

ШУШАНОВА ЛИЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ
ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ И НЕАЛЛЕРГИЧЕСКОМ
ФЕНОТИПАХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

14.01.04 – внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ставрополь – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Ягода Александр Валентинович**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Барычева Людмила Юрьевна**

Официальные оппоненты:

– **Малявин Андрей Георгиевич**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Министерства здравоохранения Российской Федерации, факультет последиplomного образования, кафедра фтизиатрии и пульмонологии, профессор кафедры

– **Воронина Людмила Петровна**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра внутренних болезней педиатрического факультета, профессор кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится 29 мая 2019 г. в 9.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.098.01 при Ставропольском государственном медицинском университете (355017, Ставрополь, ул. Мира, 310)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного медицинского университета и на сайте www.stgmu.ru

Автореферат разослан ____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Калмыкова Ангелина Станиславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Бронхиальная астма (БА) – одно из наиболее распространенных хронических заболеваний современного общества. Сегодня во всем мире БА страдает около 334 миллионов человек, к 2025 г. этот показатель может составить 400 миллионов (Huang F. Y. et al., 2014, Global Initiative for Asthma, 2014). В России распространенность БА колеблется от 5,6 до 7,3% (Хаитов Р. М., Ильина Н. И., 2014, Астафьева Н. Г. и др., 2015), что превосходит частоту встречаемости инсульта, ишемической болезни сердца, рака молочной железы, ВИЧ-инфекции. Чрезвычайно важным на современном этапе является поиск клинических и лабораторных маркеров различных фенотипов бронхиальной астмы, выявление ассоциации полиморфных локусов генов-кандидатов с высоким риском развития тяжелого течения БА (Черкашина И. И. и др., 2013). Перспективными для изучения при бронхиальной астме являются рецепторы врожденного иммунитета (TLR), контролирующие иммунное распознавание, иммунную регуляцию, синтез медиаторов воспаления и, как следствие, процессы гиперреактивности бронхиального дерева и ремоделирования дыхательных путей (Ганковская Л. В. и др., 2015; Maisonneuve C. et al., 2014).

Известно, что стимуляция TLR инициирует секрецию не только провоспалительных цитокинов, но и проаллергических медиаторов, таких как тимусный стромальный лимфопоэтин (tymic stromal lymphopoetin – TSLP), IL25, IL33, усиливающих Th2-опосредованный ответ (Свитич О. А. и др., 2017; Sathish V. et al., 2014). Полиморфные маркеры TLR детерминируются наследованием, не изменяются в течение жизни и могут использоваться в качестве маркеров потенциального риска развития БА и реализации ее различных эндотипов (Свитич О. А. и др., 2017).

В течение последних десятилетий было показано, что полиморфизмы генов TLR2 (Koronen P., et al., 2014), TLR4 (Yao Y., et al., 2014, Tizaoui K. et al., 2015), TLR6 (Koronen P., et al., 2014), TLR7 и TLR9 (Q. Zhang et al., 2010, Törmänen Sari et al., 2017) предрасполагают к развитию бронхиальной астмы. Сообщалось также о защитном эффекте отдельных полиморфизмов (Tizaoui K. et al., 2015, Törmänen Sari et al., 2017). Однако в других исследованиях не установлено взаимосвязи между генным полиморфизмом TLR и риском развития БА, крайне мало работ, посвященных полиморфизму TLR у пациентов с различными фенотипами и эндотипами БА.

Несмотря на очевидную значимость проблемы и достижение определенных результатов в изучении TOLL-подобных рецепторов при бронхиальной астме, окончательная роль TLR в развитии клинических фенотипов БА до конца не определена.

Степень разработанности темы исследования. В последние годы увеличивается число публикаций, посвященных полиморфизму генов рецепторов врожденного иммунитета, распознающих аллергены в дыхательных путях и регулирующих активность и поляризацию Th-ответа.

Результаты исследований полиморфных маркеров *TLR2* rs 5743708 *G2408A* при бронхиальной астме не однозначны. В серии масштабных работ (Hussein Y. M. et al., 2012, Tizaoui K. et al., 2015) установлена ассоциация полиморфизмов *G2408A* с бронхиальной астмой, что не подтвердилось в других исследованиях (Zhao J. et al., 2017). Отдельные клинические испытания показали, что одиночные нуклеотидные полиморфизмы *TLR6* играют определенную роль в защите от астмы (Puthothu B., Heinzmann A., 2006). В последующем было установлено, что полиморфные маркеры *TLR6* существенно связаны с фенотипами астмы (Koronen P. et al., 2014).

Клинические исследования по анализу ассоциаций аллергического воспаления и полиморфизма *C159T* рецептора *CD14* оказались не менее противоречивы, показаны протективные, предрасполагающие и нейтральные эффекты. В ряде исследований не подтверждено, что полиморфные варианты *C159T* связаны с развитием бронхиальной астмы (Zhao L., Bracken M. B., 2011), в других – установлено, что ген *CD14* можно рассматривать в качестве гена-кандидата, увеличивающего восприимчивость к atopической бронхиальной астме (Zaborowski T. et al., 2011, Yazdani N. et al., 2012, Şahin F. et al., 2014).

Несмотря на большое число публикаций, посвященных полиморфизму TLR при БА, пока не удастся связать в единую концепцию полученные результаты. Практически нет исследований, посвященных полиморфизму TLR при различных фенотипах БА, а также их взаимосвязи с лабораторными и инструментальными показателями.

Таким образом, изучение полиморфных маркеров TLR при аллергической и неаллергической БА представляется перспективным для индивидуализации подхода к прогнозированию БА и формирования теоретической базы для внедрения агонистов TLR в качестве патогенетической терапии БА в клиническую практику.

Цель исследования: определение клинических особенностей и полиморфных маркеров генов рецепторов врожденного иммунитета при аллергическом и неаллергическом фенотипах бронхиальной астмы.

Задачи исследования

1. Определить клиническую и лабораторную характеристику аллергического и неаллергического фенотипов бронхиальной астмы у взрослых пациентов Ставропольского края.

2. Оценить ассоциацию полиморфных маркеров генов рецепторов врожденного иммунитета с развитием бронхиальной астмы у взрослых пациентов русской национальности Ставропольского края.

4. Выявить возможные молекулярно-генетические маркеры повышенного риска развития бронхиальной астмы, а также ее аллергического и неаллергического фенотипов путем изучения полиморфизма генов *TLR2 G2258A*, *TLR6 C745T*, *CD14 C(-159)T*.

5. Установить наличие взаимосвязи клинико-инструментальных и лабораторных показателей у пациентов с бронхиальной астмой и вариантов генотипов *TLR2 G2258A*, *TLR6 C745T*, *CD14 C(-159)T*.

Научная новизна исследования. Впервые у взрослых пациентов русской национальности, проживающих в Ставропольском крае, установлено важное патогенетическое значение генного полиморфизма рецепторов врожденного иммунитета *TLR2 2258 G>A (Arg753Gln)* (rs5743708); *TLR6 745 C>T Ser249Pro* (rs5743810) и *CD14-159 C>T* (rs2569190) в развитии различных фенотипов бронхиальной астмы. Впервые показано, что носительство аллелей *TLR2 2258A*, *TLR6 745C* можно рассматривать в качестве предикторов развития бронхиальной астмы у русских пациентов Ставропольского края.

Впервые получены данные о том, что аллергический фенотип БА чаще развивается у респондентов генотипа *TLR6 C745T* и аллелей – *TLR2 2258A*, *TLR6 745C*, а неаллергический – у носителей генотипа *CD14 C(-159)C* и аллелей – *TLR2 2258A* и *CD14(-159)C*.

Впервые установлена ассоциативная связь тяжелого и среднетяжелого течения БА, а также низких показателей функции внешнего дыхания (ОФВ1) с генотипами *CD14*

C(-159)C и *CD14 C(-159)T*, высоких показателей сывороточного IgE – с генотипом *TLR6 C745T*.

Впервые представлены данные об увеличении эозинофилов в индуцированной мокроте преимущественно у респондентов генотипа *TLR2 A2258A*, нейтрофильных гранулоцитов – у обладателей генотипа *CD14 C(-159)T*.

Впервые обоснована необходимость и важность исследования полиморфных маркеров *TLR2 G2258A* (rs5743708); *TLR6 C745T* (rs5743810) и *CD14 C-159T* (rs2569190) для прогнозирования различных фенотипов БА и определения тактики персонализированной терапии.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Определение частоты полиморфных маркеров *TLR2 G2258A*, *TLR6 C745T*, *CD14 C(-159)T* имеет значение для формирования современных представлений о молекулярно-генетических основах развития аллергического и неаллергического фенотипов бронхиальной астмы и является теоретической базой для прогнозирования течения заболевания.

Полученные результаты, свидетельствующие об увеличении вероятности развития аллергической БА у обладателей генотипа *TLR6 C745T*, а неаллергический – у респондентов генотипа *CD14C(-159)C*, подтверждают существующее мнение о ключевой роли отдельных TLR в патогенезе БА и могут являться теоретической предпосылкой для дальнейших исследований по внедрению агонистов TLR в качестве таргетной патогенетической терапии БА в клиническую практику.

Выявленные в ходе проспективного исследования ассоциации полиморфных маркеров *CD14 C(-159)C* и *CD14 C(-159)T* с развитием тяжелого и среднетяжелого течения заболевания, а также низкими показателями функции внешнего дыхания могут быть использованы в качестве предикторов неблагоприятного течения заболевания. Представленные в работе данные о взаимосвязи *TLR2 A2258A*, *CD14 C(-159)T* с клеточным составом индуцированной мокроты открывают дополнительные возможности в оценке эозинофильного и нейтрофильного типов воспаления при БА.

Результаты диссертационной работы свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований по изучению полиморфных маркеров TLR, участвующих в реализации гиперчувствительности при БА, что позволит сформировать группы высокого риска по формированию различных фенотипов и эндотипов БА и определить тактику персонализированной терапии.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование выполнено в дизайне проспективного когортного открытого наблюдательного исследования с применением клинических, инструментальных, микробиологических, иммуноферментных, молекулярно-генетических и статистических методов. Объект исследования – пациенты с аллергической и неаллергической бронхиальной астмой русской национальности Ставропольского края, находившиеся на амбулаторном лечении в ГБУЗ СК «Городская клиническая поликлиника №1» г. Ставрополя.

Предмет исследования: полиморфные маркеры рецепторов врожденного иммунитета у больных с аллергической и неаллергической бронхиальной астмой.

Дизайн исследования отражен в протоколе, одобренном Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СТГМУ МЗ России (протокол №56 от 20.05.2016 г.). Клинико-инструментальные и лабораторные методы исследования осуществлялись на базе ГБУЗ СК «Городская клиническая поликлиника №1» г. Ставрополя. Молекулярно-генетические исследования проводились на базе лабораторий Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» (старший научный сотрудник лаборатории сибирской язвы, кандидат

медицинских наук Аксенова Л. Ю.) и ФГБОУ ВО «СТГМУ», кафедра клинической фармакологии и бактериологии с курсом ДПО (зав. лабораторией Иванова Т. П.).

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Предикторами развития бронхиальной астмы у взрослых пациентов русской национальности Ставропольского края являются аллели *TLR2 2258A*, *TLR6 745C*. Протективными свойствами обладают генотипические варианты *TLR2 G2258G* и *TLR6 T745T* и аллель *TLR2 2258G*.

2. Молекулярно-генетическими маркерами аллергического фенотипа бронхиальной астмы являются аллели *TLR2 2258A*, *TLR6 745C* и генотип *TLR6 C745T*, неаллергической бронхиальной астмы – аллели *TLR2 2258A* и *CD14(-159)C* и генотип *CD14C(-159)C*.

3. Носительство генотипов *CD14 C(-159)C* и *CD14 C(-159)T* ассоциировано с формированием тяжелой и среднетяжелой бронхиальной астмы, а также низкими показателями функции внешнего дыхания (ОФВ1) при БА. Носительство генотипа *TLR2 A2258A* связано с увеличением эозинофилов, генотипа *CD14 C(-159)T* – нейтрофильных гранулоцитов в клеточном составе индуцированной мокроты у пациентов с бронхиальной астмой.

Степень достоверности. Достоверность результатов диссертационного исследования обоснована применением принципов, технологий и методов доказательной медицины, достаточным объемом и репрезентативностью изученной выборки пациентов, использованием регламентированных клинических, лабораторных и молекулярно-генетических методов и адекватных методов статистической обработки полученных данных. Представленные в диссертационном исследовании данные согласуются с результатами исследований, опубликованных в отечественной и зарубежной научной литературе. Выводы и практические рекомендации аргументированы, сформулированы корректно и логически вытекают из результатов диссертационного исследования.

Практическое использование результатов исследования. Результаты работы внедрены в практику лечебной работы отделений ГБУЗ СК «Городская поликлиника №4», ГБУЗ СК «Краевая клиническая больница», г. Ставрополь. Итоговые результаты исследования используются в учебном процессе в лекционных курсах и на практических занятиях на кафедрах госпитальной терапии, иммунологии с курсом ДПО ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет».

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, 3 из них опубликованы в журналах, входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Казань, 2013), Национальном конгрессе терапевтов (Москва, 2013), международной научно-практической конференции «От стандартизированной к индивидуализированной терапии. Лечим не болезнь, а больного» (Курск, 2014), 18-й ежегодной неделе Медицины Ставрополя (Ставрополь, 2014), научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные разработки естественных и гуманитарных наук: современные концепции, последние тенденции развития» (Ростов-на-Дону, 2018).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав – обзора литературы, материалов и методов исследования, клинической характеристики пациентов с бронхиальной астмой, результатов иммуногенетических исследований, обсуждения полученных результатов; выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа ил-

люстрирована 25 таблицами, 24 рисунками. Список литературы содержит 293 источников, в том числе отечественных – 52, иностранных – 241.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Представленные в настоящей работе данные, получены при проспективном обследовании и диспансерном наблюдении 100 больных русской национальности Ставропольского края с бронхиальной астмой, находившихся на амбулаторном лечении в ГБУЗ СК «Городская поликлиника №1» г. Ставрополя за период 2016-2017 гг.

Диагноз J45.0 Астма с преобладанием аллергического компонента и J45.1 Неаллергическая астма устанавливали на основании Федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению бронхиальной астмы (2016) и «Global Strategy for Asthma Management and Prevention» (2016).

Аллергическая астма диагностирована у 65 больных, неаллергическая – у 35. В контрольную группу вошли 50 практически здоровых людей в возрасте от 18 до 60 лет (31 мужчина, 19 женщин). Для обеспечения репрезентативности данных из исследования были исключены больные со смешанной бронхиальной астмой, тяжелой фиксированной обструкцией дыхательных путей, крайне тяжелым течением БА и наличием жизнеугрожающих обострений, пациенты с острыми воспалительными заболеваниями легких (пневмония, бронхит), хронической обструктивной болезнью легких, наличием тяжелой соматической патологии (туберкулез, сахарный диабет, онкологические, аутоиммунные, психические заболевания, тяжелые декомпенсированные заболевания почек, печени, сердца).

Клинико-инструментальные и лабораторные методы исследования включали сбор аллергоанамнеза, клинический осмотр пациентов, оценку тяжести течения БА, исследование функции внешнего дыхания с применением компьютерной спирографии, пикфлоуметрии (ОФВ1, ПСВ, суточный разброс ПСВ), Rh-графию легких и придаточных пазух носа, определение антител – IgM, IgG к Chl. pneumoniae и Mycoplasma pneumoniae методом ИФА, цитологическое и бактериологическое исследование индуцированной мокроты (ИМ).

В зависимости от характера клеточного состава ИМ пациентов с БА делили на 4 фенотипа воспаления: эозинофильный (эозинофилы > 3%), нейтрофильный (нейтрофилы > 61%), смешанный гранулоцитарный (эозинофилы > 3% + нейтрофилы > 61%) и малогранулоцитарный, если в мокроте не выявлялось повышенного содержания эозинофилов и нейтрофилов (Green R.H., 2012). При бактериологическом исследовании ИМ диагностически значимым считалось выделение бактериальных патогенов в концентрации 10^6 , а грибковой флоры – 10^3 КОЕ/мл мокроты.

Аллергологические методы исследования включали постановку кожных проб с использованием 3-5% водных экстрактов аллергенов – бытовых, эпидермальных, пыльцевых, пищевых (Ставропольский НИИ вакцин и сывороток). Содержание общего и специфических IgE в сыворотке крови определяли методом твердофазного хемилюминесцентного анализа на автоматическом анализаторе «SIEMENS IMMULITE 2000 XPI» (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, США) с помощью наборов реагентов Total IgE (Siemens, США) и панелей аллергенов: пыльцевых, бытовых, эпителиальных и плесневых аллергенов (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, США). Учитывали ранговые величины, соответствующие классу сенсибилизации: 0 – без сенсибилизации, 1 класс (низкий уровень) – 0,3-0,7 мкг/л, 2 класс (умеренный) – 0,7-3,5 мкг/л, 3 класс (высокий) – 3,5-17,5 мкг/л, 4 класс (значительно высокий) – 17,5-100 мкг/л.

Молекулярно-генетические исследования проводили на базе лабораторий Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» (старший научный сотрудник лаборатории сибирской язвы, кандидат медицинских наук Аксенова Л. Ю.) и ФГБОУ ВО «СТГМУ», кафедра клинической фармакологии и бактериологии с курсом ДПО (зав. лабораторией Иванова Т. П., врач-лаборант Урусова Л. Д.).

Выделение ДНК осуществляли из лейкоцитов цельной крови, взятой в пробирки, содержащие 0,5% ЭДТА, с помощью реагентов «ДНК-экспресс-кровь». Для обеспечения оптимальной концентрации ДНК использовали набор «Quant-iT dsDNA». Полученные образцы нуклеиновых кислот хранили при температуре -20°C. Типирование SNPs TLR2, TLR6, CD14 осуществляли методом ПДРФ (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP analysis) с предварительной амплификацией интересующего участка и последующим выполнением эндонуклеазой рестрикции. Амплификацию осуществляли с применением многоканального амплификатора «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия) с двумя парами аллель-специфичных праймеров и выдачей трех типов заключений: «гомозигота по 1 аллели», «гомозигота по 2 аллели», «гетерозигота».

Для выявления полиморфизмов TLR2, TLR6, CD14 методом полимеразной цепной реакции в геноме человека в работе использовали диагностические тест-системы «SNP-экспресс» ООО НПФ «Литех», г. Москва. Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле, приготовленном на ТЕА буфере, с использованием электрофоретической детекции результатов ПЦР («BioRad Laboratories», США). Для идентификации результатов электрофореза применяли 1% раствор бромистого этидия, фрагменты ДНК визуализировались в виде светящихся оранжево-красных полос (УФ излучение длиной волны 310 нм).

Для статистического анализа данных использовали пакет программ «Attestat 10.5.1.», «Primer of Biostat 4,0». Количественные значения представляли в виде медианы и интерквартильного (25 и 75 процентиля) размаха (Me (Q1-Q)). Для оценки межгрупповых различий количественных признаков применяли однофакторный дисперсионный анализ, критерии Крускала-Уоллиса, Ньюмена-Кейлса, Данна. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Достоверность различий в частотах аллельных вариантов и генотипов оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона, при небольших объемах выборки – с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса. Для расчёта соответствия распределения генотипов в популяционной выборке закону Харди-Вайнберга использовали программное обеспечение Hardy-Weinberg equilibrium calculator. Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов (OR) с расчетом доверительного интервала CI.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинические и лабораторные маркеры аллергического и неаллергического фенотипов бронхиальной астмы

При анализе по гендерному признаку в обеих клинических группах пациентов отмечалось отчетливое преобладание женщин. Вместе с тем среди пациентов с неаллергической бронхиальной астмой женщин было достоверно больше (табл. 1).

Средний возраст в группе АБА составил – 34 [23,5; 45] года, в группе НБА – 61 год, $p < 0,001$. Аллергическая астма у 19 (29,2%) пациентов манифестировала в возрасте до 14 лет, неаллергическая у 23 (65,7%) после 30 лет. Средний возраст дебюта заболевания при неаллергической астме составил 34 [29; 45] года, что было достоверно

позже, чем при аллергической – 18 [12; 22] лет, $p < 0,001$. Большинство больных с АБА имели не более 2-3 обострений в год в среднем 2 [2; 3], в группе НБА обострения регистрировались чаще, в среднем – 3 раза в год [3; 4], $p < 0,05$.

Таблица 1-Клинические особенности аллергической и неаллергической бронхиальной астмы

Клинические признаки	АБА	НБА	p
Женщины	43 (66,2%)	30 (85,7%)	$p < 0,05$
Мужчины	22 (33,8%)	5 (14,3%)	$p < 0,05$
Возраст манифестации БА	18 [12; 22]	34 [29; 45]	$p < 0,001$
Стаж заболевания	16 [12; 22,5]	23 [17; 28]	$p < 0,001$
Пациенты, страдающие ожирением (ИМТ > 30 кг/м ²)	12 (18,5%)	8 (22,9%)	-
Табакокурение	18 (27,5%)	4 (11,4%)	-
Частота легких форм	12 (18,5%)	5 (14,3%)	-
Частота среднетяжелых форм	38 (58,4)	10 (28,6%)	$p < 0,01$
Частота тяжелых форм	2 (23,1%)	20 (57,1%)	$p < 0,001$
Частота обострений в год	2 [2; 3]	3 [3; 4]	$p < 0,05$
Потребность в антибактериальной терапии	1 [0,5; 2]	2 [2; 3]	$p < 0,05$
ОФВ1, %	69 [57,5; 77,5]	64 [57; 68]	$p < 0,05$
АСТ, баллы	20,5 [19,5; 21]	19 [18; 20,5]	-
Эозинофилы крови, $\cdot 10^9$ /л	0,45 [0,29; 0,68]	0,15 [0,10; 0,23]	$p < 0,001$
IgE общий	270 [111; 554]	44 [32; 90]	$p < 0,001$
Частота неконтролируемой БА	23 (35,4%)	16 (42,9%)	-

Примечание: p – статистическая значимость различий по сравнению с группой АБА (критерий χ^2 , Манна-Уитни)

При анализе степени тяжести в группе АБА преобладало среднетяжелое течение заболевания – 58,4%, $p < 0,01$, в группе НБА чаще встречались тяжелые варианты течения БА – 57,1%, $p < 0,001$. Распространенность неконтролируемой астмы в группе НБА была выше – 42,9%, чем в группе АБА – 35,4%, однако статистически значимых различий не установлено. Средние показатели АСТ-теста в группе пациентов с аллергической астмой составили – 20,5 [19,5; 21] балла, с неаллергической – 19 [18; 20,5] баллов. При анализе показателей функции внешнего дыхания установлены более низкие показатели ОФВ1 в группе НБА – 69% [57,5; 77,5], чем в группе АБА – 64% [57; 68], $p < 0,05$. Ингаляционные глюкокортикоиды в низкой дозе получали 30,8% больных с аллергической БА, в средней дозе – 46,1%, в высокой – 23,1%. Пациенты с НБА чаще использовали топические ИГКС в высокой дозе – 57,1%, $p < 0,05$.

Уровень эозинофилов периферической крови у пациентов с аллергической БА – $0,45 \cdot 10^9$ /л [0,29; 0,68] был выше, чем при неаллергической БА – $0,15 \cdot 10^9$ /л [0,10; 0,23], $p < 0,001$ и в контрольной группе – $0,18 \cdot 10^9$ /л [0,12; 0,23], $p < 0,001$.

Показатели общего сывороточного IgE в группе АБА колебались в диапазоне 4,97 МЕ/мл-2500 МЕ/мл, в группе больных с НБА – в пределах 2,91-320 МЕ/мл, в контрольной группе – 2,1-198 МЕ/мл. Установлены статистически значимые различия с увеличением общего IgE у пациентов с АБА – 270 [111; 554] МЕ/мл по сравнению с группой НБА – 44 [32; 90] МЕ/мл, $p < 0,001$ и здоровыми пациентами 47,5 [28; 89] МЕ/мл, $p < 0,001$.

Сенсибилизация к пыльцевым аллергенам (деревья, сорные травы, луговые травы) установлена у 85,4% пациентов, к бытовым аллергенам (домашняя пыль, библиотечная пыль, клещ домашней пыли, дафнии) – у 63,1%, эпидермальным аллергенам

(шерсть кошки, собаки, овцы, перхоть лошади) – у 32,3%. В 55,4% случаев выявлена смешанная сенсibilизация к неродственным аллергенам – пыльцевым и бытовым, что может быть связано с длительностью заболевания в клинической группе АБА, в среднем составившей 16 [12; 22,5] лет.

Признаки реактивной гиперчувствительности к домашней пыли имели 53,8% больных, клещу домашней пыли – 55,4%, библиотечной пыли – 24,6%, перу подушки – 30,8%, шерсти кошки – 32,3%, шерсти собаки – 26,1%, шерсти овцы – 12,3%, дафниям – 16,9%, амброзии – 76,9%, полыни – 67,7%, подсолнечнику – 60%, тимopheевке – 49,2%, еже – 46,2%, овсянице – 38,5%, березе – 38,5%.

При анализе коморбидной патологии у пациентов с АБА преобладали atopические заболевания в виде atopического дерматита (26,2%), круглогодичного персистирующего (38,5%) или преимущественно сезонного (26,1%) аллергического ринита, эпизодов крапивницы (9,2%). У пациентов с неаллергической бронхиальной астмой чаще диагностировались инфекционно-воспалительные заболевания. Повторные респираторные инфекции в течение года переносили 29 (82,9%) больных с НБА и лишь 10 (15,4%) с АБА ($p < 0,001$). Потребность в антибактериальной терапии составила 2 [2; 3] и 1 [0,5; 2] раз в год соответственно.

Для пациентов с НБА типичным было развитие инфекций ЛОР-органов и легких, у 62,9% верифицирован хронический риносинусит, у 29,2% – хронический тонзиллофарингит, у 14,3% – пневмония в анамнезе. В качестве особенности при НБА следует отметить высокий процент пациентов, имеющих полипы пазух носа (14,3%).

При микробиологическом исследовании мокроты у 74,2% больных с НБА были выявлены бактериальные и/или грибковые респираторные патогены, частота которых превышала показатели в группе с АБА – 38,5%, $p < 0,001$ (табл. 2).

Таблица 2-Микробиологическое исследование мокроты у пациентов с аллергической и неаллергической бронхиальной астмой

Микроорганизмы	АБА (n=65)	НБА (n=35)	χ^2
Выделение микроорганизмов в титрах $> 10^{-6}$	25 (38,5%)	26 (74,2%)	$p < 0,001$
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 (18,5%)	8 (22,9%)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15 (23,1%)	13 (37,1%)	-
<i>Streptococcus pneumonia</i>	5 (7,7%)	7 (20,0%)	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 (1,5%)	6 (17,1%)	$p < 0,05$
<i>Hemophilus influenzae</i>	3 (4,7%)	3 (8,6%)	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1 (1,5%)	3 (8,6%)	-
<i>Candida albicans</i>	19 (29,2%)	19 (54,2%)	$p < 0,05$
<i>Chlamydomyphila pneumoniae</i>	4 (6,2%)	7 (20,0%)	$p < 0,05$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	4 (6,2%)	5 (14,3%)	-
Бактериальные ассоциации	15 (23,1%)	12 (34,3%)	-
Бактериально-грибковые ассоциации	14 (21,5%)	13 (37,1%)	-

Примечание: p – статистическая значимость различий по сравнению с группой АБА (критерий χ)

Максимальная частота встречаемости среди монокультур у пациентов с НБА наблюдалась для *Staphylococcus epidermidis* – 51,5%, *Streptococcus pneumonia* – 4,3%, *Staphylococcus aureus* – 28,6%, *Streptococcus pyogenes* – 22,9%, *Candida albicans* –

54,2%. У значительного числа пациентов персистировали внутриклеточные возбудители – *Chlamydomphila pneumoniae* (20%) и *Mycoplasma pneumoniae* (14,3%).

У 34,3% больных обнаружены бактериальные ассоциации с идентификацией 2 и более респираторных патогенов, у 37,1% – бактериально-грибковая микробиота с выделением грибов *Candida albicans* и бактерий.

При изучении клеточного состава индуцированной мокроты у пациентов обеих клинических групп обнаружено увеличение количества эозинофилов, в том числе в группе АБА – 5% [2; 16,2] и НБА – 4,2% [0; 6,5], $p < 0,05$.

Установлено увеличение нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с НБА – 52 [46,2; 86,2] по сравнению с АБА – 38,5 [7; 65] ($p < 0,01$).

При распределении пациентов с БА в зависимости от типа клеточного воспаления выявлено, что в обеих группах наблюдения преобладающим был эозинофильный фенотип (табл. 3). Малогранулоцитарный тип отмечен только в группе с АБА и составил 27,7% случаев. Следует отметить, что у всех пациентов с этим фенотипом верифицирована легкое течение БА.

Таблица 3-Фенотипическое распределение пациентов с АБА и НБА в зависимости от типа клеточного воспаления в индуцированной мокроте

Тип воспаления	АБА (n=65)	НБА (n=35)	χ^2 с поправкой Йетса
Эозинофильный	39 (65,0%)	12 (34,3%)	$p=0,015$
Нейтрофильный	2 (4,9%)	8 (22,8%)	$p=0,002$
Малогранулоцитарный	18 (27,7%)	5 (14,3%)	$p=0,129$
Смешанный гранулоцитарный	6 (9,3%)	10 (28,6%)	$p=0,012$

Примечание: p – статистическая значимость различий по сравнению с группой АБА (критерий χ^2)

В группе взрослых пациентов с АБА нейтрофильный фенотип обнаружен только у 4,9% пациентов, в то время, как группе НБА – у 22,8%, $p < 0,05$. При этом 7 из 8 пациентов с НБА и 1 из 2-х с АБА имели возраст более 60 лет и страдали тяжелой БА с низкими показателями легочной функции.

Смешанный гранулоцитарный тип воспаления определялся у 9,3% с АБА и у 28,6% – с НБА, $p < 0,05$. У 3-х из этих пациентов из группы АБА и у 6 из группы НБА верифицирован неконтролируемый вариант БА из-за плохой приверженности к назначенной терапии ИГКС.

При сравнительной характеристике в группе АБА чаще встречался эозинофильный (65%, $p < 0,05$) и малогранулоцитарный (27,7%), а в группе НБА – нейтрофильный (22,8%, $p < 0,05$) и смешанный гранулоцитарный (28,6%, $p < 0,05$) фенотип. Нами установлено, что пациенты с НБА при нейтрофильном и смешанном гранулоцитарным типе воспаления чаще, чем при эозинофильном и малогранулоцитарном выделяли респираторные патогены из индуцированной мокроты. В группе «neutrophilic» (нейтрофильный и смешанный фенотип) показатели составили 54,2%, в группе «non-neutrophilic» (эозинофильный и малогранулоцитарный фенотип) – 20%, $p < 0,05$. При этом из мокроты пациентов с нейтрофильным биотипом чаще выделялись *Staphylococcus epidermidis* (28,6%, $p < 0,05$), *Streptococcus pneumonia* (17,1%, $p < 0,05$), *Streptococcus pyogenes* (17,1%, $p < 0,05$), *Candida albicans* (40%, $p < 0,05$).

Таким образом, клинический фенотип аллергической бронхиальной астмы у взрослых в Ставропольском крае характеризуется дебютом в молодом возрасте (18 лет), преобладанием среднетяжелых форм (58,4%), сенсibilизацией к пыльцевым (55,4%)

бытовым и эпидермальным (7,7%) аллергенам, частым развитием сочетанной гиперчувствительности (36,9%), эозинофильным (65%) и малогранулоцитарным (27,7%) типом воспаления в индуцированной мокроте.

Особенностью неаллергического фенотипа бронхиальной астмы является начало заболевания после 30 лет, преобладание женщин (85,8%), частое развитие среднетяжелого (28,6%) и тяжелого (57,1%) течения БА, сочетание с хроническим полипозным риносинуситом (14,3%), распространенная персистенция респираторных патогенов (74,2%), развитие эозинофильного (34,3%), нейтрофильного (22,8%) и смешанного гранулоцитарного воспаления (28,6%).

Полиморфные маркеры генов рецепторов врожденного иммунитета у пациентов с аллергической и неаллергической бронхиальной астмой

В соответствии с задачами исследования в работе изучены полиморфные маркеры генов *TLR2 G2258A (Arg753Gln)*, *TLR6 C745T (Ser249Pro)*, *CD14 C(-159)T* у пациентов с бронхиальной астмой. Выбор данных однонуклеотидных полиморфизмов был связан с наличием экспериментальных и клинических исследований, свидетельствующих об участии механизмов врожденного иммунитета в регуляции аллергического воспаления и патогенезе аллергической и неаллергической бронхиальной астмы (Koronen P. et al., 2014, Ганковская Л. В. и др., 2015, Tizaoui K et al., 2015, Törmänen Sari et al., 2017).

При определении полиморфного варианта rs5743708 *TLR2 (2258 G>A)* установлено, что у пациентов с БА (84,5%), как и в общей популяции (97%) преобладает мажорный аллель 2258G. Однако он встречается реже, чем в контрольной группе (84,5% и 97%, $p<0,05$) в отличие от минорного аллеля 2258A (15,5% и 3%, $p<0,05$), относительный риск развития заболевания у резидентов которого составил 4,4 (95% CI: 1,51-12,8) (табл. 4).

Таблица 4-Распределение частот аллелей и генотипов TLR2, TLR6, CD14 у больных бронхиальной астмой

Ген	Аллели /генотип	Бронхиальная астма (n=100)	Контрольная группа (n=50)	χ^2	OR (95% CI)
2258 G/A TLR2 -753	G	169/200 (84,5%)	96/100 (97%)	$p=0,004$	0,23 (0,08-0,66)
	A	31/200 (15,5%)	4/100 (3%)	$p=0,004$	4,4 (1,51-12,85)
	GG	79/100 (79%)	47/50 (94%)	$p=0,02$	0,24 (0,07-0,85)
	GA	11/100 (11%)	2/50 (4%)	$p=0,15$	2,97 (0,60-13,9)
	AA	10/100 (10%)	1/50 (2%)	$p=0,08$	5,4 (0,68-43,79)
745 C/T TLR6 -249	C	92/200 (46%)	30/100 (30%)	$p=0,049$	1,99 (1,19-3,31)
	T	108/200 (54%)	70/100 (70%)	$p=0,008$	0,50 (0,30-0,84)
	CC	20/100 (20%)	6/50 (12%)	$p=0,205$	1,83 (0,69-4,90)
	CT	53/100 (53%)	18/50 (36%)	$p=0,053$	2,01 (0,98-4,03)
	TT	27/100 (27%)	26/50 (52%)	$p=0,003$	0,34 (0,17-0,69)
CD 14 C(-159)T	C	119/200 (59,5%)	55/100 (55%)	$p=0,46$	1,20 (0,74-1,95)
	T	81/200 (40,5%)	45/100 (45%)	$p=0,46$	0,83 (0,51-1,35)
	CC	37/100 (37%)	14/50 (28%)	$p=0,36$	1,51 (0,77-3,16)
	CT	43/100 (43%)	27/50 (54%)	$p=0,27$	1,76 (0,97-3,21)
	TT	20/100 (20%)	9/50 (18%)	$p=0,94$	1,14 (0,48-2,72)

p – статистическая значимость различий по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2 Пирсона) OR-отношение шансов, CI - 95% доверительный интервал

Распространенность генотипа *G2258G* преобладала в группе условно здоровых людей (97% и 84,5%, $p<0,01$). Следует отметить, что наличие генотипа *G2258G* уменьшало риск развития БА (OR=0,24; CI: 0,07-0,85).

Частота гомозиготного генотипа *A2258A* в 5 раз чаще встречалась при бронхиальной астме, чем в группе здоровых респондентов, однако достоверных отличий получено не было.

Таким образом, можно предполагать, что носительство редкого аллеля *2258A* повышает риск развития заболевания и обладает предиктивными свойствами в отношении развития бронхиальной астмы, в то время как наличие основного аллеля *2258G* и гомозиготного генотипа *G2258G* – уменьшает вероятность развития БА.

При изучении полиморфных маркеров гена *TLR6* *C745T* (rs5743810) у пациентов с бронхиальной астмой чаще, чем в контрольной группе выявлялся распространенный аллель *745C* (46% и 30%, $p<0,05$), реже – минорный *745T* (54% и 70%). Показатель отношения шансов у резидентов мажорного аллеля составил 1,99 (95% CI: 1,19-3,31) (табл. 4). При анализе генотипов отмечалось достоверное уменьшение гомозиготного генотипа по минорному аллелю *T745T* (27% и 52%, $p<0,05$) по сравнению со здоровыми индивидуумами с уменьшением вероятности развития БА у его обладателей в кодоминантной модели (OR=0,34; 95% CI: 0,17-0,69) (табл. 4).

Таким образом, можно предполагать, что носительство полиморфного маркера – аллеля *TLR6 745C* является генетическим фактором риска развития бронхиальной астмы, в то время, как наличие гомозиготного генотипа по минорному аллелю *T745T* уменьшает риск развития БА и обладает протективными свойствами.

Анализ полиморфного варианта *CD14* rs2569190 *C(-159)T* не выявил статистически значимых различий распространенности мажорного (59,5% и 55%) и минорного (40,5% и 45%) аллелей у пациентов с бронхиальной астмой по сравнению с контрольной группой. Не было установлено различий показателей встречаемости гетерозиготного *C(-159)T* и гомозиготных *C(-159)C*, *T(-159)T* генотипов по сравнению со здоровыми респондентами.

При анализе распределения аллелей и генотипов *TLR2* в зависимости от клинического фенотипа БА выявлено уменьшение частоты распространенного аллеля *2258G*, как у пациентов с аллергической (85,4%, $p<0,05$), так и неаллергической бронхиальной астмой (82,9%, $p<0,05$) (табл. 5). Установлено уменьшение риска развития АБА (OR=0,24; CI: 0,08-0,74) и НБА (OR=0,20; CI: 0,06-0,65) у носителей доминантного аллеля *2258G*.

Распространенность редкого аллеля *2258A*, напротив, увеличивалась и составила в группе с АБА – 14,6%, $p<0,05$, в группе с НБА – 17,1%, $p<0,05$. Выявлено повышение относительного риска развития аллергической (OR=4,10; 95% CI: 1,35-12,5) и неаллергической (OR=4,97; 95% CI: 1,53-16,2) БА у резидентов минорного аллеля – *2258A*.

Не установлено статистически значимых межгрупповых различий по частоте встречаемости генотипов – *GA*, *AA* в зависимости от фенотипа БА и по сравнению со здоровыми людьми. Выявлено уменьшение частоты встречаемости гомозиготного генотипа *G2258G* у пациентов с аллергической (80,0% и 94%, $p<0,05$) и неаллергической (77,1% и 94%, $p<0,05$) БА со снижением риска развития заболевания.

Таким образом, можно предполагать, что носительство редкого аллеля *2258A* повышает вероятность развития заболевания и обладает предиктивными свойствами в отношении развития бронхиальной астмы, в то время как наличие мажорного аллеля *2258G* и гомозиготного генотипа *G2258G* – уменьшает вероятность развития БА. Полученные закономерности не зависят от клинического фенотипа БА и подтверждаются для пациентов как с аллергической, так и неаллергической бронхиальной астмой. Вероятно, носительство редкого аллеля *TLR2 2258A* можно рассматривать в качестве фактора, предрасполагающего к развитию БА в популяции Ставропольского края.

Таблица 5-Распределение частот аллелей и генотипов TLR2 у больных с аллергической и неаллергической бронхиальной астмой

Аллели /генотип	АБА n=65 (I)	НБА n=35 (II)	Контрольная группа n=50 (III)	χ^2	OR (95% CI)
G	111/130 (85,4%)	58/70 (82,9%)	96/100 (97%)	$p_{I-II}=0,791$ $p_{I-III}=0,02$ $p_{II-III}=0,009$	$0,24 (0,08-0,74)^1$ $0,20 (0,06-0,65)^2$
A	19/130 (14,6%)	12/70 (17,1%)	4/100 (4%)	$p_{I-II}=0,791$ $p_{I-III}=0,02$ $p_{II-III}=0,009$	$4,10 (1,35-12,5)^1$ $4,97 (1,53-16,2)^2$
GG	52/65 (80,0%)	27/35 (77,2%)	47/50 (94%)	$p_{I-II}=0,94$ $p_{I-III}=0,049$ $p_{II-III}=0,049$	$0,26 (0,07-0,95)^1$ $0,22 (0,05-0,88)^2$
GA	7/65 (10,8%)	4/35 (11,4%)	2/50 (4%)	$p_{I-II}=0,94$ $p_{I-III}=0,32$ $p_{II-III}=0,37$	$2,90 (0,57-14,6)^1$ $3,10 (0,52-17,9)^2$
AA	6/65 (9,2%)	4/35 (11,4%)	1/50 (2%)	$p_{I-II}=1,00$ $p_{I-III}=0,23$ $p_{II-III}=0,18$	$4,98 (0,58-42,8)^1$ $6,30 (0,68-59,2)^2$

p – статистическая значимость различий между группами (критерий χ^2 с поправкой Йетса). OR-отношение шансов, CI - 95% доверительный интервал

При анализе клинических фенотипов БА ассоциация полиморфных маркеров гена *TLR6* установлена лишь для пациентов с аллергической астмой (табл. 6).

Таблица 6-Распределение частот аллелей и генотипов гена TLR6 у больных с аллергической и неаллергической БА

Аллели /генотип	АБА n=65 (I)	НБА n=35 (II)	Контрольная группа n=50 (III)	χ^2	OR (95% CI)
C	73/130 (56,2%)	20/70 (28,6%)	30/100 (30%)	$p_{I-II}=0,001$ $p_{I-III}=0,001$ $p_{II-III}=0,841$	$2,99 (1,77-5,18)^1$ $0,49 (0,26-0,92)^2$
T	57/130 (43,8%)	50/70 (71,4%)	70/100 (70%)	$p_{I-II}=0,001$ $p_{I-III}=0,001$ $p_{II-III}=0,841$	$0,34 (0,19-0,58)^1$ $1,07 (0,55-2,10)^2$
CC	17/65 (26,1%)	2/35 (5,7%)	6/50 (12%)	$p_{I-II}=0,027$ $p_{I-III}=0,100$ $p_{II-III}=0,359$	$2,60 (0,94-7,18)^1$ $0,44 (0,08-2,34)^2$
CT	38/65 (58,5%)	15/35 (42,9%)	18/50 (36%)	$p_{I-II}=0,681$ $p_{I-III}=0,028$ $p_{II-III}=0,963$	$2,50 (1,17-5,35)^1$ $1,33 (0,55-3,23)^2$
TT	10/65 (15,4%)	18/35 (51,4%)	26/50 (52%)	$p_{I-II}=0,001$ $p_{I-III}<0,001$ $p_{II-III}=0,867$	$0,16 (0,07-0,40)^1$ $0,98 (0,41-2,32)^2$

p – статистическая значимость различий между группами (критерий χ^2 с поправкой Йетса). OR-отношение шансов, CI - 95% доверительный интервал

У больных с АБА чаще, чем у пациентов с НБА (56,2% и 28,6%, $p<0,001$) и у здоровых резидентов (56,2% и 30%, $p<0,001$) определялось носительство мажорного аллеля 745C (Ser/249), реже минорного – 745T (Pro/249). Вероятность развития АБА у

обладателей мажорного аллеля возрастала практически в 3 раза, показатель отношения шансов составил 2,99 (95% CI:1,77-5,18). Следует отметить, что у пациентов с аллергической БА достоверно чаще, чем у пациентов с неаллергической БА (26,1% и 5,7%, $p<0,05$) определялся гомозиготный генотип по распространенному в популяции аллелю *C745C*. При неаллергической БА, напротив, преобладающим был гомозиготный вариант по редкому аллелю вариант *T745T* (51,4% и 15,4, $p<0,001$). У обладателей гетерозиготного генотипа *C745T* отмечено увеличение вероятности развития аллергической БА (OR=2,50; 95% CI: 1,17-5,35), у носителей гомозиготного генотипа *T745T* – уменьшение вероятности верификации АБА, OR=0,16 (95% CI: 0,07-0,40).

Таким образом, увеличение вероятности развития аллергической БА ассоциировалось с гетерозиготным генотипом *C745T*, уменьшение – с гомозиготным по редкому аллелю генотипом – *T745T*. Не выявлено ассоциации полиморфных маркеров гена *TLR6* для неаллергической астмы.

Можно предполагать, что носительство полиморфного маркера *TLR6 745C* является генетическим фактором риска развития бронхиальной астмы. В то время, как наличие гомозиготного генотипа по минорному аллелю *T745T* уменьшает вероятность развития БА и обладает протективными свойствами. При определении полиморфных маркеров *CD14 C(-159)T rs2569190* у пациентов с различными клиническими фенотипами БА установлено увеличение распространенного аллеля *-159C* (70,0% и 55,0%, $p<0,05$) и уменьшение редкого аллеля *-159T* (30,0% и 45,0%, $p<0,05$) у пациентов с неаллергической бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми людьми (табл. 7).

Таблица 7- Распределение частот аллелей и генотипов гена *CD14* у больных с аллергической и неаллергической БА

Аллели /генотип	АБА n=65 (I)	НБА n=35 (II)	Контрольная группа n=50 (III)	χ^2	OR (95% CI)
C	71/130 (54,6%)	49/70 (70,0%)	55/100 (55,0%)	$p_{I-II}=0,078$ $p_{I-III}=0,940$ $p_{II-III}=0,049$	0,99 (0,58-1,66) ¹ 1,91 (1,01-3,64) ²
T	59/130 (45,4%)	21/70 (30,0%)	45/100 (45,0%)	$p_{I-II}=0,078$ $p_{I-III}=0,940$ $p_{II-III}=0,049$	1,02 (0,60-1,71) ¹ 0,52 (0,28-0,99) ²
CC	19/65 (29,2%)	18/35 (51,4%)	14/50 (28,0%)	$p_{I-II}=0,049$ $p_{I-III}=0,950$ $p_{II-III}=0,049$	1,06 (0,47-2,40) ¹ 2,72 (1,10-6,74) ²
CT	31/65 (47,7%)	11/35 (31,4%)	27/50 (54,0%)	$p_{I-II}=0,175$ $p_{I-III}=0,630$ $p_{II-III}=0,07$	0,78 (0,37-1,63) ¹ 0,39 (0,16-0,97) ²
TT	15/65 (23,1%)	6/35 (17,2%)	9/50 (18,0%)	$p_{I-II}=0,662$ $p_{I-III}=0,666$ $p_{II-III}=0,852$	1,37 (0,54-3,44) ¹ 0,94 (0,30-2,94) ²

p – статистическая значимость различий между группами (критерий χ^2 с поправкой Йетса). OR-отношение шансов, CI - 95% достоверный интервал

Вероятность развития НБА у обладателей аллеля *-159C* увеличивалась (OR=1,91; CI: 1,01-3,64), а у резидентов аллеля *-159T* – уменьшалась (OR=0,52; CI: 0,28-0,99). Распространенность гетерозиготного и гомозиготных по мажорному и минорному аллелям генотипов у пациентов с АБА оказалась сопоставимой с показателями в контрольной группе. У пациентов с неаллергической БА более распространенным был

гомозиготный по распространенному аллелю генотип *C(-159)C*, статистически значимые различия выявлялись по сравнению с АБА (70,0% и 29,2%, $p<0,05$) и здоровыми людьми (51,4% и 28,0%, $p<0,05$).

Вероятность развития аллергической БА не увеличивалась в зависимости от генотипа. Вероятность развития неаллергической БА достоверно возрастала у гомозигот по распространенному аллелю – *C(-159)C*, OR=2,72 (95% CI: 1,10-6,74).

Таким образом, в работе не установлено ассоциации полиморфных маркеров гена *CD14 C(-159)T* с развитием бронхиальной астмы. Однако при анализе клинических фенотипов выявлено увеличение вероятности развития неаллергической БА у резидентов распространенного аллеля *-159C* и гомозиготного генотипа *C(-159)C*, уменьшение – у респондентов минорного аллеля – *(-159)T*.

Ассоциация полиморфных маркеров генов TLR с клиническими и лабораторными показателями при бронхиальной астме

В соответствии с задачами исследования в работе проведено сопоставление клинических и лабораторных показателей у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от генотипов *TLR2 G2258A*, (rs5743708); *TLR6 C745T* (rs5743810) и *CD14 C(-159)T* (rs2569190).

При распределении пациентов с различной степенью тяжести БА не установлено ассоциации клинических форм с генотипами *TLR2 G2258A* и *TLR6 C745T*. При этом получено увеличение числа пациентов с легким течением БА среди обладателей генотипа *CD14 T(-159)T*, а с тяжелым и среднетяжелым – среди обладателей генотипов *C(-159)C* и *C(-159)T* (рис. 1).

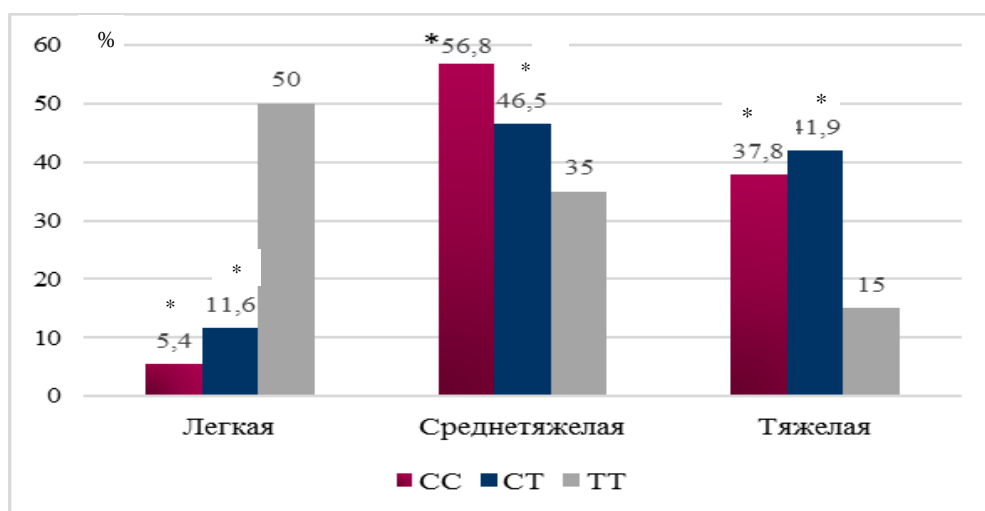


Рис. 1- Показатели степени тяжести бронхиальной астмы в зависимости от генотипов *CD14 C(-159)T*

Примечание: * – статистическая значимость различий по сравнению с генотипом *TT* (критерий χ^2 с поправкой Йетса)

С генотипами *CD14 C(-159)C* и *C(-159)T* были ассоциированы и низкие показатели функции внешнего дыхания. У гомозигот по мажорному аллелю (*C(-159)C*) уровень ОФВ1 составил 60% [56; 65], у гетерозигот (*C(-159)T*) – 62% [57; 69], $p<0,001$ у гомозигот по минорному аллелю (*T(-159)T*) – 78% [68; 84,5], $p<0,001$ (рис. 2).

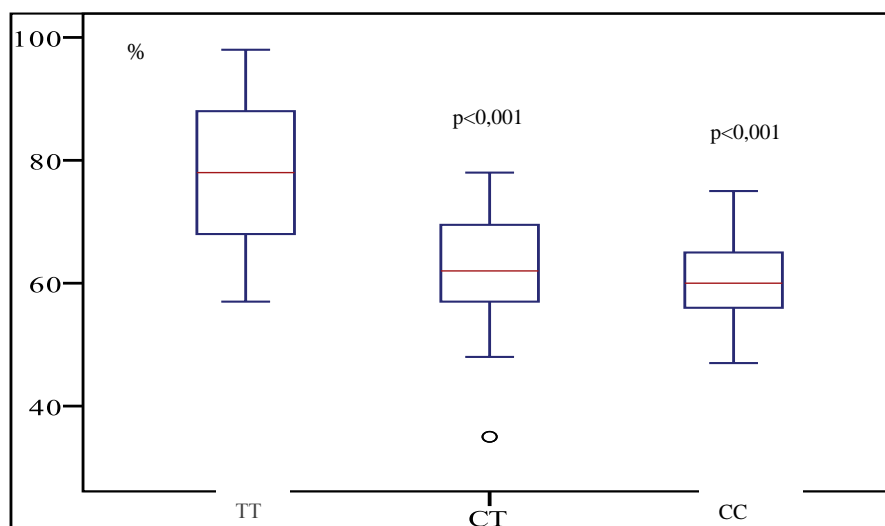


Рис. 21- Показатели ОФВ1 у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от генотипов CD14 –C-159T

Примечание: *p* – статистическая значимость различий по сравнению с группой TT

Не было установлено взаимосвязи показателей эозинофилов периферической крови и изучаемых генотипов *TLR2 G2258A*, *TLR6 C745T* и *CD14 C(-159)T*. Выявлена ассоциация показателей общего IgE с генотипом *TLR6 C745T*. Наиболее высокие уровни log IgE определялись у гетерозигот *C745T* – 2,49 [2,29; 2,87], $p < 0,001$ (рис. 3). Взаимосвязи с другими полиморфными маркерами не установлено.

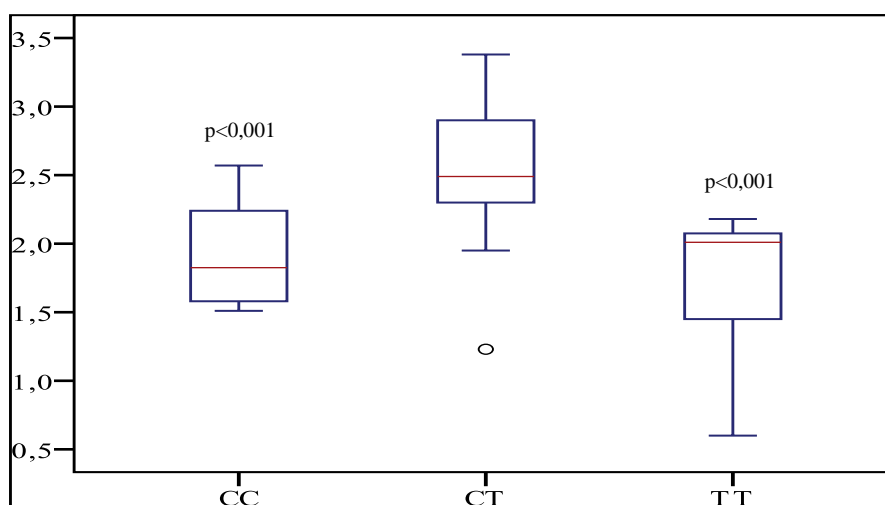


Рис. 3. Показатели log IgE у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от генотипов TL6 –C745T

Примечание: *p* – статистическая значимость различий по сравнению с группой CT

При анализе клеточного состава индуцированной мокроты нами не выявлено корреляции эозинофилов и генотипов *TLR6 C745T* (rs5743810) и *CD14 C(-159)T* (rs2569190). При этом показано достоверное увеличение эозинофилов у гомозигот по рецессивному аллелю *TLR2 A2258A* – 17,1 [12,8; 27,8], $p < 0,05$ (рис. 4), что не противоречит представленным выше данным об увеличении носителей аллеля *A* среди пациентов с аллергической (20%) и неаллергической (22,8%) бронхиальной астмой.

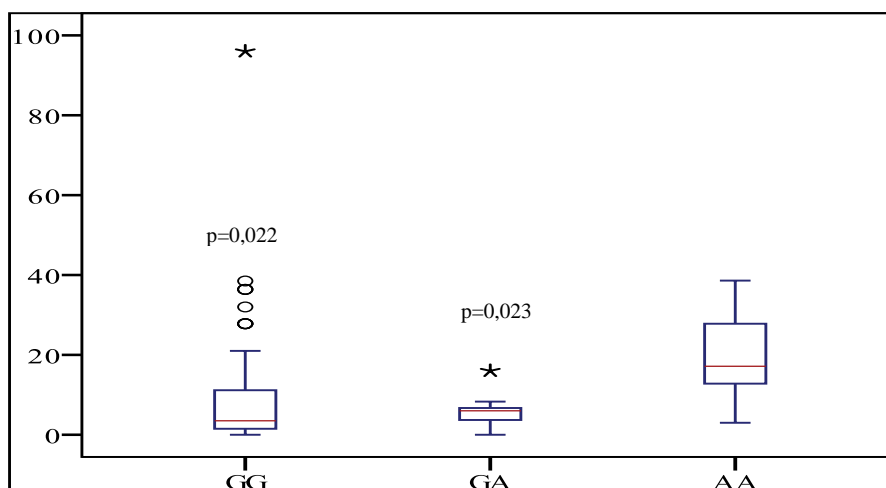


Рис. 4- Показатели эозинофилов индуцированной мокроты у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от генотипов *TLR2 G2258A*

Примечание: *p* – статистическая значимость различий по сравнению с группой *AA*

Количество нейтрофильных гранулоцитов в мокроте у пациентов с БА не зависело от полиморфных маркеров *TLR2 G2258A*, *TLR6 C745T*, однако увеличивалось у резидентов гетерозиготного генотипа *CD14 C(-159)T* – 48,4 [31,2; 69,4], $p < 0,05$ (рис. 5), что можно объяснить распространенностью тяжелого течения заболевания в этой группе больных.

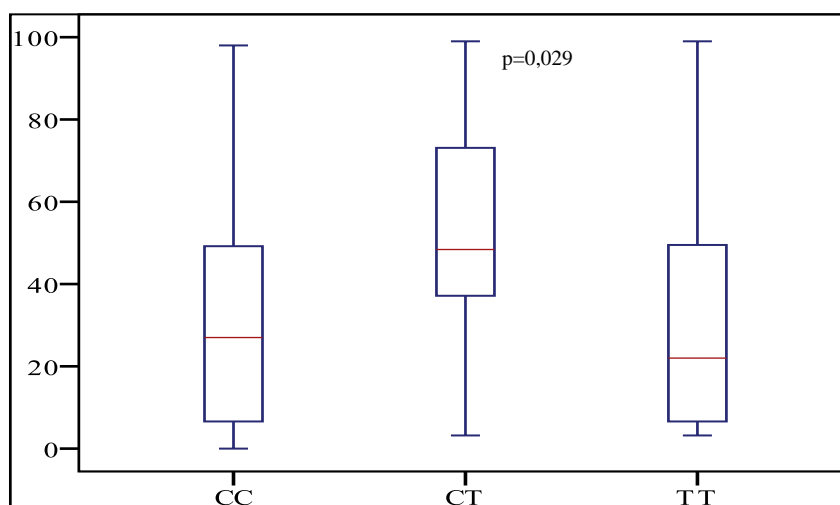


Рис 5- Показатели нейтрофилов индуцированной мокроты у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от генотипов *CD14 C(-159)T*

Примечание: *p* – статистическая значимость различий по сравнению с группой *TT*

Таким образом, высокая вероятность развития бронхиальной астмы определяется у носителей аллелей *TLR2 2258A*, *TLR6 745C*. Протективными свойствами обладают аллель *TLR2 2258G* и генотипы *TLR2 G2258G* и *TLR6 T745T*. Не установлено ассоциации полиморфных маркеров гена *CD14 C(-159)T* с развитием бронхиальной астмы.

Развитие аллергической БА ассоциировано с генотипом *TLR6 C745T* и аллелями *TLR2 2258A*, *TLR6 745C*. Протективными свойствами обладают генотипы *TLR2 G2258G*, *TLR6 T745T* и аллель *TLR6 745T*.

Повышение вероятности неаллергической БА связано с генотипом *CD14C(-159)C* и аллелями *TLR2 2258A* и *CD14(-159)C*. Защитными свойствами обладают генотип *TLR2 G2258G* и аллель *CD14(-159)T*.

Формирование тяжелой и среднетяжелой БА, а также низкие показатели функции внешнего дыхания (ОФВ1) ассоциируются с генотипами *CD14 C(-159)C* и *CD14 C(-159)T*, высокие показатели сывороточного IgE – с генотипом *TLR6 C745T*.

Увеличение эозинофилов в индуцированной мокроте выявляется преимущественно у респондентов генотипа *TLR2 A2258A*, нейтрофильных гранулоцитов – у обладателей генотипа *CD14 C(-159)T*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что генные полиморфизмы *TLR2 2258 G>A* (rs5743708), *TLR6 745 C>T* (rs5743810) и *CD14 -159 C>T* (rs2569190) могут способствовать дисрегуляции экспрессии цитокинов клетками иммунной системы и эпителием дыхательных путей, которые контролируют дифференцировку Т-хелперов, а также регулируют баланс Th1/Th2/Th17, участвующих в иммунном ответе при аллергической и неаллергической БА.

Принимая во внимание то, что TLR2, TLR6 и CD14 реагируют на поллютанты, микробные и немикробные аллергены, можно утверждать, что генетические вариации TOLL-подобных рецепторов могут оказывать заметное влияние на восприимчивость, тяжесть и прогноз при БА.

ВЫВОДЫ

1. Клинический фенотип аллергической бронхиальной астмы у взрослых пациентов русской национальности в Ставропольском крае характеризуется дебютом в молодом возрасте, преобладанием среднетяжелых форм (58,4%), сенсibilизацией к пыльцевым (85,4%) бытовым (63,1%) и эпидермальным (32,3%) аллергенам, частым развитием сочетанной гиперчувствительности (55,4%), эозинофильным (65%) и мало-гранулоцитарным (27,7%) типом воспаления в индуцированной мокроте.

2. Особенностью неаллергического фенотипа бронхиальной астмы является начало заболевания после 30 лет, преобладание женщин (85,8%), частое развитие среднетяжелой (28,6%) и тяжелой (57,1%) БА, сочетание с хроническим полипозным риносинуситом (14,3%), распространенная персистенция респираторных патогенов (74,2%), развитие эозинофильного (34,3%), нейтрофильного (22,8%) и смешанного гранулоцитарного воспаления (28,6%).

3. Полиморфные маркеры генов рецепторов врожденного иммунитета *TLR2 G2258A* и *TLR6 C745T* ассоциированы с развитием бронхиальной астмы у взрослых пациентов русской национальности Ставропольского края. Факторами риска развития заболевания являются аллели *TLR2 2258A*, *TLR6 745C*, протективными свойствами обладают генотипические варианты *TLR2 G2258G* и *TLR6 T745T* и аллель *TLR2_2258G*.

4. Молекулярно-генетическими маркерами аллергической бронхиальной астмы являются аллели *TLR2 2258A*, *TLR6 745C* и генотип *TLR6 C745T*, неаллергической бронхиальной астмы – аллели *TLR2 2258A* и *CD14(-159)C* и генотип *CD14C(-159)C*.

5. Формирование тяжелой и среднетяжелой бронхиальной астмы, а также низкие показатели функции внешнего дыхания (ОФВ1) ассоциированы с генотипами *CD14 C(-159)C* и *CD14 C(-159)T*, высокие показатели сывороточного IgE – с генотипом *TLR6 C745T*.

6. Преобладание эозинофилов в индуцированной мокроте больных бронхиальной астмой связано с носительством генотипа *TLR2 A2258A* нейтрофильных гранулоцитов – генотипа *CD14 C(-159)T*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При верификации клинико-патогенетических фенотипов бронхиальной астмы следует учитывать особенности дебюта заболевания, гендерную принадлежность, наличие сопутствующих инфекционно-воспалительных процессов, полипозного риносинусита, показатели сывороточного IgE, результаты накожного тестирования с учетом региональных особенностей и преобладания пыльцевой сенсибилизации, клеточный состав индуцированной мокроты, наличие полиморфных маркеров генов рецепторов врожденного иммунитета *TLR2 G2258A*, *TLR6 C745T*, *CD14 C(-159)T*.

2. Для повышения эффективности лечения у пациентов с нейтрофильным и смешанным гранулоцитарным характером воспаления показано бактериологическое исследование мокроты с идентификацией персистирующих респираторных патогенов.

3. У пациентов с бронхиальной астмой и генотипами *CD14 C(-159)C*, *CD14 C(-159)T* целесообразно рассмотреть возможность использования более активной стратегии профилактики тяжелых форм заболевания.

4. При наблюдении пациентов с неаллергическим фенотипом бронхиальной астмы и нейтрофильным характером индуцированной мокроты для индивидуального прогноза рекомендовано использование полиморфных маркеров гена *CD14 C(-159)T*.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего всестороннего изучения полиморфных маркеров генов рецепторов врожденного иммунитета *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR7*, *TLR9*, *CD14*, участвующих в патогенезе бронхиальной астмы и во многом определяющих особенности формирования эндотипов БА, что позволит формировать группы высокого риска по развитию тяжелых форм заболевания и совершенствовать современную тактику персонифицированной таргетной терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Позднякова, О. Ю. Информированность врачей терапевтов по ведению пациентов с неконтролируемой бронхиальной астмой в условиях поликлиники / О. Ю. Позднякова, Л. В. Шушанова // XXIII Национальный конгресс по болезням органов дыхания: сборник материалов. – Казань, 2013. – С. 38.

2. Позднякова, О. Ю. Коморбидность при неконтролируемой бронхиальной астме / О. Ю. Позднякова, А. П. Байда, Л. В. Шушанова // XXIII Национальный конгресс по болезням органов дыхания: сборник материалов. – Казань, 2013. – С. 14-15.

3. Позднякова, О. Ю. Генетические полиморфизмы у пациентов с контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой / О. Ю. Позднякова, В. А. Батулин, Л. В. Шушанова // VIII Национальный конгресс терапевтов: сборник материалов. – Москва, 2013. – С. 230-231.

4. Персонализированная терапия неконтролируемой бронхиальной астмы / О. Ю. Позднякова, А. П. Байда, В. А. Батулин, Л. В. Шушанова // От стандартизированной к индивидуализированной терапии. Лечим не болезнь, а больного: материалы международной научно-практической конференции. – Курск, 2014. – С. 86-93.

5. Позднякова О. Ю. Комплаентность и информированность пациентов с неконтролируемой бронхиальной астмой в амбулаторно-поликлинических условиях / О. Ю. Позднякова, Ю. Н. Михайлова, Л. В. Шушанова // 18-я ежегодная Неделя медицины Ставрополя: сборник научных работ. – Ставрополь: Изд-во СтГМА, 2014. – С. 39-40.

6. **Полиморфные маркеры генов рецепторов врожденного иммунитета у взрослых пациентов с бронхиальной астмой / Л. В. Шушанова, Л. Ю. Барычева, М. М. Минасян, Л. В. Душина // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 5. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28066>**

7. **Polymorphic variants of the TLR6 gene in adult patients with bronchial asthma / L. Yu. Barycheva, L. V. Shushanova, A. V. Yagoda, M. V. Golubeva, M. M. Minasyan // Medical News of North Caucasus. – 2018. – № 13(3). – P. 536-538.**

8. **Аллергический и неаллергический фенотипы бронхиальной астмы у взрослых пациентов в Ставропольском крае / Л. Ю. Барычева, Л. В. Шушанова, М. М. Минасян, Л. В. Душина // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 6. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28228>**

9. **Генный полиморфизм рецептора врожденного иммунитета TLR6 при бронхиальной астме у взрослых / Л. В. Шушанова, Л. Ю. Барычева, М. М. Минасян, Ю. Н. Медведенко // Фундаментальные и прикладные разработки естественных и гуманитарных наук: Современные концепции, последние тенденции развития: материалы XV Всероссийской научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2018. – С. 42-45.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБА – аллергическая бронхиальная астма
БА – бронхиальная астма
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ОФВ₁ – объем форсированного выдоха
ИФА – иммуноферментный анализ
ИМТ – индекс массы тела
ИГКС – ингаляционные глюкокортикостероиды
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ТЕА – трис-ацетатный буфер
НБА – неаллергическая бронхиальная астма
ПСВ – пиковая скорость выдоха
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
А – аденин
Arg – аргинин
С – цитозин
G – гуанин
Gln – глутамин
IL – интерлейкины
IgE – иммуноглобулин Е общий
Pro – пролин
SNP – одиночные единичные замены
Ser – серин
Т – тимин
TLR, TLRs – рецепторы врожденного иммунитета
Th1 – хелперы 1 типа
Th2 – хелперы 2 типа
Th17 – хелперы 17 типа