

на правах рукописи

КУЛИКОВ

Евгений Сергеевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ ТЯЖЕЛОЙ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

14.01.25 – пульмонология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

ТОМСК-2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Огородова Людмила Михайловна доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАМН, заслуженный деятель науки РФ

Официальные оппоненты:

Демко Ирина Владимировна заведующий кафедрой внутренних болезней №2 с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, доктор медицинских наук, доцент

Куделя Любовь Михайловна профессор кафедры внутренних болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

Визель Александр Андреевич заведующий кафедрой фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

Ведущая организация: ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России

Защита состоится 18 сентября 2014 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Агеева Т.С.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В течение последних лет достигнут значительный прогресс в лечении бронхиальной астмы (БА) – произошла переоценка целей лечения, разработаны и зарегистрированы к применению высокоэффективные и безопасные средства базисной противовоспалительной терапии, получили широкое распространение клинические рекомендации, регламентирующие ведение больных БА [GINA, 2011].

Несмотря на это, тяжелая форма БА остается нерешенной медико-социальной проблемой. Тяжелая астма составляет до 18% в общей структуре БА, и по данным многих исследований отмечается тенденция к росту ее распространенности [Croisant S. et al., 2014, Masoli M. et al., 2004]. При этом расходы на лечение данной формы болезни достигают 80% общей стоимости астмы, составляя основную часть фармакоэкономического бремени болезни [Szeffler S.J. et al., 2011, Meltzer E.O. et al., 2012]. Наряду с высокими показателями потребления ресурсов здравоохранения, тяжелая БА непосредственно связана с высоким риском неблагоприятных исходов и выраженным влиянием на качество жизни пациента.

В связи с высокой медико-социальной значимостью данная проблема привлекает внимание ученых во всем мире. Только за последние пять лет опубликованы около 700 различных научных работ, посвященных проблеме тяжелой БА.

Исходя из накопленных на данный момент знаний, наиболее вероятными механизмами формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности, являются дисбаланс цитокинового профиля, резистентность к глюкокортикоидам, ангиогенез и ремоделирование бронхов, модуляция иммунного ответа в направлении Th2-звена. Однако подавляющее большинство этих данных не укладывается в единую концепцию и, как следствие, не становятся объектом трансляционной медицины.

Степень разработанности. Проведенные и опубликованные на данный момент исследования разнородны по своим целям, задачам и методам, выполнены на неоднородных выборках пациентов с точки зрения степени тяжести и/или уровня контроля болезни субъектов, что не позволяет объединить результаты и сформировать полную теоретическую концепцию. Также подавляющее большинство исследований относятся к одномоментным, что не позволяет определить динамику изменения молекулярных и генетических профилей в ответ на фармакотерапию астмы.

В этой связи проведение проспективного анализа полногеномной экспрессии генов в рамках интервенционного исследования при тяжелой БА, позволит минимизировать методологические ограничения и установить наиболее вероятные механизмы формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности.

Цель исследования: Установить молекулярные механизмы формирования тяжелой бронхиальной астмы и терапевтической резистентности путем

проспективного анализа полногеномной экспрессии генов с сопоставлением клинико-функциональных параметров течения болезни на фоне терапии.

Задачи исследования:

1. В рамках контролируемого клинического исследования установить распространенность терапевтической резистентности у больных тяжелой бронхиальной астмой и дать сравнительную оценку динамики клинико-функциональных показателей и уровня контроля болезни на фоне базисной противовоспалительной терапии в группе тяжелой терапевтически чувствительной и резистентной БА.
2. Оценить дифференциальную экспрессию генов исходно и в динамике на фоне терапии у больных легкой БА, тяжелой терапевтически чувствительной и резистентной формами болезни.
3. Охарактеризовать транскрипционные различия с помощью анализа генных онтологий и KEGG путей у больных тяжелой терапевтически чувствительной и резистентной БА.
4. Оценить динамику уровня экспрессии генов на фоне терапии у пациентов с тяжелой терапевтически чувствительной и резистентной астмой.
5. Дать оценку фармакотерапевтическому режиму комбинированной терапии при тяжелой БА на основе анализа молекулярных механизмов формирования воспаления.

Научная новизна. Впервые в мире спланировано и проведено исследование полногеномной экспрессии генов в динамике у пациентов с тяжелой чувствительной к терапии и тяжелой терапевтически резистентной БА. Данное исследование выполнено в соответствии с методологическими принципами планирования проспективных интервенционных клинических исследований с использованием метода анализа глобальной экспрессии генов с помощью технологии микрочипов, которая в настоящее время является наиболее аналитически точным методом исследования в этой области.

Рецепторы кортикостероидов и бета2-агонистов в течение нескольких десятилетий являются практически единственными терапевтическими мишенями, которые применяются для лечения БА. Препараты данных групп входят в состав всех ступеней терапии, рекомендованных GINA [GINA, 2011]. Однако до сих пор регистрируется значительная доля пациентов, которые характеризуются недостаточным ответом на терапию. В связи с чем, получение новых фундаментальных данных о механизмах формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности в рамках клинического исследования с использованием современных аналитически точных методов является актуальной научной задачей.

Оценка дифференциальной экспрессии генов позволила установить, что группы легкой, тяжелой терапевтически чувствительной и терапевтически резистентной БА характеризуются различными профилями экспрессии генов, что является отражением наличия отдельных механизмов персистенции воспаления.

Впервые в данной работе на основании оценки направленности изменения экспрессии генов, формирующих генные онтологии, а также кластерного анализа временной динамики генной экспрессии, определены механизмы формирования тяжелой БА. Для тяжелой терапевтически чувствительной БА такими молекулярными механизмами являются ослабление противовирусного иммунитета, снижение регуляции программируемой клеточной гибели на фоне активации нейтрофилов и активация натуральных киллеров. При этом, феномен терапевтической резистентности обусловлен наличием отдельных молекулярных механизмов, ассоциированных со снижением активности натуральных киллеров и вовлечением в патогенез суперантигена стафилококка.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что молекулярные механизмы формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности преимущественно лежат вне области действия основных современных терапевтических мишеней.

Впервые определен и ряд специфичных факторов, которые могут лежать в основе ограничения эффективности кортикостероидов и бета2-агонистов. Так, в случае тяжелых форм болезни зарегистрирована высокая активность метаболизма ксенобиотиков, что может быть причиной укорочения периода полувыведения лекарственных препаратов, обуславливая недостаточную эффективность терапии в стандартных терапевтических дозировках. Зарегистрированы признаки возможного нитрирования молекул длительно действующих бета2-агонистов (ДДБА) и ослабления терапевтической эффективности вследствие снижения аффинитета молекулы к бета2-адренорецептору. Зарегистрированы признаки подавления секреции эндогенного эпинефрина.

Полученные данные позволят сфокусировать внимание специалистов трансляционной медицины на перспективных механизмах тяжелой БА и феномена терапевтической резистентности, определить новые таргетные терапевтические мишени, оптимизировать фармакотерапевтические подходы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Согласно современным представлениям, тяжелая БА является гетерогенным заболеванием, и на сегодняшний день накоплено достаточно данных для утверждения того, что в основе течения тяжелой астмы и феномена терапевтической резистентности лежат отдельные молекулярные механизмы формирования и персистенции воспаления. Выполненное исследование позволило установить, что группы легкой, тяжелой терапевтически чувствительной и терапевтически резистентной БА характеризуются различными профилями экспрессии генов, что является отражением наличия отдельных механизмов персистенции воспаления.

Идентифицированные молекулярные механизмы и генетические характеристики открывают возможности применения новых терапевтических мишеней и модификации существующих лекарственных средств.

Полученные данные представляют и высокую практическую ценность. Так, учитывая наличие признаков задержки реализации эффектов базисной противовоспалительной терапии, рекомендуемая продолжительность регулярной комбинированной терапии при тяжелой БА должна составлять не менее 24

недель. С учетом наличия молекулярных механизмов ограничения эффективности ингаляционных кортикостероидов (ИКС) и ДДБА при тяжелой БА, гипотетически, представляется целесообразным изменение кратности применения базисной противовоспалительной терапии (3-4 раза в сутки) при сохранении суточного объема дозы. Также у пациентов с феноменом терапевтической резистентности может быть оправдано определение суперантигена стафилококка, как независимого фактора персистенции воспаления. Таким образом, данные, полученные в рамках исследования, позволят оптимизировать мероприятия мониторинга и фармакотерапевтические подходы тяжелых форм БА.

Результаты настоящей работы могут быть рекомендованы для включения в учебные программы дипломной и последипломной подготовки врачей-терапевтов и пульмонологов. Данные результаты могут стать основой разработки методических рекомендаций терапии тяжелой и терапевтически резистентной астмы.

Полученные результаты используются в работе отделения пульмонологии ОГАУЗ «Томская областная клиническая больница» г. Томска. Материалы проведенных исследований используются в учебном процессе на кафедре госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России для студентов лечебного факультета, интернов и ординаторов, на кафедре факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России для студентов педиатрического факультета, на кафедре общей врачебной практики и поликлинической терапии ФПК и ППС ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России для врачей общей практики, на кафедре терапии факультета последипломного образования БУ ВО ХМАО-Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия для интернов, ординаторов и врачей терапевтов на сертификационных циклах, на кафедре фармакологии, клинической фармакологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии БУ ВО ХМАО-Югры "Ханты-Мансийская государственная медицинская академия" для студентов лечебного факультета.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны методологически оправданные и высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современных научно-исследовательских лабораторий ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и Национального Института Сердца и Легкого (Лондон, Великобритания).

Исследование состояло из трех этапов. На первом этапе проведено проспективное, интервенционное, клиническое исследование в параллельных группах, в рамках которого описана клиническая характеристика изучаемых групп больных, выполнена сравнительная оценка динамики клинико-функциональных показателей и уровня контроля в течение периода наблюдения длительностью 6 месяцев. Второй этап исследования проведен на базе Национального Института Сердца и Легкого (Лондон, Великобритания) в рамках совместного проекта с лабораторией молекулярной генетики и геномики при поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по

приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». Этот этап заключался в проведении полногеномного анализа экспрессии генов в периферической крови у исследованных больных с использованием микрочипов Affymetrix. В рамках третьего этапа выполнен сравнительный анализ профилей генной экспрессии в группах с разной степенью тяжести БА и в динамике на фоне лечения, проведена оценка вклада генетической составляющей в детерминацию развития тяжелой формы заболевания и терапевтической резистентности, оценена связь между экспрессией генов и эффективностью противоастматической терапии у пациентов с тяжелой БА.

Положения, выносимые на защиту:

1. В группе тяжелой БА большая часть пациентов имеет неконтролируемое течение болезни и по окончании лечебного периода продолжительностью 6 месяцев соответствует критериям терапевтической резистентности. Тяжелая терапевтически чувствительная БА характеризуется вовлечением дополнительных молекулярных механизмов персистенции воспаления, ассоциированных с ослаблением противовирусного иммунитета, снижением регуляции программируемой клеточной гибели на фоне активации нейтрофилов и натуральных киллеров.
2. Феномен терапевтической резистентности при тяжелой БА обусловлен наличием отдельных молекулярных механизмов, ассоциированных со снижением активности натуральных киллеров и вовлечением в патогенез суперантигена стафилококка.
3. Тяжелая терапевтически чувствительная и терапевтически резистентная БА ассоциированы с молекулярными механизмами ограничения эффективности ИКС и ДДБА, такими как повышение активности метаболизма ксенобиотиков и сульфатирования, нитрирование молекул ДДБА и подавление секреции эндогенного эпинефрина.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы в соответствии с протоколом клинического исследования, достаточным объемом клинического материала для полногеномных исследований, использованием современных и высокотехнологичных методов транскриптомных исследований, а также адекватных и современных методов анализа и статистической обработки результатов.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (Москва, 2009), XVII Национальном Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2010), Конгрессе Европейского респираторного общества (Амстердам, 2011), Конгрессе Европейского респираторного общества (Вена, 2012), научно-практической конференции с международным участием «Кардиоваскулярная профилактика и реабилитация 2013» (Москва, 2013), V

Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (Благовещенск, 2013), Конгрессе Европейского респираторного общества (Барселона, 2013).

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», мероприятие 1.2 – II очередь (ГК № 02.512.11.2281).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 34 работы, в том числе 19 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК РФ (16 полнотекстовых статей в российских изданиях, 2 полнотекстовые статьи в зарубежных изданиях, 1 патент).

Личное участие автора. Автор принимал непосредственное участие в проведении научно-исследовательской работы на всех этапах от разработки идеи исследования и проектирования протокола до статистического анализа, обсуждения и публикации результатов исследования.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 337 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, глав собственных наблюдений (3-6 главы), обсуждения, заключения, списка литературы, приложения. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 54 таблицами, а также включает приложение, содержащее 8 таблиц. Список источников цитируемой литературы включает в себя 358 работ, из которых 34 отечественных и 324 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

КЛИНИЧЕСКИЕ ГРУППЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с задачами, поставленными в работе, спланировано и проведено проспективное интервенционное исследование в параллельных группах с продолжительностью лечебного периода 6 месяцев. Протокол исследования разработан в соответствии со стандартом «Надлежащая клиническая практика» и одобрен Этическим комитетом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (заключение № 2093 от 19.09.2011).

В рамках протокола предусматривалось 4 визита с интервалами в 4, 8 и 12 недель (± 3 дня со времени предыдущего визита) (Рисунок 1):

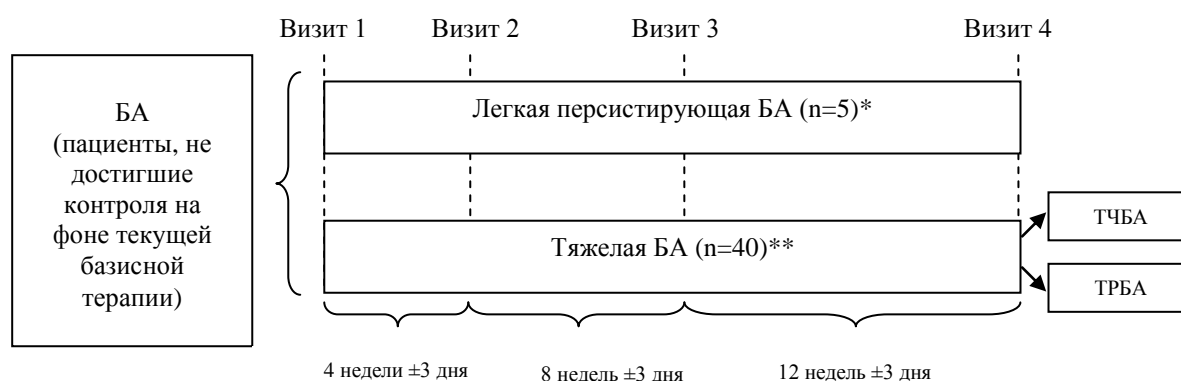


Рисунок 1. Схема исследования

Примечание:

Фармакотерапевтические режимы согласно степени тяжести заболевания:

* - Легкая степень тяжести: ФП – 250 мкг/сут по ФП

** - Тяжелая астма: Сальметерол/ФП – 1000 мкг/сут по ФП

Критерии включения:

1. Мужчины и женщины от 18 до 70 лет включительно, имеющие ранее подтвержденный диагноз БА;
2. Получение от пациента до участия в исследовании письменного информированного согласия, подписанного с указанием даты;
3. Документально подтвержденный клинический диагноз персистирующей БА длительностью как минимум 6 месяцев перед началом исследования;
4. Для легкой персистирующей астмы: симптомы чаще 1 раза в неделю, но реже 1 раза в день; ночные симптомы чаще 2х раз в месяц, но реже 1 раза в неделю; ограничение физической активности при обострениях заболевания; вариабельность ПСВ (ОФВ1) 20-30%, при этом ОФВ1 и ПСВ $\geq 80\%$ (перед началом лечения) от должных значений; или объем терапии соответствует легкой интермиттирующей астме, симптомы на фоне терапии – легкой персистирующей; или объем терапии соответствует легкой персистирующей астме, симптомы на фоне терапии – легкой интермиттирующей;
5. Для тяжелой астмы: на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы ежедневные; частые ночные симптомы; ограничение физической активности; вариабельность ПСВ (ОФВ1) более 30%, при этом ОФВ1 $\leq 60\%$ (перед началом лечения) от должного и ПСВ $\leq 60\%$ (перед началом лечения) от персонального лучшего значения; или объем терапии более 500 мкг/сутки по флутиказона пропионату (ФП); или объем терапии соответствует легкой персистирующей астме, симптомы на фоне терапии – среднетяжелой; или объем терапии соответствует легкой персистирующей астме, симптомы на фоне терапии – тяжелой; или объем терапии соответствует среднетяжелой астме, симптомы на фоне терапии – легкой персистирующей; или объем терапии соответствует среднетяжелой астме, симптомы на фоне терапии – среднетяжелой; или объем терапии соответствует среднетяжелой астме, симптомы на фоне терапии – тяжелой.
6. На протяжении последних 6 месяцев до момента включения в исследование пациент должен получать любой из препаратов базисной терапии для лечения астмы в стабильной дозе. При этом, клиническое течение заболевания, на момент включения в исследование, в соответствии с критериями контроля должно было быть расценено как неконтролируемое.

Изучаемые фармакотерапевтические режимы. На Визите 1 в соответствии с протоколом пациенту назначались следующие фармакотерапевтические режимы: легкая степень тяжести: ФП – 250 мкг/сут, тяжелая астма: сальметерол/ФП – 1000 мкг/сут по ФП.

Оценка эффективности фармакотерапии. В течение лечебного периода и по его окончании для оценки контроля использовались критерии GINA2006. В качестве дополнительного инструмента для оценки контроля БА в исследовании использовался АСТ-тест [Белевский А.С. и соавт., 2007].

В соответствии с оценкой эффективности терапии и критериями терапевтической резистентности по окончании периода наблюдения, группа пациентов с тяжелой БА апостериорно разделена на терапевтически чувствительных (ТЧБА) и терапевтически резистентных пациентов (ТРБА) [ATS, 2000].

Оценка безопасности. В качестве переменной безопасности оценивалась количество/частота нежелательных явлений, количество/частота серьезных нежелательных явлений в течение периода наблюдения.

Методы исследования:

Клинико-anamnestический метод. Каждый пациент, включенный в исследование, после подписания информированного согласия, выяснения анамнеза и проведения интервьюирования обследован с применением методов физикального осмотра больного. Диагноз «бронхиальная астма» верифицировался на основании следующих критериев: наличие анамнеза, характерного для астмы, типичных клинических симптомов заболевания и функциональных параметров.

Оценка контроля астмы. В течение лечебного периода и по его окончании для оценки контроля использовались критерии GINA2006. В качестве дополнительного инструмента для оценки контроля БА в исследовании использовался АСТ-тест.

Исследование ПСВ (пикфлоуметрия). В течение лечебного периода каждый пациент измерял ПСВ по стандартной методике с использованием пикфлоуметров.

Оценка функции внешнего дыхания и бронхиальной гиперреактивности. Тест выполнялся соответственно требованиям ATS (American Thoracic Society – Американское Торакальное Общество) [Miller M.R. et al., 2005].

Определение геномного уровня экспрессии. На репрезентативной для проведения генетического исследования выборке пациентов определен глобальный уровень экспрессии генов с помощью микрочипа Affymetrix, содержащего пробы для 28 875 генов. Во время Визитов 1, 3, 4 у субъектов исследования однократно натощак было проведено взятие венозной крови из локтевой вены в количестве 10 мл. Кровь для исследования была собрана в пробирки PAXgene (QIAGEN, Германия) и помещена на -20С до выделения РНК. Выделение РНК проводили с помощью набора PAXgene Blood RNA kit (QIAGEN, Германия). Концентрацию РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Германия). Качество РНК оценивали с помощью прибора Bioanalyzer 2100

(Agilent Technologies, США). Как показатель меры качества РНК прибор рассчитывал параметр RIN (RNA integrity number, показатель чистоты РНК), уровень которого варьирует в пределах от 2 до 10. Для проведения дальнейшего анализа исследовали образцы с RIN не менее 8. Для микрочипового анализа использовали 250 нг РНК, которую амплифицировали и конвертировали в комплементарную ДНК (кДНК) с помощью набора WT expression kit (Ambion, США). Фрагментацию кДНК, терминальную маркировку и подготовку гибридизационного коктейля проводили с помощью соответствующих наборов компании Affymetrix. Гибридизацию проводили с использованием картриджных микрочипов на оборудовании (гибридизационная камера, промывочная станция, сканер) и с использованием рекомендованных протоколов компании Affymetrix.

Полученные после сканирования изображения микрочипов конвертировали в экспрессионные сигналы с помощью программного обеспечения компании Affymetrix, которое сохраняет результаты конверсии в файлах формата .CEL. Эти файлы затем использовали 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.

Оценка дифференциальной экспрессии генов. Анализ проводили в программной среде R. Уровень экспрессии генов в различных группах сравнивали путем построения линейных моделей с помощью пакета *limma* [Smyth G.K. et al., 2005], включая анализ линейных контрастов между сравниваемыми группами (легкая БА, ТРБА, ТЧБА). Поправку на множественные сравнения проводили с помощью подхода False Discovery Rate [Benjamini Y. et al., 1995]. Для построения перечня генов с дифференциальной экспрессией значение $p < 0,05$ после поправки на множественные сравнения расценивали как статистически значимое в любом из трех сравниваемых контрастов.

Оценка генных онтологий и KEGG путей. Генные онтологии и KEGG пути проанализированы с учетом направления изменения экспрессии (повышение или снижение). В анализ включены онтологии и пути со статистической значимостью $p < 0,05$.

Кластерный анализ. Метод основан на алгоритме с-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 [Kumar L. et al., 2007]. 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 9 кластеров. Также в ходе анализа оценена связь между кластерами в пределах одной группы сравнения.

Статистический анализ клинико-функциональных параметров. Для статистической обработки был использован пакет программ Statistica for Windows version 6.0. При сравнении частот качественных признаков использовался критерий χ^2 или 2-сторонний критерий Фишера. Для оценки различия средних в попарно не связанных выборках применяли U-критерий Манна-Уитни. Для оценки различия средних в связанных выборках проводили анализ Фридмана. Для оценки вероятностей использовали программу Statcalc version 6.

Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные в виде $X \pm x$, где X – среднее арифметическое, x – ошибка среднего. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗУЧАЕМОЙ ПОПУЛЯЦИИ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

В соответствии с единым протоколом в исследование включено 5 пациентов с легкой персистирующей БА (Группа 1), и 40 пациентов с тяжелой формой заболевания (Группа 2). Размер выборки является достаточным для достижения цели исследования и соотносится с данными мировых исследований [Melén E. et al., 2011, Pietras C.O. et al., 2013].

На момент включения сравниваемые группы были сопоставимы по возрасту, но неоднородны по гендерному признаку. Пациенты сравниваемых групп, характеризовались превалированием женщин, но только в группе тяжелой БА данное преобладание было достоверным (OR 3,44; 95% CI 1,35-8,96).

В соответствии с целью исследования в протокол включены пациенты с различной степенью тяжести болезни и, следовательно, сравниваемые группы различались по показателям, характеризующим клиническое течение БА (количество дневных и ночных симптомов, количество незапланированных визитов к врачу), объективных параметров контроля (параметры ФВД, тест на БГР, результат АСТ-теста).

В соответствии с оценкой эффективности терапии и критериями ATS, по окончании лечебного периода группа пациентов с тяжелой БА апостериорно разделена на терапевтически чувствительных и резистентных пациентов [ATS, 2000].

Так как клинические группы терапевтически чувствительных и резистентных пациентов в данном исследовании формировались на основе оценки эффективности фармакотерапии астмы в течение периода наблюдения, то сформированные группы статистически достоверно различались по ключевым параметрам течения болезни (Таблица 1). Однако по гендерному составу и возрасту данные группы были сопоставимы.

Сравнительная клиническая характеристика групп ТЧБА и ТРБА

Показатель	ТЧБА	ТРБА
	n=20	n=20
Возраст (лет)	47,15±3,20	51,40±2,52
Кол-во дневных симптомов за последние 7 дней	12,45±1,51	21,35±2,13*
Среднее кол-во дневных симптомов в день	1,78±0,22	3,05±0,30*
Кол-во ночных симптомов за последние 7 дней	2,55±0,47	5,05±1,15
Среднее кол-во ночных симптомов	0,36±0,07	0,72±0,16
Стаж заболевания (лет)	9,75±1,94	16,65±1,88*
Возраст манифестации астмы, полных лет	33,30±3,91	28,15±3,78
Частота госпитализаций за последние 12 мес.	0,25±0,12	0,25±0,12
Частота вызовов скорой помощи за последние 12 мес.	0,15±0,15	2,60±1,23*
Кол-во визитов к врачу за последние 12 мес.	3,40±1,10	2,95±0,96
ОФВ1 (%)	68,10±1,89	61,97±1,97*
ПСВ (%)	73,84±3,56	68,51±2,82
ФЖЕЛ (%)	87,61±2,82	85,10±2,95
МОС25 (%)	48,69±3,79	35,99±2,29*
МОС50 (%)	36,06±3,05	27,71±1,86*
МОС75 (%)	38,33±4,21	25,05±2,02*
Дельта ОФВ1 (%)	24,94±1,96	31,27±2,99
РС20 (мг/мл)	0,06±0,00	0,06±0,00
АСТ-тест (балл)	15,30±0,58	12,40±0,89*

Примечания: *- p<0, 05

Исходно в группе ТРБА зарегистрированы более худшие клинические и функциональные параметры течения БА. Так резистентные пациенты регистрировали дневные симптомы практически в два раза чаще, чем чувствительные пациенты (12,45±1,51 vs 21,35±2,13, p<0,05), значительно чаще испытывали потребность в неотложной медицинской помощи (0,15±0,15 vs 2,60±1,23, p<0,05) и имели более низкие значения ОФВ1 (68,10±1,89 vs 61,97±1,97, p<0,05). Также исходно резистентные пациенты имели более низкий балл АСТ-теста (15,30±0,58 vs 12,40±0,89, p<0,05). Необходимо отметить, что у терапевтически резистентных пациентов стаж заболевания практически в два раза превосходил аналогичный показатель в сравнении с чувствительными к терапии пациентами (9,75±1,94 vs 16,65±1,88, p<0,05).

Сравнительный анализ динамики клинико-функциональных показателей и уровня контроля болезни в течение периода наблюдения у терапевтически чувствительных и резистентных пациентов продемонстрировал, что в группе ТЧБА статистически значимое улучшение основных клинико-функциональных показателей было зарегистрировано к моменту Визита 2 и в дальнейшем положительная динамика сохранялась. При этом к окончанию периода наблюдения значения ОФВ1 достигли условных возрастных норм, а проявление клинических симптомов было минимальным (Таблица 2).

Динамика клинико-функциональных показателей группы ТЧБА

Показатель	Визит 1	Визит 2	Визит 3	Визит 4
ОФВ1 (%)	68,10±1,89	91,44±3,84 [†]	92,23±3,17	90,82±2,87*
ПСВ (%)	73,84±3,56	90,91±3,65 [†]	93,42±3,84	93,75±3,82*
ФЖЕЛ (%)	87,61±2,82	109,64±3,48 [†]	110,13±3,29	107,61±2,92*
МОС25 (%)	48,69±3,79	69,22±3,88 [†]	73,52±4,27	69,31±3,69*
МОС50 (%)	36,06±3,05	50,82±3,74 [†]	52,29±2,88	50,04±3,13*
МОС75 (%)	38,33±4,21	41,05±4,23	39,89±3,07	37,21±3,16 [‡]
АСТ-тест (балл)	15,30±0,58	20,20±0,73 [†]	22,47±0,50 [¥]	23,05±0,52 ^{£*}
Кол-во дневных симптомов за последние 7 дней	12,45±1,51	2,60±0,91 [†]	0,55±0,30 [¥]	0,26±0,10*
Кол-во ночных симптомов за последние 7 дней	2,55±0,47	2,26±0,81	0,38±0,22 [¥]	0,05±0,05*
РС20 (мг/мл)	0,06±0,00			6,42±1,27 [†]

Примечания:

*- p<0, 05 – тест Фридмана

† - p<0, 05 – по сравнению с Визитом 1

¥ - p<0, 05 – по сравнению с Визитом 2

£ - p<0, 05 – по сравнению с Визитом 3

В группе ТРБА, напротив, в течение первых четырех недель лечебного периода зарегистрирована наибольшая динамика клинико-функциональных показателей и уровня контроля, а в последующий период динамика хоть и была положительной, но носила менее выраженный характер (Таблица 3).

Таблица 3

Динамика клинико-функциональных показателей группы ТРБА

Показатель	Визит 1	Визит 2	Визит 3	Визит 4
ОФВ1 (%)	61,97±1,97	69,61±2,59 [†]	65,18±2,91	63,57±3,00*
ПСВ (%)	68,51±2,82	76,55±3,84 [†]	72,00±4,22	69,73±3,97*
ФЖЕЛ (%)	85,10±2,95	96,34±3,20 [†]	92,12±3,54	89,23±3,52*
МОС25 (%)	35,99±2,29	42,49±3,64	36,57±2,55	34,55±2,28
МОС50 (%)	27,71±1,86	29,42±1,92	26,49±1,66	25,30±1,73
МОС75 (%)	25,05±2,02	26,23±1,32	23,51±1,74	23,23±1,43
АСТ-тест (балл)	12,40±0,89	13,55±1,06	15,16±1,06	14,65±1,28*
Кол-во дневных симптомов за последние 7 дней	21,35±2,13	11,93±1,71 [†]	7,93±1,48	5,53±1,17*
Кол-во ночных симптомов за последние 7 дней	5,05±1,15	6,84±1,52	3,79±1,63	3,68±1,15*
РС20 (мг/мл)	0,06±0,00			0,14±0,05

Примечания:

*- p<0, 05 – тест Фридмана

† - p<0, 05 – по сравнению с Визитом 1

По параметрам безопасности сравниваемые группы достоверное не различались.

При обсуждении данных результатов необходимо учитывать, что формирование данных групп в соответствии с дизайном исследования было апостериорным, и изначально пациенты, распределенные в группу ТРБА, имели признаки более тяжелого течения заболевания в сравнении с представителями группы ТЧБА.

ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Анализ транскриптома образцов, полученных на Визите 1, идентифицировал 1388 генов, экспрессия которых статистически значимо отличалась между сравниваемыми группами.

Согласно полученным данным, наибольшее число генов со специфичной дифференциальной экспрессией зарегистрировано между тяжелой терапевтически резистентной и легкой персистирующей БА ($n=1201$). Значительно меньшее количество генов со специфичной экспрессией зарегистрировано при сравнении ТЧБА и ТРБА ($n=18$), а также ТЧБА и легкой БА ($n=49$).

Для 43 генов установлены различия в уровне экспрессии одновременно при сравнении ТЧБА и ТРБА, а также тяжелой резистентной и легкой БА. Таким образом, ТРБА специфическим образом характеризуется отличием в уровне экспрессии 43 генов от других исследованных групп. Также по результатам проведенного анализа установлено, что тяжелая терапевтически чувствительная и легкая персистирующая астма характеризуются отличием в уровне экспрессии 22 и 55 генов соответственно (Рисунок 2).

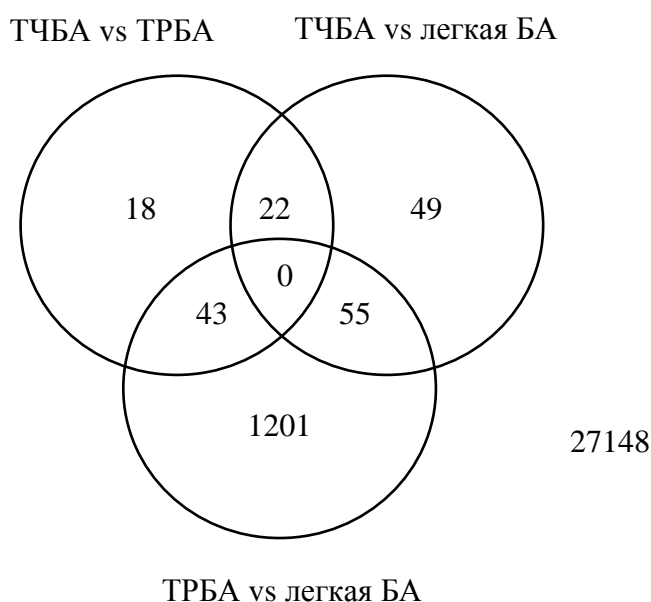


Рисунок 2. Количество генов с отличающейся экспрессией на Визите 1 ($p<0,05$)

Сравнительный анализ уровня генной экспрессии у больных тяжелой терапевтически чувствительной и легкой БА. Статистически значимые отличия в уровне экспрессии при сравнении больных тяжелой терапевтически чувствительной и легкой БА установлены для 126 генов; их распределение в зависимости от уровня значимости и степени различия в экспрессии представлено в таблице 4.

Таблица 4

Количество генов с дифференциальной экспрессией при сравнении больных с ТЧБА и легкой БА

FC (кратное изменение)	Уровень значимости		
	p<0,05	p<0,01	p<0,001
Любое изменение	126	51	19
в 2 и более раза	65	40	19
в 5 и более раз	17	13	10

В перечень генов с высоким уровнем достоверной вероятности, характеризующихся различием в уровне экспрессии в сравниваемых группах, вошли гены, функция которых может иметь отношение к механизмам развития астмы (Таблица 5).

Таблица 5

Гены с наибольшей статистической значимостью отличий в уровне экспрессии у больных ТЧБА и легкой БА

ID	Символ гена	Название гена	FC	Adj.P
8176709	CYorf15B	chromosome Y open reading frame 15B	17,30	<0,00001
8139118	Y00482 /// ENST00000390344	Y00482 /// ENST00000390344	6,26	<0,00001
8176578	USP9Y	ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked	12,19	<0,00001
8177232	KDM5D	lysine (K)-specific demethylase 5D	15,67	<0,00001
8176624	DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	22,77	<0,00001
8177137	UTY	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y-linked	26,71	<0,00001
8176698	CYorf15A	chromosome Y open reading frame 15A	9,66	0,00001
8176719	EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	21,79	0,00002
7944049	SIDT2	SID1 transmembrane family, member 2	0,38	0,00002
8105908	OCLN /// LOC647859	occludin /// occludin pseudogene	0,23	0,00002
8107044	ERAP2	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	0,26	0,00002
8176375	RPS4Y1	ribosomal protein S4, Y-linked 1	10,40	0,00002
8176460	PRKY	protein kinase, Y-linked	3,05	0,00004
8139107	TARP /// TRGV9	TCR gamma alternate reading frame protein /// T cell receptor gamma variable 9	3,22	0,00012
7945371	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	0,19	0,00027
8176384	ZFY	zinc finger protein, Y-linked	3,85	0,00027

8031398	NLRP2	NLR family, pyrin domain containing 2	0,37	0,00029
8177261	TTY10	testis-specific transcript, Y-linked 10 (non-protein coding)	3,25	0,00029
7903765	GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	3,00	0,00067
8030366	RPL13A /// SNORD35A	ribosomal protein L13a /// small nucleolar RNA, C/D box 35A	0,20	0,00106

Так, ген *USP9Y* является обязательным компонентом сигнального каскада трансформирующего фактора роста бета и костного морфогенетического белка, который вовлечен в различные фундаментальные клеточные процессы, и его дисрегуляция приводит к нарушениям многих молекулярных механизмов, включая изменение синтеза ИЛ, ИФН- γ , ФНО- α и других [Guo X. et al., 2009]. Экспрессия данного гена, по результатам настоящего исследования, увеличена более чем в 12 раз в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой ($p < 0,00001$).

Еще одним геном, функция которого может иметь отношение к патогенезу астмы является ген *NLRP2*, который кодирует протеины, участвующие в активации рецепторами TLR каспазы-1, а также вовлеченные в белковые комплексы, активирующие провоспалительные каспазы [Tschopp J. et al., 2003]. Наряду с этим, белки данного семейства подавляют активность гена ТФ NF- κ B (*NFKB1*), индуцированную ФНО и CD40. Необходимо отметить, что NF- κ B является фактором, ассоциированным с активностью воспаления при БА и влияет на различные гены, задействованные в иммунном, острофазовом и воспалительном ответах [Christman J.W. et al., 2000]. В данном исследовании установлено, что экспрессия гена *NLRP2* снижена более чем в 2,5 раза в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой ($p = 0,00029$).

Вероятная ассоциация с БА продемонстрирована для гена *IFITM3*, который кодирует интерферон-индуцированный протеин, участвующий в противовирусном клеточном иммунитете как минимум к трем патогенам человека, посредством прерывания ранних стадий репликации [Everitt A.R. et al., 2012]. Экспрессия гена *IFITM3* снижена более чем в пять раз в группе ТЧБА в сравнении с легкой БА ($p = 0,00027$). Таким образом, недостаточная активность данного гена гипотетически может способствовать колонизации дыхательных путей инфекционными агентами (в том числе *Mycoplasma pneumoniae*) и служить предиктором неконтролируемого течения заболевания и формирования терапевтической резистентности [Bakshi C.S. et al., 2006].

Можно выделить и ген *GSTM1*, кодирующий глутатион S-трансферазу, основной функцией, которой является детоксикация лекарственных препаратов, токсинов окружающей среды и продуктов оксидативного стресса посредством конъюгации с глутатионом. Этот ген расположен в высокополиморфном кластере хромосомы 1p13.3. В связи с этим генетическая вариабельность гена *GSTM1* может вносить вклад в токсичность и эффективность лекарственных препаратов, в том числе и препаратов, относящихся к базисной противовоспалительной терапии астмы [Kim S.H. et al., 2010]. Экспрессия гена *GSTM1* увеличена в три раза в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой ($p = 0,00067$).

Сравнительный анализ уровня генной экспрессии у больных ТЧБА и ТРБА. При сравнении групп тяжелой терапевтически чувствительной и резистентной астмы был также определен перечень генов с дифференциальной экспрессией (Таблица 6).

Таблица 6

Количество генов с дифференциальной экспрессией при сравнении больных с ТЧБА и ТРБА

FC (кратное изменение)	Уровень значимости		
	p<0,05	p<0,01	p<0,001
Любое изменение	83	40	22
в 2 и более раза	46	35	22
в 5 и более раз	10	10	9

В перечень генов, которые в данных контрастах характеризуются дифференциальной экспрессией с высоким уровнем достоверной вероятности, вошли гены, функция которых может иметь отношение к патогенезу астмы (Таблица 7).

Таблица 7

Гены с наибольшей статистической значимостью отличий в уровне экспрессии у больных ТЧБА и ТРБА

ID	Символ гена	Название гена	FC	Adj.P
8176709	CYorf15B	chromosome Y open reading frame 15B	17,84	<0,00001
8177232	KDM5D	lysine (K)-specific demethylase 5D	14,99	<0,00001
8165646	NC_001807	NC_001807	2,74	<0,00001
8176578	USP9Y	ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked	10,73	<0,00001
8176624	DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	20,00	0,00001
8112376	CENPK	centromere protein K	5,76	0,00001
8177137	UTY	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y-linked	21,47	0,00001
8176719	EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	24,18	0,00001
8100179	NFXL1	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1	0,31	0,00003
8176698	CYorf15A	chromosome Y open reading frame 15A	8,09	0,00004
8176375	RPS4Y1	ribosomal protein S4, Y-linked 1	9,22	0,00010
7950447	XRRA1 /// RNF169	X-ray radiation resistance associated 1 /// ring finger protein 169	0,45	0,00019
8054758	DDX11L2 /// DDX11L9	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 like 2 /// DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 like 9	3,69	0,00028
8093950	S100P	S100 calcium binding protein P	0,33	0,00033
8039236	LILRA5	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5	0,38	0,00047

8043043	DNAH6	dynein, axonemal, heavy chain 6	0,45	0,00063
7953291	CD9	CD9 molecule	0,34	0,00073
8125461	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	0,26	0,00073
8176460	PRKY	protein kinase, Y-linked	2,60	0,00073
8177261	TTY10	testis-specific transcript, Y-linked 10 (non-protein coding)	3,11	0,00073

Функция гена *USP9Y* была описана выше. По результатам данного исследования экспрессия данного гена увеличена более чем в 10 раз в группе ТЧБА в сравнении с ТРБА ($p < 0,00001$).

К генам, функция которых может иметь отношение к патогенезу астмы можно отнести ген *LILRA5*, который кодирует протеин, принадлежащий к семейству лейкоцитарных иммуноглобулин-подобных рецепторов. Эффект данных рецепторов заключается в активации и ингибировании функции лейкоцитов. Показано, что присутствие данного протеина на поверхности моноцитов приводит к секреции нескольких провоспалительных цитокинов, что доказывает его роль в активации иммунного ответа [Jones D.C. et al., 2009]. Данный ген расположен в кластере хромосомы 19q13.4. В настоящее время описаны 4 изоформы данного рецептора. Экспрессия данного гена снижена более чем в 2,5 раза в группе ТЧБА в сравнении с ТРБА ($p = 0,00047$), что может свидетельствовать о наличии паттерна повышения активации провоспалительных цитокинов при резистентной форме болезни.

Также к генам с вероятной ассоциацией с БА можно отнести ген *HLA-DQB1*, кодирующий белок, который связывается с пептидами антигена, что способствует процессингу, презентации и распознаванию CD4 Т-клетками. Данный ген является участником многих сигнальных каскадов иммунного ответа [McHugh N.J. et al., 2006]. Доказана ассоциация полиморфизмов генов *HLA-DQA1*, *-DQB1* с предрасположенностью к астме [Gao J. et al., 2002]. Экспрессия данного гена снижена почти в 4 раза в группе ТЧБА в сравнении с терапевтически резистентной формой болезни ($p = 0,00073$).

Таким образом, исходно в сравниваемых группах больных БА идентифицированы 1388 генов, экспрессия которых статистически значимо различалась. При этом для каждой группы определены гены со специфичной экспрессией. В течение периода наблюдения (24 недели) общее количество генов с дифференциальной экспрессией изменялось и к окончанию периода наблюдения на фоне базисной противовоспалительной терапии их количество достигло 4041 гена. Необходимо отметить, что к окончанию лечебного периода зарегистрировано 1209 генов, характеризующихся отличием в уровне экспрессии у больных ТРБА по сравнению с пациентами других сравниваемых групп.

Наряду с этим, к окончанию периода наблюдения в сравнении с исходными показателями почти в 6 раз возросло количество генов с увеличенной экспрессией в одном или нескольких сравниваемых контрастах и больше чем в 2,5 раза увеличилось количество генов со сниженной экспрессией.

АНАЛИЗ ГЕННЫХ ОНТОЛОГИЙ И KEGG ПУТЕЙ

При оценке дифференциальной экспрессии генов показано, что сравниваемые группы больных БА характеризуются различными профилями экспрессии, однако такой анализ дает лишь количественное представление об отличиях между группами. Для характеристики молекулярных и биологических паттернов различий нами проведен анализ генных онтологий (биологические процессы и молекулярные функции) и KEGG путей. Генные онтологии и KEGG пути проанализированы с учетом направления изменения экспрессии (повышение или снижение). В анализ включены онтологии и пути со статистической значимостью $p < 0,05$.

Генная онтология – биоинформатический проект, посвященный унификации атрибутов (прежде всего – функциональных характеристик) генов и генных продуктов всех биологических видов. С позиции генных онтологий биологический процесс представляет собой ряд событий, обусловленных одной или несколькими молекулярными функциями. В то время как молекулярная функция описывает активность на молекулярном уровне вне связи с местом и контекстом реализации данной функции.

Сравнение тяжелой терапевтически чувствительной и легкой БА. При сравнении групп тяжелой терапевтически чувствительной и легкой астмы определены 16 биологических процессов и 11 молекулярных функций, ассоциированных с генами, уровень экспрессии которых повышен у больных ТЧБА в сравнении с легкой астмой, а также 20 биологических процессов и 7 молекулярных функций, связанных с генами, уровень экспрессии которых снижен в этих группах сравнения.

С помощью анализа генных онтологий установлены биологические процессы и молекулярные функции, которые могут лежать в основе формирования тяжести болезни и определять ответ на фармакотерапию.

К одному из таких биологических процессов можно отнести «метаболизм ксенобиотиков» (GO:0006805 - xenobiotic metabolic process, $p = 0,0014$), который связан с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой. Изменение активности этого биологического процесса теоретически может вносить вклад в формирование тяжести болезни и фармакотерапевтической резистентности. В процессы метаболизма ксенобиотиков вовлечены белки семейства цитохрома P450, функции которого тесно связаны с метаболизмом лекарств и стероидов. Индукция этого биологического процесса может приводить к повышению активности цитохрома P450 и укорочению периода полувыведения лекарственных препаратов, что теоретически может быть обоснованием для изменения назначаемых доз и режима приема препаратов у пациентов с тяжелой формой болезни.

По результатам проведенного исследования эта генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии гена *CYP4F3*, который кодирует протеин из семейства цитохрома P450, ответственный, преимущественно, за инициацию процесса инактивации и деградации медиатора воспаления лейкотриена В4.

Также генная онтология «метаболизм ксенобиотиков» ассоциирована с увеличением экспрессии генов *GSTM1* и *SULT1A2*, которые имеют непосредственное отношение к метаболизму лекарственных препаратов. Ген *GSTM1* кодирует глутатион S-трансферазу класса *mu*, функция которой состоит в детоксикации канцерогенов, лекарственных препаратов, токсинов окружающей среды, посредством их конъюгации с глутатионом. Генетические вариации этого гена могут вносить вклад в индивидуальную чувствительность к канцерогенам, токсинам и лекарственным препаратам [Saadat I. et al., 2010, Kim E.J. et al., 2005]. Кроме этого, по данным многочисленных исследований полиморфизм данного гена ассоциирован с риском развития астмы, а также с нейтрофильным паттерном воспаления [Li F. et al., 2013, Liang S. et al., 2013, Hoskins A. et al., 2013]. Ген *SULT1A2* кодирует фермент сульфотрансферазу, катализирующую конъюгацию многих гормонов, нейротрансмиттеров и лекарств [Nowell S. et al., 2005].

С другой стороны, изменение активности метаболизма ксенобиотиков может модифицировать клиническую реализацию триггеров (табачный дым, загрязнение окружающей среды, профессиональные раздражители), а также модифицировать риск развития заболевания [Muñoz Soto R.B. et al., 2011, Polonikov A.V. et al., 2009].

К процессу биотрансформации ксенобиотиков имеет отношение и биологический процесс «сульфатирование» (GO:0051923 – sulfation, $p=0,0265$), который ассоциирован с генами, уровень экспрессии которых, по данным проведенного исследования, увеличен в группе ТЧБА в сравнении с легкой формой болезни. Процесс сульфатирования относится ко второй фазе биотрансформации ксенобиотиков. Основными генными продуктами данной онтологии являются ферменты семейства сульфотрансфераз. У человека обнаружены три семейства данного фермента – SULT1, SULT2, SULT3 и около 40 изоферментов. Основную роль в сульфатировании лекарственных средств и их метаболитов играют изоферменты SULT1, из которых особенно важными считаются SULT1A1 и SULT1A3 [119]. По результатам нашего исследования эта генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии гена *SULT1A2*, кодирующего сульфотрансферазу, имеющую непосредственное отношение к метаболизму лекарственных препаратов.

Одним из генных продуктов, ассоциированных с генной онтологией «сульфатирование», является N-деацетилаза/N-сульфотрансфераза-1, которая является ключевым продуктом в биосинтезе гепаран сульфата. На модели астмы у мышей, дефицитных по этому гену, продемонстрировано снижение БГР, значительное снижение содержания эозинофилов, макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов в очаге воспаления, а также уровней ИЛ-5, ИЛ-2, TGF- β 1 и эотаксина [Zuberi R.I. et al., 2009]. Таким образом, повышение активности сульфатирования теоретически может вносить вклад в формирование тяжести болезни.

Особенности процессов сульфатирования показаны для некоторых препаратов, широко применяющихся в терапии астмы. Так, кортикостероид будесонид состоит из двух эпимеров 22R и 22S, которые конъюгируются цитозольной сульфотрансферазой (SULT2A1), при этом эпимеры обладают различной кинетической активностью. Показано, что эпимер 22R сульфатируется

в 3,5 раза активнее в сравнении с эпимером 22S, что приводит к укорочению периода полувыведения [Meloche C.A. et al., 2002]. Сальбутамол также представляет собой эквимолярную смесь двух энантиомеров (рацемат). При этом R-сальбутамол обладает свойствами бета2-агониста, а S-форма – нет. Рацемат сальбутамола также подвергается стереоселективному сульфатированию сульфотрансферазами, в связи с чем S-форма выводится значительно медленнее и достигает более высоких концентраций в плазме. При этом показано, что метаболизм сальбутамола различается у пациентов с астмой и здоровых лиц. Так, у пациентов с астмой, не получающих кортикостероиды, регистрируются более высокие уровни R- и S-форм в сравнении со здоровыми лицами и пациентами, получающими базисную противовоспалительную терапию. Наиболее вероятным объяснением этим данным могут быть дефектные метаболические функции у пациентов с БА, возможно ферментативного происхождения [Naidu Sjöswärd K. et al., 2003].

Другим биологическим процессом, вероятно, ассоциированным с патогенезом астмы, по данным нашего исследования, является «метаболизм лейкотриенов» (GO:0006691 – leukotriene metabolic process, $p=0,0318$). Эта генная онтология ассоциирована с генами, экспрессия которых повышена в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой.

В патогенезе БА лейкотриены участвуют в регуляции ранней фазы реакции немедленного типа и обладают исключительно провоспалительными и бронхоконстрикторными свойствами. Ключевую роль лейкотриены играют в патогенезе аспириновой астмы, что подтверждается высокой эффективностью использования блокаторов липоксигеназы при данной форме болезни.

По данным последних исследований блокада функции лейкотриенов может рассматриваться в качестве терапевтической мишени не только для аспириновой астмы, но и для других форм болезни. Так показано, что выпадение функции рецептора 1 лейкотриена B₄, который экспрессируется на Th2 лимфоцитах, приводит к подавлению развития БГР, эозинофильного воспаления и гиперплазии бокаловидных клеток на модели астмы у животных. Также данные изменения сопровождаются снижением продукции IgE и накоплением ИЛ-5 и ИЛ-13 в БАЛ [Terawaki K. et al., 2005]. Таким образом, наблюдается снижение выраженности практически всех эффекторов атопического воспаления.

По результатам нашего исследования данная генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии гена *CYP4F3*, который кодирует протеин, принадлежащий к семейству цитохрома P450 и ответственен преимущественно за инициацию процесса инактивации и деградации лейкотриена B₄.

Еще одним биологическим процессом, ассоциированным с патогенезом астмы, по данным нашего исследования, является «метаболизм катехоламинов» (GO:0006584 - catecholamine metabolic process, $p=0,0421$), который также ассоциирован с генами, экспрессия которых повышена в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой. Эта генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии гена *SULT1A2*, кодирующего сульфотрансферазу, ответственную за конъюгацию гормонов, лекарств и ксенобиотиков. Повышение активности этого

фермента может быть ассоциировано с более быстрой инактивацией катехоламинов.

Катехоламины опосредуют свое действие через адренорецепторы, что приводит к подавлению секреции провоспалительных цитокинов эффекторными клетками воспаления и, соответственно, уменьшению выраженности отека и воспаления. В физиологических концентрациях с бета-рецепторами связывается преимущественно адреналин. При этом снижение уровня адреналина в плазме крови ниже физиологического уровня, вероятно, может лежать в основе активации секреции цитокинов провоспалительного профиля у пациентов с БА.

Однако, по данным некоторых исследований, при клинических симптомах БА и обострении болезни регистрируется кратное увеличение уровня катехоламинов (адреналин в 4,6 раза, норадреналин в 2,9 раза) и биогенных аминов (гистамин в 3,6 раза, серотонин в 1,4 раза) [Мордашова О.Н. и соавт., 2005]. Авторы исследования этот феномен объясняют изменением концентрации метаболитов в местном очаге воспаления, так как катехоламины являются первичными медиаторами стрессорного действия.

В аспекте тяжелой БА данному феномену может быть и другое объяснение. На фоне частого приема бета2-адреномиметиков, которые в терапии астмы используются как средства «скорой помощи», повышенный метаболизм катехоламинов может быть следствием адаптационного механизма на фоне функциональной несостоятельности и/или десенситизации бета2-адренорецепторов у данной группы пациентов [Selivanova P.A. et al., 2012].

Среди молекулярных функций, ассоциированных с генами, экспрессия которых повышена в группе ТЧБА в сравнении с легкой БА, по данным нашего исследования, не зарегистрировано онтологий, которые могут лежать в основе формирования тяжести болезни и определять ответ на фармакотерапию.

С помощью анализа генных онтологий установлены биологические процессы и молекулярные функции, ассоциированные с генами, экспрессия которых понижена в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой.

Одним из таких биологических процессов, вероятно, можно считать «сигнальный путь ИФН 1 типа» (GO:0060337 - type I interferon-mediated signaling pathway, $p=0,00013$). Данный биологический процесс представляет собой серию молекулярных сигналов, которые инициируются связыванием ИФН первого типа с рецептором на поверхности клетки, что приводит к изменению клеточных процессов и транскрипции. Основным эффектом ИФН первого типа состоит в подавлении синтеза вирусных белков. По данным нашего исследования эта генная онтология ассоциирована со снижением экспрессии целого ряда генов, ответственных за синтез белков, обеспечивающих противовирусный иммунитет - *IFITM3* (вирус гриппа А, H1N1, вирус западного Нила, тропическая лихорадка), *MX1* (вирус гриппа), *OAS3*, *IFITM1* (вирус гриппа А, коронавирус и др.), а также участвующих в регуляции апоптоза - *IFI6* и *IFITM1*.

В связи с этим, снижение данного биологического процесса в группе ТЧБА может быть основой предрасположенности пациентов данной группы к вирусным инфекциям, которые могут лежать в основе неконтролируемого течения болезни и служить причиной частых обострений.

Данный феномен может подтверждать и снижение экспрессии генов, ассоциированных с другим биологическим процессом – «ответ на вирус» (GO:0009615 - response to virus, $p=0,00023$) – *IFITM3*, *MX1*, *IFITM1*, *BCL3*, *HERC5*, *RSAD2*. В ряде исследований продемонстрирована сниженная индукция ИФН 1 и 3 типов вирусами семейства риновирус у пациентов со среднетяжелой и тяжелой БА. В культуре клеток пациентов с тяжелой астмой на фоне высокой вирусной нагрузки регистрировались низкие уровни мРНК ИФН. Более того, в неинфицированных клетках данной группы пациентов оказались сниженными уровни мРНК TLR-3, индуцибельного гена ретиноидной кислоты и меланома ассоциированного гена 5, что может свидетельствовать о врожденном дефекте противовирусного ответа при тяжелой БА [Edwards M.R. et al., 2013]. Наряду с этим в ряде исследований на модели астмы у животных была продемонстрирована способность ИФН подавлять эозинофилию в слизистой дыхательных путей и неспецифическую БГР [Kroegel C. et al., 2009, Kikkawa Y. et al., 2012].

Еще одним биологическим процессом, который связан с генами, уровень экспрессии которых снижен в группе ТЧБА в сравнении с легкой БА, является «ответ на стимулы кортикостерона» (GO:0051412 - response to corticosterone stimulus, $p=0,00460$). Наиболее фармакологически активным глюкокортикоидом является кортизол, при этом кортикостерон является малоактивным гормоном коры надпочечников у человека. Однако данный гормон играет значительную роль в адаптивных возможностях организма. По результатам нашего исследования данная генная онтология ассоциирована со снижением экспрессии таких генов как *JUNB* и *PEBP1*, продукты которых проявляют свою активность преимущественно в центральной нервной системе [Xu Y.F. et al., 2010]. В последние несколько лет опубликован ряд работ, в которых продемонстрирована ассоциация психологического и социального стресса с параметрами, характеризующими атопическое воспаление на моделях астмы у животных.

Так в 2009 году Bailey M.T. и соавт. продемонстрировали, что стресс, сопровождающийся выбросом кортикостерона, ассоциирован с увеличением выраженности аллерген-индуцированного воспаления бронхов, что сопровождается повышением уровней ИЛ-5, ГМ-КСФ, IgG1, тимус-активированных и регуляторных хемокинов, ФНО- α и ИЛ-6, а также со снижением связывающей способности ГКР in vitro [Bailey M.T. et al., 2009].

Результаты данной работы воспроизведены и на модели астмы у морских свинок, где также зафиксировано увеличение БГР, уровней провоспалительных хемокинов и снижение чувствительности ГКР в ответ на психосоциальный стресс [Li V. et al., 2013]. Однако необходимо отметить, что данные результаты получены на моделях астмы у мышей и морских свинок, а у данных животных, в отличие от человека, кортикостерон является основным глюкокортикоидом.

Применительно к тяжелой БА тенденция к вероятному снижению данного биологического процесса может быть обусловлена угнетением гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы на фоне регулярного применения высоких доз ИКС.

Вероятно, одним из основных биологических процессов, применительно к атопическому воспалению и «классическому» патогенезу БА является

«врожденный иммунный ответ» (GO:0045087 - innate immune response, $p=0,03218$). По данным нашего исследования данная генная онтология ассоциирована с генами, экспрессия которых понижена в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой. Аналогичным направлением изменения экспрессии ассоциированных генов характеризовались и другие онтологии, имеющие отношение к реализации atopического воспаления - биологический процесс «хемотаксис» (GO:0006935 - chemotaxis, $p=0,00637$) и молекулярные функции – «активность рецепторов С-С хемокинов» (GO:0016493 - C-C chemokine receptor activity, $p=0,00473$) и «связывание хемокинов» (GO:0019956 - chemokine binding, $p=0,01323$).

К генам со сниженной экспрессией, ассоциированных с онтологией «врожденный иммунный ответ» (GO:0045087), по данным настоящего исследования можно отнести – *IFITM3*, *MX1*, *S100B*, *IFI6*, *OAS3*, *LILRA5*, *HLA-DQA1*, *HERC5*, *CFP*, *IFITM1*. Ряд белковых продуктов этих генов играет ключевую роль в противовирусном иммунитете и регуляции апоптоза (*IFITM3*, *MX1*, *IFITM1*, *IFI6*, *OAS3*, *S100B*, *HERC5*, *CFP*).

Ген *LILRA5* кодирует протеин, принадлежащий к семейству лейкоцитарных иммуноглобулин-подобных рецепторов. Эффект данных рецепторов заключается в активации и ингибировании функции лейкоцитов. Показано, что присутствие данного протеина на поверхности моноцитов приводит к секреции нескольких провоспалительных цитокинов, что доказывает его роль в активации иммунного ответа [Wende H. et al., 2000, Mosbrugger T.L. et al., 2010].

Ген *HLA-DQA1* кодирует компонент главного комплекса гистосовместимости класса II (Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1) и играет ключевую роль в процессе презентации антигена на поверхности антигенпрезентирующих клеток. В целом ряде исследований продемонстрирована ассоциация полиморфизмов данного гена с предрасположенностью к астме и уровнем продукции сывороточного IgE [Movahedi M. et al., 2008, Gao J. et al., 2003]. Эти данные нашли подтверждение и в полногеномном исследовании, опубликованном в 2012 году [Lasky-Su J. et al., 2012].

Данная характеристика генных онтологий в изучаемых группах может быть обусловлена отличающимся паттерном воспаления при тяжелой форме заболевания в сравнении с легкой.

На данный момент опубликованы результаты десятков исследований, посвященных анализу воспалительного компонента при тяжелой астме. Однако сопоставление полученных результатов представляется затруднительным.

Так продемонстрировано, что тяжелая БА у взрослых в большинстве случаев характеризуется неатопическим компонентом и персистирующим эозинофильным воспалением в отличие от среднетяжелой и легкой формы болезни [Amelink M. et al., 2013]. В то время как аналогичная форма болезни у детей также характеризовалась эозинофильным воспалением, но практически полным отсутствием экспрессии цитокинов Th2-профиля [Bossley C.J. et al., 2012].

Однако в большинстве подобных исследований, в том числе и проведенных нашим научным коллективом, основной эффекторной клеткой при тяжелой форме

болезни является нейтрофил [Nakagome K. et al., 201, Grigoraş A. et al., 2010, Selivanova P.A. et al., 2010].

Таким образом, накопленные данные позволяют с большой долей вероятности говорить о том, что в основе тяжелой БА лежат механизмы воспаления, отличные от таковых при легкой и средней степенях тяжести. При этом преобладающий паттерн нейтрофильного воспаления может являться причиной недостаточной эффективности ИКС, которые действуют преимущественно на эозинофильный компонент.

Еще одним биологическим процессом, связанным с генами, экспрессия которых снижена в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой, является «регуляция программируемой клеточной гибели» (GO:0043067 - regulation of programmed cell death, $p=0,00734$). Считается доказанным, что при БА количество апоптотически измененных эозинофилов прогрессивно уменьшается с нарастанием степени тяжести заболевания [Duncan C.J. et al., 2003]. При этом супрессия апоптоза сочетается с преобладанием некротического пути гибели клеток и высвобождением провоспалительных цитокинов и медиаторов. Данные изменения апоптоза характерны и для нейтрофилов.

В работах, выполненных в СибГМУ, подтверждаются данные о снижении апоптотической гибели эозинофилов, наиболее выраженные у пациентов с тяжелой БА, а также выявлен ряд специфических механизмов нарушения апоптоза, особенно в группе больных с неконтролируемой астмой, связанный с дисбалансом анти- и проапоптотических факторов, что может лежать в основе формирования терапевтической резистентности [Lamb J.P. et al., 2005, Огородова Л.М. и соавт., 2005]. Различные молекулярные механизмы, активирующие апоптоз, в настоящее время рассматриваются в качестве терапевтической мишени для лечения БА [Feng Y.H. et al., 2012].

Сравнение тяжелой терапевтически чувствительной и резистентной астмы. При сравнении групп ТЧБА и ТРБА определены 11 биологических процессов и 9 молекулярных функций, ассоциированных с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТЧБА в сравнении с ТРБА, а также 20 биологических процессов и 5 молекулярных функций, связанных с генами, уровень экспрессии которых снижен у больных тяжелой терапевтически чувствительной астмой.

С помощью анализа генных онтологий установлены биологические процессы и молекулярные функции, которые могут лежать в основе формирования тяжести болезни и определять ответ на фармакотерапию.

К одному из таких биологических процессов можно отнести «биосинтез лейкотриенов» (GO:0019370 - leukotriene biosynthetic process, $p=0,0273$), который связан с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТЧБА в сравнении с резистентной формой. По результатам нашего исследования эта генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии гена *RNPEP*, кодирующего экзопептидазу, которая гидролизует лейкотриен А4 в лейкотриен В4, который опосредует хемотаксис, экссудацию плазмы, бронхоспазм [Jakschik V.A. et al., 1983]. С учетом доказанной роли лейкотриенов в патогенезе астмы

вероятное изменение активности этого биологического процесса теоретически может вносить вклад в формирование тяжести болезни. Необходимо отметить, что данная генная онтология также ассоциирована с генами, экспрессия которых повышена в группе ТЧБА в сравнении с легкой астмой.

К ассоциированным с патогенезом астмы биологическим процессам можно отнести и «активацию НК» (GO:0030101- natural killer cell activation, $p=0,0487$). По данным нашего исследования эта генная онтология ассоциирована с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТЧБА в сравнении с резистентной формой. Этот биологический процесс ассоциирован с увеличением экспрессии гена *KIR3DS1*, кодирующего иммуноглобулин-подобный рецептор НК для HLA-C аллелей.

Клетки НК являются компонентом врожденного иммунитета и играют роль эффекторов цитотоксичности в отношении опухолевых клеток, бактерий, вирусов и паразитов. Для реализации своих функций они не требуют предварительной сенситизации [Kagimi K. et al., 2013]. В интактных тканях НК находятся в неактивном состоянии, после активации НК способны синтезировать и высвобождать широкий спектр преимущественно провоспалительных цитокинов ИФН- γ , ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-22, ФНО, ГМ-КСФ, RANTES и другие. На моделях астмы у животных показано, что присутствие НК необходимо не только для развития аллерген-индуцированной гиперреактивности бронхов, но и для разрешения воспалительного процесса в бронхах [Akbari O. et al., 2006, Haworth O. et al., 2011]. Возможная роль НК в патогенезе астмы у человека подтверждается регистрацией этих клеток в легких у пациентов с плохо контролируемым течением болезни. Так, в БАЛ пациентов с тяжелой астмой зарегистрировано статистически значимое повышение количества НК [Hamzaoui A. et al., 2006]. Максимальную цитотоксическую активность НК проявляют в присутствии нейтрофилов, которые являются основной эффекторной клеткой при тяжелой форме болезни по данным многочисленных исследований [Nakagome K. et al., 2012, Selivanova P.A. et al., 2010]. Таким образом, у данных пациентов основной причиной неконтролируемого течения болезни могут быть Th2 независимые факторы, такие как вирусные инфекции, загрязнение воздуха и физическая нагрузка.

Среди молекулярных функций, ассоциированных с генами, экспрессия которых повышена в группе ТЧБА в сравнении с ТРБА, по данным нашего исследования, не зарегистрировано генных онтологий, которые могут лежать в основе формирования тяжести болезни и определять ответ на фармакотерапию.

С помощью анализа генных онтологий установлены биологические процессы, ассоциированные с генами, экспрессия которых понижена в группе ТЧБА в сравнении с резистентной формой болезни.

К одной из таких онтологий, вероятно, можно отнести процесс «биосинтеза С21-стероидных гормонов» (GO:0006700 - C21-steroid hormone biosynthetic process, $p=0,0438$), который ассоциирован с генами, экспрессия которых снижена при ТЧБА в сравнении ТРБА.

К С21-стероидам, принадлежат гестагенные гормоны (прогестерон) и кортикостероиды (кортикостерон, кортизол, альдостерон). Вероятное снижение

активности этого биологического процесса в группе ТЧБА может быть следствием угнетения эндогенной секреции кортикостероидов на фоне получения высоких доз ИКС и сохраненной чувствительности ГКР [Bakkeheim E. et al., 2010]. Напротив, на фоне вероятного снижения при терапевтически чувствительной форме болезни, в группе резистентных пациентов можно предположить увеличение активности процессов, характеризующихся этой генной онтологией. В данном случае этот феномен может быть обусловлен наличием молекулярных механизмов формирования резистентности к глюкокортикоидам (дефект связывания с лигандом, нарушение ядерной транслокации, альтернативный сплайсинг рецепторов) [Leung D.Y. et al., 1998, Bonnans C. et al., 2003].

Сравнение тяжелой терапевтически резистентной и легкой БА. При сравнении групп ТРБА и легкой астмы определены 9 биологических процессов и 6 молекулярных функций, ассоциированных с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТРБА в сравнении с легкой БА, а также 20 биологических процессов и 20 молекулярных функций, связанных с генами, уровень экспрессии которых снижен у больных ТРБА по сравнению с больными легкой астмой.

С помощью анализа генных онтологий установлены биологические процессы и молекулярные функции, которые могут лежать в основе формирования тяжести болезни и определять ответ на фармакотерапию.

К одному из таких биологических процессов можно отнести «костимуляцию Т-клеток» (GO:0031295 – T cell costimulation, $p=0,0045$), связанный с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТРБА в сравнении с легкой астмой. Этот процесс характеризует предоставление второго антигеннезависимого сигнала для активации Т-клеток.

По результатам нашего исследования эта генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии генов *TNFSF14* и *HLA-DQB1*. Ген *TNFSF14* кодирует протеин из семейства ФНО, который стимулирует пролиферацию Т-клеток, является триггером для активации апоптоза в различных опухолевых клетках, активирует NF-κB. Ген *HLA-DQB1* кодирует одну из молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1) и играет ключевую роль в процессе презентации антигена на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Также как и для гена *HLA-DQA1* в целом ряде исследований продемонстрирована ассоциация полиморфизмов этого гена с предрасположенностью к астме и уровнем продукции сывороточного IgE [Movahedi M. et al., 2008, Lasky-Su J. et al., 2012].

Другим биологическим процессом, вероятно, ассоциированным с патогенезом астмы, является «метаболизм ксенобиотиков» (GO:0006805 - xenobiotic metabolic process, $p=0,0112$), который связан с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТРБА в сравнении с легкой астмой.

Данная генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии таких генов как *MAOA*, *GSTM1*, *MAT1A*. Необходимо отметить, что ген *GSTM1* в аналогичной генной онтологии зарегистрирован при сравнении ТЧБА и легкой

БА. Ген *MAOA* кодирует фермент моноаминоксидазу, играющую важную роль в метаболизме нейроактивных и вазоактивных аминов в центральной нервной системе и периферических тканях – таких как допамин, серотонин и адреналин. Нарушение регуляции этого фермента ассоциировано с развитием депрессии и дефицитом внимания [Beach S.R. et al., 2010, Wargelius H.L. et al., 2012]. Считается доказанным, что депрессивные расстройства и панические атаки регистрируются у 70% пациентов с тяжелой формой заболевания, однако в течение длительного времени в качестве ведущего патогенетического звена этого явления рассматривалась гипоксия [Wong K.O. et al., 2013, Potoczek A. et al., 2006].

Еще одним биологическим процессом, ассоциированным с механизмами астмы, является «иммунный ответ» (GO:0006955 - immune response, $p=0,0454$), связанный с генами, уровень экспрессии которых повышен в группе ТРБА в сравнении с легкой астмой.

По данным нашего исследования эта генная онтология ассоциирована с увеличением экспрессии генов *TNFSF14*, *CLEC4D*, *IL18RAP*, *HLA-DQB1*, *CXCL1*, *OPRD1*. Повышенная экспрессия генов *TNFSF14* и *HLA-DQB1* также ассоциирована с биологическим процессом костимуляции Т-клеток. Функция белковых продуктов других генов, ассоциированных с данной генной онтологией, также может иметь отношение к механизмам воспаления. Так ген *CLEC4D* кодирует внутриклеточный рецептор, который, вероятно, играет роль в распознавании инфекционного антигена, его процессинге и презентации Т-клеткам. Ген *IL18RAP* кодирует субъединицу рецептора ИЛ-18, присутствие которой увеличивает связывающую активность рецептора. В то время как ИЛ-18 играет важную роль в поляризации Т-клеток и индуцирует продукцию синтеза провоспалительных цитокинов – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9 и ИЛ-13 Т-клетками, тучными клетками, базофилами и НК [Kawayama T. et al., 2012]. Также присутствие этого ИЛ является необходимым условием для созревания клеток Th2 ряда, продукции IgE и дифференцировки Th17 клеток. Ген *CXCL1* кодирует хемокин, который играет важную роль в воспалении, являясь хемоаттрактантом нейтрофилов. Увеличение экспрессии этого гена, может быть одним из компонентов формирования нейтрофильного паттерна воспаления при тяжелой форме БА.

Среди молекулярных функций, ассоциированных с генами, экспрессия которых повышена в группе ТРБА в сравнении с легкой БА, по данным нашего исследования, не зарегистрировано онтологий, которые могут лежать в основе формирования тяжести болезни и определять ответ на фармакотерапию.

С помощью анализа генных онтологий установлены биологические процессы и молекулярные функции, ассоциированные с генами, экспрессия которых понижена в группе ТРБА в сравнении с легкой астмой.

Так, зарегистрирован целый ряд биологических процессов, относящихся к регуляции Т-клеток, которые связаны с генами, уровень экспрессии которых снижен в группе ТРБА в сравнении с легкой астмой. По результатам нашего исследования к таким генным онтологиям относятся: «сигнальный путь рецепторов Т-клеток» (GO:0050852 - T cell receptor signaling pathway, $p=0,0002$), «костимуляция Т-клеток» (GO:0031295 - T cell costimulation, $p=0,00075$),

«регуляция активации Т-клеток» (GO:0050863 -regulation of T cell activation, $p=0,00122$), «селекция Т-клеток» (GO:0045058 -T cell selection, $p=0,00243$), «положительная регуляция активации альфа-бета Т-клеток» (GO:0046635 - positive regulation of alpha-beta T cell activation, $p=0,01176$), «положительная регуляция пролиферации Т-клеток» (GO:0042102 - positive regulation of T cell proliferation, $p=0,01598$).

Проведенный анализ функции генов, ассоциированных с данными генными онтологиями, не выявил блокаторов данных биологических процессов, что позволяет охарактеризовать данные процессы как сниженные в группе ТРБА в сравнении с легкой формой болезни.

Исключение представляет онтология «костимуляции Т-клеток» (GO:0031295 - T cell costimulation, $p=0,00075$). По результатам нашего исследования этот процесс ассоциирован с увеличением экспрессии генов *TNFSF14* и *HLA-DQB1*, а также ассоциирован со снижением экспрессии генов *CD5*, *HLA-DQA1*, *CD247*, *CD3E*, *DPP4*, *CD28*. Все эти гены, за исключением *HLA-DQA1*, кодируют сигнальные протеины, являющиеся адаптерными для процессов активации, пролиферации и проведения сигналов Т-клеток.

Другими биологическими процессами, вероятно, имеющими отношение к формированию воспаления при астме, являются «регуляция продукции ИЛ-10» (GO:0032653 - regulation of interleukin-10 production, $p=0,00190$), «регуляция продукции ИЛ-12» (GO:0032655 - regulation of interleukin-12 production, $p=0,00641$) и «положительная регуляция продукции ИФН- γ » (GO:0032729 - positive regulation of interferon-gamma production, $p=0,01285$).

Данные генные онтологии, ассоциированы с генами, уровень экспрессии которых снижен в группе ТРБА в сравнении с легкой астмой.

По данным нашего исследования эти биологические процессы ассоциированы со снижением экспрессии генов *CD40LG*, *IL23A*, *TRIB2*, *RELA*, *CD3E*, два из которых (*CD40LG* и *IL23A*) являются общими для трех онтологий. Анализ функции этих генов не выявил блокаторов данных биологических процессов, что позволяет охарактеризовать эти процессы как сниженные в группе ТРБА в сравнении с легкой формой болезни.

Еще одним биологическим процессом, ассоциированным с механизмами астмы, является «гуморальный иммунный ответ» (GO:0006959 - humoral immune response, $p=0,01786$), который связан с генами, уровень экспрессии которых снижен в группе ТРБА в сравнении с легкой формой болезни.

Этот биологический процесс ассоциирован со снижением экспрессии генов, которые вовлечены в процессы регуляции активации, миграции, индукции и дифференцировки Т-клеток: *ST6GAL1*, *GIMAP5*, *CCR6*, *CD28*.

Таким образом, у больных ТРБА в сравнении с легкой БА оказались сниженными преимущественно биологические процессы, характеризующие регуляцию, селекцию и пролиферацию Т-клеток.

По результатам данного исследования зарегистрированы KEGG пути, ассоциированные с генами, уровень экспрессии которых различался при сравнении тяжелой терапевтически резистентной и легкой астмы.

Всего установлено 4 таких пути: «астма» (hsa05310 – Asthma, $p=0,01789$), «метаболизм лекарств – цитохром P450» (hsa00982 - Drug metabolism - cytochrome P450, $p=0,04335$), «сигнальные пути рецепторов Т-клеток» (hsa04660 - T cell receptor signaling pathway, $p<0,00001$), «взаимодействие цитокинов с цитокиновыми рецепторами» (hsa04060 - Cytokine-cytokine receptor interaction, $p=0,00650$).

В составе KEGG пути «астма», генами, уровень экспрессии которых был увеличен, являлись *RNASE3* и *HLA-DQB1*, а генами, экспрессия которых оказалась сниженной – *HLA-DQA1* (8179489 и 8178199) и *CD40LG*.

Разнонаправленное изменение уровня экспрессии генов, кодирующих белки главного комплекса гистосовместимости класса II, DQA1 (снижение экспрессии) и DQB1 (повышение экспрессии) также зарегистрировано в составе различных генных онтологий, описанных ранее в данном разделе.

Главный комплекс гистосовместимости представляет собой большую группу генов, играющих ключевую роль в иммунном ответе и обеспечивающих, прежде всего, презентацию антигена иммунокомпетентным клеткам.

Белковые продукты генов *HLA-DQA1* и *HLA-DQB1*, соединяясь вместе, формируют функциональный белковый комплекс – антигенсвязывающий DQ $\alpha\beta$ гетеродимер (antigen-binding DQ $\alpha\beta$ heterodimer), который и осуществляет презентацию чужеродных пептидов иммунной системе. В этой связи дисбаланс экспрессии единиц DQA1 и DQB1, теоретически, может вносить вклад в формирование тяжести течения болезни.

Путь KEGG «метаболизм лекарств – цитохром P450» ассоциирован с генами, уровень экспрессии которых увеличен – *MAOA* и *GSTM1*. Повышенный уровень экспрессии гена *GSTM1* зарегистрирован в составе одной из генных онтологий при сравнении ТЧБА и легкой БА, а также в составе ГО-процессов при сравнении ТРБА и легкой БА. В то время как повышение экспрессии гена *MAOA* зарегистрировано только в группе ТРБА в сравнении с легкой БА. Повышение ферментативной активности продуктов этих генов может вносить вклад в ускорение метаболизма лекарственных препаратов и сокращению времени циркуляции активных компонентов.

К другим KEGG путям, вероятно, имеющим отношение к формированию тяжести болезни и терапевтической резистентности, можно отнести «сигнальные пути рецепторов Т-клеток» и «взаимодействие цитокинов с цитокиновыми рецепторами». Данные пути ассоциированы с генами, экспрессия которых снижена, а перечень, ассоциированных с ними генов, практически полностью совпадает с генными онтологиями, характеризующими регуляцию, селекцию и пролиферацию Т-клеток в данном контрасте.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМИКИ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ В ТЕЧЕНИЕ ЛЕЧЕБНОГО ПЕРИОДА

С целью оценки динамики генной экспрессии в течение лечебного периода для определения молекулярно-генетических механизмов формирования терапевтической резистентности проведен кластерный анализ временных рядов. 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 9 кластеров.

При проведении кластерного анализа группа легкой БА считалась «референсной» с точки зрения астмы, в связи с чем характеристика тяжелой и терапевтически резистентной формы болезни осуществлялась с учетом отличий от легкой БА.

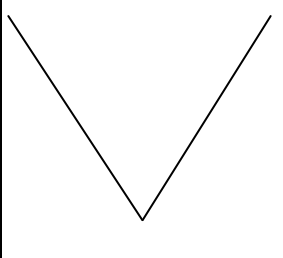
Применение данного подхода было обоснованным с позиции следующих результатов. В группе легкой БА на фоне терапии уже через 4 недели контроля болезни достигли 60% пациентов, а с Визита 3 (12 недель) и до конца периода наблюдения у всех пациентов течение болезни расценивалось как контролируемое. Принадлежность пациента к группе легкой БА и наблюдаемая динамика клинико-функциональных параметров течения болезни дали нам основание предположить, что изменения экспрессии генов в динамике являются характерными для данной группы пациентов и являются отражением изменения активности на фоне регулярной базисной противовоспалительной терапии. Наше предположение находит подтверждение в постепенном снижении экспрессии генов, формирующих KEGG путь «астма» (hsa05310), который ассоциирован с генами, имеющими отношение к установленным механизмам патогенеза БА, что отражает динамику генной активности в ответ на терапию ИКС у пациентов с легкой астмой.

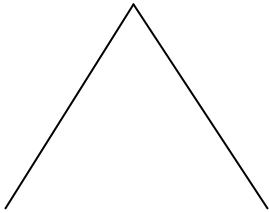
Для получения более точной характеристики динамики генные онтологии, связанные с механизмами БА, были объединены по признаку закономерности экспрессии на основе анализа связи между кластерами в каждой сравниваемой группе.

Группа ТЧБА. Закономерности изменения экспрессии группы кластеров генов были соотнесены со статистически значимыми KEGG путями и генными онтологиями, ассоциированными с механизмами астмы (Таблица 8).

Таблица 8

Соотнесение изменений экспрессии группы кластеров генов со статистически значимыми KEGG путями и генными онтологиями для ТЧБА

Закономерность изменения экспрессии группы кластеров (тренды)	Статистически значимые KEGG пути и генные онтологии, ассоциированные с механизмами астмы
	hsa04650 – Natural killer cell mediated cytotoxicity, p=0,00385 (1) hsa04660 – T cell receptor signaling pathway, p=0,01756 (1) GO:0050776 – regulation of immune response, p<0,00001 (1) GO:0060338 – regulation of type I interferon-mediated signaling pathway, p=0,00047 (1) GO:0030888 – regulation of B cell proliferation, p=0,00108 (1) GO:0032715 – negative regulation of interleukin-6 production, p=0,00158 (1) GO:0045582 – positive regulation of T cell differentiation, p=0,00171 (1) GO:0042119 – neutrophil activation, p=0,00178 (1) GO:0003823 – antigen binding, p=0,00506 (1)

	<p>GO:0019956 – chemokine binding, p=0,00655 (1) hsa4662 – B cell receptor signaling pathway, p=0,02356 (2) GO:0019885 – antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I, p<0,00001 (2) GO:0002446 – neutrophil mediated immunity, p=0,00011 (2) GO:2000515-negative regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell activation, p=0,00047 (2) GO:0046639 – negative regulation of alpha-beta T cell differentiation, p=0,00071 (2) hsa4612 -Antigen processing and presentation, p=0,04517 (8) GO:0006955 – immune response, p=0,00096 (8) GO:0006954 – inflammatory response, p=0,00151 (8) GO:0050776- regulation of immune response, p=0,00282 (8) GO:0001816 – cytokine production, p=0,00342 (8) GO:0043067 – regulation of programmed cell death, p=0,01386 (8) GO:0030101 – natural killer cell activation, p=0,02829 (8) GO:0006935 – chemotaxis, p=0,04005 (8) GO:0008009 – chemokine activity, p=0,00412 (8) GO:0004896 – cytokine receptor activity, p=0,02412 (8)</p>
	<p>GO:0010820 – positive regulation of T cell chemotaxis, p=0,0350 (3) GO:0042535 – positive regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process, p=0,0350 (3) GO:0032743 – positive regulation of interleukin-2 production, p=0,0384 (3) GO:0090026 – positive regulation of monocyte chemotaxis, p=0,0384 (3) GO:0006805 – xenobiotic metabolic process, p=0,0351 (4) GO:0045087 – innate immune response, p=0,0376 (4) GO:0019083 – viral transcription, p=0,00020 (5) GO:0045087 – innate immune response, p=0,00317 (6) GO:0002682 – regulation of immune system process, p=0,01936 (6) GO:0008207 – C21-steroid hormone metabolic process, p=0,03368 (6) GO:0034391 -regulation of smooth muscle cell apoptotic process, p=0,04245 (6) GO:0019083 – viral transcription, p<0,00001 (9) GO:0002479- antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, p=0,00118 (9) GO:0006805 – xenobiotic metabolic process, p=0,00170 (9)</p>

При интерпретации этих результатов необходимо учесть, что в рамках протокола проведенного исследования все пациенты данной группы находились на регулярной базисной комбинированной терапии в объеме 1000 мкг/сут по ФП. У пациентов данной группы статистически значимое улучшение основных клинико-функциональных показателей зарегистрировано уже к моменту Визита 2 (4 недели терапии) и в дальнейшем положительная динамика сохранялась. К окончанию периода наблюдения значения ОФВ1 достигли условных возрастных норм, а проявление клинических симптомов было минимальным.

Таким образом, по данным нашего исследования в течение первых трех месяцев терапии снижалась, а затем постепенно увеличивалась экспрессия генов, участвующих в процессах преимущественно пяти функциональных направлений – регуляция иммунного ответа, изменения активности Т-клеток, активация НК, активация нейтрофилов и регуляция апоптоза.

Прежде всего, необходимо отметить, что по сравнению с легкой БА в группе ТЧБА по результатам кластерного анализа зарегистрировано значительно большее количество генных онтологий, ассоциированных с механизмами заболевания. Это может свидетельствовать о более сложной регуляции воспаления и вовлеченности в воспалительный каскад дополнительных механизмов.

Так, например, функциональное направление регуляция иммунного ответа представлено двумя KEGG путями и 13 биологическими процессами.

В составе генов первого кластера зарегистрированы такие биологические процессы как «регуляция иммунного ответа» (GO:0050776 – regulation of immune response, $p < 0,00001$), «регуляция пролиферации В-клеток» (GO:0030888 – regulation of B cell proliferation, $p = 0,00108$), «связывание антигена» (GO:0003823 – antigen binding, $p = 0,00506$), «связывание хемокинов» (GO:0019956 – chemokine binding, $p = 0,00655$) и «негативная регуляция продукции ИЛ-6» (GO:0032715 – negative regulation of interleukin-6 production, $p = 0,00158$). Изменения экспрессии генов, формирующих данный кластер, можно охарактеризовать некоторой задержкой увеличения экспрессии в первые 12 недель лечебного периода с дальнейшим выраженным ростом экспрессии.

В составе генов второго кластера из данного функционального направления зарегистрирован KEGG путь «сигнальный путь В-клеток» (hsa4662 – B cell receptor signaling pathway, $p = 0,02356$), и онтология «процессинг антигена и презентация антигена эндогенного пептида через главный комплекс гистосовместимости класса I» (GO:0019885 – antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I, $p < 0,00001$). Изменения экспрессии генов, составляющих данный кластер, были сопоставимы с кластером 1, однако в первые 12 недель терапии наблюдалось незначительное снижение экспрессии с последующим выраженным ростом в оставшемся периоде.

В составе генов, формирующих восьмой кластер зарегистрирован путь «процессинг и презентация антигена» (hsa4612 – Antigen processing and presentation, $p = 0,04517$) и биологические процессы «иммунный ответ» (GO:0006955 – immune response, $p = 0,00096$), «воспалительный ответ» (GO:0006954 – inflammatory response, $p = 0,00151$), «регуляция иммунного ответа» (GO:0050776 – regulation of immune response, $p = 0,00282$), «продукция цитокинов» (GO:0001816 – cytokine production, $p = 0,00342$), «хемотаксис» (GO:0006935 – chemotaxis, $p = 0,04005$), «активность хемокинов» (GO:0008009 – chemokine activity, $p = 0,00412$) и «активность рецепторов хемокинов» (GO:0004896 – cytokine receptor activity, $p = 0,02412$). При этом, несмотря на то, что первый, второй и восьмой кластеры входят в связанную группу, изменения экспрессии генов, составляющих восьмой кластер, отличались от первого и второго. Так, в данном кластере экспрессия нарастала в первые 12 недель терапии с последующим замедлением экспрессии.

Таким образом, на фоне регулярной комбинированной базисной противовоспалительной терапии в группе ТЧБА в течение первых 12 недель наблюдается подавление экспрессии начальных фаз иммунного ответа (пролиферация В-клеток, связывание антигена и хемокинов) с последующим повышением экспрессии, вероятно, в связи с активацией компенсаторных механизмов. С другой стороны, характеристика изменений экспрессии генов, формирующих «эффektorные» механизмы (воспалительный ответ, продукция цитокинов, активность хемокинов и их рецепторов), состоящая в подавлении экспрессии только во второй половине периода наблюдения свидетельствует о

том, что длительность терапии в стабильной дозе у данной группы пациентом не должна быть менее 6 месяцев.

К функциональному направлению «изменение активности Т-клеток» можно отнести следующие онтологии – KEGG путь «сигнальный путь рецепторов Т-клеток» (hsa04660 – T cell receptor signaling pathway, $p=0,01756$) и биологические процессы «положительная регуляция дифференцировки Т-клеток» (GO:0045582 – positive regulation of T cell differentiation, $p=0,00171$), «негативная регуляция активации CD4 позитивных альфа-бета Т-клеток» (GO:2000515- negative regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell activation, $p=0,00047$) и «негативная регуляция дифференцировки альфа-бета Т-клеток» (GO:0046639 - negative regulation of alpha-beta T cell differentiation, $p=0,00071$). Данные онтологии сформированы генами, входящими в состав первого и второго кластера, изменения экспрессии этих генов состоят в подавлении или замедлении экспрессии в первые 12 недель терапии с последующим ростом.

Таким образом, на фоне терапии в данной группе пациентов с течением времени нарастает негативная регуляция дифференцировки и активации альфа-бета Т-клеток. Задержка изменения экспрессии в первой половине лечебного периода может свидетельствовать как об исходной высокой активности данных процессов, так и о задержке реализации эффектов терапии. При этом необходимо отметить, что на сегодняшний день опубликован целый ряд исследований, в которых показана ассоциация тяжести течения болезни с уровнем Т-клеток, их фенотипами и секретируемыми цитокинами [Chien J.W. et al., 2013, Pietruczuk M. et al., 2012, Machura E. et al., 2010].

Активация нейтрофилов и регуляция апоптоза представлены биологическими процессами «активация нейтрофилов» (GO:0042119 – neutrophil activation, $p=0,00178$), «иммунитет модулируемый нейтрофилами» (GO:0002446 – neutrophil mediated immunity, $p=0,00011$) и «регуляция программируемой клеточной гибели» (GO:0043067 – regulation of programmed cell death, $p=0,01386$). На фоне терапии экспрессия генов, формирующих данные онтологии, нарастала. Как уже отмечалось в предыдущей главе, согласно современным представлениям нейтрофил является основной эффекторной клеткой при тяжелой форме болезни [Selivanova P.A. et al., 2010]. Наряду с этим преобладающий паттерн нейтрофильного воспаления может являться причиной недостаточной эффективности ИКС, которые действуют преимущественно на эозинофильный компонент [Mann B.S. et al., 2006, Cundall M. et al., 2003]. Более того, в нескольких исследованиях продемонстрировано, что монотерапия ИКС в высоких дозах ассоциирована с достоверным приростом количества нейтрофилов, в то время как добавление сальметерола приводило к стабилизации количества нейтрофилов [Reid D.W. et al., 2003]. Однако, по данным нашего исследования данный эффект сальметерола не был реализован и в течение периода наблюдения на фоне комбинированной терапии, процессы, отражающие активность нейтрофилов, нарастали.

Также на фоне терапии в течение лечебного периода увеличивалась экспрессия генов, формирующих процессы, отражающие активацию и цитотоксичность НК – KEGG путь «цитотоксичность НК» (hsa04650 – Natural

killer cell mediated cytotoxicity, $p=0,00385$) и биологический процесс «активация НК» (GO:0030101 – natural killer cell activation, $p=0,02829$).

Необходимо отметить, что биологический процесс «активация НК» с учетом изменения экспрессии, ассоциированных с ним генов, был повышенным в группе ТЧБА в сравнении с резистентной формой болезни по результатам анализа генных онтологий.

Отличительной особенностью данных клеток является отсутствие необходимости предварительной сенситизации для реализации своих функций [Karimi K. et al., 2013]. После активации НК способны синтезировать и высвобождать широкий спектр преимущественно провоспалительных цитокинов, их активность ассоциирована с БГР и модуляцией Th2-клеток, в настоящее время в патогенезе астмы им все чаще отводится роль модуляторов воспаления [Thomas S.Y. et al., 2010, Umetsu D.T. et al., 2010, Koh Y.I. et al., 2012].

Во второй группе связанных кластеров на фоне терапии наблюдалось снижение экспрессии генов, формирующих такие онтологии как «положительная регуляция хемотаксиса Т-клеток» (GO:0010820 – positive regulation of T cell chemotaxis, $p=0,0350$), «положительная регуляция хемотаксиса моноцитов» (GO:0090026 – positive regulation of monocyte chemotaxis, $p=0,0384$), «положительная регуляция биосинтеза ФНО» (GO:0042535 – positive regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process, $p=0,0350$), «положительная регуляция продукции ИЛ-2» (GO:0032743 – positive regulation of interleukin-2 production, $p=0,0384$), «врожденный иммунный ответ» (GO:0045087 – innate immune response, $p=0,0376$), «процессинг антигена и презентация экзогенного пептида через главный комплекс гистосовместимости класса I» (GO:0002479- antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, $p=0,00118$) и «регуляция иммунной системы» (GO:0002682 – regulation of immune system process, $p=0,01936$). Снижение описанных процессов, вероятно, можно отнести к эффектам комбинированной базисной противовоспалительной терапии.

К онтологиям, ассоциированным с патогенезом БА, можно отнести и «метаболизм С21-стероидных гормонов» (GO:0008207 – C21-steroid hormone metabolic process, $p=0,03368$). Данный биологический процесс зарегистрирован в рамках кластера 6, экспрессия генов которого имела тенденцию к увеличению в первые 12 недель терапии и к снижению во второй половине периода наблюдения. Вероятно, начальное повышение экспрессии данного процесса ассоциировано с развитием компенсаторных функций, а последующее снижение может быть следствием угнетения эндогенной секреции кортикостероидов на фоне получения высоких доз ИКС и сохраненной чувствительности кортикостероидного рецептора [Bakkeheim E. et al., 2010]. Необходимо также отметить, что близкая по функциональности онтология «процесс биосинтеза С21-стероидных гормонов» (GO:0006700) зарегистрирована в рамках анализа генных онтологий в данном исследовании.

Генами шестого кластера был сформирован биологический процесс «регуляция апоптоза гладкомышечных клеток» (GO:0034391 -regulation of smooth muscle cell apoptotic process, $p=0,04245$), что может быть отражением процесса ремоделирования в бронхах [Korshunov V.A. et al., 2008].

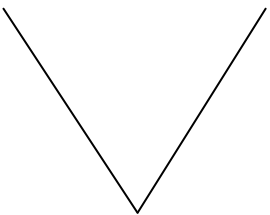
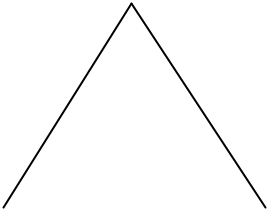
Сразу в составе генов двух кластеров 9 и 4 зарегистрированы биологические процессы «метаболизм ксенобиотиков» (GO:0006805 – xenobiotic metabolic process, $p=0,00170$ (9) и GO:0006805 – xenobiotic metabolic process, $p=0,0351$ (4)). Однако при сопоставлении изменения экспрессии генов, формирующих данные онтологии, с терапией представляется затруднительной интерпретация снижения на фоне регулярного приема комбинированного препарата в высоких дозах.

Также в составе генов двух кластеров 9 и 5 зарегистрированы такие биологические процессы как «вирусная транскрипция» (GO:0019083 – viral transcription, $p<0,00001$ и $p=0,00020$). Однако, учитывая клинко-функциональную характеристику данной группы и отсутствие признаков вирусного поражения верхних дыхательных путей, как на момент включения, так и в течение лечебного периода, данные процессы могут и не быть прямо ассоциированы с механизмами астмы.

Группа ТРБА. Закономерности изменения экспрессии группы кластеров генов были соотнесены со статистически значимыми KEGG путями и генными онтологиями, ассоциированными с механизмами астмы (Таблица 9).

Таблица 9

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, $p=0,00429$ (1) GO:0006691 – leukotriene metabolic process, $p<0,00001$ (1) GO:0006954 – inflammatory response, $p=0,00141$ (1) GO:0033604 – negative regulation of catecholamine secretion, $p=0,00188$ (1) GO:0048242 -epinephrine secretion, $p=0,00188$ (1) GO:0045628 – regulation of T-helper 2 cell differentiation, $p=0,00188$ (1) GO:0045087 – innate immune response, $p=0,00318$ (1) GO:0002446 -neutrophil mediated immunity, $p=0,00422$ (1) GO:0003707 – steroid hormone receptor activity, $p=0,0164$ (1) GO:0032648 – regulation of interferon-beta production, $p=0,00307$ (5) GO:0032760 – positive regulation of tumor necrosis factor production, $p=0,00444$ (5) GO:0002281 – macrophage activation involved in immune response, $p=0,00492$ (5) GO:0045351 – type I interferon biosynthetic process, $p=0,00711$ (5) GO:0002360 – T cell lineage commitment, $p=0,03508$ (6) GO:0019885 – antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I, $p<0,03508$ (6) hsa05100 – Bacterial invasion of epithelial cells, $p=0,03957$ (7) GO:0004896 – cytokine receptor activity, $p=0,00235$ (7)
	GO:0019083 – viral transcription, $p<0,00001$ (2) GO:0002479 – antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, $p<0,00001$ (2) GO:0005164 – tumor necrosis factor receptor binding, $p=0,01544$ (2) hsa05310 – Asthma, $p=0,00013$ (3) hsa04612 – Antigen processing and presentation, $p=0,00216$ (3) hsa05150 -Staphylococcus aureus infection, $p=0,02619$ (3) GO:0019083 – viral transcription, $p<0,00001$ (3)

GO:0002504 – antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II, p<0,00001 (3) hsa05310 – Asthma, p=0,00064 (9) hsa05150 -Staphylococcus aureus infection, p=0,01580 (9) GO:0019083 – viral transcription, p<0,00001 (9) GO:0002504 – antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II, p<0,00001 (9) GO:0050852 – T cell receptor signaling pathway, p<0,00001 (9) GO:0031295 – T cell costimulation, p=0,00011 (9) GO:0060333 – interferon-gamma-mediated signaling pathway, p=0,00297 (9) GO:0043312 – neutrophil degranulation, p=0,00438 (9)

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

В первой группе связанных кластеров гены сформировали 2 KEGG пути и 13 генных онтологий, вероятно, ассоциированных с механизмами астмы. При этом подавляющее большинство онтологий и характер изменения экспрессии генов, формирующих их, во времени оказались сопоставимыми с таковыми в группе ТЧБА. К таким процессам можно отнести онтологии двух функциональных направлений – регуляция иммунного ответа и изменение активности Т-клеток: «воспалительный ответ» (GO:0006954 – inflammatory response, p=0,00141), «регуляция дифференцировки Т-хелперов 2» (GO:0045628 – regulation of T-helper 2 cell differentiation, p=0,00188), «врожденный иммунный ответ» (GO:0045087 – innate immune response, p=0,00318), «иммунитет модулируемый нейтрофилами» (GO:0002446 -neutrophil mediated immunity, p=0,00422), «регуляция продукции ИФН-β» (GO:0032648 – regulation of interferon-beta production, p=0,00307), «положительная регуляция продукции ФНО» (GO:0032760 – positive regulation of tumor necrosis factor production, p=0,00444), «активация макрофагов, вовлеченных в иммунный ответ» (GO:0002281 – macrophage activation involved in immune response, p=0,00492), «биосинтез ИФН первого типа» (GO:0045351 – type I interferon biosynthetic process, p=0,00711), «повышение формирования Т-клеток» (GO:0002360 – T cell lineage commitment, p=0,03508), «процессинг антигена и презентация антигена эндогенного пептида через главный комплекс гистосовместимости класса I» (GO:0019885 – antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I, p<0,03508), «активность рецепторов хемокинов» (GO:0004896 – cytokine receptor activity, p=0,00235), «метаболизм лейкотриенов» (GO:0006691 – leukotriene metabolic process, p<0,00001).

Наряду с этим, в данной группе связанных кластеров генов зарегистрированы пути и биологические процессы, которые характерны только для данной группы.

К такой онтологии можно отнести KEGG путь «метаболизм азота» (hsa00910 – Nitrogen metabolism, p=0,00429). 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

мониторировании течения болезни и оценки риска обострений [Cabral A.L. et al., 2009, Sunyer J. et al., 2002, Comhair S.A. et al., 2005].

В исследовании Matsunaga K. et al., 2013 продемонстрировано, что выдыхаемая фракция оксида азота повышена у большинства тяжелых пациентов, несмотря на терапию ИКС и даже назначение системных кортикостероидов (СКС) приводило к падению данного показателя только у половины пациентов. Результаты этого исследования представляют особый интерес при их сопоставлении с данными оценки активности бета2-агонистов в условиях оксидативного стресса. Так, сразу в двух исследованиях, проведенных в 2009 и 2011 гг. продемонстрировано, что на фоне высокой пероксидазной активности и уровня оксида азота в дыхательных путях при астме происходит нитрирование и, как следствие, изменение структурных и функциональных свойств таких бета2-агонистов как фенотерол, метапротеренол и сальбутамол [Reszka K.J. et al., 2009, Reszka K.J. et al., 2011]. При этом нитрированный сальбутамол характеризуется сниженным аффинитетом к бета2-адренорецептору в сравнении с нативной молекулой лекарства [Reszka K.J. et al., 2011].

Таким образом, данный механизм может лежать в основе недостаточной эффективности, как терапии скорой помощи, так и комбинированной терапии в составе ИКС и бета2-агониста длительного действия.

Отличительными онтологиями являются также биологические процессы «негативная регуляция секреции катехоламинов» (GO:0033604 – negative regulation of catecholamine secretion, $p=0,00188$), «секреция эпинефрина» (GO:0048242 - epinephrine secretion, $p=0,00188$) и молекулярная функция «активность рецептора стероидов» (GO:0003707 – steroid hormone receptor activity, $p=0,0164$). Таким образом, на фоне терапии высокими дозами ИКС, вероятно, по принципу обратной отрицательной связи наблюдается снижение экспрессии эндогенного эпинефрина и, как следствие, «ослабление» негативной регуляции секреции катехоламинов. Однако регистрация генных онтологий, отражающих процессы эндогенной секреции кортикостероидов, вероятно, может свидетельствовать об их значении в механизмах резистентности к терапии ИКС.

Так, в 2005 году учеными Feng J.T. и Hu C.P. на основе проведенных экспериментов была выдвинута гипотеза, согласно которой у астматиков нарушен процесс секреции эндогенного адреналина вследствие избыточной экспрессии фактора роста нерва, что приводит к снижению объема медуллярной ткани надпочечников [Feng J.T. et al., 2005]. В нескольких исследованиях продемонстрировано, что глюкокортикоиды способны индуцировать трансформацию норадреналина в адреналин [Kvetnansky R. et al., 2006, Yamaguchi-Shima S. et al., 2007]. При этом высокие концентрации глюкокортикоидов оказывают протективное действие на процессы трансформации медуллярных клеток в нейроны [Hodel A., 2001, Grumolato L. et al., 2003].

Сопоставление результатов этих исследований с паттерном изменения активности онтологий на основе оценки экспрессии генов (снижение экспрессии генов, формирующих биологические процессы в первые 12 недель терапии с дальнейшим ростом в оставшийся период), вероятно, может свидетельствовать о

том, 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 нашего исследования, могут рассматриваться как компоненты неэффективности терапии ИКС при данной форме болезни.

Во второй группе связанных кластеров зарегистрировано 3 KEGG пути и 11 генных онтологий, вероятно, ассоциированных с механизмами астмы. Также 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 – Asthma, $p=0,00013$ и $p=0,00064$). При интерпретации этого результата, необходимо отметить, что данный путь сформирован генами, которые имеют отношение к установленным механизмам патогенеза болезни, и в группе легкой БА на фоне терапии экспрессия генов, формирующих данный путь, закономерно снижалась в течение всего периода наблюдения. В группе ТРБА экспрессия генов данного пути в течение первых трех месяцев повышается, а ее постепенное снижение регистрируется только в оставшиеся 12 недель. Подобная картина может отражать низкую эффективность и длительный период реализации эффектов базисной противовоспалительной терапии.

Другим важным, с точки зрения механизмов астмы, KEGG путем, зарегистрированным в данной группе пациентов, является «инфекция *Staphylococcus aureus*» (hsa05150 – *Staphylococcus aureus* infection, $p=0,02619$, $p=0,01580$).

При инфекционных заболеваниях верхних дыхательных путей показано, что энтеротоксин золотистого стафилококка индуцирует продукцию IgE, что посредством активации тучных клеток приводит к повышению активности воспаления [Zele van T. et al., 2008].

В более поздних исследованиях показано, что данная модель персистенции воспаления применима и к астме. Так в 2011 г. Kowalski M.L. et al. опубликовано исследование ассоциации уровня энтеротоксин-специфического IgE *Staphylococcus aureus* с ТРБА и параметрами ее течения. Так, в группе пациентов с терапевтической резистентностью уровень энтеротоксин-специфического IgE был в 3 раза выше в сравнении с терапевтически чувствительными пациентами. Более того, данный параметр был достоверно ассоциирован с более низкими показателями ФВД и более высокими показателями обратимости бронхиальной обструкции. Практически аналогичные результаты были воспроизведены в исследовании, проведенном Bachert C. et al. в 2012 году.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентифицированные молекулярные механизмы и генетические характеристики позволят сфокусировать внимание научной общественности на перспективных направлениях изучения механизмов тяжелой БА и феномена терапевтической резистентности, открывают возможности применения новых терапевтических мишеней. Наряду с высокой теоретической ценностью данные, полученные в рамках исследования, позволят оптимизировать мероприятия мониторинга и фармакотерапевтические подходы тяжелых форм БА.

КОНЦЕПЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализируя данные современных исследований, посвященных изучению механизмов формирования БА, с большой долей вероятности можно утверждать, что в основе тяжелой БА лежат патофизиологические механизмы, отличные от таковых при легкой и среднетяжелой формах болезни. Данные механизмы и являются основой формирования неконтролируемого течения и терапевтической резистентности, в связи с чем, отсутствует возможность достижения контроля болезни на фоне применения адекватной базисной противовоспалительной терапии, действующей на основные терапевтические мишени – рецепторы кортикостероидов и бета2-агонистов [Siroux V. et al., 2011, Morjaria J.V. et al., 2011].

В течение уже нескольких десятилетий рецепторы кортикостероидов и бета2-агонистов являются практически единственными терапевтическими мишенями при БА. Лекарственные препараты, действующие на данные мишени, входят в состав всех рекомендованных ступеней лечения, а степень клинического ответа на терапию является критериями контролируемого течения болезни и феномена терапевтической резистентности. С учетом этого с большой долей вероятности можно утверждать, что патогенетические механизмы тяжелых форм БА лежат вне зоны реализации эффектов данных групп препаратов.

Опубликованы результаты исследований, посвященных идентификации молекулярных механизмов, которые могли бы быть использованы как в диагностических целях, так и стать новыми таргетными мишенями терапии БА. Но количество таких работ, выполненных в группе ТРБА, достаточно ограничено, и, как правило, каждое отдельное исследование характеризует только один биомаркер, не оценивая изменения и дисбаланс в молекулярных воспалительных каскадах в целом при данной форме болезни.

С целью минимизации методологических ограничений нами было спланировано и проведено по единому протоколу проспективное, интервенционное, клиническое исследование в параллельных группах длительностью 6 месяцев. А применение проспективного анализа полногеномной экспрессии генов с сопоставлением клинико-функциональных параметров течения болезни на фоне терапии позволило существенно расширить «область поиска» и установить наиболее вероятные механизмы формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности.

По результатам настоящего исследования факторами персистенции воспаления при ТЧБА являются ослабление противовирусного иммунитета,

снижение регуляции программируемой клеточной гибели на фоне активации нейтрофилов и активация натуральных киллеров. А факторами формирования феномена терапевтической резистентности являются снижение активности натуральных киллеров и вовлечение в патогенез суперантигена стафилококка.

Наряду с идентификацией новых механизмов, в рамках проведенного полногеномного исследования, установлено, что тяжелая терапевтически чувствительная и резистентная БА ассоциированы с молекулярными механизмами ограничения эффективности ИКС и ДДБА, такими как повышение активности метаболизма ксенобиотиков и сульфатирование, нитрирование молекул ДДБА и подавление секреции эндогенного эпинефрина.

ВЫВОДЫ

1. При проведении контролируемого клинического исследования установлено, что 50% пациентов с тяжелой БА не достигает контроля болезни и по окончании лечебного периода продолжительностью 6 месяцев соответствует критериям терапевтической резистентности. Группа терапевтически резистентных пациентов характеризуется значительно менее выраженной динамикой клинико-функциональных показателей и отсутствием достижения контроля в сравнении с терапевтически чувствительными пациентами на фоне базисной противовоспалительной терапии.
2. Все сравниваемые группы характеризуются различными исходными профилями экспрессии генов, в рамках периода наблюдения на фоне базисной противовоспалительной терапии эти различия нарастают преимущественно за счет изменения экспрессии генов в группе терапевтически резистентной БА.
3. В группе тяжелой терапевтически чувствительной БА установлено снижение активности генов, ассоциированных с такими процессами, как «сигнальный путь интерферона 1 типа», «ответ на вирус» и «регуляция программируемой клеточной гибели». В группе тяжелой терапевтически резистентной БА установлено снижение активности генов, ассоциированных с биологическим процессом «активация натуральных киллеров».
4. На фоне терапии в группе тяжелой терапевтически чувствительной БА повышается уровень экспрессии генов, формирующих биологические процессы, характеризующие активацию нейтрофилов и натуральных киллеров. Группа терапевтически резистентной БА характеризуется повышением в первые 12 недель терапии и последующим снижением уровня экспрессии генов, формирующих KEGG путь «инфекция *Staphylococcus aureus*».
5. Ряд генетических характеристик свидетельствует о наличии механизмов, ограничивающих эффективность ИКС и ДДБА в случае тяжелых форм болезни – высокая активность метаболизма ксенобиотиков, нитрирование ДДБА, регуляция секреции эндогенных стероидов, задержка реализации эффектов терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Динамика генной экспрессии у больных тяжелой терапевтически резистентной астмой на фоне терапии [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, И.В. Салтыкова, И.А. Деев, П.А. Селиванова // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2014. – Том 13. – № 1. – С. 47–55. (0,331)
2. Генетические паттерны тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмы по данным транскриптомного исследования: анализ генных онтологий и KEGG-путей [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, И.В. Салтыкова, И.А. Деев, П.А. Селиванова // **Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные науки.** – 2014. – Вып. 1. – С. 121–131. (0,034)
3. Heterogeneous levels of CD86+CD209+ and CD83+CD209+ dendritic cells in patients with different severity of bronchial asthma [Текст] / E. Kremer, N. Kirillova, E. Kulikov, T. Perevozchikova, E. Fajt, S. Logvinov, L. Ogorodova // *Eur. Respiratory J.* – 2013. – Vol. 42, suppl. 57. – P. 177s.
4. High prevalence of FEV1 decline without diagnose [Текст] / S. Fedosenko, E. Kulikov, O. Kobyakova, M. Muzykina, I. Deev, E. Starovoytova, N. Kirillova, N. Kosova, V. Boykov, O. Laricheva, Y. Chatorova, S. Mazeina, A. Almikeeva. // *Eur. Respiratory J.* – 2013. – Vol. 42, suppl. 57. – P. 494s.
5. Nitric oxide oxidation products in bronchoalveolar lavage of patients with different severity of asthma [Текст] / P. Selivanova, E. Kulikov, N. Kirillova, O. Kozina, M. Freidin, L. Ogorodova, S. Fedosenko. // *Eur. Respiratory J.* – 2013. – Vol. 42, suppl. 57. – P. 170s.
6. Молекулярно-генетические аспекты различных фенотипов хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы [Текст] / Л.М. Огородова, Б.А. Черняк, О.В. Козина, М.Б. Фрейдин, И.Н. Трофименко, Е.С. Куликов, П.А. Селиванова // **Пульмонология.** – 2013. – № 1. – С. 5–11. (0,738)
7. Молекулярные и фармакогенетические механизмы тяжелой бронхиальной астмы [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, И.А. Деев, П.А. Селиванова, С.В. Федосенко, Н.А. Кириллова // **Вестник Российской академии медицинских наук.** – 2013. – № 3. – С. 15–23. (0,641)
8. Молекулярные механизмы тяжелой бронхиальной астмы [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, И.А. Деев, П.А. Селиванова, С.В. Федосенко, Н.А. Кириллова // **Молекулярная медицина.** – 2013. – № 1. – С. 24–32. (1,407)
9. Распространенность снижения ОФВ1 среди посетителей Центров здоровья на территории Томской области [Текст] / В.А. Бойков, О.С. Кобякова, И.А. Деев, Е.С. Куликов, Е.А. Старовойтова, Н.А. Кириллова, Н.В. Косова, М.Н. Музыкина, О.Н. Ларичева, Ю.Г. Чаторова, С.В. Мазейна, А.А. Альмикеева // **Кардиоваскулярная профилактика и реабилитация.** – 2013. – Т. 12, спец. вып. (апрель). – С. 43–44.
10. Распространенность снижения параметров функции внешнего дыхания

- среди посетителей центров здоровья на территории Томской области [Текст] / В.А. Бойков, О.С. Кобякова, И.А. Деев, Е.С. Куликов, Е.А. Старовойтова, Н.А. Кириллова, Н.В. Косова, М.Н. Музыкина, О.Н. Ларичева, Ю.Г. Чаторова, С.В. Мазеина, А.А. Альмикеева // Материалы V Съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока. – Благовещенск, 2013. – С. 138–139.
11. Состояние функции внешнего дыхания у пациентов с ожирением [Текст] / В.А. Бойков, О.С. Кобякова, И.А. Деев, Е.С. Куликов, Е.А. Старовойтова // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2013. – № 1. – С. 86–92. (0,331)
 12. Сравнительная оценка дифференциальной экспрессии генов при тяжелой бронхиальной астме [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдin, И.В. Салтыкова, И.А. Деев, П.А. Селиванова // **Фундаментальные исследования**. – 2013. – № 12. – С. 231-234. (0,296)
 13. Differential expression of the β 2-adrenoreceptor and M3-cholinoreceptor genes in bronchial mucosa of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease [Текст] / P.A. Selivanova, E.S. Kulikov, O.V. Kozina, I.N. Trofimenko, M.B. Freidin, B.A. Chernyak, L.M. Ogorodova // **Ann Allergy Asthma Immunol**. – 2012. – Vol. 108, N 1. – P. 39–43. (3,449)
 14. Expression of the beta2-adrenoreceptor and M3-cholinoreceptor genes in patients with different severity of asthma and BHR level [Текст] / P. Selivanova, E. Kulikov, N. Kirillova, M. Freyidin, L. Ogorodova // *Eur. Respiratory J.* – 2012. – Vol. 40, suppl. 56. – P. 341s.
 15. Helminth extract from *Opisthorchis felinus* suppresses allergic inflammation through modulation of dendritic cells phenotype [Текст] / E. Kremer, N. Kirillova, E. Kulikov, L. Ogorodova, S. Logvinov, T. Perevozchikova, E. Fajt // *Eur. Respiratory J.* – 2012. – Vol. 40, suppl. 56. – P. 420s.
 16. Low level of FoxP3 in bronchial asthma (BA) is associated with frequent exacerbations [Текст] / N. Kirillova, E. Kremer, L. Ogorodova, I. Deev, E. Kulikov, O. Fedorova, P. Selivanova // *Eur. Respiratory J.* – 2012. – Vol. 40, suppl. 56. – P. 340s.
 17. T-reg cells levels in smoking and non-smoking patients with asthma [Текст] / E. Kulikov, N. Kirillova, E. Kremer, I. Deev, L. Ogorodova, P. Selivanova, O. Fedorova. // *Eur. Respiratory J.* – 2012. – Vol. 40, suppl. 56. – P. 414s.
 18. Фармакогенетика неконтролируемой бронхиальной астмы [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдin, И.А. Деев, А.А. Рудко, П.А. Селиванова // **Российский аллергологический журнал**. – 2012. – № 6. – С. 6–14. (0,385)
 19. Effect of adenosine receptors stimulation on generation of CD1alowCD14+CD209+ cells in patients with bronchial asthma [Текст] / K. Yuryeva, S. Ryzhov, J. Yakovleva, E. Korotkaya, K. Goremykin, E. Kulikov, A. Sazonov // *Eur. Respiratory J.* – 2011. – Vol. 38, suppl. 55. – P. 579s.
 20. Kulikov, E. Comparative efficacy of the therapy strategies for the asthma control maintenance in real clinic practice [Текст] / E. Kulikov, L. Ogorodova, I. Deev // *Eur. Respiratory J.* – 2011. – Vol. 38, suppl. 55. – P. 152s.
 21. Kulikov, E. Efficiency of different strategies of asthma control achievement in

- real clinical practice [Текст] / E. Kulikov, L. Ogorodova, I. Deev // *Eur. Respiratory J.* – 2011. – Vol. 38, suppl. 55. – P. 152s.
22. Аденозинзависимая регуляция экспрессии паракринных факторов в моноцитах венозной крови человека [Текст] / С.В. Рыжов, К.С. Юрьева, К.В. Горемыкин, Е.В. Короткая, И.В. Салтыкова, Ю.А. Яковлева, Е.С. Куликов, О.С. Федорова, Е.Э. Кремер, Н.С. Фаттахов, А.Э. Сазонов // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2011. – № 3. – С. 54–62. (0,331)
 23. Динамика функциональных показателей при применении различных схем лечения бронхиальной астмы: данные многоцентрового исследования СТРЕЛА-АСТ [Текст] / Л.М. Огородова, Е.С. Куликов, И.А. Деев, Б.А. Черняк, Р.С. Фассахов // **Клиническая медицина.** – 2011. – № 4. – С. 36–41. (0,573)
 24. Использование метода лазерной спектроскопии в оценке эффективности терапии пациентов с тяжелой бронхиальной астмой [Текст] / Л.А. Краснобаева, П.А. Селиванова, Е.А. Старовойтова, Е.С. Куликов, Н.А. Кириллова, Ю.В. Кистенев, Л.М. Огородова, О.Ю. Никифорова, В.А. Фокин, А.В. Мочула, О.В. Мочула // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2011. – № 4. – С. 15–21. (0,331)
 25. Пат. 2433401 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способы прогнозирования риска развития терапевтической резистентности у больных бронхиальной астмой / Л. Огородова, М. Фрейдин, И. Салтыкова, Е. Куликов, П. Селиванова, А. Сазонов. – № **2010129482/15**; заявл. 15.07.2010 ; опубл. 10.11.2011, Бюл. № 31. – 13 с.
 26. Полногеномный анализ ассоциаций аллергических заболеваний с молекулярными маркерами у русских жителей западной Сибири [Текст] / М.Б. Фрейдин, Е.Ю. Брагина, О.С. Федорова, И.А. Деев, Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, В.П. Пузырев // **Молекулярная биология.** – 2011. – Т. 45, № 3. – С. 464–472. (0,318)
 27. Morphological and molecular characteristics of “Difficult” Asthma [Текст] / P.A. Selivanova, E.S. Kulikov, O.V. Kozina, E.A. Gereng, M.B. Freidin, L.M. Ogorodova // **J Asthma.** – 2010. – Vol. 47, N 3. – P. 269–275. (1,848)
 28. Динамика газовыделений больных тяжелой бронхиальной астмой на фоне базисной противовоспалительной терапии [Текст] / Е.С. Куликов, Л.А. Краснобаева, П.А. Селиванова, Е.А. Старовойтова, Н.А. Кириллова, Ю.В. Кистенев, А.В. Мочула, М.В. Мочула, Л.М. Огородова, В.А. Фокин, С.И. Бажин, Д.В. Эйдензон // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2010. – № 6. – С. 55–61. (0,331)
 29. Исследование газовыделений больных тяжелой бронхиальной астмой [Текст] / Л.А. Краснобаева, П.А. Селиванова, Е.А. Старовойтова, Е.С. Куликов, Н.А. Кириллова, А.В. Мочула, О.В. Мочула // *Медицинский академический журнал.* – 2010. – № 5. – С. 218–219.
 30. Куликов, Е.С. Факторы, ограничивающие достижение контроля бронхиальной астмы, в условиях реальной клинической практики [Текст] / Е.С. Куликов, И.А. Деев // *Человек и лекарство: сборник материалов конгресса.* – М., 2010. – С. 656–657.

31. Эффективность стратегий достижения и поддержания контроля над бронхиальной астмой в условиях реальной клинической практики: данные многоцентрового исследования СТРЕЛА-АСТ [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, А.С. Белевский, Ф.И. Петровский, А.Г. Чучалин // **Пульмонология.** – 2010. – № 1. – С. 80–86. (0,738)
32. Профили генной экспрессии при тяжелой бронхиальной астме и механизмы терапевтической резистентности [Текст] / Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов, О.И. Уразова, И.В. Петрова, П.А. Селиванова, Е.С. Куликов, Е.Э. Кремер, И.В. Салтыкова, Е.А. Старовойтова, А.Г. Андросова, И.В. Маринкина, Е.Б. Михайловская, О.С. Киселева // Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы : сборник тезисов. – М., 2009. – С. 84–85.
33. Сравнительная эффективность стратегий достижения контроля в условиях реальной клинической практики: данные многоцентрового исследования СТРЕЛА [Текст] / Л.М. Огородова, А.С. Белевский, Е.С. Куликов, Ф.И. Петровский, И.А. Деев, А.Г. Чучалин // **Пульмонология.** – 2009. – № 6. – С. 69–77. (0,738)
34. Характеристика эпидемиологических и молекулярных взаимоотношений аллергических и гельминтных болезней в эндемическом очаге описторхоза [Текст] / Л.М. Огородова, О.С. Федорова, М.Б. Фрейдин, М.В. Васильева, Н.А. Черевко, А.Э. Сазонов, И.В. Петрова, И.В. Салтыкова, Е.Ю. Брагина, Е.С. Куликов, И.А. Деев // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2008. – Т.7, № 4. – С. 37–43. (0,331)

Список сокращений и условных обозначений

БА	бронхиальная астма
БАЛ	бронхоальвеолярный лаваж
БГР	бронхиальная гиперреактивность
ГКР	глюкокортикоидный рецептор
ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ДДБА	длительно действующие бета2-агонисты
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИКС	ингаляционные кортикостероиды
ИЛ	интерлейкин
ИФН	интерферон
кДНК	комплементарная ДНК
МОС	минутная объемная скорость
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
НК	натуральный киллер
ОФВ1	объем форсированного выдоха за первую секунду
ПСВ	пиковая скорость выдоха
СКС	системные кортикостероиды
ТРБА	терапевтически резистентная бронхиальная астма
ТЧБА	терапевтически чувствительная бронхиальная астма
ФВД	функция внешнего дыхания
ФЖЕЛ	форсированная жизненная емкость легких
ФНО	фактор некроза опухолей
ФП	флутиказона пропионат
ATS	American Thoracic Society (Американское торакальное общество)
CD	cluster designation (маркеры клеточной поверхности лейкоцитов)
FC	fold-change (кратное изменение)
GINA	The Global Initiative for Asthma (регламентирующий документ «Глобальная инициатива по астме»)
GO	gene ontology (генная онтология)
IgE	иммуноглобулин класса E
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Киотская Энциклопедия Генов и Геномов)
PC20	мера бронхиальной гиперреактивности (предельная концентрация метахолина, вызывающая падение ОФВ1 на 20%)
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
TGF- β	transforming growth factor- β (трансформирующий ростовой фактор бета)
Th	T хелпер
TLR	Toll-like рецепторы

Подписано в печать **XX.XX.XXXX** г.
Усл.печ.листов **0,65** Печать на ризографе.
Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08
Заказ № **XX** Тираж **XXX** экземпляров