

На правах рукописи

Еремеева Анна Викторовна

Патогенетическая роль транскрипционного фактора Foxp3 в кооперативной регуляции транскрипционных факторов c-Maf, GATA3 и T-bet при различных вариантах бронхиальной астмы

14.01.25 - Пульмонология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2016

Работа выполнена на кафедре госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого Федерального Государственного образовательного учреждения Высшего Образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства Здравоохранения РФ.

Научный руководитель: **Сорокина Лада Николаевна**
доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты: **Мазуров Вадим Иванович**
академик РАМН, доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой терапии и
ревматологии им. Э.Э.Эйхвальда ФГБОУ ВО
«Северо-Западный государственный
медицинский университет им.
И.И.Мечникова» МЗ РФ, главный терапевт и
ревматолог СЗФО РФ

Харитонов Михаил Анатольевич
доктор медицинских наук, профессор
I кафедры (терапии усовершенствования
врачей) ФГБОУ ВО «Военно-медицинская
академия имени С.М. Кирова» МО РФ,
заместитель главного пульмонолога МО РФ

Ведущая организация: Санкт-Петербургский Государственный университет

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 201_ г. в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д.208.090.02 при Первом Санкт-Петербургском Государственном медицинском университете имени академика И.П.Павлова (197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена 12, зал заседаний Ученого Совета, ауд.12, 6 этаж).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Первого Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета имени академика И.П.Павлова по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6-8.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор медицинских наук,
профессор

Альберт Леонидович Александров

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Бронхиальная астма представляет собой одно из самых часто встречающихся заболеваний не только на территории Российской Федерации, но и в мире. По данным различных источников (Чучалин А.Г., Илькович М.М., 2009), сохраняется непрерывное нарастание заболеваемости бронхиальной астмой, увеличивается распространенность этого заболевания в различных государствах, достигая уровня 10% в детской и в среднем 4-10% - во взрослой популяции. Согласно исследованию GARD, направленному на выявление истинной распространенности бронхолегочной патологии в мире, симптомы БА выявлялись у 25,7% опрошенного населения России (Chuchalin A.G., Khaltayev N., Antonov N.S. et al, 2014), что значительно превышает приведенные данные официальной статистики.

В связи с высокой социально-экономической значимостью бронхиальной астмы и трудностями ее лечения становится актуальным поиск новых возможных мишеней терапии и более глубокое изучение патогенеза заболевания, в частности изучение межклеточных взаимодействий. Известно, что в патогенезе бронхиальной астмы над другими патологическими процессами доминирует воспаление, ассоциированное с цитокинами Т-лимфоцитов. Предполагается, что ключевым звеном в данном процессе является нарушение регуляции определенных транскрипционных факторов (Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И., 2010). В этой связи представляется актуальным поиск дефектов и звеньев, а также анализ нарушений, вызванных этими дефектами. Одним из таких транскрипционных факторов является Foxp3.

В процессе изучения Foxp-группы транскрипционных факторов, включающей Foxp1, Foxp2 и Foxp3, содержащих идентичный ДНК-связывающий домен, предполагалось, что все представители данной группы влияют на экспрессию генов Т-клеток. Однако исследования показали, что только Foxp3 обладает данной способностью, в частности, способностью подавлять выработку IL-2, IL-4, IFN- γ (Bettelli E., Dastrange M., Oukka M., 2005).

В последние десятилетия стали появляться сведения о роли нового семейства таких факторов, как GATA, при различных патологических процессах (Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., 2012). К настоящему времени накоплены сведения о вкладе этих белков в регуляцию органогенеза, дифференцировку и пролиферацию клеток, в том числе – в развитие лимфоцитов. В частности, белок GATA3 необходим для дифференцировки Т-лимфоцитов и может служить как активатором, так и репрессором транскрипции их генов.

В настоящее время не вызывает сомнения, что Foxp3 наряду с GATA3, c-Maf и T-bet, является одной из ключевых составляющих, необходимых для дифференцировки Т-клеток. Кооперативные взаимодействия данных факторов представляют большой интерес с позиции изучения патогенеза воспалительных

заболеваний легких, так как всё больше исследований выявляет повышение уровня GATA3 и c-Maf у пациентов, страдающих бронхиальной астмой и связанное с ним изменение уровня экспрессии T-bet и Foxp3 (Vale-Pereira S., Todo-Bom A., Geraldес L. et al., 2011).

Степень разработанности темы

В ходе научных исследований было убедительно доказано, что GATA3 играет важнейшую роль в развитии аллергических заболеваний, участвуя в регуляции высвобождения цитокинов из Th2 (Christodoulopoulos P., Cameron L., Nakamura Y. et al., 2001; Maneechotesuwan K., Xin Y., Ito K. et al., 2007), также было продемонстрировано возрастание экспрессии GATA3 у больных бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми людьми (Трофимов В.И., Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. и др. 2013)

Было установлено, что дефекты GATA-белков выявляются при заболеваниях крови, онкозаболеваниях легких, желудочно-кишечного тракта, яичников (Kong S.Y., Kim K.S., Kim J. et al., 2016). Также имеются данные о присутствии мутации гена Foxp3 у пациентов с IPEX – X-сцепленным заболеванием, проявляющимся энтеропатиями и полиэндокринопатиями (Vacchetta R., Barzagli F., Roncarolo M.G. 2016).

В то же время большой научный интерес представляет изучение T-bet – транскрипционного фактора, вырабатываемого Т-лимфоцитами и оказывающего непосредственное влияние на дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Th1 посредством снижения уровня GATA-3 и подавления ее функций.

Хорошо известно, что Т-лимфоциты принимают участие в развитии иммунного ответа, опосредованного через IL-4 путь сигнализации, при бронхиальной астме, однако ни в отечественной, ни в иностранной научной литературе нет единого мнения о роли фактора c-Maf в данном процессе (Ray A., Cohn L. et al., 1999; Wierenga E.A., Walchner M., Kick G. et al., 1999).

Таким образом, можно предположить, что в Т-лимфоцитах существует многокомпонентная сеть антагонистичных друг другу систем транскрипционных факторов, которая может служить субстратом для формирования патологических путей, лежащих в основе различных клинических вариантов бронхиальной астмы.

Базируясь на опыте предыдущих исследований других транскрипционных факторов (Vale-Pereira S., Todo-Bom A., Geraldес L. et al., 2011, Ding J., Su J., Zhang L. et al., 2015), предполагается, что новый транскрипционный фактор Foxp3 может играть значительную роль в патогенезе бронхиальной астмы, в том числе при комплексном действии с другими транскрипционными факторами (T-bet, c-Maf, GATA3), а анализ их экспрессии позволит прогнозировать клинические особенности бронхиальной астмы.

Полученные к настоящему времени данные, свидетельствуют о том, что в физиологических условиях Foxp3 является репрессором двух факторов, являющихся ключевыми для экспрессии генов цитокинов, NF-κB (ядерный

фактор κВ - универсальный фактор транскрипции, влияющий на экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла) и NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток, семейство транскрипционных факторов, контролирующая активацию и функциональную активность клеток иммунной системы). В то же время в ряде научных исследований была показана (Charoval S., Dasgupta P., Dorsey N.J. et al., 2010) способность GATA3 подавлять экспрессию гена, кодирующего Foxp3, путем непосредственного связывания с промотором. Также было продемонстрировано, что Foxp3 негативно регулируется некоторыми цитокинами, например, IL-4 (Mantel P.Y., Kuipers H., Bouman O. et al., 2007).

Однако в настоящее время имеются противоположные данные. Так, было установлено, что экспрессия GATA3 необходима для поддержания высокого уровня Foxp3 в ходе реализации механизмов воспаления (Wohlfert E.A., Grainger J.R., Bouladoux N. et al., 2011). Таким образом, не существует единого мнения о реализации кооперативных взаимодействий данных транскрипционных факторов.

GATA3 играет ключевую и, подчас, определяющую роль в дифференцировке и синтетической активности Т-лимфоцитов. Обнаружено, что избыточная экспрессия усиливает выработку цитокинов Th2 (Tamauchi H., Terashima M., Ito M. et al., 2004; Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А. и др., 2010).

По данным зарубежных исследователей, в регуляции синтеза ключевых интерлейкинов Т-лимфоцитов, наряду с Foxp3 и GATA3, участвуют c-Maf, T-bet (Kwon S.J., Crespo-Barreto J., Zhang W. Et al., 2014, Hertweck A., Evans C.M., Eskandarpour M. et al., 2016). Дефицит или избыточное количество этих молекул в лимфоцитах, вероятно, оказывают эффект на функцию клеток и реализуются в изменении течения Th2-иммунного ответа и, соответственно, могут отражаться на клинических характеристиках заболевания.

Цель работы

Установить патогенетическую роль транскрипционных факторов Foxp3, GATA-3, c-Maf, T-bet при различных вариантах бронхиальной астмы.

Задачи

1. Определить экспрессию мРНК Foxp3, GATA3, c-Maf, T-bet при аллергической и неаллергической бронхиальной астме в сравнении с контрольной группой.
2. Выявить изменения экспрессии Foxp3, GATA3, c-Maf, T-bet в фазе обострения и ремиссии бронхиальной астмы, а также при разной тяжести течения заболевания.
3. Оценить изменение уровней экспрессии IgE и цитокинов (IL-4, IL-13, IL-17, IL-6, IFN-γ) в связи с изменениями экспрессии транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, c-Maf, T-bet при аллергической и неаллергической бронхиальной астме в фазе обострения и ремиссии у больных с разной тяжестью течения заболевания.

Научная новизна

1. Впервые определена роль Foxp3 в патогенезе бронхиальной астмы и его связь с клиническими особенностями заболевания.
2. Впервые проведено исследование с-Maf в мононуклеарах периферической крови у больных аллергической и неаллергической бронхиальной астмой в сравнении с группой практически здоровых лиц в зависимости от клинико-патогенетических особенностей заболевания.
3. Впервые установлен характер комплексного кооперативного действия транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, с-Maf, T-bet в регуляции функций Т-лимфоцитов при бронхиальной астме.

Практическая ценность работы

1. Разработан комплексный подход к анализу уровней экспрессии у больных АБА и НАБА мРНК Foxp3 GATA3 T-bet с-Maf и концентраций IL-17 для оценки и прогнозирования тяжести течения заболевания.
2. Определение уровней экспрессии мРНК GATA3 у больных АБА может быть рекомендовано при отборе больных для возможной таргетной терапии в диагностически сложных случаях.

Ценность научных работ соискателя

Результаты проведенных исследований внедрены в лечебную практику пульмонологического отделения клиники госпитальной терапии ФГБОУ ВО “Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова” Министерства Здравоохранения РФ (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 234-54-51, vnmineev@mail.ru, www.spb-gmu.ru), а также межклинического аллергологического отделения ПСПбГМУ им.акад.И.П.Павлова (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 234-24-75, www.spb-gmu.ru) и консультативно-диагностического центра на базе поликлиники №31 Петроградского района Санкт-Петербурга (197022, СПб, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. (812) 499-71-60, <http://poliklinika-31-spb-gmu-im.spb24.net>).

Методология и методы исследования

Методология проводимого исследования включает в себя различные этапы внутриклеточной регуляции транскрипционными факторами (Foxp3, GATA3, T-bet, с-Maf): внеклеточный уровень оценивается по концентрации цитокинов и иммуноглобулина Е, цитоплазматический уровень анализируется по экспрессии мРНК изучаемых регуляторов.

Во всех описанных методиках использовались мононуклеары периферической крови.

Выделение клеток выполняли посредством центрифугирования сразу после забора венозной крови (или максимум через 40 минут). Подготовленную кровь наслаивали на 3 мл градиента плотности и центрифугировали 30 минут при 400 G до формирования “кольца” мононуклеаров. Мононуклеары отбирали пипеткой и помещали в отдельную пробирку. Полученную клеточную взвесь трижды отмывали

физиологическим раствором (9 г/л, pH=7,2) и доводили концентрацию до 2×10^6 клеток/мл. Далее выделенные мононуклеары инкубировали в течение 60 минут в среде IMDM при 37 °С в чашках Петри для осаждения моноцитов на пластик, после чего клеточную взвесь дважды отмывали в среде IMDM при 1200 оборотах в минуту в течение 10 минут. Итоговое количество клеток доводили до концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток в 1мл среды IMDM.

Экспрессия мРНК транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf в мононуклеарах периферической крови исследовалась методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR).

Работа выполнялась на базе лаборатории на базе лаборатории Научно-Методического Центра по молекулярной медицине на базе ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Праймеры были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank).

- Foxp3
 - 5': 5'- TGGAGAGCCCAGCCATGAT-3'
 - 3': 5'- GCCACGTTGATCCCAGGTG -3'
- T-bet
 - 5': 5'- GATGTTTGTGGACGTGGTCTTG-3'
 - 3': 5'- CTTCCACACTGCACCCACTT-3'
- GATA3
 - 5': 5'- CGCCTGCGGGCTCTATC-3'
 - 3': 5'- CCTTCGCTTGGGCTTAATGA-3'
- c-Maf
 - 5': 5'- AAGGAGAAATACGAGAAGCTGGTGA-3'
 - 3': 5'- TGGGATCGCGTGTACACTCACATG-3'
- β-актин
 - 5': 5'- TTGTCTTTCAGCAAGGACTGG-3'
 - 3': 5'- CCACTTAACTATCTTGGGCTGTG-3'

Результат электрофореза фотографировали в ультрафиолетовом свете и анализировали в программе Gel-Pro3.1. Экспрессию мРНК транскрипционных факторов GATA3, T-bet, Foxp3, c-Maf оценивали относительно уровня β-актина.

Определение концентрации общего IgE сыворотки крови. Работа выполнена на базе кафедры госпитальной терапии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Выполнение исследования концентрации общего IgE сыворотки проводилось методом ИФА с применением стандартной методики при использовании коммерческих наборов (ООО Цитокин, Россия) на ИФА-анализаторе ИФА-анализаторе StatFlax 303+ с длиной волны 450 нм с построением с построением калибровочной кривой «от точки к точке».

Определение концентрации цитокинов плазмы. Работа выполнена на базе кафедры госпитальной терапии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Определение уровня цитокинов проводилось по стандартному протоколу методом ИФА на ИФА-анализаторе StatFlax 303+ с длиной волны

450 нм с построением калибровочной кривой «от точки к точке» с использованием коммерческих наборов производства eBioscience, США (IL-13, IL-4, IFN- γ) и ООО Цитокин, Россия (IL-6, IL-17).

Методы статистической обработки. Для анализа результатов исследований была сформирована база данных на основе программы SPSS (Statistical Package for the Social Science, (статистический пакет для социальных наук, русифицированная версия 13.0).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью методов параметрической и непараметрической статистики в соответствии с рекомендациями по обработке результатов медико-биологических исследований (Гланц С., 1998). Заключение о статистической значимости давалось при уровне вероятности ошибочного заключения не менее 0,05.

Степень достоверности результатов исследований

Работа выполнена на достаточном клинико-лабораторном материале.

Обоснованность выводов обусловлена репрезентативным материалом исследований, точностью выполнения методик исследования, большим количеством наблюдений, а также грамотной статистической обработкой.

Выводы диссертации логично обоснованы и вытекают из содержания проведенных исследований.

Апробация работы

Полученные в диссертации результаты были изложены в докладах на «Булатовских чтениях» (Санкт-Петербург, 2013); на 22-ом Конгрессе ERS (European Respiratory Society) в Вене (Австрия) в 2012 году; на 23 Конгрессе ERS (European Respiratory Society) в Барселоне (Испания) в 2013 году; на 24 Конгрессе ERS (European Respiratory Society) в Мюнхене (Германия) в 2014 году; на 25-м Конгрессе ERS (European Respiratory Society) в Амстердаме (Нидерланды) в 2015 году; на 24-м Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания в Москве в 2014 году; на 25-м Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания в Москве в 2015 году.

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ. Из них 5 - статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлены различные уровни экспрессии мРНК в составе микросети транскрипционных факторов при разных вариантах бронхиальной астмы. Ключевую роль при АБА играет GATA3, при НАБА – T-bet, Foxp3 – при всех вариантах бронхиальной астмы.
2. Установлена зависимость между уровнями Foxp3 и IL-17, проявляющаяся как в группе АБА, так и в группе НАБА и указывающая на развитие у больных дисбаланса в системе Treg/Th17 при нарастании тяжести течения заболевания.
3. Бронхиальная астма характеризуется развитием регуляторного дисбаланса, что проявляется в изменении цитокинового спектра при доминировании GATA3 – в сторону Th2-ассоциированных цитокинов, при доминировании

T-bet – в сторону Th1-ассоциированных цитокинов, при снижении Foxp3 – в сторону Th17-ассоциированных цитокинов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы исследования

Нами было обследовано 129 человек: 82 больных бронхиальной астмой (БА), 47 практически здоровых лиц.

Контрольная группа состояла из 47 практически здоровых лиц (14 (29,79%) мужчин и 33 (70,21%) женщин), средний возраст в контрольной группе был $33,42 \pm 3,56$. Включенные в эту группу лица должны были отвечать следующим критериям: отсутствие аллергических заболеваний, бронхиальной астмы и других острых и хронических заболеваний бронхолегочной системы; отсутствие другой хронической патологии; отсутствие острых заболеваний за 4 месяца до забора крови в настоящем исследовании; отсутствие отягощенной наследственности по каким-либо заболеваниям (в том числе, по аллергической патологии и бронхиальной астме).

Было выделено две группы больных БА. В группу с аллергическим вариантом и преимущественно аллергическим вариантом бронхиальной астмы (АБА) вошло 42 пациента, в группу с неаллергической и преимущественно неаллергической бронхиальной астмой (НАБА) – 40 пациентов.

В группе больных БА было 60 (73,17%) женщин и 22 (26,83%) мужчин, страдающих бронхиальной астмой.

Обследованные подписали форму информированного согласия, утверждённую локальным этическим комитетом. Больным с бронхиальной астмой проводили стандартное клиническое, лабораторное и рентгенологическое обследование, а также цитологическое исследование мокроты и кожное аллергологическое тестирование с постановкой проб к разным группам аллергенов. Также лабораторное обследование включало клинический и биохимический анализы крови. Диагноз БА устанавливался в соответствии с критериями глобальной инициативы в диагностике, лечении и профилактике БА (GINA, 2016).

Сравнительная характеристика клинико-лабораторных признаков у больных АБА и НАБА представлена в таблице 1. Для больных АБА были характерны достоверно более продолжительный срок заболевания, более высокие медианы абсолютного числа эозинофилов крови и величина процентного содержания эозинофилов мокроты.

Таблица 1.

Сравнительная характеристика клинико-лабораторных признаков у больных обследованных групп

Признак	АБА*	НАБА*	Значимость различий
Возраст (годы)	$49,79 \pm 17,52$	$55,20 \pm 16,97$	$p=0,292$

Признак	АБА*	НАБА*	Значимость различий
Срок заболевания (годы)	16,00 (9,00; 24,00)	7,50 (3,00; 17,50)	p=0,007
Исследование крови:			
Лейкоциты (10^9 /л)	7,05 (5,65; 9,35)	8,05 (6,10; 10,30)	p= 0,266
Нейтрофилы (10^9 /л)	4,04 (3,25; 5,82)	4,36 (2,99; 6,27)	p=0,969
Лимфоциты (10^9 /л)	1,70 (1,45; 2,40)	2,35 (1,80; 3,00)	p=0,066
Эозинофилы (10^9 /л)	0,153 (0,02; 0,30)	0,12 (0,01; 0,24)	p=0,488
Моноциты (10^9 /л)	0,56 (0,41; 0,70)	0,625 (0,51; 0,83)	p=0,182
СОЭ, мм/час	12,00 (8,00; 18,50)	12,00 (8,00; 18,50)	p=0,765
Исследование мокроты:			
Уровень нейтрофилов в мокроте (% от общего числа клеток)	35,00 (30,00; 47,50)	42,50 (32,00; 49,00)	p=0,410
Уровень макрофагов в мокроте (% от общего числа клеток)	18,50 (14,00; 29,00)	19,00 (12,00; 21,00)	p=0,709
Уровень эозинофилов в мокроте (% от общего числа клеток)	19,50 (16,00; 27,00)	17,50 (13,00; 21,00)	p=0,247
Уровень лимфоцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	7,00 (6,50; 11,00)	8,00 (7,00; 10,00)	p=0,580
Уровень моноцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	0,50 (0,00; 2,00)	0,00 (0,00; 1,00)	p=0,581
Исследование ФВД:			
ОФВ1 (% от должного до бронхолитика)	83,50 (73,30; 94,80)	78,20 (51,65; 99,10)	p=0,133
ОФВ1 (% от должного после бронхолитика)	96,80 (84,00; 105,50)	88,45 (58,20; 108,50)	p=0,087
ПОС (% от должного до бронхолитика)	87,20 (77,30; 99,00)	74,40 (55,60; 99,10)	p=0,036
ПОС (% от должного после бронхолитика)	98,40 (87,70; 110,50)	85,85 (61,30; 109,45)	p=0,024
МОС50 (% от должного до бронхолитика)	51,50 (34,90; 66,10)	38,15 (14,50; 60,85)	p=0,053
МОС50 (% от должного после бронхолитика)	64,20 (44,70; 89,40)	48,90 (20,15; 80,45)	p=0,064

Признак	АБА*	НАБА*	Значимость различий
МОС75 (% от должного до бронхолитика)	34,40 (20,20; 48,60)	25,05 (15,05; 49,15)	p=0,361
МОС75 (% от должного после бронхолитика)	41,50 (25,80; 58,10)	31,35 (16,10; 61,20)	p=0,359

Примечание: для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, указаны среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$); уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения двух несвязанных выборок использован параметрический t-критерий Стьюдента для независимых выборок). Для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи; для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Сравнительная характеристика анамнестических данных у больных обследованных групп представлена в таблице 2.

Таблица 2.

Особенности анамнеза в исследованных группах пациентов

Признак	АБА	НАБА	Значимость различий
Отягощенный аллергический анамнез	42 (100%)	20 (50,00%)	p=0,001
Бытовая сенсibilизация	32 (76,19%)	9 (22,50%)	p=0,0001
Пыльцевая сенсibilизация	28 (66,67%)	6 (15,00%)	p=0,0001
Эпидермальная сенсibilизация	22 (52,38%)	2 (5,00%)	p=0,0001
Пищевая сенсibilизация	24 (57,14%)	9 (22,50%)	p=0,017
Лекарственная непереносимость	33 (78,57%)	12 (30,00%)	p=0,003
Наследственная предрасположенность по БА	15 (35,71%)	9 (22,50%)	p=0,229
Курение	15 (35,71%)	13 (32,50%)	p=0,818
Профессиональные вредности	11 (26,19%)	16 (40,00%)	p=0,241
Ожирение	13 (30,95%)	11 (27,50%)	p=0,811
Наличие любых сопутствующих заболеваний	42 (100%)	40 (100%)	-
Сопутствующий аллергический ринит	23 (54,76%)	0 (0,00%)	p=0,0001
Сопутствующий хронический тонзиллит	2 (4,76%)	6 (15,0%)	p=0,150
Сопутствующие заболевания ЛОР-органов	24 (57,14%)	21 (52,50%)	p=0,825
Сопутствующая кардиологическая патология	26 (61,90%)	26 (65,00%)	p=0,821
Сопутствующая эндокринная патология	15 (35,71%)	11 (27,50%)	p=0,482
Сопутствующий сахарный диабет	4 (9,52%)	4 (10,00%)	p=1,00

Признак	АБА	НАБА	Значимость различий
Сопутствующая патология щитовидной железы	12 (28,57%)	9 (22,50%)	p=0,617
Сопутствующая патология ЖКТ	31 (73,81%)	25 (62,50%)	p=0,344
Сопутствующая патология почек	10 (23,81%)	4 (10,00%)	p=0,143
Сопутствующие заболевания кожи	3 (7,14%)	1 (2,50%)	p=0,616
Сопутствующая патология нервной системы	2 (4,76%)	1 (2,50%)	p=1,00

Примечание: * - сравнение частот проводилось с применением двустороннего точного критерия Фишера или критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса.

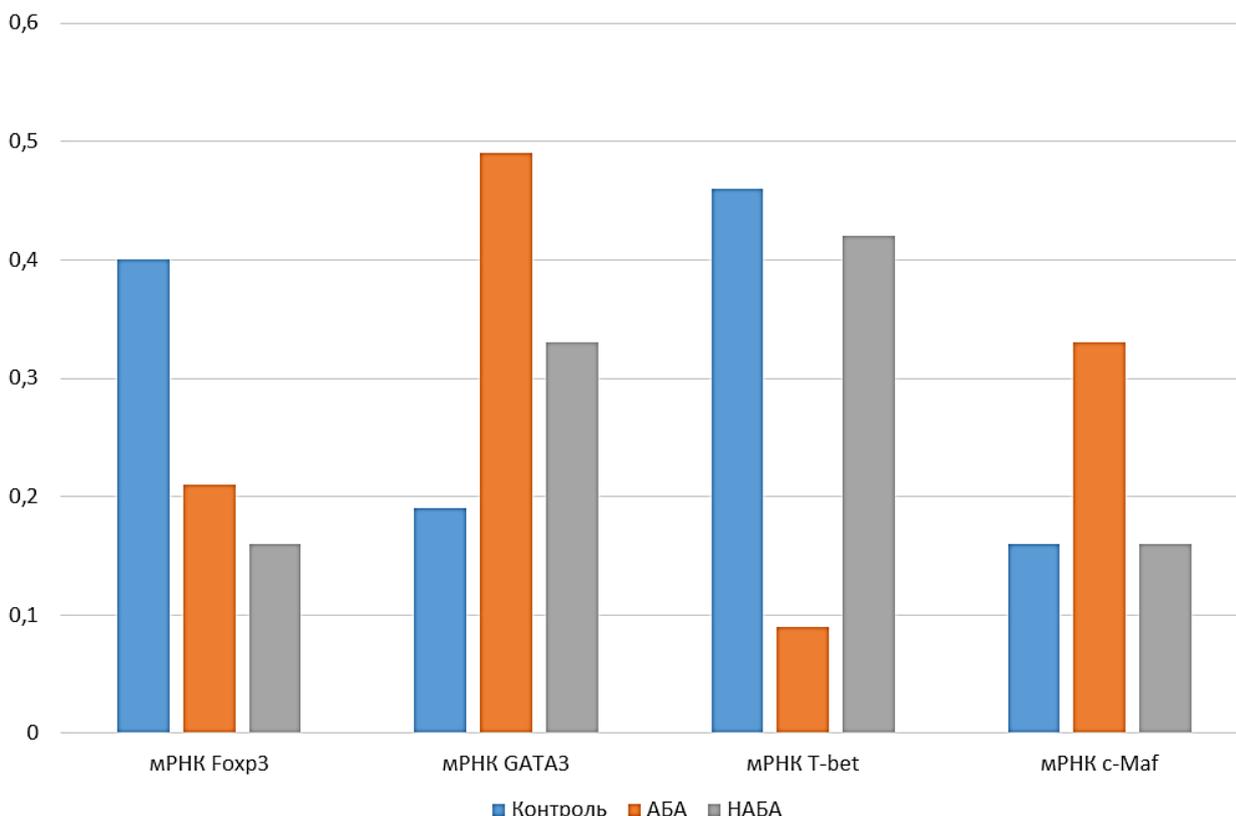
Обследование проводили в фазе обострения и в фазе ремиссии заболевания. Комплекс лечебных мероприятий у больных БА полностью соответствовал варианту заболевания. Больные получали медикаментозную терапию в соответствии со стандартами лечения (GINA, 2016).

Результаты исследования и их обсуждение

Для обобщения результатов изучения экспрессии транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, c-Maf и T-bet нами составлена диаграмма, позволяющая систематизировать сформированные представления (рисунок 1).

Рисунок 1.

Динамика уровней экспрессии мРНК Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf в обследованных группах



Как видно из рисунка 1, больные АБА характеризуются выраженным преобладанием экспрессии GATA3 и c-Maf, то есть транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию Th2-ассоциированных цитокинов ($p < 0,05$). У пациентов с НАБА, напротив, зафиксировано резкое снижение экспрессии GATA3, в то время как уровни T-bet практически не отличались от таковых в группе контроля ($p > 0,05$). В целом, полученные результаты подтверждают принятую на сегодняшний день концепцию о доминировании Th2-воспаления при аллергической бронхиальной астме, ключевую роль в котором играет именно GATA3 (Zhu J., Min B., Hu-Li J. et al., 2004). Также является ожидаемым преобладание экспрессии c-Maf в группе больных АБА: для c-Maf показана способность активировать транскрипцию гена IL-4 (Lai C.Y., Lin S.Y., Wu C.K. et al., 2012) и отрицательно влиять на дифференцировку Th1 путем снижения продукции IFN- γ (Ho I.C., Lo D., Glimcher L.H., 1998), что косвенно усиливает экспрессию GATA3 и снижает выработку T-bet.

Обращает на себя внимание снижение экспрессии Foxp3 в обеих группах больных БА, более выраженное в группе НАБА, что, вероятнее всего, указывает на наличие нарушений иммунного гомеостаза у всех пациентов с бронхиальной астмой, не ограничивающихся Th1/Th2 дисбалансом, но также включающих в себя снижение Treg, что может являться стимулом к уменьшению супрессивного влияния Treg на продукцию воспалительных цитокинов.

При проведении анализа изменения экспрессии мРНК указанных транскрипционных факторов у больных бронхиальной астмой, нас, несомненно, интересовали уровни цитокинов, специфически ассоциированных с функциональной активностью соответствующих транскрипционных факторов в обследованных группах, а именно: IFN- γ (T-bet), IL-4 (GATA3, c-Maf), IL-13, IgE (GATA3). В качестве «маркерных» цитокинов для Foxp3 нами были выбраны IL-17 и IL-6. Несмотря на то, что данные цитокины не продуцируются Treg, их можно рассматривать как отражение активности процессов, обусловленных супрессией Foxp3: показана способность Foxp3 подавлять экспрессию IL-17 (посредством блокирования ROR γ и ROR α - ключевых транскрипционных факторов Th17) и IL-6, взаимно стимулирующих продукцию друг друга (Wan Y.Y., Flavell R.A., 2007; Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., 2008). Обобщенные результаты исследования концентраций цитокинов представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Динамика концентраций IFN- γ , IL-4, IgE, IL-13, IL-6, IL-17 в обследованных группах

	Контроль	АБА	НАБА
Концентрации IFN- γ	N	↓	↑↑* **
Концентрации IL-4	N	↑↑*	↑* **
Концентрации IgE	N	↑↑*	↑* **
Концентрации IL-13	N	↑↑*	↑**

	Контроль	АБА	НАБА
Концентрации IL-6	N	↑↑	↑
Концентрации IL-17	N	↑↑	↑*

Примечание: N – нормальные значения экспрессии, соответствующие контрольной группе; ↓ и ↓↓ - снижение экспрессии по сравнению с контрольной группой; ↑ и ↑↑ - повышение экспрессии по сравнению с контрольной группой; * - значимое изменение экспрессии в сравнении с группой контроля; ** - значимое изменение экспрессии в сравнении с группой АБА.

Данные таблицы 3 свидетельствует, что цитокиновый спектр каждой из исследуемых групп соответствовал доминирующему транскрипционному фактору. Так наибольшие концентрации IFN- γ выявлялись в группе НАБА (23,72 (4,65; 70,78) пг/мл); IL-4 (3,22 (1,58; 14,43) пг/мл), IL-13 (12,31 (7,20; 49,80) пг/мл) и IgE (554,00 (82,07; 893,23) МЕ/мл) – группе АБА.

Отдельное внимание следует уделить IL-6 и IL-17. Как и ожидалось, концентрации цитокинов оказались повышены на фоне снижения экспрессии мРНК Foxp3. Однако в настоящее время известны некоторые особенности динамик концентраций, присущие IL-6 и IL-17. Так показано, что высокие концентрации IL-17 отмечались у пациентов с тяжелым течением заболевания и плохим ответом на терапию (Al-Ramli W., Préfontaine D., Chouiali F. et al., 2009). Выявлено, что IL-17 ассоциирован с развитием фиброза тканей дыхательных путей, в том числе посредством стимуляции экспрессии IL-6 (Dragon S., Rahman M.S., Yang J. et al., 2007). Сам IL-6 обладает способностью подавлять дифференцировку Treg (Pasare C., Medzhitov R., 2003) и связан с ухудшением функций дыхательных путей у пациентов с тяжелой бронхиальной астмой (Neveu W.A., Allard J.L., Raymond D.M. et al., 2010).

В связи с представленными данными особый интерес вызывает анализ концентраций указанных цитокинов и экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 в зависимости от тяжести течения заболевания. Нами было показано, что у пациентов с тяжелым течением бронхиальной астмы (как в группе АБА, так и в группе НАБА) уровни IL-6 и IL-17 многократно превышали таковые в группах легкой БА и БА средней тяжести ($p < 0,05$). В то же время для Foxp3 обнаружена обратная закономерность – наименьшей экспрессией мРНК транскрипционного фактора характеризовалась именно группа тяжелой БА. ($p = 0,007$)

Таким образом, нами было установлено, что цитокиновый спектр при различных вариантах течения бронхиальной астмы соответствует транскрипционному фактору, влияние которого является преобладающим при определенном варианте БА.

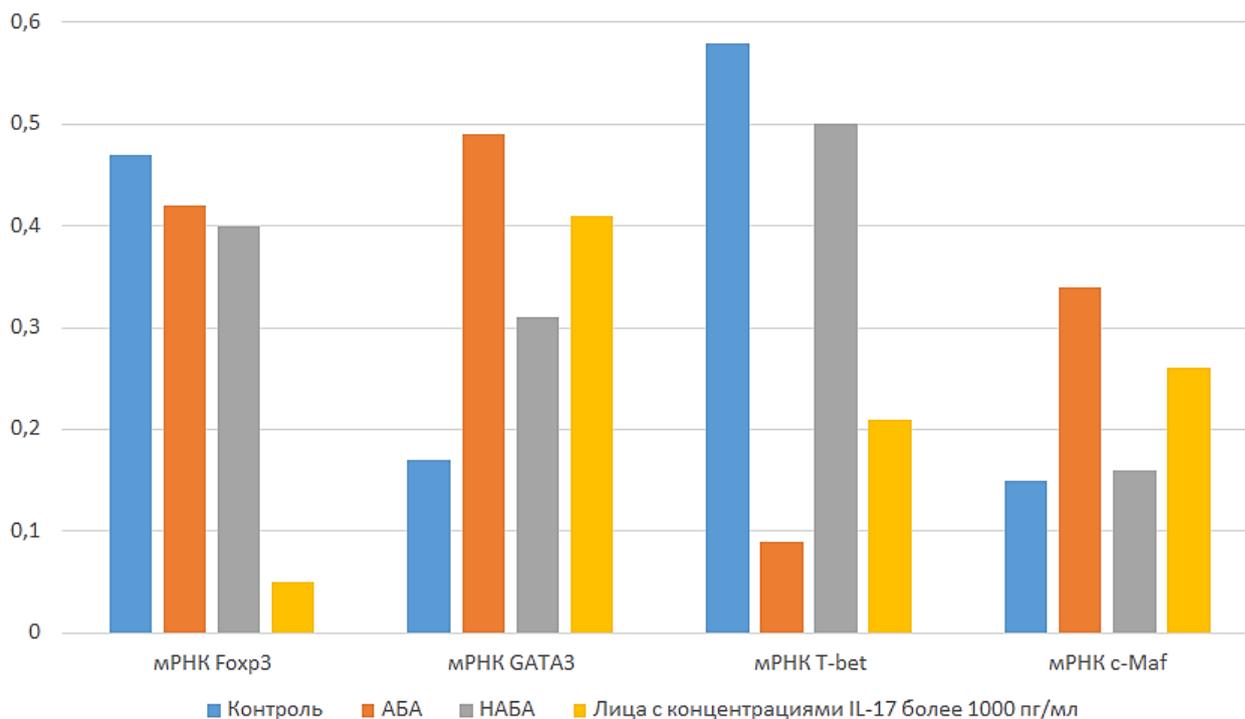
Исследование изменения экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от тяжести заболевания показало, что уровни транскрипционного фактора GATA3 нарастали в зависимости от тяжести течения заболевания во всех группах БА, как АБА ($p = 0,305$), так и НАБА ($p = 0,0001$), достигая максимальных значений при тяжелом течении заболевания. Особенно этот факт интересен в связи с показанной ранее способностью GATA3

непосредственно подавлять экспрессию Foxp3 (Charoval S., Dasgupta P., Dorsey N.J. et al., 2010), что, вероятно, указывает на усугубление Treg/Th2 дисбаланса при нарастании тяжести заболевания. В то же время транскрипционный фактор T-bet в группе НАБА, напротив, характеризовался снижением экспрессии у пациентов с тяжелым течением БА ($p=0,0003$). В совокупности с продемонстрированным нарастанием уровней GATA3 это может свидетельствовать о нарастании Th2/Th1 дисбаланса в сторону доминирования Th2-лимфоцитов.

Исследование экспрессии мРНК транскрипционных факторов и концентраций цитокинов в зависимости от фазы заболевания, в целом, не выявило значимых различий между фазами обострения и ремиссии ($p>0,05$), однако был обнаружен крайне высокий уровень IL-17 у пациентов с ремиссией НАБА, что могло указывать на наличие выраженного Treg/Th17 дисбаланса у отдельных пациентов. Для проверки этой гипотезы нами была дополнительно выделена группа лиц с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (рисунок 2).

Рисунок 2.

Динамика уровней экспрессии мРНК Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf в обследованных группах с учетом выделения группы лиц с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл



В представленных результатах необходимо обратить внимание на крайне низкие уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 у лиц с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл ($p<0,05$). Кроме того, для этой же группы была характерна высокая экспрессия GATA3, приближающаяся к таковой в группе АБА, что могло являться подтверждением выдвинутой нами

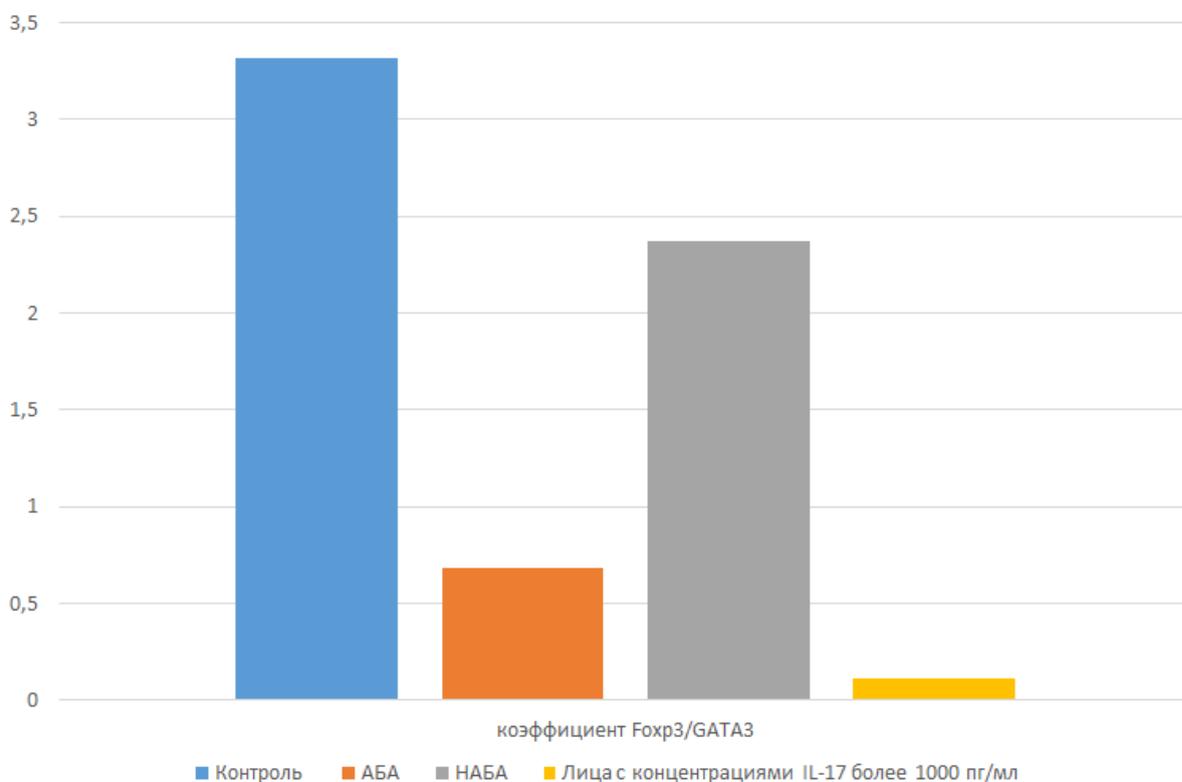
ранее гипотезы о наличии у пациентов с БА нарушения регуляторных механизмов, приводящих к сдвигу Treg/Th2 баланса в сторону преобладания Th2-ответа.

Продолжая обсуждение результатов анализа с учетом выделения группы пациентов с высокими концентрациями IL-17 необходимо упомянуть установленное нами наличие связи экспрессии Foxp3 и уровней IL-17. Как корреляционный анализ, так и метод линейной регрессии показали наличие прочной отрицательной связи в значениях двух переменных в группах АБА и НАБА. Поскольку основным продуцентом IL-17 являются Th17 (Maek A.W., Buranapraditkun S., Klaewsongkram J. et al., 2007), популяция клеток, антагонистичная Treg (Duan M.C., Zhang J.Q., Liang Y. et al., 2016; Nosratabadi R., Rastin M., Sankian M. et al., 2016), можно утверждать, что полученные результаты являются свидетельством присутствия у больных бронхиальной астмой дисбаланса между Foxp3+Treg и Th17 в пользу повышения Th17 и снижения Foxp3+Treg клеток, особенно выраженного у пациентов с высокими концентрациями IL-17.

С учетом многофакторности влияний, определяющих экспрессию Foxp3, для наиболее точной характеристики Treg/Th2 баланса нами был проанализирован коэффициент Foxp3/GATA3 (рисунок 3).

Рисунок 3.

Значения коэффициента Foxp3/GATA3 в обследованных группах



Как и ожидалось из представленных выше результатов, наименьшими значениями коэффициента характеризовались группа АБА и группа пациентов с высокими концентрациями IL-17 ($p=0,0000$), что свидетельствует о наиболее

выраженном дисбалансе Treg/Th2. Поскольку, в целом, наибольшими концентрациями IL-17 и наименьшими уровнями экспрессии мРНК Foxp3 характеризовались пациенты с тяжелым течением БА, можно—предположить, что одним из факторов, усиливающих тяжесть течения заболевания, может являться именно подавление регуляторной функции Treg.

В то же время группа НАБА характеризовалась значениями коэффициента Foxp3/GATA3, наиболее близкими к группе контроля ($p=0,872$). По всей видимости, этот факт в совокупности с высокими концентрациями IFN- γ является отражением того, что у пациентов с НАБА имеет место сдвиг равновесия в сторону преобладания Th1-воспаления.

Одной из задач нашего исследования являлось изучение возможного влияния транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet и c-Maf на клинические особенности течения бронхиальной астмы. Проведенный с этой целью корреляционный анализ показал присутствие корреляционных связей между экспрессией мРНК транскрипционных факторов и показателями ФВД, для уточнения характера которых нами был проведен регрессионный анализ.

Регрессионный анализ показал выраженный положительный вклад экспрессии Foxp3 и T-bet в величины показателей ФВД. В то же время, GATA3 вносил преимущественно отрицательный вклад в величины показателей ФВД, что является очередным доказательством роли сдвига Т-клеточного баланса в сторону преобладания Th2 в нарастании тяжести БА и сопутствующим ухудшением показателей ФВД. Другой Th2-ассоциированный транскрипционный фактор c-Maf практически не показал влияния на показатели ФВД. По-видимому, среди рассматриваемых транскрипционных факторов, влияющих на функциональную активность Th2, именно GATA3 играет ключевую роль в патогенезе бронхиальной астмы.

С учетом данных проведенных ранее исследований, показавших, что увеличение концентраций IL-17 характерно для пациентов с доминирующим нейтрофильным воспалением (Murcia R.Y., Vargas A., Lavoie J.P., 2016) при анализе клеточного состава мокроты и показателей клинического анализа крови мы снова применили выделение отдельной группы пациентов со значениями концентраций IL-17 более 1000 пг/мл. Обращает на себя внимание, что именно эта группа характеризовалась наибольшим содержанием нейтрофилов как в клиническом анализе крови, так и в мокроте, причем доминирование нейтрофилов сохранялось в том числе и в фазе ремиссии. Показано, что нейтрофильное воспаление у пациентов с бронхиальной астмой ассоциировано с тяжелым течением заболевания и плохим ответом на ГКС терапию (Yang X., Jiang Y., Wang C., 2016). В этой связи особый интерес представляет исследование Murcia R.Y. et al., показавшее способность IL-17 напрямую активировать нейтрофилы, подавлять их апоптоз и способствовать их персистенции в дыхательных путях, что, по мнению авторов, является одним из механизмов формирования устойчивости к глюкокортикоидной терапии (Murcia R.Y., Vargas A., Lavoie J.P., 2016).

В связи с этим особый интерес представляют результаты, полученные нами при оценке экспрессии транскрипционных факторов под влиянием ГКС

терапии. В целом, транскрипционные факторы демонстрировали однонаправленную динамику изменений как при ингаляционной терапии ГКС, так и при парентеральном введении: GATA3, T-bet, c-Maf характеризовались снижением экспрессии на фоне увеличения дозы ГКС, Foxp3 – увеличением. Это согласуется с данными литературы. Так, в работах Bakr S.I., Mahran M.Z., Soliman D.A., 2013, Yüksek M., et al. 2011, было показано, что у больных бронхиальной астмой на фоне ГКС терапии происходило нарастание численности Treg и ассоциированный с ним прирост Foxp3. Вероятнее всего, данный эффект обусловлен восстановлением баланса между клеточными субпопуляциями на фоне реализации противовоспалительных эффектов ГКС, в том числе и динамикой Th17/Treg соотношения в сторону увеличения ранее сниженных регуляторных Т-клеток. Тем не менее, необходимо отметить, что статистическая значимость динамик была подтверждена только для транскрипционного фактора T-bet в группе пациентов, получающих парентеральную терапию ГКС в дозе более 8 мг и более ($p=0,022$). Вероятнее всего, полученные результаты являются отражением тенденции, реализующейся в рамках супрессивной активности ГКС на фоне длительной терапии.

Таким образом, снижение экспрессии GATA3 на фоне увеличения дозы и ГКС является ожидаемым. Отсутствие четко выраженных различий в значениях показателя на фоне применения разных доз парентеральных ГКС, вероятнее всего, обусловлено активностью патологического процесса: все пациенты, получавшие парентеральные ГКС, на момент забора крови для исследования находились в фазе обострения БА, сопровождающегося максимально выраженным нарушением клеточного баланса.

В завершении обсуждения полученных результатов необходимо вернуться к рассмотрению связей между экспрессией различных транскрипционных факторов и ассоциированных с ними цитокинов. В таблице 4 представлены обобщенные результаты регрессионного анализа.

Таблица 4.

Результаты регрессионного анализа экспрессии транскрипционных факторов и ассоциированных с ними цитокинов (представлен характер статистически значимого вклада независимой переменной в зависимую)

АБА				
	Foxp3	GATA3	T-bet	c-Maf
Foxp3		-		
GATA3	-		-	
T-bet		-		
c-Maf				
IFN- γ				-
IL-4		+		+
IL-13	-	+	-	

IgE	-			+
IL-17	-			
IL-6	-			
НАБА				
	Foxp3	GATA3	T-bet	c-Maf
Foxp3		-		
GATA3	-		-	
T-bet		-		
c-Maf				
IFN- γ			+	
IL-4				+
IL-13		+		+
IgE	-		-	
IL-17	-			
IL-6				

Результаты регрессионного анализа подтверждают описанную ранее связь цитокинов и транскрипционных факторов в зависимости от типа воспаления, кроме того подтверждён взаимный вклад экспрессии транскрипционных факторов в величины друг друга. Так показан антагонистический характер экспрессии GATA3 и T-bet, GATA3 и Foxp3.

В целом, полученные нами результаты указывают на наличие сложных кооперативных взаимодействий между транскрипционными факторами лимфоцитов, участвующих в патогенезе бронхиальной астмы. Foxp3, GATA3, T-bet и c-Maf формируют микросети транскрипционных факторов и цитокинов, вовлеченных в процесс регуляции баланса Th1/Th2/Foxp3+Treg и Th17/Foxp3+Treg. Выявленные отличия в характере, значимости и направленности связей позволяют предполагать существование особенностей в механизмах регуляции и клеточной кооперации при АБА и НАБА, что проявляется в клиническом аспекте формированием различных фенотипов бронхиальной астмы.

Таким образом, полученные нами данные позволяют выдвинуть концепцию существования дисбаланса в системах Th1/Th2/Foxp3+Treg и Th17/Foxp3+Treg, что может определять клинические особенности при различных вариантах бронхиальной астмы.

Выводы

1. Анализ полученных данных указывает на наличие микросети транскрипционных факторов и цитокинов, вовлеченных в процесс регуляции баланса Th1/Th2/Foxp3+Treg и Th17/Foxp3+Treg, а выявленные отличия в характере, значимости и направленности корреляционных связей позволяют предполагать существование особенностей в механизмах регуляции и клеточной кооперации при АБА и НАБА, что проявляется в клиническом аспекте формированием различных фенотипов бронхиальной астмы. Полученные данные позволяют выдвинуть концепцию

- существования дисбаланса в системах Th1/Th2/Foxp3+Treg и Th17/Foxp3+Treg, что может определять клинические особенности при различных вариантах бронхиальной астмы.
2. При исследовании экспрессии мРНК транскрипционного фактора Foxp3 в мононуклеарах периферической крови больных АБА и НАБА выявлено снижение уровня экспрессии мРНК этого транскрипционного фактора по сравнению с группой практически здоровых лиц, вне зависимости от фазы заболевания, наиболее выраженное у больных НАБА (положительно коррелирующее с ОФВ1), что может указывать на снижение регуляторной роли Treg при бронхиальной астме. При этом у больных АБА и НАБА уровень экспрессии мРНК Foxp3, как и уровни IL-17 и IL-6 характеризуют тяжесть заболевания.
 3. Регрессионный анализ между уровнями Foxp3 и IL-17 в группах АБА и НАБА показал наличие сильных корреляционных связей как в группе АБА, так и в группе НАБА, что в совокупности с разнонаправленной динамикой экспрессии мРНК и уровней IL-17 указывает на развитие у больных бронхиальной астмой дисбаланса между Foxp3+Treg и Th17 в пользу повышения активности Th17 и снижения Foxp3+Treg клеток, что приводит к снижению экспрессии мРНК Foxp3 и повышению экспрессии IL-17 в мононуклеарах периферической крови.
 4. Для больных АБА характерно значимое повышение экспрессии мРНК Th2-специфичных транскрипционных факторов c-Maf и GATA3 в совокупности с повышением IL-4, IL-13 и IgE по сравнению с группой практически здоровых лиц и больных НАБА, вне зависимости от фазы и тяжести заболевания. Уровень экспрессии мРНК GATA3 при НАБА нарастает при увеличении степени тяжести, достигая максимальных значений при тяжелом течении, что может играть патогенетическую роль в усугублении тяжести заболевания. При этом в группе НАБА определяется выраженное увеличение интегрального коэффициента Foxp3/GATA3 и уровня IFN- γ , что может свидетельствовать о сдвиге регуляторного Foxp3+Treg/Th2/Th1 баланса в сторону Treg/Th1, в особенности у больных с высокими концентрациями IL-17.
 5. При оценке экспрессии мРНК транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови в группе больных АБА, вне зависимости от тяжести течения заболевания и его фазы выявлено снижение уровня экспрессии по сравнению с группой практически здоровых лиц и больных НАБА. При нарастании степени тяжести бронхиальной астмы в группе НАБА выявлено снижение экспрессии мРНК T-bet, что в совокупности с нарастанием экспрессии мРНК GATA3 свидетельствует о нарастании Th1/Th2-клеточного дисбаланса в сторону доминирования Th2-ответа.
 6. При бронхиальной астме показано влияние глюкокортикостероидов на экспрессию транскрипционного фактора T-bet (снижение экспрессии), более выраженное в группе больных, получающих парентеральную глюкокортикостероидную терапию.

Практические рекомендации

1. У больных АБА и НАБА рекомендуется исследование спектра мРНК Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf и концентрации IL-17 для оценки и прогнозирования тяжести течения заболевания.
2. Проведение исследования экспрессии GATA3 у больных АБА может быть рекомендовано при отборе больных для возможной таргетной терапии в диагностически сложных случаях ингаляционным ингибитором GATA3.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Еремеева А.В. Транскрипционные факторы GATA-3, FOXP3 и их кооперативные взаимодействия при бронхиальной астме // Вестник СПбГУ. – 2012. – Сер. 11. – №4. – С.23-31.
2. Еремеева А.В., Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А. Роль транскрипционного фактора GATA-3 в патогенезе бронхиальной астмы // Труды VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье-основа человеческого потенциала. Проблемы и пути их решения». – 2012. - Том 7. – С.372.
3. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Еремеева А.В., Нёма М.А. Беденко А.С. Патогенетическая роль кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов Foxp3, GATA-3, PAX-5 при бронхиальной астме // Медицинская иммунология. – 2012. – Т.11. – № 2 – С.10-15.
4. Трофимов В.И., Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нема М.А., Лим В.В., Еремеева А.В. Значение кооперации транскрипционных факторов STAT6, STAT4, GATA3 И T-bet при бронхиальной астме // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т.13. – №1. – С.67-72.
5. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Еремеева А.В. Взаимодействие транскрипционных факторов PAX-5 и STAT6 в патогенезе аллергической бронхиальной астмы. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т.16, № 1. – С.35-42.
6. Еремеева А.В., Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Нёма М.А., Асекова Н.А., Трофимов В.И. Транскрипционные факторы GATA3, T-bet при бронхиальной астме // Труды XXV Национального Конгресса по болезням органов дыхания. – 2015 – С.53.
7. Еремеева А.В., Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Лим В.В., Нёма М.А. Экспрессия фактора транскрипции Foxp3 при бронхиальной астме // Медицинская иммунология. – 2016. – Т.18. – № 4. – С.373-378.
8. Mineev V., Sorokina L., Nyoma M., Lipkin G., Lim V., Eremeeva A., Malfygina Y., Ivanov V., Trofimov V. The role of transcription factor PAX-5 (BSAP) in asthma severity and in the activity of allergic inflammation // Eur Respir J. - 2012. - Vol. 39, Suppl.57. – P.130.
9. Sorokina L., Mineev V., Lim V., Nyoma M., Eremeeva A., Trofimov V. The complex role of SOCS1 expression in peripheral blood mononuclears of patients with bronchial asthma. Eur. Respir. J. – 2012. – V.39, Suppl.56. – P.134.
10. Mineev V., Nyoma M., Sorokina L., Lim V., Eremeeva A., Bedenko A.,

- Ivanov V., Trofimov V. New outlook on the Th1/Th2-alternative signaling pathways in asthma // *Eur Respir J.* - 2013. - Vol. 42, Suppl.57. – P.88.
11. Sorokina L.N., Mineev V.N., Nyoma M.A., Lim V.V., Ereemeeva A.A., Ivanov V.A., Bedenko A., Trofimov V.I. The crucial role of the expression of negative regulator of gene transcription SOCS5 in asthma pathogenesis. *Eur. Respir. J.* – 2013. – V.42, no.57. – P.91.
 12. Sorokina L., Mineev V., Nyoma M., Lim V., Ereemeeva A., Ivanov V., Trofimov V. The asthma-COPD overlap syndrome: Transcription factors GATA3 and STAT6 as possible markers // *Eur Respir J.* - 2014. - Vol. 44, Suppl.58.
 13. Ivanov V., Sorokina L., Mineev V., Nyoma M., Ereemeeva A., Rubeko E., Petrova S., Trofimov V. Asthma and diabetes: Possible markers of their co-existence. The possible role of transcription factors GATA-3 and T-bet and negative regulator of transcription SOCS1 in the worsening of asthma // *Eur Respir J.* - 2015. - Vol. 46, Suppl.59