ММР9 в сыворотке крови у этих пациентов были зарегистрированы только между детьми, находящимися на естественном и смешанном вскармливании.

Анализ данных, полученных в группе пациентов, страдающих БА и АД, показал, что у них так же отмечается значимое повышение показателей ММР9 в сыворотке крови (473,02

[339,33; 687,26] пг/мл) по сравнению с контрольной группой (251,80 [155,67; 352,79] нг/мл) [$p = 0,003$]. У детей с контролируемым (566,12 [424,94; 687,26] пг/мл) и неконтролируемым (376,55 [241,04; 815,64] пг/мл) течением БА значения ММР9 не имели статистически значимых отличий ($p = 0,831$). Однако у детей с поливалентной сенсibilизацией концентрация данной матриксной металлопротеиназы была несколько выше (473,95 [413,77; 687,26] пг/мл), чем при моновалентной (246,20 [234,24; 776,06]) [$p = 0,161$].

Полученные нами данные свидетельствуют о значимой роли исследуемых факторов роста и металлопротеиназы 9 в патогенезе БА и АД, а также о неатопической составляющей в их генезе, способствующей формированию необратимых склеротических изменений 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.

Взаимосвязи ассоциации полиморфных вариантов генов факторов роста и металлопротеиназ с риском развития бронхиальной астмы и атопического дерматита у детей

В ходе данной работы был проведен подробный анализ ассоциации полиморфных локусов генов исследуемых факторов роста (-634G>C гена *VEGFA*, Arg25Pro гена *TGFβ1*, 2073A>T гена *EGFR*) и некоторых матриксных металлопротеиназ (-8202A>G гена *MMP9*, 320A>C гена *MMP20*, 837T>C гена *MMP20*) с риском формирования БА и АД у детей.

Установлены статистически значимые различия в частотах аллелей и генотипов по полиморфизму 634G>C гена *VEGFA* между группой больных БА и контрольной группой ($p = 0,01$) [табл. 4].

Таблица 4

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

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

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

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). Важно отметить, что у пациентов, носителей гетерозиготного генотипа, содержание *VEGFA* в сыворотке крови значительно больше ($187,03 \pm 19,03$ пг/мл), чем у гомозигот по исследуемому полиморфизму ($102,06 \pm 45,24$ пг/мл; *p* = 0,007).

Исследование частот аллелей и генотипов по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ₁* установило наличие статистически значимых различий между пациентами, страдающими БА и детьми контрольной группы (табл. 5). 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 здоровых детей лишь 46 %. 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 БА значительно повышен (*OR* составил 10,57; 95% *CI* – 4,17-26,79, *p* < 0,001).

Таблица 5

Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму *Arg25Pro* гена *TGFβ₁* 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> (χ^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
χ^2 (p)	35.48 (p<0,001)		31.76 (p<0,001)			
<i>OR</i> (95 % <i>CI</i>)	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

Исследование концентрации *TGFβ₁* в сыворотке крови детей, страдающих от приступов удушья, показало, что максимальные цифры данного фактора роста отмечаются у носителей *Arg/Arg*-генотипа ($205,99 \pm 316,65$ (2,69 [2,26; 277,62]) пг/мл), тогда как средние его значения у гетерозигот составили $2,29 \pm 0,29$ (2,25 [2,01; 2,47]) пг/мл.

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*. При этом 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 ($p > 0,05$).

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 %), а, следовательно, их взаимодействие повышает суммарный риск развития БА у детей (рис 3).

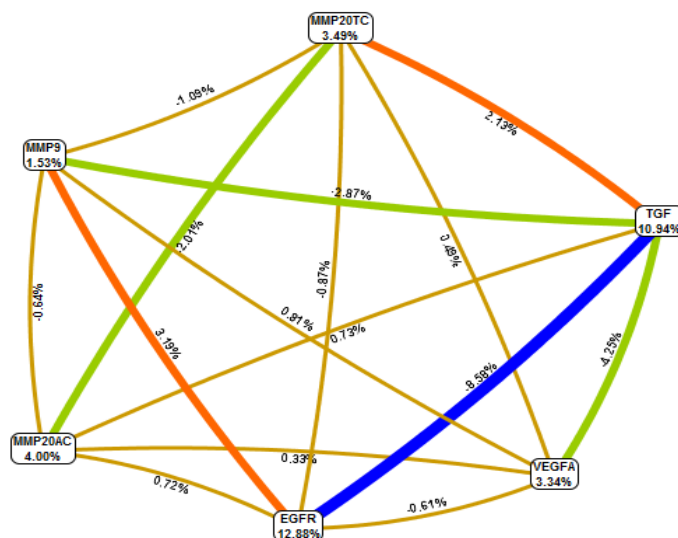


Рисунок 3. Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *MMP9*, *MMP20*, *VEGFA*, *EGFR*, *TGFβ* при бронхиальной астме у детей
Примечание: на вершинах шестигранника представлены информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров. Красным цветом обозначено наличие синергизма, зеленым – отсутствие синергизма

Итак, результаты проведенных нами исследований установили, что полиморфизмы -634G>C гена *VEGFA* и Arg25Pro гена *TGFβ₁* ассоциированы с высоким риском развития БА у детей ($p < 0,05$). Показана взаимосвязь -634G>C полиморфизма гена *VEGFA* и Arg/Arg-генотипа гена *TGFβ₁* с более высокой продукцией данных факторов роста у больных. В отличие от больных БА, анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей у пациентов с АД не выявил достоверно значимых отличий по частоте встречаемости всех исследуемых аллелей и генотипов за исключением полиморфизма -8202A>G гена *MMP9* (табл. 6). Важно отметить, что у детей с генотипом A/A по данному полиморфному варианту 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 $OR - 0,07$. Однако, исследования концентрации MMP9 в сыворотке крови больных АД, имеющих

различные генотипы, показало, что достоверных отличий между носителями гомо- и гетерозиготного генотипов установлено не было ($p > 0,05$).

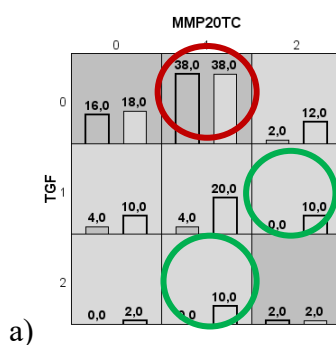
Таблица 6

Частота встречаемости генотипов и аллелей по исследуемым SNP генов металлопротеиназы среди больных atopическим дерматитом

Генотип, аллель	Больные	Здоровые	χ^2	P	OR	
	n = 26	n = 122			Знач.	95 % CI
-8202A>G гена MMP9						
Аллель A	0.846	0.508	19.95	p<0,001	5.32	2.41 – 11.78
Аллель G	0.154	0.492			0.19	0.08 – 0.42
Генотип A/A	0.692	0.230	22.91	p<0,001	7.55	2.97 – 19.21
Генотип A/G	0.308	0.557			0.35	0.14 – 0.87
Генотип G/G	0.000	0.213			0.07	0.00 – 1.17
PXB (χ^2)	0,86	1.61				

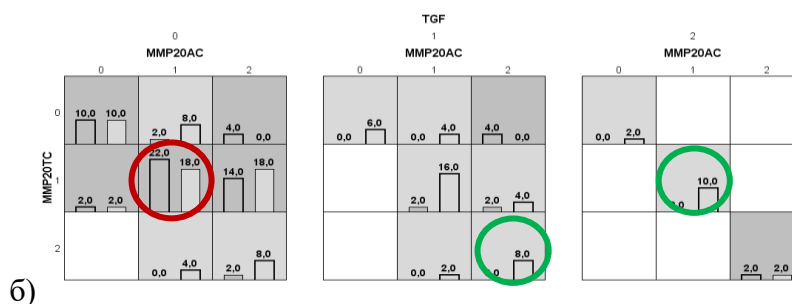
Примечание: PXB- равновесие Харди-Вайнберга

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 *TGF β ₁* и *2073A>T* гена *EGFR* ($p < 0,05$). Причем важно отметить, что аллельный *Arg/Arg*-вариант гена *TGF β ₁* является сильным фактором риска развития как БА, так и сочетанной аллергопатологии у детей ($OR = 6,57$ [95% CI – 3.02 – 14.33, $p < 0,001$]). А анализ межгенных взаимодействий изучаемых полиморфных вариантов генов позволил определить наиболее значимые сочетания генотипов повышенного и пониженного рисков развития БА и АД (рис. 4).



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 – OR0,08 (0,005 – 1,39; $p = 0,04$)
 Для зеленого круга в центральном квадрате – OR0,21 (0,046 – 0,93; $p = 0,047$)
 Для красного круга – OR 2,89 (1,41 – 5,91; $p = 0,0054$)

Рисунок 4. Модели межгенных взаимодействий генов-кандидатов предрасположенности к развитию сочетанной аллергопатологии (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.

Полученные нами результаты генетических исследований показали насколько важно изучение вклада не только отдельных полиморфизмов, но и сочетаний аллелей в патогенез аллергических заболеваний 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 БА и АД детей.

Модели прогнозирования течения бронхиальной астмы у детей с 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. 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 F1 и F2 имели следующий вид:

$$F1=1,14*X1+2,9*X2+1,44*X3+2,3*X4-9,45, F2=1,43*X1+4,3*X2+2,1*X3+3,5*X4-16,99,$$

где F1 – значение функции, соответствующее заключению о контролируемом течении БА, F2 – значение функции, соответствующее заключению о высоком риске неконтролируемого течения БА, X1 – возраст пациента в годах, X2 – 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 БА 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 ($p < 0,05$). Все показатели, включенные в модель, имеют высокое значение Wilks' Lambda (лямбды Уилкса). 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 атопическим 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. 5).

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 5. Окно автоматического расчета риска неконтролируемого течения БА у детей с атопическим дерматитом

С помощью данного способа было обследовано 26 детей, страдающих БА и АД. Согласно критериям, приведенным в рекомендательных документах, 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%, эффективность - 92,3%.

Тщательный анализ полученных данных позволил также 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 $K = \frac{\exp(-2,05 - 13,83 \cdot x + 0,037 \cdot y)}{1 + \exp(-2,05 - 13,83 \cdot x + 0,037 \cdot y)}$, где K – коэффициент риска, x – концентрация в сыворотке крови TGF-β 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 БА и АД 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-β в нг/мл и VEGFA в пг/мл. Зависимость между тяжестью течения БА и концентрацией факторов роста в сыворотке крови иллюстрирована на рисунке 6.

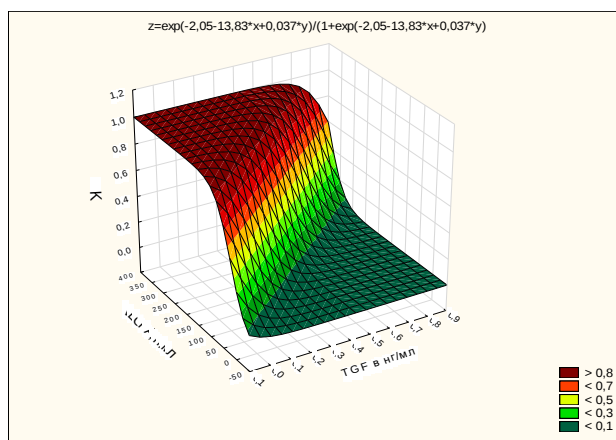


Рисунок 6. Кривая логит-регрессии для расчета риска тяжелой степени БА при сочетании с АД у детей

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.

Для оценки чувствительности и специфичности данной модели проведено обследование 29 детей, страдающих БА и АД. Согласно критериям, приведенным в рекомендательных документах, у 23 детей было диагностировано тяжелое течение БА, а у 6 детей легкое и среднетяжелое. 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. 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.

Особенности протеомного спектра сыворотки крови детей с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом (данные литературы и собственных исследований)

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). Подробный анализ протеинограмм в каждой группе обследованных пациентов позволил выявить следующие отличия. Так, у детей, страдающих БА, отмечено, что продукция 16 белков снижалась (диапазон $M_r = 25-59$ кДа) и 4 – повышалась (диапазон $M_r = 25-39$ кДа) в сыворотке крови относительно группы контроля (рис. 7). Сравнение двумерных белковых профилей сыворотки крови больных атопическим дерматитом и детей контрольной группы также выявило ряд отличий, 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.

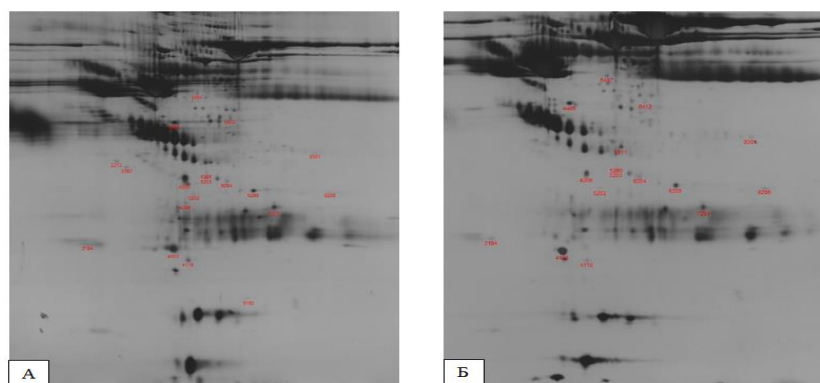


Рисунок 7. Протеомные карты сыворотки крови ребенка контрольной группы (А) и больного БА (Б)

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. Следует отметить, что в протеомном спектре сыворотки больных как с кожными проявлениями атопии, так и с сочетанием АД и 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 Bio Tools 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) [табл. 9].

Таблица 9

Белки, идентифицированные методом протеомного анализа сыворотки крови обследованных пациентов

Названия белка (ID)	№ в базе Swiss-Prot	Mr, кДа	pI	Score	Sequence coverage
Глутатионпероксидаза 3 (GPX3)	P22352	25,8	9,1	67,3%	37,6
Транстретин(ТТНУ)	P02766	16	5,4	68,7%	129
Компонент комплемента С4-В (C04-B)	P0C0L5	32,6	6,4	74,1	67,2
Компонент комплемента С3 (C03)	P01024	21,6	6,1	113	15,4

Примечание. Mr – молекулярная масса белков; pI – изоэлектрическая точка белков; Score – индекс достоверности идентификации белка; sequence coverage – процент покрытия аминокислотной последовательности белка по базам данных совпадающими пептидами.

Среди всех белков удалось идентифицировать четыре молекулы: SPP 4209 – транстиретин (ТТНУ); SPP 6208 – фрагмент компонента комплемента 4b (C4b); SPP 4110 – глутатионпероксидаза 3 (GPX3); SPP 7203 – фрагмент компонента комплемента 3 (C3).

У больных, страдающих БА, отмечено значимое снижение экспрессии всех идентифицированных молекул. В то время как у пациентов с АД зарегистрировано снижение интенсивности пятен ТТНУ, C4b, C3, сопряженное с повышением концентрации GPX3 в сыворотке крови. Если же говорить о пациентах с сочетанным вариантом аллергопатологии, то у них также выявлено снижение экспрессии ТТНУ, C4b, GPX3, как и у больных БА, однако при этом на 14,2% повышена интенсивность пятна C3 на двумерных протеинограммах.

Оценив основные функции идентифицированных дифференциально-экспрессирующихся белков, можно составить определенное представление об их роли в патогенезе БА и АД 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 8.).

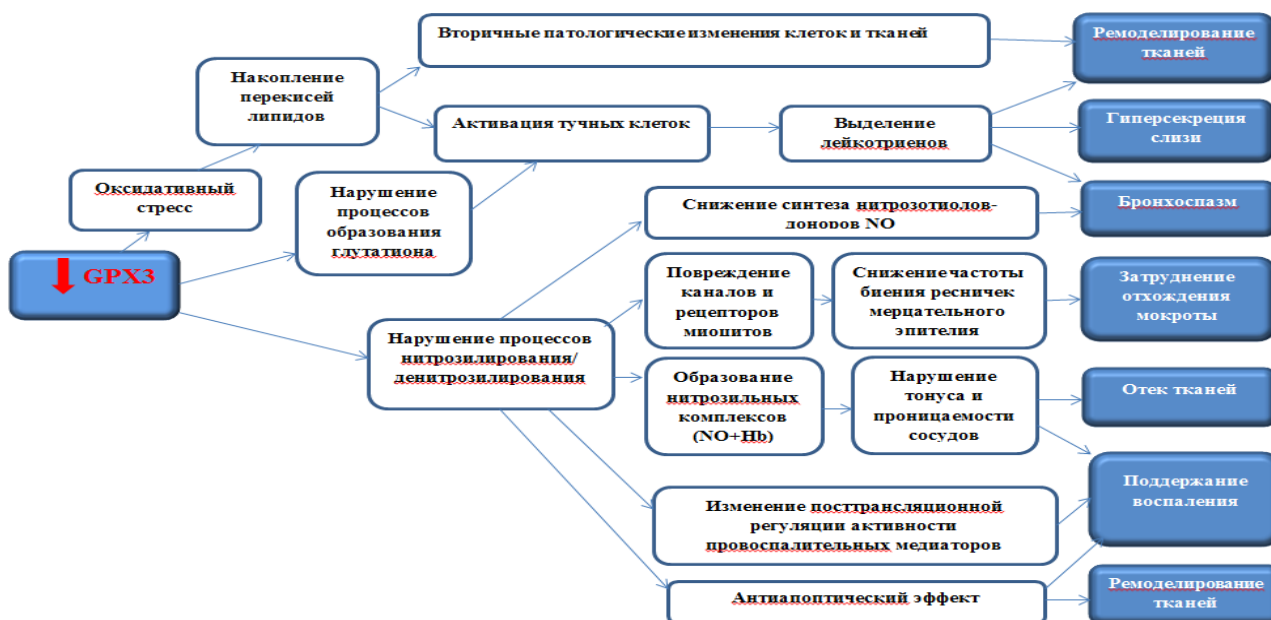


Рисунок 8. Роль снижения экспрессии глутатионпероксидазы в патогенезе аллергического воспаления

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. 9).



Рисунок 9. Роль снижения экспрессии транстретина в патогенезе БА и АД

Снижение уровня C3 и C4 фракций комплемента в сыворотке крови больных детей, страдающих аллергическими заболеваниями может быть следствием хронического воспаления и истощения компенсаторных возможностей организма (рис. 10).



Рисунок 10. Роль C3 и C4 фракций системы комплемента в патогенезе БА и АД

Установленные в ходе данного исследования особенности протеомного спектра у детей с БА и АД расширяют наши представления о молекулярных аспектах их патогенеза, обеспечивая новые возможности для диагностики данных заболеваний у детей.

Заключение

Полученные в ходе данного научного исследования результаты востребованы как в научной среде, так и в практическом здравоохранении, т.к. БА и АД являются серьезной проблемой общественного здоровья. Применение современных методов исследования позволило разработать комплексный подход не только к диагностике, но и прогнозированию течения БА, АД и сочетания этих нозологий. А выявление предикторов тяжелого течения данных заболеваний 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 β , 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 β 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 β_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 β_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 β_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 *TGFβ₁* 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, транстиретин, 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 БА и АД 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.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в ходе данного диссертационного исследования результаты позволили раскрыть новые аспекты в развитии БА и АД у детей. Дальнейшее изучение факторов, способствующих их тяжелому течению, а также ремоделированию тканей является перспективным направлением в педиатрии и аллергологии. Будущие исследования патогенеза аллергических заболеваний позволят не только улучшить стратификацию риска их формирования, но и способствуют разработке современных таргетных препаратов, направленных на достижение контроля над заболеванием, а также предотвращение развития осложнений. А данные полученные в ходе данной работы, внедренные в ежедневную клиническую практику, способствуют разработке целого комплекса профилактических мер.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список работ, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ

1. Сависько, А.А. Отличительные особенности генотипических и фенотипических значений показателей и факторов риска у детей с контролируемым и неконтролируемым течением бронхиальной астмы / А.А. Сависько, А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник // Владикавказский медико-биологический вестник. - 2011. - Т. 12. - № 19. - С. 94-99.
2. Лебеденко, А.А. Нейрогуморальные аспекты обострения бронхиальной астмы у детей / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник // Пульмонология. - 2013. - № 5. - С. 36-39.
3. Семерник, О.Е. Показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у детей с бронхиальной астмой в период обострения и ремиссии заболевания / Семерник О.Е. // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 2-1. - С. 157-161.
4. Семерник, О.Е. Кардиовегетологические аспекты бронхолитической терапии у детей с бронхиальной астмой / О.Е. Семерник // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. - Т. 20. - № 2. - С. 208-212.

5. Семерник, О.Е. Особенности вегетативного реагирования у детей с бронхиальной астмой в периоде обострения заболевания / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2015. - Т. 70. - № 2. - С. 222-226.
6. Лебеденко, А.А. Оптимизация бронхолитической терапии у детей с обострением бронхиальной астмы с учетом риска развития кардиогемодинамических нарушений / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2015. - Т. 78. - № 7. - С. 7-11.
7. Лебеденко, А.А. Состояние систолической и диастолической функции сердца у подростков с бронхиальной астмой в периоде обострения / А.А. Лебеденко, Т.Д. Тараканова, О.Е. Семерник // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2015. - Т. 10. - № 3. - С. 217-221.
8. Лебеденко, А.А. Изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов *Arg25Pro* гена трансформирующего фактора роста β_1 и *C634G* гена фактора роста эндотелия сосудов с риском развития атопического дерматита у детей / А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, Е.В. Машкина, О.Е. Семерник, Т.К. Дрейзина // Российский Аллергологический Журнал. - 2017. - Т. 14. - № 4-5. - С. 66-70.
9. Лебеденко, А.А. Диагностические возможности современных методов исследования функции внешнего дыхания у детей с бронхиальной астмой / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, Е.Б. Тюрина // Сеченовский вестник. - 2017. - № 2 (28). - С. 42-46.
10. Лебеденко, А.А. Значение фактора роста эндотелия сосудов в патогенезе атопического дерматита у детей / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, Е.О. Кислов и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2018. - № 3 (67). - С. 121-123.
11. Лебеденко, А.А. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов факторов роста с риском развития бронхиальной астмы у детей / А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, Е.В. Машкина, О.Е. Семерник, Т.К. Дрейзина // Пульмонология. - 2018. - Т. 28. - № 1. - С. 7-12.
12. Лебеденко, А.А. Исследование полиморфизма *Arg25Pro* гена трансформирующего фактора роста β_1 у детей с бронхиальной астмой / А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, Е.В. Машкина, О.Е. Семерник, Т.К. Дрейзина // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2018. - Т. 13. - № 2. - С. 364-366.
13. Семерник, О.Е. Омализумаб: опыт применения у детей с тяжелой бронхиальной астмой, проживающих в Ростовской области / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко, Т.Д. Тараканова и др. // Аллергология и Иммунология в педиатрии. - 2019. - № 3 (58). - С. 33-38.

14. Лебеденко, А.А. Особенности протеомного профиля сыворотки крови детей с бронхиальной астмой, перенесших перинатальное поражение центральной нервной системы / А.А. Лебеденко, А.А. Афонин, И.Г. Логинова, О.Е. Семерник и др. // Медицинский вестник Юга России. - 2019. - Т. 10. - № 4. - С. 59-65.
15. Семерник, О.Е. Роль мутаций генов металлопротеиназ и рецептора эпителиального фактора роста в патогенезе бронхиальной астмы у детей / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят и др.// Пульмонология. - 2020. - Т. 30. - № 1. - С. 17-22.
16. Лебеденко, А.А. Роль матриксной металлопротеиназы-9 в генезе хронического воспаления бронхов у детей с бронхиальной астмой / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, М.В. Дударева, Е.Б.Тюрина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2020. - Т. 65. - № 2. - С. 49-54.
17. Семерник, О.Е. Частота стационарной помощи детям с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом в крупном промышленном город / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко, А.А. Аппоева, Д.Ю. Кобцева, В.Р. Руденко // Аллергология и Иммунология в педиатрии. – 2020. - №4 (63). – С. 23-28.

Работы, опубликованные в других изданиях

18. Сависько, А.А. Анализ клинико-anamnestических и социально-средовых факторов, влияющих на достижение контроля над бронхиальной астмой у детей / А.А. Сависько, А.А. Лебеденко, С.А. Пятницкая, Н.Ю. Швыдченко, О.Е. Семерник // Российский аллергологический журнал. - 2011. - Т. 4. - № 1. - С. 316.
19. Сависько, А.А. Прогнозирование риска развития неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей / А.А. Сависько, М.М. Батюшин, А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник // Фундаментальные исследования. - 2011. - № 6. - С. 154-157.
20. Лебеденко, А.А. Влияние бронхолитических препаратов на состояние вегетативного гомеостаза у детей с бронхиальной астмой / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник // Международный научно-исследовательский журнал. – 2013. – 11(18). Часть 3. – С.46-47.
21. Лебеденко, А.А. Нейрогуморальные изменения в периоде обострения бронхиальной астмы у детей / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, Т.Д. Тараканова, Т.Б. Козырева, М.С. Касьян, Е.В. Носова // Цитокины и воспаление. - 2014. - Т. 13. - № 3. - С. 113-114.
22. Лебеденко, А.А. Роль фактора роста эндотелия сосудов в генезе хронического аллергического воспаления у детей с бронхиальной астмой / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, А.А. Аванесян // Журнал фундаментальной медицины и биологии. - 2014.- № 3. - С.24-28.

23. Lebedenko, A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as marker of pulmonary hypertension in children with asthma / A. Lebedenko, O. Semernik // European Respiratory Journal. – 2014. - Vol. 44. – P.2347.
24. Лебеденко, А.А. Нейрогуморальные аспекты обострения бронхиальной астмы у детей / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник // LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrücken, Deutschland. - 2014. – 83 с.
25. Semernik, O. Concentration of vascular endothelial growth factor in the exacerbation of asthma in children / O. Semernik, A. Lebedenko // Abstract book: «Molecular and Laboratory Asthma: A course for the practicing clinician». Istanbul, Turkey, April 2015, EAACI. – P.8
26. Semernik, O. The role of vasoactive intestinal peptide in regulation of bronchial tone in children with asthma during the period of exacerbation / O. Semernik, A. Lebedenko // European respiratory journal. - 2015. - A-425.
27. Shkurat, T.P. Vascular endothelial growth factor: genetic aspects in children with asthma in the rostov region / T.P. Shkurat, E.V. Mashkina, T.K. Dreyzina, A.A. Lebedenko, O.E. Semernik // Online Journal of Health and Allied Sciences. - 2016. - T.15.- №4.- С. 7.
28. Лебеденко, А.А. Полиморфизм гена фактора роста эндотелия сосудов у детей Ростовской области, страдающих бронхиальной астмой / А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, Е.В. Машкина, О.Е. Семерник, Т.К. Дрейзина // Валеология. – 2016. - №4. – С.20-25
29. Лебеденко А.А. Текущие вопросы детской аллергологии / А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, О.Е. Семерник и др. // Ростов-на-Дону. - 2017. – 114с.
30. Дрейзина, Т.К. Исследование ассоциации аллельных вариантов генов факторов роста с риском развития бронхиальной астмы у детей / Т.К. Дрейзина, Е.В. Машкина, О.Е. Семерник, Е.Б. Тюрина, А.А. Лебеденко // Молекулярная диагностика. - 2017. Т.2. - С. 53-54.
31. Лебеденко, А.А. Роль трансформирующего фактора роста β в патогенезе атопического дерматита у детей / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, Т.Д. Тараканова // Цитокины и воспаление. - 2017. - Т. 16. - № 4. - С. 39-42.
32. Лебеденко, А.А. Исследование тканевых факторов роста у детей с бронхиальной астмой / А.А. Лебеденко, С.В. Мальцев, О.Е. Семерник, Е.Б. Тюрина, Н.А. Гребенкина // Валеология. - 2017. - № 3. - С. 10.
33. Лебеденко, А.А. Исследование ассоциации полиморфизма A2073T гена рецептора эпидермального фактора роста с риском развития бронхиальной астмы у детей / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, С.Х. Луспикаян, Ю.С. Катыхева // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2017. - Т. 62. - № 4. - С. 205-206.

34. Лебеденко, А.А. Особенности клинического течения бронхиальной астмы у детей различного возраста / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2017. - № 7-2. - С. 198-200.
35. Semernik, O. The study of respiratory function in children with asthma receiving basic therapy / O. Semernik, A. Lebedenko // European Respiratory Journal. – 2017. - Vol. 50. PA-1339.
36. Лебеденко, А.А. Ассоциация полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ с клиническими проявлениями бронхиальной астмы у детей / А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, Е.В. Машкина, О.Е. Семерник, Т.К. Дрейзина, Е.Б. Тюрина // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20. - № 6. - С. 905-912.
37. Лебеденко, А.А. Особенности синдрома вегетативной дисфункции у детей с обострением бронхиальной астмы / А.А. Лебеденко, Т.Д. Тараканова, Е.В. Носова, Е.Б. Тюрина, О.Е. Семерник // Кубанский научный медицинский вестник. - 2018. - Т. 25. - № 3. - С. 68-72.
38. Семерник, О.Е. Анализ ассоциации полиморфного локуса Arg25Pro гена трансформирующего фактора роста с риском развития БА у детей / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко // Сборник трудов XXVIII Национального Конгресса по болезням органов дыхания, Москва, 2018. С.54.
39. Семерник, О.Е. Значение трансформирующего фактора роста - бета в патогенезе бронхиальной астмы у детей / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко, Е.Б. Тюрина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2018. - Т. 63. - № 4. - С. 253.
40. Lebedenko, A.A. Transforming growth factor β : clinical significance and peculiarities of inheritance in children with atopic dermatitis / A.A. Lebedenko, O.E. Semernik, D.N. Ivanova, T.P. Shkurat, E.V. Mashkina, T.K. Dreyzina // Online Journal of Health and Allied Sciences. - 2018. - Т. 17.- № 1.- С. 5.
41. Semernik, O. The Role of Growth Factors in the Pathogenesis of Childhood Asthma: Genetic and Clinical Aspects / O. Semernik, A. Lebedenko // Аллергология и иммунология (приложение).Тезисы I Международной олимпиады по аллергологии и иммунологии для студентов и молодых ученых. – 2018. –Т.19, №3. – С.172.
42. Семерник, О.Е. Исследование частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов факторов роста у детей с аллергическими заболеваниями / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко, М.В. Дударева, Е.Н. Ермоленко // В сборнике: Актуальные вопросы педиатрии. - 2019. - С. 134-136.
43. Лебеденко, А.А. Протеомный анализ сыворотки крови детей с бронхиальной астмой с патологией перинатального периода / А.А. Лебеденко, А.А. Афонин, О.Е. Семерник,

В.О. Гунько, И.Г. Логинова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2019. - Т. 64. - № 4. - С. 275.

44. Семерник, О.Е. Полиморфные варианты генов матриксных металлопротеиназ у детей с атопическим дерматитом / О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, Е.В. Машкина, Т.К. Дрейзина // Российский Аллергологический Журнал. - 2019. - Т. 16. - № 2. - С. 33-37.

45. Semernik, O. Proteomic analysis of blood serum of children with bronchial asthma / O. Semernik, A. Lebedenko, V. Gunko // European Respiratory Journal. – 2019. – Vol. 54. - PA4506.

46. Lebedenko, A. Proteomic spectrum of blood serum of children with bronchial asthma / A. Lebedenko, A. Afonin, O. Semernik et al. // Abstracts Second Moscow Molecular Allergology Meeting (MMAM 2019). – 2019. – P.36

47. Semernik, O. The role of gene polymorphisms and serum levels of growth factors in the immunopathogenesis of atopic diseases in children / O. Semernik, A. Lebedenko // Allergy. – 2019. – Vol. 74. – P. 77.

48. Лебеденко, А.А. Современные аспекты изучения бронхолегочной патологии у детей. / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, А.В. Демьяненко и др. - Ростов-на-Дону. - 2020. – 107с.

Патенты на изобретение

49. Способ диагностики контроля бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом // А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, А.А. Демидова / патент на изобретение RUS №2706377 Заявка №2019120864 от 2.07.19г. Оpubл. 18.11.19г.

50. Способ оценки эффективности применения препарата «беродуал» для купирования приступа бронхиальной астмы у ребенка // А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник / патент на изобретение RUS № 2545895. Заявка № 2014112382/14 от 31.03.2014. Оpubл. 10.04.2015.

51. Способ выбора препарата-бронхолитика для лечения бронхиальной астмы в периоде обострения заболевания // А.А. Лебеденко О.Е. Семерник, А.А. Демидова // патент на изобретение RUS № 2530658. Заявка № 2013129647/14 от 27.06.2013. Оpubл. 10.10.2014.

Принятые сокращения

БА – бронхиальная астма	IgE - иммуноглобулин Е
АД – атопический дерматит	SCORAD – шкала для оценки степени тяжести АД
TGF – трансформирующий фактор роста	ПЦР - полимеразная цепная реакция
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов	ПСВ - пиковая скорость выдоха
EGFR – рецептор эпителиального фактора роста	ИФА - иммуноферментный анализ
ММП - металлопротеиназа	GPX3 - глутатионпероксидаза 3
ОФВ1 – объем формированного выдоха за 1 секунду	ТТНУ - транстиретин
ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких	С4-В - компонент комплемента С4-В
	С3 - компонент комплемента

