

На правах рукописи

Гассан Дина Анатольевна

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

14.01.25 – пульмонология

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Благовещенск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания».

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

Официальные оппоненты:

Зайкова-Хелимская Ирина Васильевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра госпитальной терапии, профессор;

Кострова Ирина Васильевна, кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра госпитальной терапии, доцент.

Ведущая организация: Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится **18 октября 2019 г. в 11:30 ч.** на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.199.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 675006, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, д. 95.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Приходько Анна Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Тяжелая бронхиальная астма (ТБА) составляет 5-20% от всех случаев бронхиальной астмы в мире (С.Н. Авдеев и соавт., 2018). На лечение ТБА отводится около 80% всех экономических затрат, предназначенных на это заболевание в целом (F. Novelli et al., 2015).

Доля больных с контролируемым течением БА в клинической практике не превышает 50%, несмотря на терапию современными базисными противовоспалительными средствами (В.В. Архипов и соавт., 2011; А.Ю. Куликов и соавт., 2015; О.М. Урясьев и соавт., 2017).

Низкая обратимость воспалительного процесса в слизистой оболочке бронхов, активность оксидативного стресса и флюктуирующая бронхиальная обструкция, являются основными причинами, негативно влияющими на достижение и эффективность, а также поддержание контроля заболевания (Ю.М. Перельман и соавт., 2014). У больных БА, страдающих холодовой гиперреактивностью дыхательных путей (ХГДП) на фоне стандартной базисной терапии именно персистирующее воспаление и недостаточное снижение продуктов свободно радикального окисления усложняют достижение контролируемого течения и также сопровождаются высоким риском обострений (А.Б. Пирогов и соавт., 2016).

В условиях низких температур ХГДП диагностируется более чем у 60% больных БА жителей Сибири и Дальнего Востока любой степени тяжести, при систематическом контакте с провоцирующим фактором (А.Г. Приходько и соавт., 2011г.). Он характеризуется снижением чувствительности к стероидам, трудно контролируется терапией современными комбинированными противоастматическими препаратами в отличие от больных БА с отсутствием холодового бронхоспазма (А.Г. Приходько и соавт., 2011г.).

В настоящее время имеющиеся сведения позволяют говорить о гетерогенности причин и механизмов формирования ХГДП. Согласно им, ХГДП можно объяснить экспрессией в эпителии бронхов и сенсорных нейронах ионного канала TRPM8 в качестве терморецептора, активируемого под действием холодного воздуха (Д.Е. Наумов и соавт., 2011,2012; Д.Е. Наумов, 2015; Т.В. Козырева и соавт., 2011,2014). Существуют доказательства вовлеченности этих рецепторов в

развитие воспаления, гиперреактивности и обструкции бронхов, а также данные, что у больных БА повышена концентрация *TRPM8* в клетках бронхиального эпителия (Д.Е. Наумов и соавт., 2012, 2015).

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

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

Степень разработанности темы исследования

В ходе изучения темы исследования были проанализированы и изучены более 300 научных работ отечественных и зарубежных авторов. Особое внимание уделялось изучению патофизиологии, фенотипированию, терапии и генетике тяжелой бронхиальной астмы.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

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

Методология и методы диссертационного исследования

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

Положения выносимые на защиту

1. Отсутствие контроля заболевания у больных тяжелой бронхиальной астмой ассоциировано с особенностями клинического течения болезни, воспалительным паттерном бронхов, снижением функции легких и наличием холодовой гиперреактивности дыхательных путей.
2. Определение типа бронхиального воспаления следует использовать для выбора оптимальных схем противовоспалительной терапии у больных тяжелой БА и наличием ХГДП.
3. Полиморфизм rs11562975 гена холодового рецептора *TRPM8* у больных БА влияет на течение заболевания и снижение функции лёгких.
4. Полиморфизм rs11562975 гена *TRPM8* в сочетании со злоупотреблением курением приводит к появлению тяжелых обструктивных нарушений у больных БА носителей аллеля С.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

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

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

Публикации

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

Личный вклад автора

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

Объём и структура диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

На базе клинико-диагностического и пульмонологического отделений клиники ДНЦ ФПД в 2015-2018 гг. обследовано 109 пациентов с подтверждённым диагнозом тяжелой бронхиальной астмы. Среди них 58 женщин (57%) и 51 мужчин (43%), европеоидной расы, в возрасте от 20 до 74 лет (средний возраст $52,2 \pm 1,4$ лет). Диагноз тяжелой БА выставлялся в соответствии с Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), критериями Глобальной инициативы по бронхиальной астме (GINA, 2018) и Федеральными клиническими рекомендациями по бронхиальной астме 2018 года. По данным анкетирования Asthma Control Test (АСТ, Quality Metric Inc., 2002), все больные исследуемой выборки имели неконтролируемое течение БА – 109 (100%), средний балл составил $8,27 \pm 0,21$ баллов. Смешанная форма БА (J45.8) диагностирована у 91 (84%) больного ТБА, аллергическая форма (J45.0) - у 28 (26%) больных.

В программу обследования больных входили общеклинические, функциональные, лабораторные, генетические методы исследования. Данные о жалобах, анамнезе жизни и заболевания, анамнезе курения, данные объективного осмотра, анкетного опроса, генетического исследования регистрировались в тематической карте. Оценка функции внешнего дыхания (ФВД) проводилась методом спирометрии на аппарате «FlowScreen» (Erich-Jaeger, Германия) исходно, после ингаляции сальбутамола (200 мкг), а также в динамике. Для выявления особенностей реагирования бронхов на холодовое воздействие проводилось анкетирование больных ТБА с использованием специального вопросника, позволяющего выявить клинические симптомы холодовой гиперреактивности дыхательных путей. У пациентов с БА, отобранных для генетического исследования (лёгкой и средней степени тяжести) для подтверждения ХГДП выполнялась проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом (-20°C , 3 минуты, с уровнем вентиляции 60% должной минутной вентиляции лёгких (А.Г. Приходько и соавт., 2011).

С целью изучения бронхиального воспаления осуществлялся сбор мокроты. Микропрепараты изучали при помощи светооптической иммерсионной микроскопии, с подсчётом не менее 400 клеток в 100 полях зрения. Подсчитанное количество клеток выражали в процентах. Проводилось цитохимическое исследование активности миелопероксидазы (МПО) нейтрофилов и эозинофилов мокроты по

методу Грэхема-Кнолля, определялась степень и интенсивность процессов деструкции и цитолиза нейтрофилов и эозинофилов мокроты.

С целью генетических исследований осуществлялся однократный забор крови из локтевой вены. Генотипирование однонуклеотидного полиморфизма гена TRPM8 с. 750G> C (rs11562975) проводилось методом LATE-ПЦР с анализом плавления зондов типа «molecular beacon» (молекулярные маяки).

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

Результаты собственных исследований

По данным анкетного опроса по выявлению ХГДП у больных ТБА, включённые в исследование, были выделены две группы по наличию или отсутствию клинических признаков холодовой гиперреактивности дыхательных путей. Клинически значимая реакция холод (ХГДП) была выявлена у 48 больных ТБА (44%), 61 человек (56%) не реагировали на холод, больные не отличались по возрасту ($52,6 \pm 1,5$ и $51,7 \pm 1,8$ лет, $p > 0,05$, соответственно), стажу заболевания ($10,2 \pm 1,6$ и $12,8 \pm 1,4$ года, $p > 0,05$) и ИК ($18,3 \pm 3,8$ и $12,7 \pm 2,2$ пачка/лет, $p > 0,05$). Уровень контроля по АСТ в группе с ХГДП составил $7,92 \pm 0,26$ балла, для группы с отсутствием ХГДП - $8,73 \pm 0,31$ баллов ($p < 0,05$). При анализе основных клинически значимых симптомов выявлено, что приступы удушья беспокоили больных с ХГДП чаще, чем без ХГДП ($\chi^2 = 8,7$; $p < 0,01$; $\chi^2 = 9,8$; $p < 0,01$). Эти больные имели более низкий ОФВ₁ $38,1 \pm 1,6$ и $42,4 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$), соответственно. Таким образом, учитывая клиническое течение болезни, функцию внешнего дыхания и ответы на вопросы АСТ, больные с ХГДП имели более тяжёлое течение болезни по отношению к больным, не имевшим реакции на холод.

1. Роль бронхиального клеточного воспаления в формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных тяжёлой бронхиальной астмой

С целью изучения клеточного бронхиального воспаления обследовано 48 больных ТБА (средний возраст $51,4 \pm 2,3$ года) в осенне-зимний период времени. В I группу (n=22) вошли больные с ведущим эозинофильным вариантом воспаления (эозинофилов - $31 \pm 3,1\%$; нейтрофилов $22 \pm 2,2\%$), во II группу (n=26) - со смешан-

ный паттерном воспаления (эозинофилов – $7,2 \pm 1,4\%$, $p < 0,001$; нейтрофилов – $71,8 \pm 2,7\%$; $p < 0,001$).

При анализе клинических данных, больные II группы со смешанным паттерном воспаления, по отношению к I группе имели достоверно более длительное течение заболевания и объем получаемой противовоспалительной базисной терапии (доза сальметерол/флутиказона: $705,3 \pm 19,7$; $650,7 \pm 14,8$ мкг/сутки, соответственно). Кроме того, в последние 7 дней до предстоящего исследования, больные II группы по сравнению с группой I чаще испытывали затруднение дыхания в дневные часы и потребность в дополнительном приёме лекарств неотложной помощи. Они также имели большее число случаев обострения болезни за последний год и более низкий контроль над заболеванием за последние 4 недели (Таблица 1). По данным спирометрии было выявлено что, больные со смешанным паттерном бронхиального воспаления характеризовались более низкими значениями показателей, отражающими проходимость мелких дыхательных путей и меньшей лабильностью бронхов в ответ на введение бронхолитика.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика обследованных групп пациентов ($M \pm m$)

Показатель	I группа	II группа	p
Количество дневных симптомов за последнюю неделю	$12,7 \pm 2,01$	$16,3 \pm 1,79$	$p > 0,05$
Стаж заболевания, лет	$4,7 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$	$p < 0,001$
Количество эпизодов использования короткодействующих β_2 агонистов в сутки за последнюю неделю	$5,1 \pm 0,42$	$6,8 \pm 0,51$	$p < 0,05$
Количество обострений за год	$3,1 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,4$	$p < 0,05$
АСТ, баллы	$17,6 \pm 0,2$	$11,9 \pm 0,6$	$p < 0,001$
ОФВ ₁ , % долж.	$48,7 \pm 2,3$	$43,4 \pm 1,7$	$p > 0,05$
МОС ₂₅₋₇₅ , % долж.	$17,2 \pm 1,4$	$12,2 \pm 1,4$	$p < 0,05$
Δ ОФВ ₁ , %	$12,3 \pm 1,2$	$8,6 \pm 0,8$	$p < 0,05$

Примечание: p - достоверность различий показателей между I и II группой; Δ ОФВ₁ - прирост ОФВ₁ на введение β_2 агониста короткого действия.

При оценке частоты встречаемости холодовой гиперреактивности дыхательных путей в обеих группах, клинически значимая реакция на холодное воз-

действие присутствовала у 79% больных II группы и только у 19% больных I группы ($\chi^2=14,18$; $p<0,001$). Оценивая шанс появления ХГДП у пациентов II группы, найдено его превышение в три раза по отношению к больным I группы [отношение шансов (ОШ) при 95% доверительном интервале (ДИ) составляло от 0,43 до 5,68].

При изучении ферментативной функции гранулярных лейкоцитов мокроты более высокие значения внутриклеточной МПО получены у больных II группы по отношению к I группе, так средний цитохимический коэффициент подсчитанный в пикселях (СЦК) МПО нейтрофилов составил $158,3\pm12,3$ и $110,6\pm8,4$ ($p<0,01$), СЦК МПО эозинофилов $117,6\pm5,9$ и $97,8\pm5,4$ ($p<0,05$), соответственно.

Для оценки эпителиальной деструкции как маркера инертности достижения контроля клинических проявлений болезни, у больных ТБА были рассчитаны индексы деструкции основных клеточных элементов мокроты, отвечающих за воспаление и степень деструкции эпителиальных клеток (Рисунок 1).

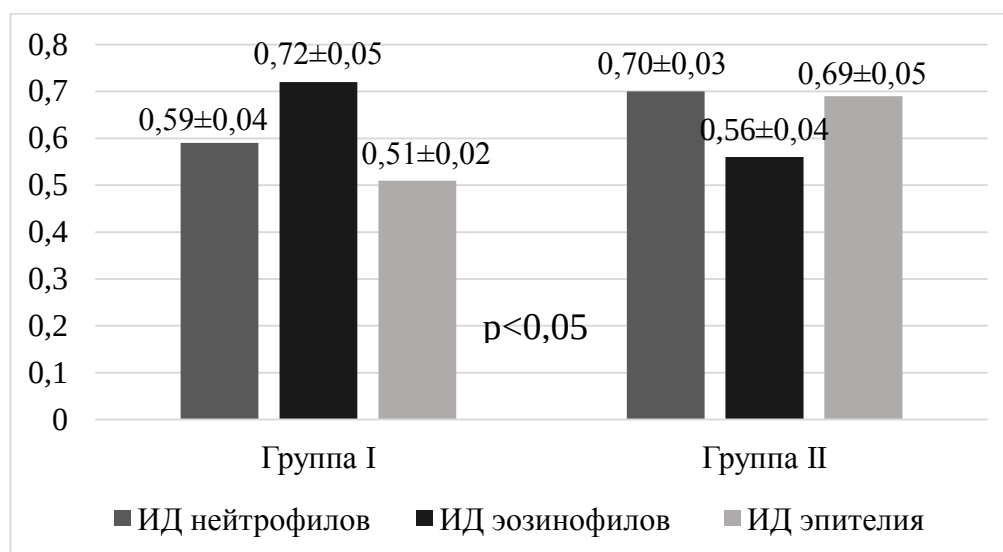


Рисунок 1 – Средние значения индекса деструкции клеток мокроты больных ТБА ($M\pm m$)

Установлено, что у лиц со смешанным вариантом бронхиального воспаления (II группа) найдены более высокие значения ИД по всем вычисляемым параметрам, относительно больных с эозинофильным типом воспаления (группа I). Кроме того, во II группе прослеживалась более выраженная деструкция нейтрофилов и менее выраженная деструкция эозинофилов, по отношению к пациентам I группы.

По данным корреляционного анализа у больных со смешанным паттерном воспаления ИД эпителия был взаимосвязан с ИД нейтрофилов ($r=0,61$; $p<0,01$),

ИД эозинофилов ($r=0,48$; $p<0,05$), а уровень контроля астмы (АСТ) зависел от степени выраженности процессов деструкции в гранулярных лейкоцитах мокроты: ИДК нейтрофилов ($r=-0,71$; $p<0,01$); ИДК эозинофилов ($r=-0,53$; $p<0,05$). Кроме того, на общей группе была обнаружена связь между числом баллов по вопросу АСТ и количеством эпителиальных клеток ($r=-0,35$; $p=0,046$).

Таким образом, для больных тяжелой бронхиальной астмой низкий уровень контроля над заболеванием связан с наличием холодовой гиперреактивности дыхательных путей, более значимыми нарушениями вентиляционной функции лёгких, смешанным паттерном бронхиального воспаления и более выраженной деструкцией гранулярных лейкоцитов воспалительного инфильтрата.

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

С целью оценки эффективности влияния различных режимов противовоспалительной терапии на клиническое течение заболевания, уровень бронхиального воспаления и оптимизацию лечения, больным I и II групп была назначена терапия с динамическим наблюдением в течение 24 недель.

В I группе, больным с эозинофильным типом воспаления назначен комбинированный препарат ИГКС/ДДБА - флутиказона пропионат/сальметерол (Серетид®, ГласкоСмитКляйн, Великобритания), в дозе соответствующей тяжести заболевания ($772,73 \pm 52,81$ мкг/сут по флутиказону пропионату). Пациентам II группы дополнительно к комбинации высокими дозами флутиказона пропионата/сальметерола ($910,71 \pm 33,22$ мкг/сут по флутиказону пропионату) в вечернее время был добавлен монтелукаст натрия (10 мг).

По окончании 24 недель терапии у больных I группы наблюдалась положительная динамика клинических симптомов болезни, показателей ФВД ($ОФВ_1$, $МОС_{50}$, $МОС_{25-75}$) по сравнению с данными на момент включения пациентов в исследование (Таблица 2). Больные меньше использовали короткодействующие β_2 -агонисты, меньше беспокоили симптомы астмы, во время лечения уменьшилось количество случаев обострения болезни. По результатам АСТ частично-контролируемого течения БА достигли у 63% пациентов.

Больные II группы со смешанным паттерном воспаления, имели менее выраженную динамику по клиническим симптомам астмы, более низкие показатели ФВД, более низкий уровень АСТ, продолжали чаще использовать в β_2 -агонисты короткого действия, во время лечения сохранялась высокая частота обострений заболевания. Последнее, регистрировалось у пациентов II группы значительно чаще 86% больных, в I группе 36% ($\chi^2=3,03$; $p>0,05$). У всех пациентов II группы с внеплановыми визитами за медицинской помощью оказалось неконтролируемое течение БА. Лишь у 14% согласно результатам АСТ определялся частичный контроль болезни. У пациентов второй группы на этапе 24-недельного курса терапии преобладали и наиболее специфичные симптомы (удушье и/или затруднённое дыхание) при контакте с холодным воздухом по сравнению с I группой ($\chi^2=5,69$; $p<0,05$). Оценивая шансы появления ХГДП, в 17,8 раз увеличена вероятность, по отношению к группе I (отношение шансов (8,0) при 95% доверительном интервале от 1,75 до 200,0).

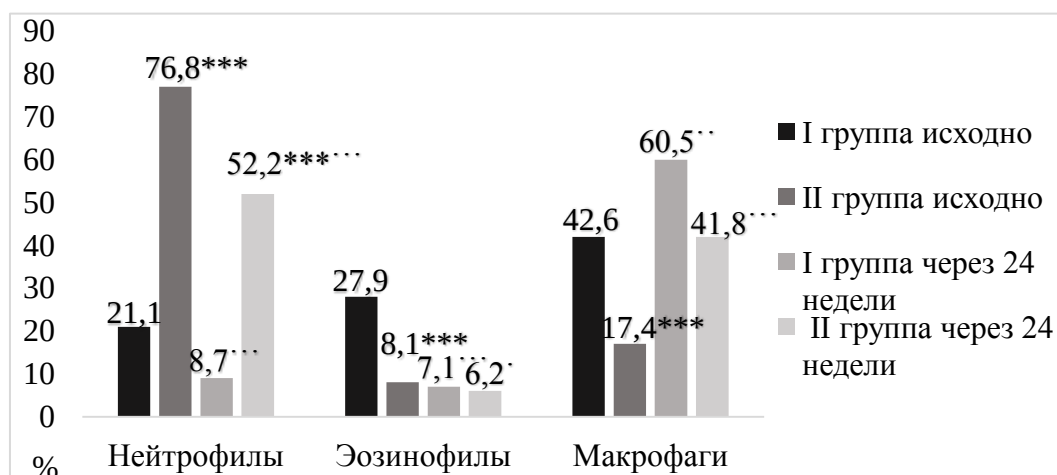
Таблица 2 – Клиническая и функциональная характеристика больных в конце 24-недельного наблюдения ($M\pm m$)

Показатели	I группа	II группа
Количество дневных симптомов БА за неделю	2,81 $\pm$ 0,1***	4,1 $\pm$ 0,5***, $p<0,05$
Количество ночных симптомов БА за неделю	2,2 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,4; $p>0,05$
Частота использования короткодействующего β_2 -агониста за сутки	3,2 $\pm$ 0,2**	5,3 $\pm$ 0,2*; $p<0,001$
Количество обострений за 24 недели терапии	1,8 $\pm$ 0,5**	3,6 $\pm$ 0,3; $p<0,01$
АСТ, баллы	19,6 $\pm$ 1,3***	15,9 $\pm$ 1,2***; $p<0,05$
ОФВ ₁ , %долж	79,2 $\pm$ 2,2***	72,3 $\pm$ 2,5***; $p<0,05$
МОС ₅₀ , %долж	57,3 $\pm$ 3,1***	47,8 $\pm$ 2,7***; $p<0,05$
МОС ₂₅₋₇₅ , %долж	50,1 $\pm$ 2,42***	34,1 $\pm$ 2,3***; $p<0,001$

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

При оценке клеточного бронхиального воспаления в динамике (Рисунок 2), после терапии зарегистрировано значимое снижение в мокроте эозинофильных лейкоцитов на 72%, нейтрофильных гранулоцитов на 41% у больных первой группы. Исходно у пациентов II группы со смешанным типом воспаления в кле-

точном составе мокроты прослеживался высокий уровень как нейтрофилов, так и эозинофилов, число нейтрофилов, достоверно превышало ($p < 0,001$) содержание нейтрофилов у больных I группы. К окончанию периода наблюдения количество нейтрофилов сократилось в меньшей степени (42%) по сравнению с эозинофилами в I группе при менее выраженной положительной динамике клинических симптомов и невысоким уровнем контроля болезни.



Примечание: Звёздочка – достоверность различий показателя по сравнению с исходными данными (***- $p < 0,001$); точка - достоверность различий между группами (.- $p < 0,05$, -.- $p < 0,01$, ...- $p < 0,001$).

Рисунок 2 – Клеточный состав мокроты у больных ТБА исходно и спустя 24-недели

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

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

ным препаратом – флутиказона пропионат/сальметерол в режиме увеличения объёма, в качестве дополнительного терапевтического средства больные II группы, помимо флутиказона пропионата/сальметерола получали один раз в день препарат тиотропия бромид, доставляемый с помощью ингалятора нового поколения Респимат® (5 мкг/сут).

К концу 24 недель наблюдения больные I группы не показали дальнейшего улучшения со стороны клинических симптомов болезни и параметров ВФЛ. У больных II группы, по отношению к предыдущим данным, на фоне дополнительного применения тиотропия бромида отмечалась положительная динамика (Таблица 3) с угасанием клинических симптомов болезни, достоверным улучшением проходимости мелких дыхательных путей.

Таблица 3 – Клиническая и функциональная характеристика больных БА через 24 недели терапии ($M \pm m$)

Показатели	I группа	II группа
Число дневных симптомов БА (за неделю)	$2,1 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,3^*$; $p > 0,05$
Число ночных симптомов БА (за неделю)	$2,3 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,2^{***}$; $p > 0,05$
Использование короткодействующего β_2 -агониста (за неделю) (кол-во/сутки)	$3,2 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,2^{**}$ $p < 0,05$
Число обострений за 24 недели терапии	$1,6 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$; $p > 0,05$
АСТ, баллы	$19,9 \pm 1,2$	$18,8 \pm 0,6^*$; $p > 0,05$
ОФВ ₁ , % должной	$86,1 \pm 2,9$	$80,3 \pm 3,2$; $p > 0,05$
МОС ₂₅₋₇₅ , % должной	$56,4 \pm 4,2$	$43,7 \pm 2,2^{**}$; $p < 0,05$

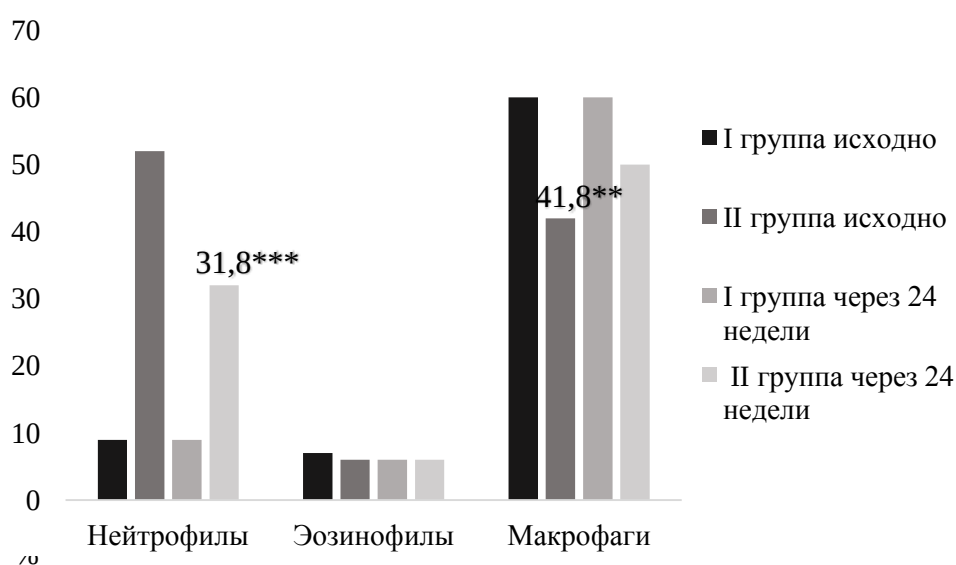
Примечание: p - достоверность различий показателей между группами. Звёздочка - достоверность различий в сравнении с исходными данными (*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$).

Использование М-холинолитика в сочетании с ИГКС/ДДБА приводило к эффективному снижению дневных и ночных симптомов астмы, уменьшению в потребности препаратов симптоматической терапии. Дополнительное использование М-холинолитика приводило к эффективному снижению дневных и ночных симптомов астмы, потребности в препаратах симптоматической терапии. Обращает на себя внимание снижение частоты обострений болезни, во II группе оно

снизилось до 43% случаев, между тем как в 1 группе пациентов не изменилось 36% случаев ($\chi^2=0,006$; $p>0,05$).

Уровень контроля над заболеваниями у больных I группы оставался прежним и составил в конце лечения - $19,6 \pm 1,3$ баллов ($p>0,05$), соответственно. У больных II группы подключение к противовоспалительной терапии тиотропия бромидом позволило увеличить контроль над заболеванием с $15,9 \pm 1,2$ до $18,8 \pm 0,6$ ($p<0,05$).

Фенотип воспаления больных II группы претерпевал значимые изменения, проявляющие себя в существенном снижении числа нейтрофилов мокроты, приводя к переходу смешанного типа воспаления в эозинофильный (Рисунок 3).



Примечание: Звёздочка – достоверность различий показателя по сравнению с исходными данными (**- $p<0,01$, ***- $p<0,001$).

Рисунок 3 – Динамика показателей клеточного состава мокроты исходно и через 24 недели терапии

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

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

С целью изучения роли полиморфизма с.750G> C (rs11562975) гена холодо-

вого рецептора TRPM8 на снижение функции лёгких дополнительно было обследовано 285 больных легким и среднетяжелым персистирующим течением БА (106 с легкой степенью тяжести и 179 со средней степенью тяжести БА). Среди больных преобладали женщины (61%), против 39% мужчин ($\chi^2 = 26,9$, $p < 0,001$).

При анализе показателей функции внешнего дыхания у носителей разных генотипов, оказалось, что у носителей аллеля С показатели вентиляционной функции лёгких были достоверно более низкими, по сравнению с носителями генотипа GG (Рисунок 4).

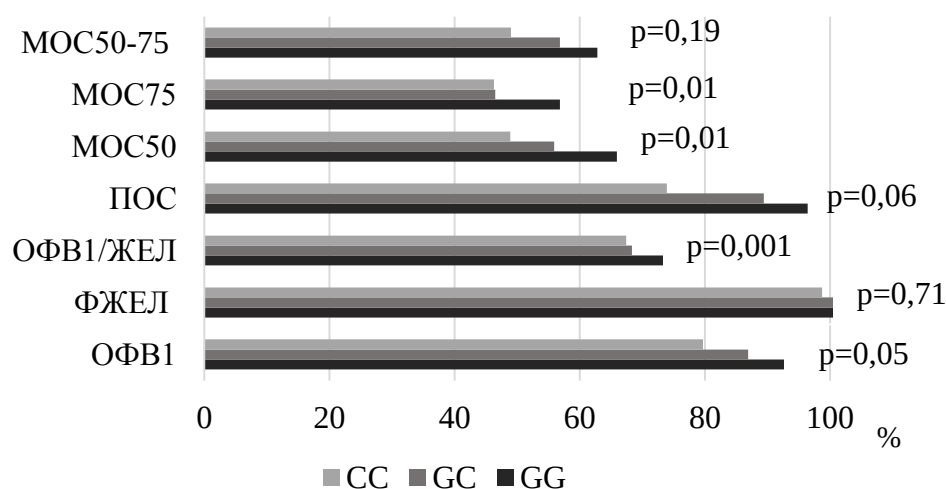


Рисунок 4 – Показатели функции внешнего дыхания исходно у носителей разных генотипов по полиморфизму rs11562975

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

Было обнаружено, что гетерозиготный генотип GC в среднем ассоциирован с 5% снижением постбронходилатационного ИТ, по сравнению с генотипом GG ($73,7 \pm 1,89\%$ и $78,9 \pm 0,62\%$, $p=0,002$, соответственно) (Рисунок 5).

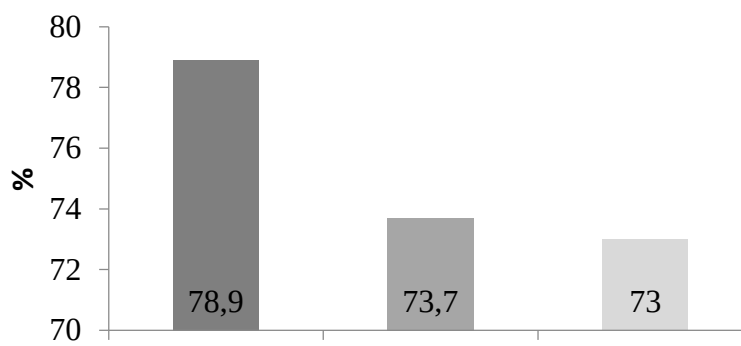


Рисунок 5 – Значимость различий ИТ между генотипами после применения β_2 агониста короткого действия

Значимая ассоциация полиморфизма обнаруживалась также с ИТ <80%. При этом, носители генотипа GC и CC составляли 18,1% и 1,8% больных БА с ИТ<80%, но в два раза реже встречались у больных с ИТ $\geq$ 80% (9,2% и 0,8%, соответственно). Полученные различия были значимы при сравнении в доминантной (ОШ 2,2 (1,09-4,49), $p=0,03$) и аддитивной модели ($p=0,03$), а также при анализе частот аллелей ($p=0,02$) (Рисунок 6).

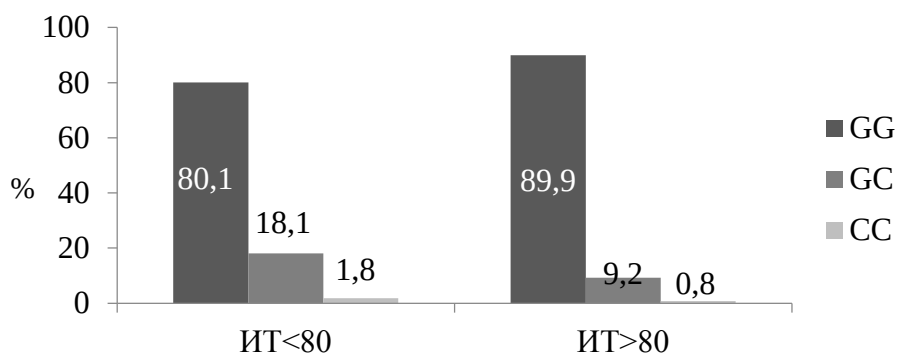


Рисунок 6 – Ассоциация rs11562975 с постбронходилатационным ИТ <80 (доминантная и аддитивная модели)

Таким образом, полиморфизм rs11562975 влияет на легочную функцию и оказывает независимый эффект на ИТ. Носительство С аллеля ассоциировано с более выраженной бронхиальной обструкцией.

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

Для оценки влияние полиморфизма с.750G> C (rs11562975) гена *TRPM8* и курения на формирование тяжелой бронхиальной обструкции проведено генетическое обследование 416 больных различной степенью тяжести БА. В исследовании приняли участие 3,8% лёгкой интермиттирующей БА, 28,4% больных – легкой персистирующей формой БА, 47,1% средней степени тяжести, 20,7% - тяжелой формой БА, средний возраст - $37,5 \pm 0,72$ лет, 41% мужчин, 59% - женщин (χ^2

= 27,04, $p < 0,001$). Согласно собранному анамнезу курили 141 (34%) из них 82 (58%) человека были бывшими курильщиками, 59 (42 %) являлись активными курильщиками. Среди пациентов, имевших опыт курения, 87 (61%) больных имели стаж курения ≥ 10 пачка/лет, 54 (39%) пациентов ≥ 20 пачка/лет.

Влияние курения на снижение функции легких было значимо во всех моделях статистики. Так, показатели ФВД среди куривших более 10 пачка/лет, были гораздо ниже, чем у пациентов, куривших менее 10 пачка/лет или не куривших совсем ($p < 0,001$). У больных в категории ≥ 10 пачка/лет ОФВ₁ составил $67,6 \pm 2,58\%$, у пациентов со стажем менее 10 пачка/лет и не курившими $88,8 \pm 3,35\%$ ($p < 0,001$) и $85,3 \pm 1,44\%$, ($p < 0,001$; $p > 0,05$). Проведя корреляционный анализ среди куривших больных БА была получена достоверная обратная зависимость между высоким стажем курения и низкими показателями функции внешнего дыхания (ОФВ₁: $R = -0,44$, $p < 0,001$; ФЖЕЛ: $R = -0,30$, $p = 0,002$; ИТ: $R = -0,39$, $p < 0,001$).

Несмотря на отсутствие достоверных различий, спирометрические показатели у СС гомозигот и гетерозигот были ниже, чем у гомозигот GG (Рисунок 7).

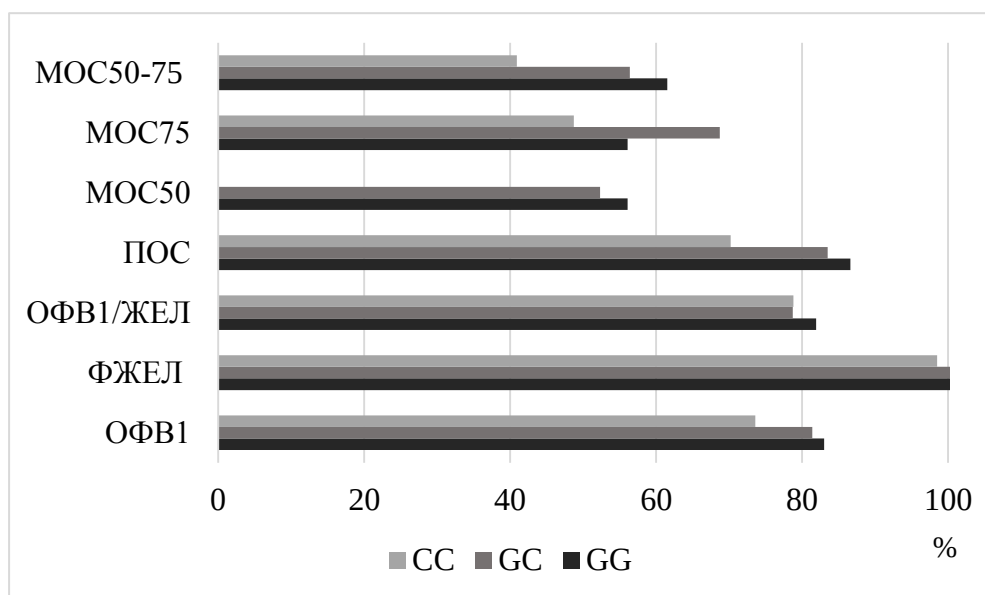


Рисунок 7 – Показатели функции внешнего дыхания у больных БА, носителей разных генотипов по полиморфизму rs11562975

Корреляционная взаимосвязь между стажем курения и показателями функции внешнего дыхания была менее выражена у носителей GG генотипа, чем у общей группы ($R = -36,0$, $p < 0,001$). Но в случае носительства гетерозиготного генотипа ее сила заметно росла ($R = -66,0$, $p < 0,001$). У больных БА с анамнезом куре-

ния 10 п/лет и более, GC генотип был ассоциирован с сниженными значениями показателей ФВД, по сравнению с GG генотипом. У не куривших пациентов или со стажем курения менее 10 п/лет, влияния генотипа на показатели ФВД не было.

У 42% курильщиков со стажем курения более 10 п/лет с GG генотипом сформировалась тяжелая бронхиальная обструкция, у носителей GC генотипа – 58%. При этом относительный риск развития тяжелой бронхиальной обструкции при стаже курения более 10 п/лет у носителей GG генотипа по полиморфизму rs11562975 составлял 2,6 95% доверительного интервала (1,61-4,2) ($p<0,001$), в случае GC генотипа относительный риск был в 1,8 раза выше - 4,7 95% доверительного интервала (1,76-12,52), $p=0,002$ (Рисунок 8).

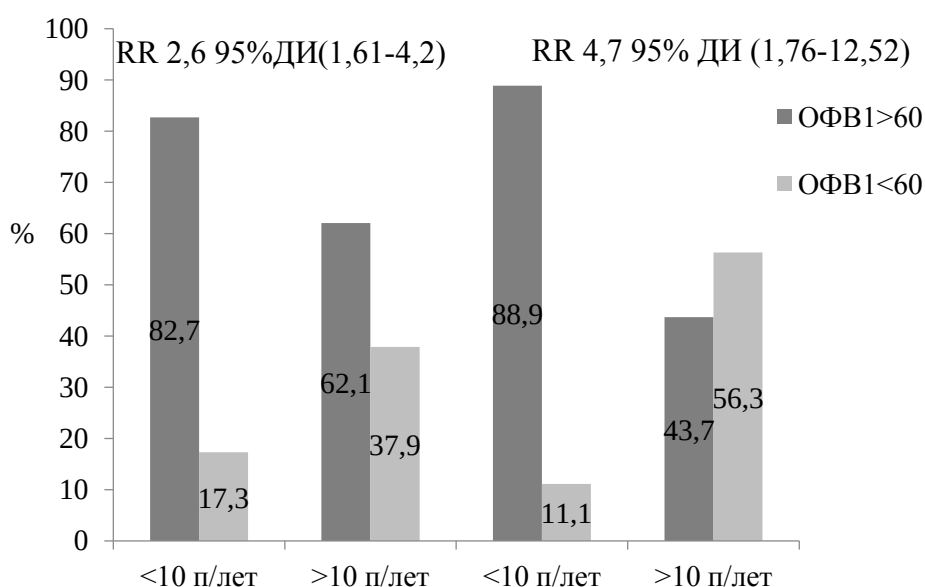


Рисунок 8 – Риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции у курящих пациентов 10 пачка/лет и более

Ещё более выраженный эффект GC генотип оказывал на пациентов со стажем курения более 20 пачка/лет, при этом относительный риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции составлял 1,8 95% доверительного интервала (1,02-3,13) $p=0,04$, по сравнению с гомозиготным генотипом (Рисунок 9).

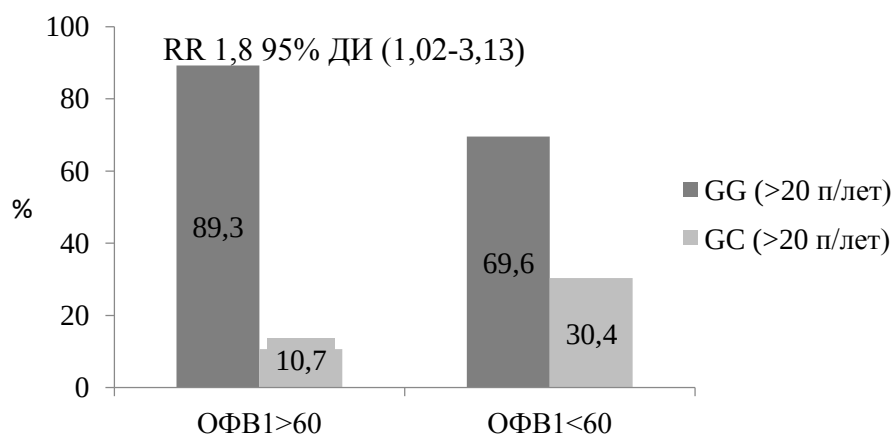


Рисунок 9 – Риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции у курящих пациентов более 20 пачка/ лет

Выводы

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

Практические рекомендации

1. Варианты воспалительных паттернов бронхов могут быть использованы в клинической практике для подбора оптимальных противовоспалительных режимов комбинированной терапии. У больных ТБА с ХГДП и смешанным типом воспаления наиболее предпочтительна терапия комбинированным ИГКС/ДДБА в сочетании с длительно действующим антихолинергическим препаратом.

2. Больным бронхиальной астмой и холодовой гиперреактивностью дыхательных путей рекомендовано проведение генетического исследования с изучением ОНП rs11562975 гена холодового рецептора TRPM8 с целью выявления лиц подверженных формированию бронхиальной обструкции.

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

Список печатных работ по теме диссертации

1. Особенности воспалительных паттернов бронхов, и клинико-функциональная характеристика тяжелой неконтролируемой астмы у больных с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей / Пирогов А.Б., Колосов В.П., Перельман Ю.М, Гассан Д.А. [и др.] // **Пульмонология.** – 2016. – № 26. – С. 701-707.

2. Роль полиморфизмов гена TRPM8 в формировании фенотипа бронхиальной астмы с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей / Наумов Д.Е., Котова О.О., Гассан Д.А. [и др.] // **Бюллетень физиологии и патологии дыхания.** – 2017. – № 65. – С. 16-23.

3. Полиморфизм гена TRPM8 и курение как факторы формирования тяжелой бронхиальной обструкции у больных бронхиальной астмой / Гассан Д.А., Наумов Д.Е, Котова О.О. [и др.] // **Бюллетень физиологии и патологии дыхания.** – 2017. – № 65. – С. 24-30.

4. Модулирующий эффект генетического полиморфизма TRPM8 на формирование тяжелой бронхиальной обструкции у больных бронхиальной астмой на фоне курения / Гассан Д.А., Наумов Д.Е, Котова О.О. [и др.] // В сборнике: Материалы VII съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (с международным участием). – 2017. – С. 64-68.

5. Роль полиморфизмов гена холодовых рецепторов TRPM8 в формировании фенотипа бронхиальной астмы с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей / Наумов Д.Е, Котова О.О., Гассан Д.А. [и др.] // В сборнике: Материалы VII съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (с международным участием). – 2017. – С. 68-72.

6. Выявление деструкции эпителия бронхов в оценке достижения контроля болезни у больных тяжелой бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью

- дыхательных путей / Пирогов А.Б., Колосов В.П., Перельман Ю.М., Гассан Д.А. [и др.] // В сборнике: Материалы VII съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (с международным участием). – 2017. – С. 82-85.
7. TRPM8 polymorphisms interaction in the development of predisposition to asthma phenotype with cold-induced airway hyperresponsiveness / Naumov D.E., Kotova O.O., Gassan D.A. [et al.] // *Respirology*. – 2017. – Vol.22. – Sup.3.
8. Effect of TRPM8 single nucleotide polymorphism and smoking on the development of severe bronchial obstruction in patients with asthma / Gassan D.A., Naumov D.E., Kotova O.O. [et al.] // *Respirology*. – 2017. – Vol.22. – Sup.3.
9. Особенности экспрессии рецептора TRPM8 в респираторном тракте больных бронхиальной астмой / Наумов Д.Е., Гассан Д.А., Килимиченко К.Ф. [и др.] // **Бюллетень физиологии и патологии дыхания**. – 2018. – № 69. – Р. 19-24.
10. Эффективность противовоспалительной терапии у пациентов с тяжелой формой бронхиальной астмы и холодовой гиперреактивностью дыхательных путей / Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Гассан Д.А. [и др.] // **Пульмонология**. – 2018. – № 28. – С. 576-583.
11. TRPM8 is overexpressed in the respiratory tract of steroid-naïve asthma patients / Naumov D.E., Gassan D.A., Kotova O.O. [et al.] // *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*. – 2018. – Vol.11. – Sup.10.
12. Полиморфизм гена *TRPM8* как независимый фактор формирования бронхиальной обструкции у больных бронхиальной астмой / Наумов Д.Е., Гассан Д.А., Котова О.О. [и др.] // **Бюллетень физиологии и патологии дыхания**. – 2019. – № 61. – Р. 31-36.
13. Деструкция эпителия бронхов у больных тяжелой бронхиальной астмой при различных паттернах воспаления и холодовой гиперреактивности дыхательных путей / Пирогов А.Б., Гассан Д.А., Зиновьев С.В. // **Терапевтический архив**. – 2019. – № 3. – Р. 31-35.

Список основных сокращений

АСТ	- тест по контролю над астмой
БА	- бронхиальная астма
ТБА	- тяжелая бронхиальная астма

ДДБА	- длительнодействующие β_2 -агонисты
ГКС	- глюкокортикостероиды
ИГКС	- ингаляционные глюкокортикостероиды
ИГХВ	- изокапническая гипервентиляция холодным воздухом
ЖЕЛ	- жизненная емкость легких
ИТ	- индекс Вотчала-Тиффно
КДБА	- короткодействующие β_2 -агонисты
МОС ₂₅	- мгновенная объёмная скорость на уровне 25% ФЖЕЛ
МОС ₅₀	- мгновенная объёмная скорость на уровне 50% ФЖЕЛ
МОС ₇₅	- мгновенная объёмная скорость на уровне 75% ФЖЕЛ
ОФВ ₁	- объем форсированного выдоха за 1-ю секунду
ФЖЕЛ	- форсированная жизненная ёмкость легких
ФВД	- функция внешнего дыхания
ХГДП	- холодовая гиперреактивность дыхательных путей
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
TRP	- transient receptor potential
ПЦР	- полимеразно-цепная реакция
ОНП	- однонуклеотидный полиморфизм