

УДК 616.248-039.3-085.015.6:575.117.2

ДИНАМИКА ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ РЕЗИСТЕНТНОЙ АСТМОЙ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ

Куликов Е.С.¹, Огородова Л.М.¹, Фрейдин М.Б.², Салтыкова И.В.¹, Деев И.А.¹, Селиванова П.А.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

РЕЗЮМЕ

В настоящее время доминирующие механизмы формирования терапевтической резистентности при астме не определены. Целью настоящего исследования была динамическая оценка профилей генной экспрессии при тяжелой терапевтически резистентной астме в течение периода наблюдения.

Проведено проспективное интервенционное исследование в параллельных группах с продолжительностью лечебного периода 24 нед. Апостериорно в соответствии с критериями ATS группа пациентов с тяжелой астмой была разделена на терапевтически чувствительных и резистентных пациентов. Глобальный уровень экспрессии генов определен в лимфоцитах периферической крови с помощью микрочипа Affymetrix HuGene ST1.0. Выполнен кластерный анализ временных рядов.

По данным исследования, в качестве механизмов развития резистентности могут рассматриваться повышение уровня оксида азота и, как следствие, нитрация бета-2-агонистов, дисрегуляция секреции эндогенных стероидов и процессы трансформации норадреналина в адреналин, вовлечение в патогенез суперантигена и (или) энтеротоксина золотистого стафилококка. Характеристика динамики экспрессии генов KEGG-пути «астма» может отражать низкую эффективность или длительный период реализации эффектов базисной противовоспалительной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бронхиальная астма, терапия, тяжелая бронхиальная астма, терапевтическая резистентность, молекулярные механизмы.

Введение

Согласно современным представлениям, тяжелая форма астмы является гетерогенным заболеванием, в структуре которого выделяют несколько клинических вариантов течения (фенотипов), существенно различающихся по характеристике [1, 2]. Однако, несмотря на существование достаточно четко сформулированных клинических критериев отдельных фенотипов, данные знания не позволяют с высокой степенью точности определить фенотип-специфичный подход к терапии болезни.

Классификационный подход GINA (2010) не учитывает подтипов внутри степеней тяжести, и особенно остро это несоответствие проявляется при ведении пациентов с тяжелыми формами болезни [3–6]. Важно, что предложенные клинические группировки фе-

нотипов бронхиальной астмы (БА) не позволяют скорректировать фармакотерапевтический подход в связи с отсутствием знаний о патофизиологических механизмах, лежащих в основе формирования фенотипов тяжелой астмы [7].

Прогресс в изучении молекулярных механизмов тяжелой БА очевиден. Так, в многочисленных доказательных исследованиях определены наиболее вероятные причинные факторы и молекулы, лежащие в основе формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности, которые могли бы быть использованы как в диагностических целях, так и стать новыми таргетными мишенями терапии БА [8].

Вместе с тем утверждать, что сегодня имеется полное понимание механизмов формирования тяжелой астмы и терапевтической резистентности не представляется возможным. Во-первых, большинство проведенных исследований достаточно разнородны по своим целям и задачам, выполнены на неоднородных выборках пациентов с точки зрения степени тяжести и

✉ Куликов Евгений Сергеевич, тел. +7-906-950-2882, факс: +7 (3822) 51-49-67; e-mail: evgeny.s.kulikov@gmail.com

(или) уровне контроля болезни, что не позволяет объединить результаты исследований и сформировать полную теоретическую концепцию. Во-вторых, опубликовано ограниченное количество исследований, в которых в качестве субъектов выступали пациенты с тяжелой терапевтически резистентной БА или представители фенотипов тяжелой астмы. В-третьих, подавляющее большинство исследований являются одномоментными, что не позволяет определить динамику изменения молекулярных и генетических профилей в ответ на фармакотерапию астмы.

Цель исследования – установить молекулярные механизмы тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмы.

Материал и методы

Для решения задач исследования было спланировано и проведено по единому протоколу проспективное интервенционное исследование в параллельных группах с продолжительностью лечебного периода 6 мес. Протокол исследования был разработан в соответствии со стандартом ICH GCP и прошел этическую экспертизу.

Диагноз БА был установлен в соответствии с критериями GINA [3]. Сформированы две группы пациентов – с легкой персистирующей и тяжелой БА. Клиническое течение заболевания на момент включения пациентов в исследование в соответствии с критериями контроля должно было быть расценено как неконтролируемое. В рамках исследования в соответствии с протоколом пациенту назначались следующие фармакотерапевтические режимы: легкая персистирующая БА – флутиказона пропионат (ФП) 250 мкг/сут, тяжелая астма – сальметерол/ФП – 1000 мкг/сут по ФП. По окончании лечебного периода в соответствии с оценкой эффективности терапии и критериями ATS (2000) группа пациентов с тяжелой БА апостериорно разделена на терапевтически чувствительных (ТЧБА) и резистентных пациентов (ТРБА) [9]. Клиническая характеристика представлена в табл. 1.

Глобальный уровень экспрессии генов определен в лимфоцитах периферической крови с помощью микрочипа Affymetrix HuGene ST1.0 (Affymetrix, США), содержащего пробы для 28 875 генов. Выделение РНК, пробоподготовку, гибридизацию и сканирование микрочипов проводили в соответствии с протоколами Affymetrix. Гибридизация, окрашивание, промывка и сканирование микрочипов выполнена с помощью устройства GeneTitan. Полученные после сканирования изображения микрочипов конвертировали в экспрессионные сигналы с помощью программного обеспечения компании Affymetrix. Эти файлы затем использо-

вали для оценки качества мечения и гибридизации микрочипов, а также препроцессинга, включающего коррекцию на фон, квантильную нормализацию и суммирование экспрессионных сигналов с помощью программы Affymetrix Power Tools 1.12.0. Последующий анализ проводили в программной среде R. Уровень экспрессии генов в различных группах сравнивали путем построения линейных моделей с помощью пакета limma, включая анализ линейных контрастов между сравниваемыми группами (легкая БА, ТЧБА, ТРБА) [10]. Поправку на множественные сравнения проводили с помощью подхода False Discovery Rate (FDR) [11].

Таблица 1

Клиническая характеристика групп сравнения			
Показатель	Легкая БА (n = 5)	ТЧБА (n = 20)	ТРБА (n = 20)
Возраст, лет	53,80 ± 0,97	47,15 ± 3,20	51,40 ± 2,52
Количество дневных симптомов за последние 7 дней	6,00 ± 1,97	12,45 ± 1,51	21,35 ± 2,13*
Количество ночных симптомов за последние 7 дней	0,80 ± 0,20	2,55 ± 0,47	5,05 ± 1,15
Стаж заболевания, лет	9,00 ± 2,24	9,75 ± 1,94	16,65 ± 1,88*
Частота вызовов скорой помощи за последние 12 мес	–	0,15 ± 0,15	2,60 ± 1,23*
ОФВ ₁ , %	99,36 ± 5,57	68,10 ± 1,89	61,97 ± 1,97*
РС20, мг/мл	4,01 ± 3,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
АСТ-тест, балл	20,40 ± 0,98	15,30 ± 0,58	12,40 ± 0,89*

Примечание. ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за первую секунду; * – показатели, достоверно отличающиеся в сравнении с группой ТЧБА на уровне статистической значимости 5% ($p < 0,05$).

С целью оценки динамики генной экспрессии в течение лечебного периода проведен кластерный анализ временных рядов. Метод основан на алгоритме средних (с-means), который заключается в расчете средних значений («центров масс») множества переменных (в данном случае – уровней генной экспрессии) и отнесении отдельных объектов (генов) к одной из групп на основании близости уровня их экспрессии к одному из «центров масс». Расчет средних значений осуществляется для каждого временного периода отдельно; кластеры формируются для совокупности временных периодов, и гены относят к тому или иному кластеру на основании динамики уровня их экспрессии, соответствующей таковой для кластера [12].

В ходе проведенного анализа для каждой из сравниваемых групп проанализировано 5000 наиболее изменчивых генов, которые в результате определения общих закономерностей изменения экспрессии во времени сформировали девять кластеров.

Для статистической обработки был использован пакет программ Statistica 6.0 for Windows. При сравнении частот качественных признаков использовался критерий χ^2 или двухсторонний критерий Фишера.

Для оценки различия средних в попарно не связанных выборках применяли *U*-критерий Манна–Уитни. Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные в виде $X \pm x$, где X – среднее арифметическое значение, x – ошибка среднего. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика изменений экспрессии кластеров ТРБА в течение периода наблюдения

В группе ТРБА для четырех кластеров (2, 3, 8, 9) зарегистрировано увеличение экспрессии в первые 12 нед терапии с дальнейшим снижением экспрессии во вторые 12 нед лечебного периода (рис. 1). Четыре кластера (1, 4, 5, 7) характеризовались снижением экспрессии в течение первых 3 мес лечебного периода и увеличением экспрессии в оставшийся период. Только для одного кластера (6) зарегистрировано увеличение экспрессии в течение всего лечебного периода. Необходимо отметить, что только в данной группе не было зарегистрировано кластера, экспрессия генов которого закономерно понижалась в течение лечебного периода.

Оценка динамики генной экспрессии в течение лечебного периода

С целью оценки динамики генной экспрессии в течение лечебного периода в сравниваемых группах были соотнесены изменения экспрессии кластеров во времени со статистически значимыми KEGG-путями и генными онтологиями, ассоциированными с механизмами астмы (табл. 2).

По результатам анализа связи между кластерами выделены только две группы кластеров, которые характеризуются общей закономерностью экспрессии (трендами) (табл. 3). Для генов, входящих в кластеры 1, 4, 5, 6, 7 была характерна закономерность, состоящая в различной степени выраженности снижения экспрессии в первые 12 нед терапии с дальнейшим повышением во второй половине лечебного периода. А для генов кластеров 2, 3, 8, 9 зарегистрирована обратная закономерность – увеличение экспрессии с последующим снижением. Эти закономерности изменения экспрессии группы кластеров генов были соотнесены со статистически значимыми KEGG-путями и генными онтологиями, ассоциированными с механизмами астмы (табл. 3).

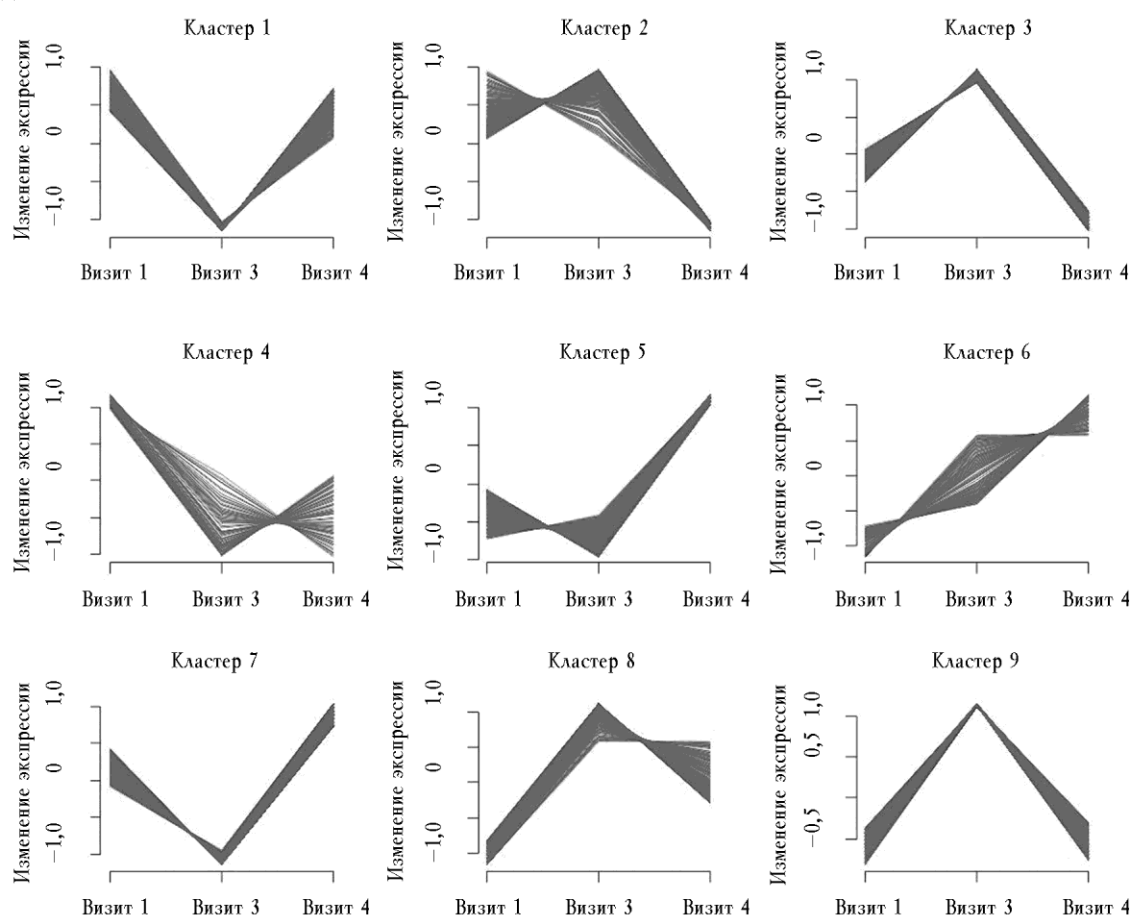


Рис. 1. Кластеры, отражающие изменения генной экспрессии во времени в группе больных тяжелой терапевтически резистентной БА

Т а б л и ц а 2

Соотнесение изменений экспрессии кластеров во времени и статистически значимых KEGG-путей и генных онтологий для ТРБА, ассоциированных с механизмами астмы	
Изменения экспрессии кластеров во времени	Статистически значимые KEGG-пути и генные онтологии, ассоциированные с механизмами астмы
Кластер 1	hsa00910 – Nitrogen metabolism GO:0006691 – leukotriene metabolic process GO:0006954 – inflammatory response GO:0033604 – negative regulation of catecholamine secretion GO:0048242 – epinephrine secretion GO:0045628 – regulation of T-helper 2 cell differentiation GO:0045087 – innate immune response GO:0002446 – neutrophil mediated immunity GO:0003707 – steroid hormone receptor activity
Кластер 2	GO:0019083 – viral transcription GO:0002479 – antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I GO:0005164 – tumor necrosis factor receptor binding
Кластер 3	hsa05310 – Asthma hsa04612 – Antigen processing and presentation hsa05150 – <i>Staphylococcus aureus</i> infection GO:0019083 – viral transcription GO:0002504 – antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II
Кластер 5	GO:0032648 – regulation of interferon-beta production GO:0032760 – positive regulation of tumor necrosis factor production GO:0002281 – macrophage activation involved in immune response GO:0045351 – type I interferon biosynthetic process
Кластер 6	GO:0002360 – T cell lineage commitment GO:0019885 – antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I
Кластер 7	hsa05100 – Bacterial invasion of epithelial cells GO:0004896 – cytokine receptor activity
Кластер 9	hsa05310 – Asthma hsa05150 – <i>Staphylococcus aureus</i> infection GO:0019083 – viral transcription GO:0002504 – antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II GO:0050852 – T cell receptor signaling pathway GO:0031295 – T cell costimulation GO:0060333 – interferon-gamma-mediated signaling pathway GO:0043312 – neutrophil degranulation

Примечание. В табл. 2 не представлены кластеры 4 и 8, так как в них не зарегистрировано статистически значимых KEGG-путей и генных онтологий, ассоциированных с механизмами астмы.

В первой группе связанных кластеров гены сформировали два KEGG-пути и 15 генных онтологий, вероятно, ассоциированных с механизмами астмы. При

этом подавляющее большинство онтологий и характер изменения экспрессии генов, формирующих их, во

Т а б л и ц а 3

Соотнесение изменений экспрессии группы кластеров генов со статистически значимыми KEGG-путями и генными онтологиями для ТРБА	
Закономерность изменения экспрессии группы кластеров (тренды)	Статистически значимые KEGG-пути и генные онтологии, ассоциированные с механизмами астмы
∇	hsa00910 – Nitrogen metabolism (1) GO:0006691 – leukotriene metabolic process (1) GO:0006954 – inflammatory response (1) GO:0033604 – negative regulation of catecholamine secretion (1) GO:0048242 – epinephrine secretion (1) GO:0045628 – regulation of T-helper 2 cell differentiation (1) GO:0045087 – innate immune response (1) GO:0002446 – neutrophil mediated immunity (1) GO:0003707 – steroid hormone receptor activity (1) GO:0032648 – regulation of interferon-beta production (5) GO:0032760 – positive regulation of tumor necrosis factor production (5) GO:0002281 – macrophage activation involved in immune response (5) GO:0045351 – type I interferon biosynthetic process (5) GO:0002360 – T cell lineage commitment (6) GO:0019885 – antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I (6) hsa05100 – Bacterial invasion of epithelial cells (7) GO:0004896 – cytokine receptor activity (7)
∧	GO:0019083 – viral transcription (2) GO:0002479 – antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I (2) GO:0005164 – tumor necrosis factor receptor binding (2) hsa05310 – Asthma (3) hsa04612 – Antigen processing and presentation (3) hsa05150 – <i>Staphylococcus aureus</i> infection (3) GO:0019083 – viral transcription (3) GO:0002504 – antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II (3) hsa05310 – Asthma (9) hsa05150 – <i>Staphylococcus aureus</i> infection (9) GO:0019083 – viral transcription (9) GO:0002504 – antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II (9) GO:0050852 – T cell receptor signaling pathway (9) GO:0031295 – T cell costimulation (9) GO:0060333 – interferon-gamma-mediated signaling pathway (9) GO:0043312 – neutrophil degranulation (9)

времени оказались сопоставимыми с таковыми в группе ТЧБА. К таким процессам можно отнести он-

тологии двух функциональных направлений – регуляция иммунного ответа и изменение активности Т-клеток: «воспалительный ответ» (GO:0006954), «регуляция дифференцировки Т-хелперов 2» (GO:0045628), «врожденный иммунный ответ» (GO:0045087), «иммунитет модулируемый нейтрофилами» (GO:0002446), «регуляция продукции интерферона бета» (GO:0032648), «положительная регуляция продукции ФНО» (GO:0032760), «активация макрофагов, вовлеченных в иммунный ответ» (GO:0002281), «биосинтез интерферона первого типа» (GO:0045351), «повышение формирования Т-клеток» (GO:0002360), «процессинг антигена и презентация антигена эндогенного пептида через главный комплекс гистосовместимости класса I» (GO:0019885), «активность рецепторов хемокинов» (GO:0004896), «метаболизм лейкотриенов» (GO:0006691).

Наряду с этим в данной группе связанных кластеров генов были зарегистрированы пути и биологические процессы, характерные только для этой группы.

К такой онтологии можно отнести KEGG-путь «метаболизм азота» (hsa00910). Отличительными онтологиями являются также биологические процессы «негативная регуляция секреции катехоламинов» (GO:0033604), «секреция эпинефрина» (GO:0048242) и молекулярная функция «активность рецептора стероидов» (GO:0003707).

Во второй группе связанных кластеров зарегистрировано 3 KEGG-пути и 11 генных онтологий, вероятно, ассоциированных с механизмами астмы. Так же как и в первой группе, большинство онтологий и характер изменения экспрессии генов, формирующих их, во времени оказались сопоставимыми с таковыми в группе ТЧБА. К паттернам, характерным только для терапевтически резистентной формы болезни, можно отнести отсутствие снижения экспрессии генов, формирующих KEGG-путь «астма», который был зарегистрирован в составе сразу двух кластеров (hsa05310). Другим важным с точки зрения механизмов астмы KEGG-путем, зарегистрированным в данной группе пациентов, является «инфекция *Staphylococcus aureus*» (hsa05150).

Обсуждение

При интерпретации полученных результатов необходимо отметить, что в рамках протокола исследования все пациенты группы ТРБА находились на регулярной базисной комбинированной терапии в объеме 1000 мкг/сут по ФП. На фоне этого режима лечения был зарегистрирован незначительный начальный положительный эффект, но в дальнейшем положительная динамика практически отсутствовала и к окончанию

лечебного периода течение болезни у всех пациентов данной группы было расценено как неконтролируемое.

Согласно результатам исследования отличительными онтологиями для ТРБА были KEGG-путь «метаболизм азота» (hsa00910) и ряд биологических процессов и молекулярных функций, отражающих регуляцию катехоламинов («негативная регуляция секреции катехоламинов» – GO:0033604, «секреция эпинефрина» (GO:0048242), «активность рецептора стероидов» (GO:0003707)). При этом для вышеописанных онтологий была характерна закономерность, заключающаяся в различной степени выраженности снижения экспрессии в первые 12 нед терапии с дальнейшим повышением во второй половине лечебного периода.

Значение окиси азота, ферментативного пути и метаболитов широко обсуждается в современной литературе как в аспекте патогенеза БА, так в оценке возможной роли данных субстанций в мониторинговании течения болезни и оценки риска обострений [13, 14].

В исследовании К. Matsunaga и соавт. (2013) продемонстрировано, что выдыхаемая фракция оксида азота повышена у большинства тяжелых пациентов, несмотря на терапию ингаляционными кортикостероидами (ИКС) и даже назначение системных кортикостероидов приводило к снижению данного показателя только у половины пациентов [15]. Результаты этого исследования представляют особый интерес при их сопоставлении с данными оценки активности бета-2-агонистов в условиях оксидативного стресса. Так, в двух исследованиях, проведенных в 2009 и 2011 гг., было продемонстрировано, что на фоне высокой пероксидазной активности и уровня оксида азота в дыхательных путях при астме происходит нитрация и, как следствие, изменение структурных и функциональных свойств таких бета-2-агонистов как фенотерол, метапротеренол и сальбутамол [16, 17]. При этом нитрированный сальбутамол характеризуется сниженным аффинитетом к бета-2-адренорецептору в сравнении с нативной молекулой лекарства [17]. Таким образом, данный феномен может быть причиной недостаточной эффективности, как терапии скорой помощи, так и комбинированной терапии в составе ИКС и бета-2-агониста длительного действия.

Снижение экспрессии эндогенного эпинефрина и, как следствие, ослабление негативной регуляции секреции катехоламинов наблюдается, вероятно, на фоне терапии высокими дозами ИКС по принципу обратной отрицательной связи.

Так, в 2005 г. J.T. Feng и С.Р. Ну на основе проведенных экспериментов была выдвинута гипотеза, согласно которой у астматиков нарушен процесс секре-

ции эндогенного адреналина вследствие избыточной экспрессии фактора роста нерва, что приводит к снижению объема медуллярной ткани надпочечников [18]. В ряде исследований было продемонстрировано, что глюкокортикоиды способны индуцировать трансформацию норадреналина в адреналин [19, 20]. При этом высокие концентрации глюкокортикоидов оказывают протективное действие на процессы трансформации медуллярных клеток в нейроны [21].

Сопоставление результатов этих исследований с паттерном изменения активности онтологий на основе оценки экспрессии генов (снижение экспрессии генов, формирующих биологические процессы в первые 12 нед терапии с дальнейшим ростом в оставшийся период) позволяет предположить, что на фоне терапии высокими дозами ИКС наблюдалась тенденция к снижению эндогенного эпинефрина, базальные уровни которого исходно уже были снижены.

Таким образом, регуляция секреции эндогенных стероидов и процессы трансформации норадреналина в адреналин, по данным исследования, могут рассматриваться как компоненты неэффективности к терапии ИКС при ТРБА.

Обратная закономерность изменения экспрессии генов в течение лечебного периода (повышение экспрессии в первые 12 нед терапии с дальнейшим снижением во второй половине) была характерна для KEGG-путей «астма» (hsa05310) и «инфекция *Staphylococcus aureus*» (hsa05150). При интерпретации данной картины необходимо отметить, что KEGG-путь «астма» сформирован генами, которые имеют отношение к установленным механизмам патогенеза болезни, и в группе легкой БА на фоне терапии экспрессия генов, формирующих этот путь, закономерно снижалась в течение всего периода наблюдения. В группе ТРБА экспрессия генов пути в течение первых 3 мес повышалась, а ее постепенное снижение регистрировалось только в оставшиеся 12 нед. Полученная картина может отражать низкую эффективность или длительный период реализации эффектов базисной противовоспалительной терапии.

В последнее время в литературе широко обсуждается роль бактериальной инфекции как потенциально фактора риска формирования тяжелой БА и триггера обострения у детей и взрослых. Так, например, установлено, что дефицит экспрессии T-bet способствует колонизации дыхательных путей инфекционными агентами (*Mycoplasma pulmonis*), что может являться предиктором неконтролируемого течения заболевания и формирования терапевтической резистентности [22]. Также дефицит T-bet у мышей, лишенных гена данного фактора, приводит к большей

подверженности инфицированию *Mycobacterium tuberculosis* [23].

Анализ литературы позволил установить для золотистого стафилококка специфичные механизмы, которые способны оказывать влияние непосредственно на иммунное звено воспаления. При инфекционных заболеваниях верхних дыхательных путей было установлено, что энтеротоксин золотистого стафилококка индуцирует продукцию IgE, что посредством активации тучных клеток приводит к повышению выраженности воспаления [24]. В более поздних исследованиях было показано, что данная модель персистенции воспаления применима и к астме. Так, в 2011 г. M.L. Kowalski и соавт. было проведено исследование ассоциации уровня энтеротоксин-специфического IgE *S. aureus* с ТРБА и параметрами ее течения [25]. В группе пациентов с терапевтической резистентностью уровень энтеротоксин-специфического IgE был в 3 раза выше, чем у терапевтически чувствительных пациентов. Более того, данный параметр был достоверно ассоциирован с более низкими показателями функции внешнего дыхания и более высокими показателями обратимости бронхиальной обструкции. Аналогичные результаты были воспроизведены в исследовании, проведенном С. Vachert и соавт. в 2012 г. [26].

Таким образом, регистрация в сыворотке крови энтеротоксин-специфического IgE может свидетельствовать о вовлечении в патогенез тяжелой астмы суперантигена стафилококка.

Заключение

В результате оценки динамики экспрессии генов в течение периода наблюдения у пациентов с ТРБА были зарегистрированы механизмы развития резистентности к терапии – повышение уровня оксида азота и, как следствие, нитрация бета-2-агонистов, дисрегуляция секреции эндогенных стероидов и процессы трансформации норадреналина в адреналин, вовлечение в патогенез суперантигена и (или) энтеротоксина золотистого стафилококка.

Также необходимо отметить, что характеристика динамики экспрессии генов KEGG-пути «астма» может отражать низкую эффективность или длительный период реализации эффектов базисной противовоспалительной терапии.

Литература

1. Chung K.F., Godard P., Adelroth E. Difficult therapy-resistant asthma // Eur. Respir. J. 1999. 13. P. 1198–1208.
2. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.А. Многоликая бронхиальная астма: диагностика, лечение и профилактика. М.: Нордмедиздат, 2011. С. 343.
3. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхи-

- альной астмы / под ред. А.С. Белевского. М.: Российское респираторное общество, 2012. 108 с.
4. Miller M.K., Johnson C., Miller D.P. et al. Severity assessment in asthma: an evolving concept // J. Allergy Clin. Immunol. 2005. 116. P. 990–995.
 5. Чучалин А.Г., Огородова Л.М., Петровский Ф.И. и др. Мониторинг и лечение тяжелой бронхиальной астмы у взрослых: результаты национального многоцентрового исследования НАБАТ // Терапевтический архив. 2005. 77 (3). С. 36–42.
 6. Чучалин А.Г., Огородова Л.М., Петровский Ф.И. и др. Базисная терапия тяжелой бронхиальной астмы. Данные национального исследования НАБАТ // Пульмонология. 2004. 6. С. 32.
 7. Bel E.H. Clinical phenotypes of asthma // Curr. Opin. Pulm. Med. 2004. 10. P. 44–50.
 8. Voelkel N., Spiegel S. Why is effective treatment of asthma so difficult? An integrated systems biology hypothesis of asthma // Immunol. Cell. Biol. 2009. 87 (8). P. 601–605.
 9. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions // American Thoracic Society. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000. Dec; 162 (6). P. 2341–2351.
 10. Smyth G.K. Limma: linear models for microarray data // Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor / R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.). New York: Springer, 2005. P. 397–420.
 11. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // J. R. Stat. Soc. B. 1995. 57. P. 289–300.
 12. Kumar L., Futschik M.E. Mfuzz: A software package for soft clustering of microarray data // Bioinformatics. 2007. 2 (1). P. 5–7.
 13. Cabral A.L., Vollmer W.M., Barbirotto R.M. et al. Exhaled nitric oxide as a predictor of exacerbation in children with moderate-to-severe asthma: a prospective, 5-month study // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2009. Sep; 103 (3). P. 206–211.
 14. Sunyer J., Basagaña X., Belmonte J. et al. Effect of nitrogen dioxide and ozone on the risk of dying in patients with severe asthma // Thorax. 2002. Aug; 57 (8). P. 687–693.
 15. Matsunaga K., Hirano T., Akamatsu K. et al. Predictors for identifying the efficacy of systemic steroids on sustained exhaled nitric oxide elevation in severe asthma // Allergol Int. 2013. Sep; 62 (3). P. 359–365.
 16. Reszka K.J., McGraw D.W., Britigan B.E. Peroxidative metabolism of beta2-agonists salbutamol and fenoterol and their analogues // Chem. Res. Toxicol. 2009. Jun; 22 (6). P. 1137–1150.
 17. Reszka K.J., Sallans L., Macha S. et al. Airway peroxidases catalyze nitration of the beta2-agonist salbutamol and decrease its pharmacological activity // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. Feb; 336 (2). P. 440–449.
 18. Feng J.T., Hu C.P. Dysfunction of releasing adrenaline in asthma by nerve growth factor // Med. Hypotheses. 2005. 65 (6). P. 1043–1046.
 19. Kvetnansky R., Kubovcakova L., Tillinger A. et al. Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure // Cell Mol. Neurobiol. 2006. Jul-Aug; 26 (4–6). P. 735–754.
 20. Yamaguchi-Shima N., Okada S., Shimizu T. et al. Adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells and celiac sympathetic ganglia are differentially controlled by centrally administered corticotropin-releasing factor and arginine-vasopressin in rats // Eur. J. Pharmacol. 2007. Jun 14; 564 (1–3). P. 94–102.
 21. Hodel A. Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells // J. Neuroendocrinol. 2001. Feb; 13 (2). P. 216–220.
 22. Wood P.R., Hill V.L., Burks M.L. Mycoplasma pneumoniae in children with acute and refractory asthma // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2013. May; 110 (5). P. 328–334.
 23. Sullivan B.M., Jobe O., Lazarevic V. Increased susceptibility of mice lacking T-bet to infection with Mycobacterium tuberculosis correlates with increased IL-10 and decreased IFN-gamma production // The Journal of Immunology. 2005. 175. P. 4593–4602.
 24. Van Zele T., Gevaert P. Role of Staphylococcus aureus in upper respiratory infections // Verh K Acad Geneesk Belg. 2008. 70 (5–6). P. 369–378.
 25. Kowalski M.L., Cieślak M., Pérez-Novo C.A. et al. Clinical and immunological determinants of severe/refractory asthma (SRA): association with Staphylococcal superantigen-specific IgE antibodies // Allergy. 2011. Jan; 66 (1). P. 32–38.
 26. Bachert C., van Steen K., Zhang N. et al. Specific IgE against Staphylococcus aureus enterotoxins: an independent risk factor for asthma // J. Allergy Clin. Immunol. 2012. Aug; 130 (2). P. 376–381.

Поступила в редакцию 17.12.2013 г.

Утверждена к печати 24.01.2014 г.

Куликов Евгений Сергеевич (✉) – канд. мед. наук, ассистент кафедры общей врачебной практики и поликлинической терапии СибГМУ (г. Томск).

Огородова Людмила Михайловна – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

Фрейдин Максим Борисович – канд. биол. наук, ст. научн. сотрудник лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Салтыкова Ирина Владимировна – канд. мед. наук, научн. сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ (г. Томск).

Деев Иван Анатольевич – д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

Селиванова Полина Александровна – канд. мед. наук, докторант кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

✉ **Куликов Евгений Сергеевич**, тел. 8-906-950-2882, факс 8 (3822) 51-49-67; e-mail: evgeny.s.kulikov@gmail.com

GENE EXPRESSION DYNAMICS IN PATIENTS WITH SEVERE THERAPY-RESISTANT ASTHMA DURING TREATMENT PERIOD

Kulikov Ye.S.¹, Ogorodova L.M.¹, Freidin M.B.², Saltikova I.V.¹, Deyev I.A.¹, Selivanova P.A.¹

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: The leading mechanisms and causes of severe therapy resistant asthma are poorly understood. The aim of this study was to define global patterns of gene expression in adults with severe therapy-resistant asthma in dynamic during treatment period.

Methods: Performed 24-week prospective interventional study in parallel groups. Severe asthma patients was aposterior divided at therapy sensitive and resistant patients according to ATS criteria. Global transcriptome profile was characterized using the Affymetrix HuGene ST1.0 chip. Cluster analysis was performed.

Results and conclusion: According to our data several mechanisms of therapy resistance may be considered: increased levels of nitric oxide and beta2-agonists nitration, dysregulation of endogenous steroids secretion and involvement in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Absence of suppression of gene expression KEGG-pathway "asthma" may reflect the low efficiency or long period of anti-inflammatory therapy effect realization.

KEY WORDS: bronchial asthma, therapy, severe bronchial asthma, therapy resistance, molecular mechanisms.

Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 1, pp. 47–55

References

1. Chung K.F., Godard P., Adelroth E. Difficult therapy-resistant asthma. *Eur. Respir. J.*, 1999, 13, pp. 1198–1208.
2. Fedoseyev G.B., Trofimov V.I., Petrova M.A. *The many faces of asthma, diagnosis, treatment and prevention*. Moscow, Nordmedizdat Publ., 2011. P. 343 (in Russian).
3. *Global strategy for the treatment and prevention of bronchial asthma*. Ed. A.S. Belevsky. Moscow, Russian Respiratory Society, 2012. 108 p. (in Russian).
4. Miller M.K., Johnson C., Miller D.P. et al. Severity assessment in asthma: an evolving concept. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, 116, pp. 990–995.
5. Chuchalin A.G., Ogorodova L.M., Petrovsky F.I et al. *Therapeutic archive*, 2005, 77 (3), pp. 36–42 (in Russian).
6. Chuchalin A.G., Ogorodova L.M., Petrovsky F.I et al. *Pulmonology*, 2004, 6, p. 32 (in Russian).
7. Bel E.H. Clinical phenotypes of asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2004, 10, pp. 44–50.
8. Voelkel N., Spiegel S. Why is effective treatment of asthma so difficult? An integrated systems biology hypothesis of asthma. *Immunol. Cell. Biol.*, 2009, 87 (8), pp. 601–605.
9. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. *American Thoracic Society. Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, Dec; 162 (6), pp. 2341–2351.
10. Smyth G.K. (2005). Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, New York, pp. 397–420.
11. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B.*, 1995, 57, pp. 289–300.
12. Kumar L., Futschik M.E. Mfuzz: A software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics*, 2007, 2 (1), pp. 5–7.
13. Cabral A.L., Vollmer W.M., Barbirotto R.M. et al. Exhaled nitric oxide as a predictor of exacerbation in children with moderate-to-severe asthma: a prospective, 5-month study. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2009, Sep; 103 (3), pp. 206–211.
14. Sunyer J., Basagaña X., Belmonte J. et al. Effect of nitrogen dioxide and ozone on the risk of dying in patients with severe asthma. *Thorax*, 2002, Aug; 57 (8), pp. 687–693.
15. Matsunaga K., Hirano T., Akamatsu K. et al. Predictors for identifying the efficacy of systemic steroids on sustained exhaled nitric oxide elevation in severe asthma. *Allergol. Int.*, 2013, Sep; 62 (3), pp. 359–365.
16. Reszka K.J., McGraw D.W., Britigan B.E. Peroxidative metabolism of beta2-agonists salbutamol and fenoterol and their analogues. *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, Jun; 22 (6), pp. 1137–1150.
17. Reszka K.J., Sallans L., Macha S. et al. Airway peroxidases catalyze nitration of the beta2-agonist salbutamol and decrease its pharmacological activity. *J. Pharmacol. Exp.*

- Ther.*, 2011, Feb; 336 (2), pp. 440–449.
18. Feng J.T., Hu C.P. Dysfunction of releasing adrenaline in asthma by nerve growth factor. *Med. Hypotheses*, 2005, 65 (6), pp. 1043–1046.
 19. Kvetnansky R., Kubovcakova L., Tillinger A. et al. Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2006, Jul–Aug; 26 (4–6), pp. 735–754.
 20. Yamaguchi-Shima N., Okada S., Shimizu T. et al. Adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells and celiac sympathetic ganglia are differentially controlled by centrally administered corticotropin-releasing factor and arginine-vasopressin in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, Jun 14; 564 (1–3), pp. 94–102.
 21. Hodel A. Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J. Neuroendocrinol.*, 2001, Feb; 13 (2), pp. 216–220.
 22. Wood P.R., Hill V.L., Burks M.L. *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute and refractory asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2013, May; 110 (5), pp. 328–334.
 23. Sullivan B.M., Jobe O., Lazarevic V. Increased susceptibility of mice lacking T-bet to infection with *Mycobacterium tuberculosis* correlates with increased IL-10 and decreased IFN-gamma production. *The Journal of Immunology*, 2005, 175, pp. 4593–4602.
 24. Van Zele T., Gevaert P. Role of *Staphylococcus aureus* in upper respiratory infections. *Verh K Acad Geneeskd Belg.*, 2008, 70 (5–6), pp. 369–378.
 25. Kowalski M.L., Cieślak M., Pérez-Novo C.A. et al. Clinical and immunological determinants of severe/refractory asthma (SRA): association with Staphylococcal superantigen-specific IgE antibodies. *Allergy*, 2011, Jan; 66 (1), pp. 32–38.
 26. Bachert C., van Steen K., Zhang N. et al. Specific IgE against *Staphylococcus aureus* enterotoxins: an independent risk factor for asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Aug; 130 (2), pp. 376–381.

Kulikov Yevgeny S. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ogorodova Ljudmila M., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Freidin Maksim B., Research Institute of Medical Genetics, SB RAMS, Tomsk, Russian Federation.

Saltikova Irina V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Deyev Ivan A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Selivanova Polina A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Kulikov Yevgeny S.**, Ph. +7-906-950-2882, Fax +7 (3822) 51-49-67; e-mail: evgeny.s.kulikov@gmail.com