

**ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА**

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

**Научный руководитель
доктор медицинских наук,
доцент Сорокина Л.Н.**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2016**

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ FOXP3, GATA3, T-BET, C-MAF (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1. Транскрипционный фактор Foxp3.....	14
1.2. Транскрипционный фактор GATA3.....	22
1.3. Транскрипционный фактор T-bet	30
1.4 Транскрипционный фактор c-Maf.....	35
1.5. Кооперативные взаимодействия транскрипционных факторов Foxp3, c-Maf, GATA3, T-bet при бронхиальной астме.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Клиническая характеристика обследованных больных.....	45
2.2. Методологическая схема	55
2.3. Методы исследования.....	56
2.3.1. Выделение мононуклеаров периферической крови	56
2.3.2. Исследование экспрессии мРНК методом RT-PCR	56
2.3.3. Определение концентрации иммуноглобулина Е сыворотки крови	58
2.3.4. Определение концентрации цитокинов плазмы	58
2.4. Методы статистической обработки.....	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
3.1. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме.....	62
3.2. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора GATA3 в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме.....	76
3.3. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме.....	89
3.4. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора c-Maf в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме.....	103

3.5. Характеристика экспрессии цитокинов в периферической крови при бронхиальной астме и кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf.....	117
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	162
ВЫВОДЫ	177
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	179
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	180

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 ее распространенность в различных государствах, достигая уровня 10% в детской и в среднем 4-10% - во взрослой популяции.

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., Трофимов В.И., 2010). 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 (Georas S.N., Guo J., De Fanis U. et al., 2005).

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 (Christodouloupoulos 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 (Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И., 2010).

Было установлено, что дефекты GATA-белков выявляются при заболеваниях крови, онкозаболеваниях легких, желудочно-кишечного тракта, яичников. Также имеются данные о присутствии мутации гена Foxp3 у пациентов с IPЕХ – Х-сцепленным заболеванием, проявляющимся энтеропатиями и полиэндокринопатиями.

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,

наблюдающегося 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 имеет место 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 (Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И., 2010), 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 κB -универсальный фактор транскрипции, влияющий на экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла) и NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток, семейство транскрипционных факторов, контролирующих активацию и функциональную активность клеток иммунной системы). В то же время в ряде научных работ была показана 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., Boyman O. et al., 2007).

Однако в настоящий момент получены противоположные данные. 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 (Bettelli E., Dastrange M., Oukka M., 2005; Raby B.A., Hwang E.S., Van Steen K. et al., 2006). 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

На сегодняшний день принято считать, что в физиологических условиях Foxp3 является репрессором двух факторов, являющихся ключевыми для экспрессии генов цитокинов, NF-κB и NFAT. В то же время в ряде научных работ была показана 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., Boymann O. et al., 2007). В то же время в ряде экспериментов были получены противоположные результаты: так группой Wohlfert E.A. было показано, 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). Противоположные результаты исследований демонстрируют отсутствие полного понимания механизмов кооперативных взаимодействий рассматриваемых 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 результатам исследований зарубежных научных групп, в регуляции синтеза ключевых интерлейкинов Т-лимфоцитов, наряду с Foxp3 и GATA3, участвуют c-Maf, T-bet (Bettelli E., Dastrange M., Oukka M., 2005; Raby B.A., Hwang E.S., Van Steen K. et al., 2006). Дефицит или избыточное количество этих транскрипционных факторов в лимфоцитах, вероятно, оказывают эффект на функцию клеток и реализуются в изменении течения Th2-иммунного ответа и, соответственно, могут отражаться на клинических характеристиках заболевания.

В данной работе:

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

Практическая значимость работы

1. Разработан комплексный подход к анализу уровней экспрессии у больных АБА и НАБА мРНК Foxp3 GATA3 T-bet c-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.

Методология и методы исследования

Методология проводимого исследования включает в себя различные этапы внутриклеточной регуляции транскрипционными факторами лимфоцитов (Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf): внеклеточный уровень оценивается по концентрации цитокинов, цитоплазматический и постранскрипционный уровни анализируются по экспрессии мРНК данных регуляторов.

Моделью для исследования в описанных ниже методиках выбраны мононуклеары периферической крови. Экспрессия мРНК транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf исследовалась методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (reverse transcription - PCR). Праймеры для Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf и β -актина были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank).

Определение концентрации общего IgE сыворотки проводилось методом ИФА с применением стандартной методики при использовании коммерческих наборов (ООО Цитокин, Россия). Определение уровня цитокинов проводилось по стандартному протоколу методом ИФА на ИФА-анализаторе StatFlax 303+ с использованием коммерческих наборов производства eBioscience, США (IL-13, IL-4, IFN- γ) и ООО Цитокин, Россия (IL-6, IL-17).

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.

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 выполнена публикация тринадцати печатных работ, которые представлены пятью статьями в периодических изданиях, рекомендованных ВАК.

ГЛАВА 1. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ FOXP3, GATA3, T-BET, C-MAF (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Бронхиальная астма является одной из самых распространенных патологий в мире, причем число заболевших продолжает неуклонно увеличиваться. По данным Всемирной Организации здравоохранения в 2013 году около 235 миллионов человек по всему миру имели установленный диагноз бронхиальной астмы. В разных странах число больных БА (бронхиальной астмой) составляет от 1 до 18% от общей численности населения, при общей распространенности аллергических заболеваний среди работающих лиц более 35%.

Согласно официальной статистике Министерства Здравоохранения Российской Федерации абсолютное число зарегистрированных больных в 2013 году составляло 65096, в то время как в 2014 оно увеличилось до 67379 человек¹. Однако эти числа не отражают истинного уровня заболеваемости, так как базируются только на частоте обращаемости за медицинской помощью. По данным различных источников (Чучалин А.Г., Илькович М.М., 2009), сохраняется непрерывное нарастание заболеваемости бронхиальной астмой, увеличивается ее распространенность 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.

Смертность и инвалидизация, вызванные бронхиальной астмой, также характеризуются высокими значениями (Кокосов А.Н., 2005; Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.А., 2011). В последние годы увеличилось количество больных с тяжелым неконтролируемым течением, а также лекарственной резистентностью, среди которых высок процент лиц молодого возраста и детей.

¹ <https://www.rosminzdrav.ru/documents/9479-statisticheskaya-informatsiya-za-2014>

Распространенность заболевания, его несомненное влияние на качество жизни, а также сопряженные с ним финансовые затраты заставляют ученых искать все новые подходы к лечению. Безусловным толчком к углублению знаний о патогенезе бронхиальной астмы и открытию новых терапевтических мишеней послужило «расширение» интереса к внутриклеточным процессам и межклеточным взаимодействиям.

В настоящее время большое внимание уделяется необходимости разрабатывать современные инновационные пути решения вопросов диагностики и терапии БА с основательным анализом патогенетических механизмов бронхолегочной патологии (Кокосов А.Н., 2009; Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.А., 2011), углубленным изучением молекулярно-генетических аспектов формирования аллергических заболеваний (Келембет Н.А., Гембицкая Т.Е., Иващенко Т.Э. и др., 2008), центральным дефектом которых является нарушение функционирования клеточного мембранно-рецепторного аппарата (Минеев В.Н., 2005) и различных звеньев межклеточной и внутриклеточной сигнализации (Barnes J.P., 2008).

Как известно, основные звенья патогенеза бронхиальной астмы реализуются за счет активности цитокинов, продуцируемых Th1 и Th2 (Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., 2006), однако в последнее время все активнее обсуждается роль и других субпопуляций Т-лимфоцитов, в частности регуляторных Т-клеток (Treg) (Wei B., Zhang H., Li L., et al, 2011). Регуляторами функций лимфоцитов выступают транскрипционные факторы, способные как «активировать» так и «подавлять» деятельность клетки. Именно они в настоящее время рассматриваются как основные звенья патологического процесса и даже как потенциальные мишени для разработок новых лекарственных препаратов.

1.1. Транскрипционный фактор Foxp3

Foxp3 (forkhead box P3) – транскрипционный фактор, принадлежащий к многочисленной группе транскрипционных факторов FOX (forkhead/winged-helix). Её представители принимают участие в различных биологических процессах. Так подсемейство forkhead box O1 (FoxO) выявляется в гранулезных клетках на разных стадиях развития фолликула (Pisarska M.D., Kuo F.-T., Tang D. et al, 2009), а факторы FoxF и FoxH – активные участники развития мезодермы (Amin N.M., Shi H., Liu J., 2010).

Структура Foxp-транскрипционных факторов представлена forkhead-доменом, цинковым доменом (zinc finger domain) и лейциновым компонентом (leucine zipper motif), регулирующими связывание с ДНК и транскрипционную активность посредством гомо- и гетеродимеризации, а также N-концом, выполняющим репрессорную функцию.

В настоящий момент известно о четырех представителях подсемейства Foxp: Foxp1, Foxp2, Foxp3 и Foxp4. Считается, что Foxp1, Foxp2 и Foxp4 регулируют основные звенья развития некоторых тканей, в частности легочной, сердечной, мозговой, тимуса и кишечника. Foxp1 встречается в сосудистом эндотелии легких, выявляется в миокарде и эндокарде развивающегося сердца и участвует в пролиферации миоцитов. Экспрессия Foxp4 наблюдается в развивающейся легочной, нервной ткани, а также ткани кишечника, а ген Foxp2 считается «ответственным» за некоторые нарушения речи и наряду с Foxp1 и Foxp4 экспрессируется в эпителии развивающегося кишечника (Lu M.M., Li S., Yang H. et al, 2002).

Мутации в гене *foxp3* выявлялись при синдроме IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) - редкой патологии, проявляющейся множественными нарушениями иммунной регуляции (Owen C.J., Jennings C.E., Imrie H. et al, 2009). Также при дефекте этого гена регистрировались различные фатальные аутоиммунные заболевания, ключевую роль в развитии которых играли Т-клетки, характеризующиеся экспрессией Foxp3. Показано развитие

диабета, лифаденопатий, гипер-IgE синдрома. Первоначально считалось, что выработка Foxp3 характерна только для CD4+ Т-клеток, несущих на своей поверхности α -субъединицу, однако на сегодняшний день показано его наличие не только в регуляторных Т-лимфоцитах, но и на других типах клеток, в том числе и опухолевых.

В связи с актуальностью поиска новых возможных терапевтических мишеней для лечения онкологических заболеваний, наиболее полно Foxp3 изучен именно при данном типе патологий. Считается установленной способность Т-клеток, нормальных и злокачественных эпителиальных клеток экспрессировать Foxp3. Так высокое содержание Foxp3+ Treg выявлялось у пациентов с раком яичников, желудка, меланомой. В этих случаях регуляторные клетки играли непосредственную роль в развитии опухолевого процесса. В то же время для больных раком желчного пузыря и опухолями головы и шеи такой связи выявлено не было. Наоборот, предполагается, то количество Treg положительно коррелировало с благоприятным прогнозом. Эти диаметрально противоположные данные позволяют предположить сложную и, возможно, антагонистическую роль Treg в патогенезе других заболеваний и обуславливают необходимость рассматривать экспрессию Foxp3 не только в общем, но и с учетом типа клеток-экспрессоров.

CD4+CD25+клетки, характеризующиеся высоким уровнем CD5 и рецептора CTLA-4, были объединены в группу регуляторных Т-клеток (Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S. et al, 2000). Регуляторные клетки представлены двумя подтипами Treg: nTreg (natural), вырабатываемые в тимусе, iTreg (induced) или aTreg (adaptive), экспрессируемые на периферии. Позднее было показано, что стимулирование экспрессии Foxp3 в CD4+CD25- клетках вызывало их дифференцировку в Treg. В целом уровень экспрессии Foxp3 критичен для супрессивной функции Treg и, соответственно, для негативной регуляции иммунного ответа (Campbell D.J., Koch M.A., 2011). Предполагается, что при онкологических заболеваниях Treg подавляют CD8+ цитотоксические лимфоциты, тем самым резко снижая противоопухолевый ответ. Также считается,

что сходный механизм лежит в предотвращении Foxp3-ассоциированных аутоиммунных реакций.

Дифференцировка Treg под влиянием Foxp3 может осуществляться как внутри тимуса, так и вне его. Внутри тимуса этот процесс требует обязательного отсутствия TGF β (трансформирующий фактор роста β , семейство белков, контролирующих пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток), однако в то же время TGF β необходим для поддержания нормального числа Treg в периферической крови (Marie J.C., Letterio J.J., Gavin M. et al, 2011). Показано, что основными пусковыми факторами экспрессии Foxp3 являются NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток, семейство транскрипционных факторов, контролирующих активацию и функциональную активность клеток иммунной системы) и Smad3 (представитель семейства Smad-белков, сигнальных трансдуктеров и модуляторов транскрипции), связывающиеся с энхансерным регионом промотора Foxp3 и приводящие к ацетилированию гистона H4, причем Smad3 необходим на ранних этапах развития Treg, а NFAT - на поздних. Известно, что в этом процессе также принимают участие Sp1, AP1, (транскрипционные факторы, задействованные как в активации, так и репрессии множества патологических путей), NFAT, STAT5 (представитель семейства STAT, сигнальный трансдуктер и активатор транскрипции), но точные механизмы их влияния до сих пор не ясны (рисунок 1.1.).

В целом, в настоящий момент Foxp3 признан одним из основных супрессивных регуляторов: установлено, что у Foxp3-дефицитных мышей резко нарушены Treg-зависимые супрессивные механизмы (Wan Y.Y., Flavell R.A., 2007) Также в зрелых клетках данный транскрипционный фактор необходим для поддержания фенотипа: делеция Foxp3-аллеля в зрелых регуляторных Т-лимфоцитах приводила не только к нарушению функции и исчезновению характерных поверхностных маркеров Treg, но и к приобретению клетками эффекторных черт, в частности продукции специфических цитокинов. Данные изменения зафиксированы только в Treg: в других клеточных субпопуляциях удаление Foxp3 не влияло ни на функциональные характеристики, ни на уровни

экспрессируемых цитокинов (Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. et al, 2007), что позволило сделать вывод о том, что все патологические состояния, возникающие при дефиците Foxp3, связаны именно с нарушением функций Treg.

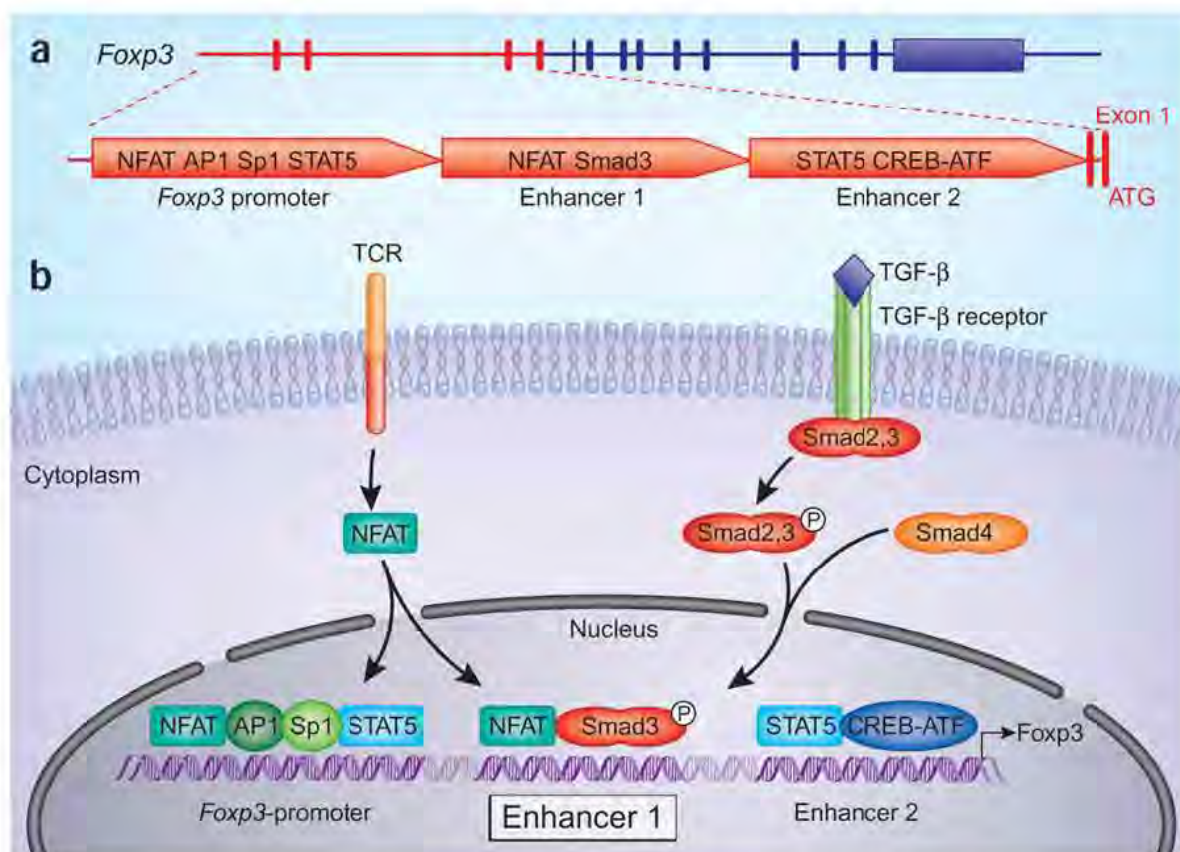


Рисунок 1.1. Основные внутриклеточные механизмы регуляции экспрессии Foxp3.

NFAT - ядерный фактор активированных Т-клеток, Smad2,3,4 - сигнальные трансдуктеры и модуляторы транскрипции, Sp1 и AP1 - транскрипционные факторы, задействованные как в активации, так и репрессии множества патологических путей, STAT5 - сигнальный трансдуктер и активатор транскрипции (von Boehmer H., Nolting J., 2008).

В ряде исследований было показано, что для развития Treg необходимо присутствие IL-2 и в меньшей степени IL-15, IL-7. У мышей с дефицитом этих цитокинов резко снижалось число Treg (Vang K.B., Yang J., Mahmud S.A., et al, 2008), в связи с чем было выдвинуто предположение о вероятном активирующем влиянии STAT5 на Foxp3, так как экспрессия именно этого представителя Jak-STAT сигнальной системы запускается под воздействием IL-2. Способность STAT5 взаимодействовать с промотором Foxp3 подтверждена в экспериментах с искусственным введением активного STAT5: в этих условиях, даже при

отсутствии IL-2 численность Treg поддерживалась на уровне нормальных значений (Burchill M.A., Goetz C.A., Prlic M., et al, 2003). Однако до сих пор не ясно как именно действует STAT5: непосредственно связывается с промотором, вызывая ремоделирование хроматина, или другими, неустановленными на настоящий момент, путями.

Какие же механизмы служат «пусковым» фактором дифференцировки наивного Т-лимфоцита в регуляторную Т-клетку? Как уже упоминалось ранее, в основе этого процесса лежит активная экспрессия мРНК Foxp3 и подавление синтеза других транскрипционных факторов в достаточном количестве для изменения направления дифференцировки Т-клетки в сторону других Т-клеточных популяций. Белок Foxp3 совместно с комплексом Runx1-TGFβ (Runx – связанный транскрипционный фактор 1 – трансформирующий фактор роста β) связывается с CNS2 элементом ДНК (консервативная некодирующая последовательность) в *foxp3* локусе. Вторым регуляторным элементом, от которого зависит экспрессия Foxp3 это CNS1, содержащий сайты связывания с NFAT, RAR/RXR (комплекс рецептора ретиноидной кислоты и ретиноидного X-рецептора) и TGF-β-активированным Smad3: взаимодействие с NFAT предотвращает формирование комплексов NFAT-AP-1, необходимых для экспрессии генов эффекторных Т-лимфоцитов, и, таким образом, запускает программу, необходимую для функционирования и развития Treg (Wu Y., Borde M., Heissmeyer V., et al, 2006).

Анализ влияния Foxp3 на уровни различных цитокинов показал способность транскрипционного фактора подавлять экспрессию IL-2, TNF-α, IFN-γ, IL-17 и IL-4, причем подавление IL-17, вероятнее всего, обусловлено изменением транскрипционной активности RORγ и RORα (представители семейства многофункциональных транскрипционных факторов RAR-related orphan receptor, в частности вовлеченных в развитие лимфатических узлов и участвующих в функциональной активности Th17) (Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., et al, 2008). В других экспериментах снижение уровня Foxp3 приводило к возрастанию числа Th2 и их цитокинов (Wan Y.Y., Flavell R.A., 2007), а также

отмечалось усиление экспрессии IL-6 и OX40 (белка, характерного для Th2) в Treg.

В связи с этим, особый интерес представляет взаимосвязь экспрессии IL-17 и IL-6 с Foxp3. IL-17 – провоспалительный цитокин, вырабатываемый преимущественно Th17. На сегодняшний день активно изучается его роль в хронических воспалительных заболеваниях. Так первоначально в экспериментах на животных, а позже и в широкомасштабных клинических исследованиях была показана эффективность блокады IL-17 у пациентов с псориазом и анкилозирующим спондилитом (Farahnik B., Beroukhim K., Zhu T.H. et al., 2016; Papp K.A., Reich K., Paul C. et al., 2016). Успех данной терапевтической стратегии стимулировал поиск других IL-17-ассоциированных состояний.

При бронхиальной астме высокий уровень экспрессии IL-17 отмечался у пациентов с низким содержанием Th2 и доминирующим нейтрофильным воспалением. Заболевание в данной популяции характеризовалось тяжелым течением и плохим ответом на терапию (Al-Ramli W., Préfontaine D., Chouiali F. et al., 2009). Предполагается, что влияние IL-17 может быть связано с развитием фиброза тканей дыхательных путей (Al-Muhsen S., Letuve S., Vazquez-Tello A. et al., 2013). Кроме того, IL-17 способствует продукции целого ряда цитокинов, в частности IL-6, ускоряя процессы ремоделирования и нарушая функции гладкомышечных клеток дыхательных путей (Dragon S., Rahman M.S., Yang J. et al., 2007).

IL-6 – цитокин, вырабатываемый разными клеточными популяциями, ассоциирован с неаллергической бронхиальной астмой (Virchow J.C. Jr, Kroegel C., Walker C., Matthys H., 1996). На основании установленной роли гиперэкспрессии IL-6 в формировании ряда воспалительных заболеваний (гломерулонефрита, ревматоидного артрита), а также легочного фиброза у мышей, предпринимался ряд попыток связать полиморфизм гена IL-6 с риском развития бронхиальной астмы (Fangwei L., Xinming X., Shaojun L. et al., 2015). Установлено, что IL-6 в комбинации с транскрипционным фактором STAT3, стимулируют дифференцировку Th17 с последующим нарастанием уровней IL-17

(Camporeale A., Poli V., 2012) (рисунок 1.2). В целом, на сегодняшний день доминирование IL-6 и IL-17 представляется одним из ведущих механизмов формирования аутоиммунной патологии.

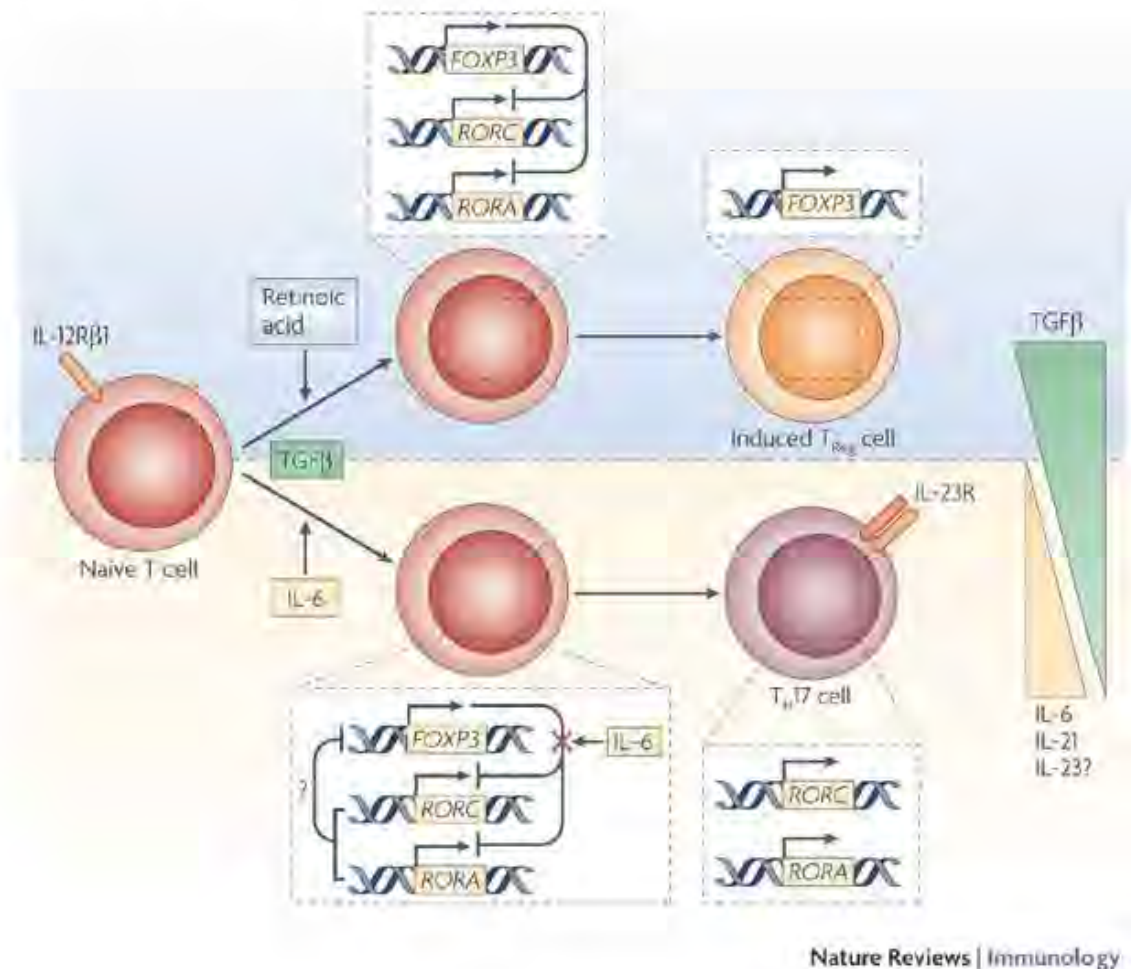


Рисунок 1.2. Дифференцировка наивного Т-лимфоцита под влиянием интерлейкина-6. Интерлейкин-6 (IL-6) блокирует активности Foxp3, тем самым нивелируя фактор, подавляющий транскрипционные факторы ROR (RORA, RORC), и способствуя дифференцировке клетки в Th17, основного продуцента IL-17. TGFβ – трансформирующий фактор роста β (Weaver C.T., Hatton R.D., 2009).

Приведенные данные позволяют говорить об антагонистичности процессов, регулируемых Treg и Th17. Поскольку антагонистичное влияние Foxp3 и RORγ, ключевых транскрипционных факторов данных клеточных популяций, считается достоверно установленным (Ziegler S.F., Buckner J.H. et al., 2009), ожидаемым

является присутствие отрицательной обратной связи в регуляции Foxp3/IL17 взаимодействия.

В заключение необходимо отметить, что примерно 20-30% Foxp3-связанных генов регулируются Foxp3 напрямую. При анализе этих генов было установлено, что, несмотря на то, что Foxp3 позиционируется как репрессор, большинство генов под его влиянием скорее активируются, чем подавляются. В то же время данные результаты не противоречат выдвинутой ранее гипотезе о превалировании подавляющих влияний в функциях рассматриваемого транскрипционного фактора: основная часть Foxp3-связанных генов представлена супрессорами. Таким образом, подтверждается роль Foxp3 как сильного блокатора избыточной активации иммунного ответа.

1.2. Транскрипционный фактор GATA3

Транскрипционный фактор GATA3 является одним из представителей семейства GATA. Все его члены содержат в своей структуре цинковый домен и GATA-мотив (ДНК последовательность W(A/T)GATAR(A/G)) (Ko L.J., Engel J.D. et al., 1993). У млекопитающих, в частности у человека, обнаруживаются шесть транскрипционных факторов, принадлежащих семейству GATA, GATA 1-6.

На сегодняшний день установлено, что факторы GATA 1-3 участвуют в развитии гемопоэтических клеток. Для GATA1 показана экспрессия в мультипотентных стволовых клетках, а также в клетках-предшественниках эритроцитов, мегакариоцитов, эозинофилов, тучных клеток (Fujiwara Y., Browne C.P., Cunniff K. et al., 1996). GATA2 имеет сходный ареал экспрессии: этот транскрипционный фактор обнаруживается в гемопоэтических стволовых клетках, миелоидных прогениторах и тучных клетках (Rodrigues N.P., Tipping A.J., Wang Z. et al., 2012). Он необходим для гемопоэза в процессе эмбриогенеза и пролиферации стволовых клеток в костном мозге у взрослых (Ling K.W., Ottersbach K., van Hamburg J.P. et al., 2004). GATA4 характерен для клеток желточного мешка и мезодермы, служащей субстратом для последующего формирования сердца (Molkentin J.D., Lin Q., Duncan S.A. et al., 1997). GATA5 важен для формирования органов мочеполовой системы, а GATA6 для бронхиального эпителия (Molkentin J.D., Tymitz K.M., Richardson J.A. et al., 2000; Morrissey E.E., Tang Z., Sigrist K. et al., 1998).

В настоящее время транскрипционные факторы семейства GATA считаются жизненно необходимыми для развития эмбриона. Такой вывод был сделан на основании результатов, полученных при изучении нокаутных мышей. В частности, *Gata1*- и *Gata2*- мыши имели серьезные дефекты эритропоэза. GATA3-нокаутные эмбрионы погибали из-за внутренних кровотечений и несовместимых с жизнью деформаций головного и спинного мозга. Кроме того, делеция GATA3 приводила к полной остановке развития и дифференцировки Т-клеток (Hosoya T.,

Kuroha T., Moriguchi T. et al., 2009; Hendriks R.W., Nawijn M.C., Engel J.D. et al., 1999).

Показано, что транскрипционный фактор GATA3 экспрессируется не только в клетках крови, но и в клетках других тканей: почек, надпочечников, кожи, молочных желез, органов центральной нервной системы. Он также является одним из ключевых участников некоторых клеточных процессов. Так тимопоэз требует активации нескольких регуляторных путей, в частности Notch1 рецепторов (представитель семейства Notch – рецепторов, участвующих в формировании и развитии большинства внутренних органов и тканей организма), которые инициируют и поддерживают развитие Т-клеток. На этой же стадии активируется GATA3, хотя на данный момент остается неясным, связано ли это непосредственно с Notch-рецепторами. Тесное взаимодействие этих путей требуется и на этапе подавления развития В-клеток посредством ингибирования транскрипционного фактора Ebf1 (early B cell factor-1 – ключевой фактор дифференцировки и развития В-клеток) (Banerjee A., Northrup D., Boukarabila H. et al., 2013).

На разнообразие функций GATA3 указывают и нарушения, выявленные при дефиците этого транскрипционного фактора у человека: показана связь возникновения HDR-дисплазии (hypoparathyroidism-deafness-renal dysplasia, аутосомно-доминантное заболевание определяемое наличием триады гипопаратиреоз – дисплазия почек – потеря слуха) с различными аномалиями строения GATA3 (Ali A., Christie P.T., Grigorieva I.V. et al., 2007). Кроме того, мутации GATA3 обнаруживались у больных раком молочной железы и высокоинвазивным раком желчного пузыря, причем низкая экспрессия фактора ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом. Также было установлено, что низкоацетилированные мутантные формы GATA3 снижают выживаемость Т-клеток.

Транскрипционный фактор GATA3 привлек внимание ученых как важное патогенетическое звено в заболеваниях, в развитии которых так или иначе задействованы Th2, а также их основные цитокины - IL-4, IL-5 и IL-13. Для

лучшего понимания процессов, непосредственным участником которых является GATA3, необходимо подробнее рассмотреть известную информацию о его структуре и особенностях взаимодействия с другими внутриклеточными путями.

GATA3 содержит ядерный сигнальный фрагмент, чья локализация в ядре или цитоплазме обусловлена фосфорилированием сериновых фрагментов с помощью p38MAPK (представитель семейства митоген-активированных протеинкиназ, участник мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей, контролирующих транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз и другие процессы). p38MAPK в свою очередь активируется посредством Т-клеточного рецептора. Этот процесс усиливает связывание GATA3 с белком-переносчиком импортином- α и способствует переносу транскрипционного фактора в ядро (Maneechotesuwan K., Xin Y., Ito K. et al., 2007; Furusawa J., Moro K., Motomura Y. et al., 2013). Именно эти связи обуславливают механизм влияния глюкокортикостероидов на функции GATA3: в основе находится подавление переноса транскрипционного фактора в ядро путем индуцирования MAPK фосфатазы-1, ингибитора p38MAPK (Maneechotesuwan K., Yao X., Ito K. et al., 2009).

Транскрипционный фактор способен связываться с промоторами *IL5*, *IL13*, а также регуляторными элементами интрона *IL4* (Kishikawa H., Sun J., Choi A. et al., 2011; Zhang D.H., Yang L., Ray A., 1998). Кроме того, он воздействует на такие специфические сайты, как HSII- IE (intronic enhancer), HSIII, HSVa, HSV (hypersensitive sites – открытый хроматин, участки хроматина, свободные от нуклеосом), первый из которых является сильнейшим из известных энхансеров *IL-4* в Th2. *In vitro* была продемонстрирована способность GATA3 связываться с HSS1 и HSS2, локализованных в регуляторном регионе CNS-1 (conserved noncoding region), а также с RHS5 и RHS7, также представляющих собой участки открытого хроматина, расположенные в пределах LCR*Rad50* (locus control region – цис-регуляторный элемент, усиливающий экспрессию связанных с ним генов), под влиянием STAT6 (Takemoto N., Kamogawa Y., Jun Lee H. et al., 2000; Lee D.U., Rao A., 2004).

В процессе дифференцировки Th2 STAT6 усиливает продукцию GATA3, что приводит к экспрессии ключевых цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 (Ribeiro de Almeida C., Heath H., Krpic S. et al., 2009). Установлено, что GATA3 взаимодействует со всеми важнейшими для Th2 DHS (DNaseI hypersensitive site – участок открытого хроматина, гиперчувствительный к ДНКазе I), в частности ключевыми для активации *Il4*, а также способен активировать эти DHS в Th1, вызывая последующее ремоделирование хроматина (Tanaka S., Motomura Y., Suzuki Y. et al., 2011).

GATA3 и STAT6 напрямую ремоделируют LCR (locus control region – цис-регуляторный элемент, усиливающий экспрессию связанных с ним генов) при участии некоторых дополнительных транскрипционных факторов и хроматиновых организаторов, таких как SATB1 (AT-rich binding protein1 – участвует в организации транскрипционно уравновешенного хроматина), YY1 (YinYang1 – репрессор транскрипции), CTCF (CCCTC-binding factor – регулятор структуры хроматина), когезин (комплекс белков, который регулирует процесс разделения сестринских хроматид в ходе деления клетки) (Lee D.U., Rao A., 2004; Cai S., Lee C.C., Kohwi-Shigematsu T., 2006; Parelho V., Hadjur S., Spivakov M. et al., 2008). Интересным представляется тот факт, что и GATA1 и GATA2 также связываются с HSII в локусе *Il4* тучных клеток, что может являться косвенным свидетельством участия этих транскрипционных факторов в реализации функций GATA3 (Kwan M., Powell D.R., Nachman T.Y. et al., 2005).

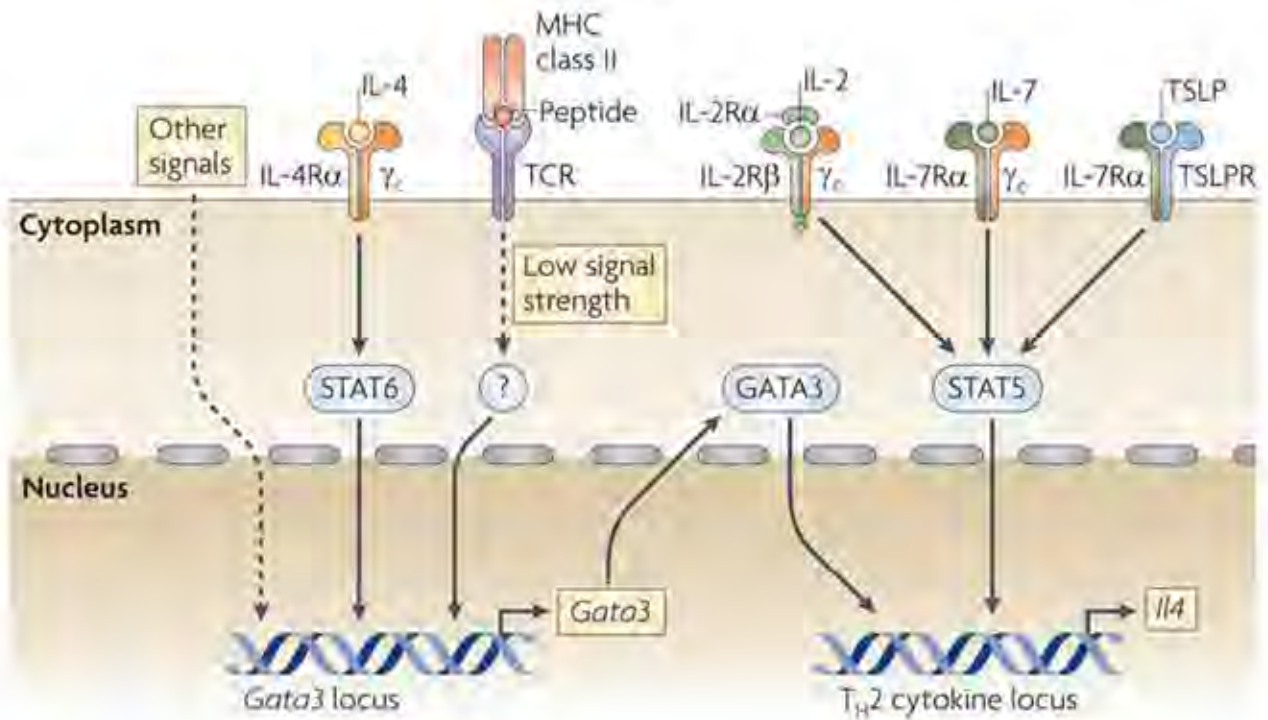
На сегодняшний день общеизвестно, что Th2 представляют собой популяцию клеток иммунной системы, характеризующуюся экспрессией провоспалительных цитокинов: IL-4, IL-5, IL-13. Установлено, что GATA3 необходим как для дифференцировки наивных Т-клеток в Th2, так и для активации уже зрелых Th2. В этом процессе задействован IL-4, индуцирующий фосфорилирование и активацию STAT6, который в свою очередь усиливает экспрессию GATA3 через дистальный и проксимальный промоторы.

Способность IL-4-STAT6 индуцировать экспрессию GATA3 в зрелых Th2 приводит к формированию положительной обратной связи: IL-4 крайне

необходим для дифференцировки субпопуляции клеток, которая является его основным продуцентом. Несмотря на то, что IL-4 продуцируется в том числе и другими типами клеток, Th2-иммунный ответ активируется при продукции данного интерлейкина именно Th2 клетками, что было подтверждено в экспериментах на мышах с дефектами IL-4-ассоциированного сигнала (Schmitz J., Thiel A., Kühn R. et al., 1994).

Показано, что выработка GATA3 стимулируется двумя путями: напрямую или через транскрипционный фактор Dec2 (Ouyang W., Löhning M., Gao Z. et al., 2000; Yang X.O., Angkasekwinai P., Zhu J. et al., 2009). Другие описанные пути связаны с исходной продукцией IL-4. Воздействие на Т-клеточный рецептор индуцирует продукцию GATA3 и IL-4, а также активирует IL-2, который в свою очередь активирует STAT5a (Lin J.X., Leonard W.J., 2000; Yamane H., Zhu J., Paul W.E., 2005). STAT5a способен связываться с уже упоминавшимися сайтами HSII и HSIII в локусе *il4*, таким образом, совместно с GATA3 индуцируя Th2 дифференцировку (Cote-Sierra J., Foucras G., Guo L. et al., 2004) (рисунок 1.3).

Также обсуждается роль уже упоминавшейся ранее Notch-системы, представленной четырьмя рецепторами, в регуляции жизненного цикла Th2. На данный момент считается, что Notch-рецепторы способствуют дифференцировке Т-клеток, непосредственно активируя промотор *GATA3* и воздействуя на энхансер *Il4*. Оба эти механизма реализуются за счет RBPjk (recombination-signal-binding protein for immunoglobulin Jk region – один из транскрипционных факторов Notch-сигнального пути), при недостатке которого Notch1 и Notch2 рецепторы теряли способность влиять на активацию Th2 в ответ на воздействие паразитарных агентов (Amsen D., Antov A., Jankovic D. et al., 2007).



Nature Reviews | Immunology

Рисунок 1.3. STAT-белки и активация GATA3. Синтез мРНК GATA3 стимулируется под влиянием IL-4/STAT6 пути. Активация STAT5 (через влияние IL-2) и его совместная функциональная активность с GATA3 приводит к окончательной дифференцировке клетки в Th2 и началу самостоятельной продукции IL-4 (Paul W.E., Zhu J., 2010).

Таким образом, несмотря на доказанное влияние IL-4 на активацию и дифференцировку Th2, вероятнее всего Th2-ассоциированный ответ реализуется за счет комбинации влияний многих пусковых факторов, в том числе и рассмотренных выше вариантов активации GATA3.

Представляет интерес тот факт, что сходные процессы описаны для развития Th9, субпопуляции Т-лимфоцитов, роль которых в аллергических заболеваниях, в том числе при бронхиальной астме, сейчас активно изучается и даже рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень. Данный тип клеток характеризуется продукцией IL-9 - одного из пусковых факторов развития бронхиальной гиперреактивности у мышей. Установлено, что Th9 развиваются как из наивных Т-клеток, так и из Th2 под воздействием TGFβ, IL-4, IL-9 (Kaplan M.H., 2013). В настоящий момент показана способность GATA3 регулировать как

экспрессию IL-9R, так и подавление продукции IL-9 при селективном снижении Notch1 и Notch2 (Wei G., Abraham B.J., Yagi R. et al., 2011; Elyaman W., Bassil R., Bradshaw E.M. et al., 2012).

В целом, в ряде экспериментов неоднократно была подтверждена способность GATA3 ингибировать основные Th1-специфичные факторы – T-bet и IFN- γ , а также STAT4 и IL-12R β 2 (Usui T., Preiss J.C., Kanno Y. et al., 2006). Об этом свидетельствуют результаты исследований, выявивших повышенную экспрессию STAT4 и IL-12R β 2 у GATA3-дефицитных мышей (Wei G., Abraham B.J., Yagi R. et al., 2011). Однако на сегодняшний день показано, что активность GATA3 и T-bet не является взаимно исключающей: зафиксирована способность Th1-клеток продуцировать GATA3 в крайне малых количествах. Так при инфицировании лимфоцитарным хориоменингитом в организме обнаруживаются и стабильно функционируют GATA3+ T-bet+ Т-лимфоциты (Antebi Y.E., Reich-Zeliger S., Hart Y. et al., 2013; Fang M., Xie H., Dougan S.K. et al., 2013). Такие клетки участвуют как в Th1-, так и в Th2-ассоциированном иммунном ответе, характеризующемся низкой интенсивностью.

Недавние исследования продемонстрировали роль GATA3 как основного регулятора развития и функционирования одного из подтипов врожденных лимфоидных (ILC) клеток – ILC2c. Стоит заметить, что в этом случае, как и в случае с Т-хелперами, отмечается соответствие функций клетки маркерному транскрипционному фактору. ILC1c, представленные натуральными киллерами и другими IFN- γ -продуцирующими клетками, экспрессируют транскрипционный фактор T-bet. Их основная роль – защита от вирусов и простейших. ILC2c, в свою очередь, характеризуются экспрессией IL-5 и IL-13 в ответ на стимуляцию IL-25 и IL-33, участвуют в противогельминтной защите, аллергическом воспалении и гиперреактивности дыхательных путей. ILC3c, влияющие на барьерную функцию легких посредством регуляции выработки слизи, требуют для развития (и продуцируют сами) фактор ROR γ t, IL-17A и IL-22.

Врожденные лимфоидные клетки являются полноправными участниками иммунного ответа. В модели аллергического воспаления дыхательных путей у

мышей ILC2s наряду с Th2 показали себя как основные продуценты IL-5 и IL-13, усиливающего миграцию активированных дендритных клеток и дифференцировку наивных Т-клеток в Th2 (Halim T.Y., Steer C.A., Mathä L. et al., 2014).

Таким образом, в настоящее время считается убедительно доказанной роль GATA3 как значимого участника аллергических процессов, «ответственного» за регуляцию функций Th2.

1.3. Транскрипционный фактор T-bet

Транскрипционный фактор T-bet (T-box protein, TBX21) относится к семейству TBX (T-box protein), включающему 18 белков. Все они имеют общий концевой T-box домен, связывающийся с ДНК посредством последовательности TCACACCT и отвечающий за регуляцию транскрипции (Wilson V., Conlon F.L., 2002). Однако в остальном структура домена у разных представителей семейства может значительно различаться. Так TBX1 и TBX2 имеют 61% идентичности структуры ДНК-связывающего сайта, а обсуждаемый транскрипционный фактор T-bet гомологичен им на 50%, что обуславливает разные механизмы связывания.

Экспрессия T-bet увеличивается при стимуляции T-клеточного рецептора и влиянии IL-12 и IFN- γ . IFN- γ , связываясь с рецептором, активирует STAT1 и транскрипцию генов TBX21, *IFNG* и *IL12RB2*. Экспрессия β 2-субъединицы рецептора к IL-12 через IL12-STAT4 взаимодействие, приводит к дифференцировке клеток в Th1. Также продемонстрирован обратный процесс: T-bet напрямую связывается с *IFNG* промотором и активирует транскрипцию, увеличивая, таким образом, содержание IFN- γ и регулируя свою собственную экспрессию по механизму положительной обратной связи. Кроме того, этот процесс приводит к дифференцировке клеток-предшественников в Th1, что согласуется с ранее продемонстрированной способностью экзогенного T-bet индуцировать дифференцировку наивных T-лимфоцитов в Th1 и превращать зрелые Th2 в Th1 (Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L. et al., 2000).

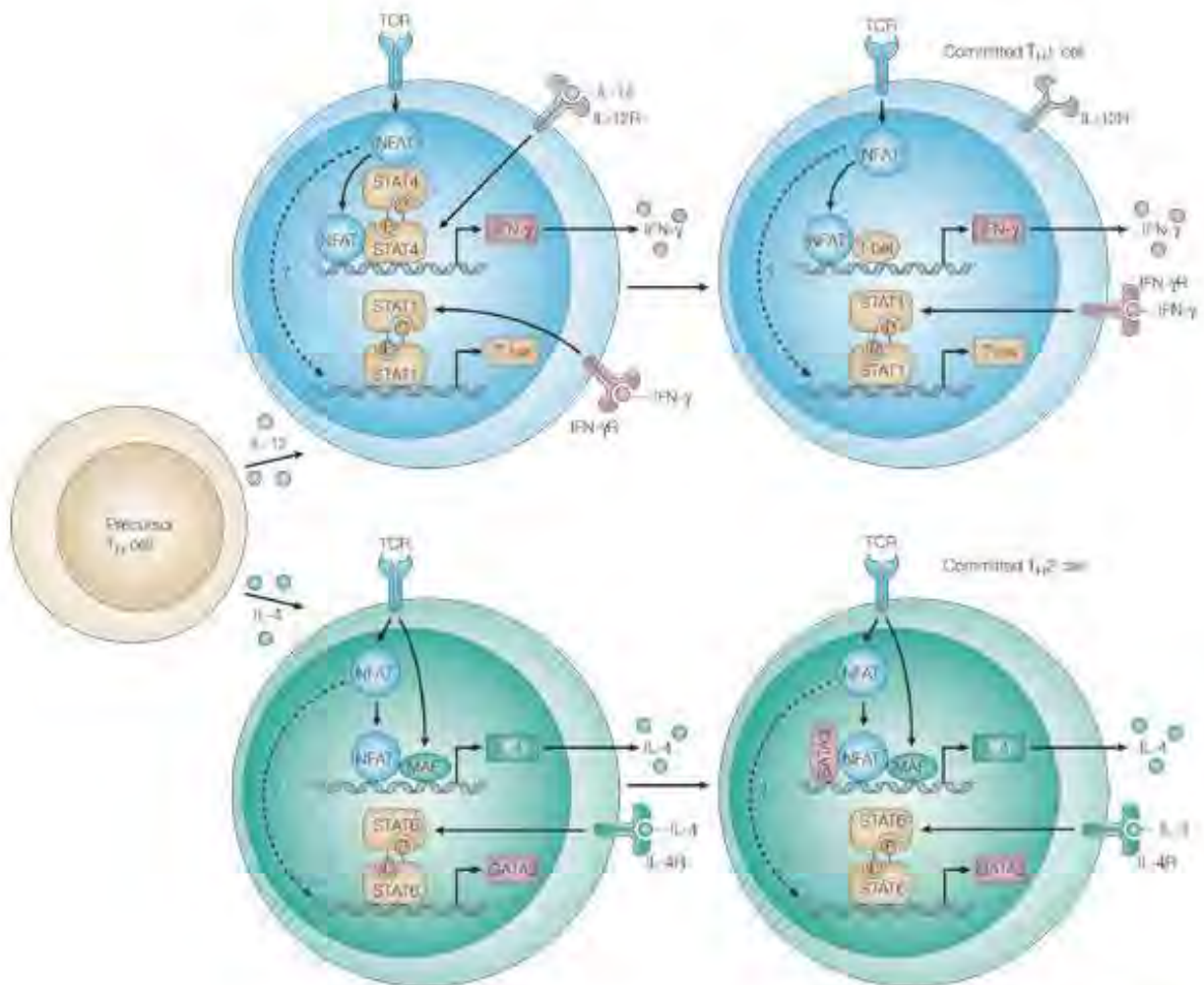
Также T-bet значимо подавляет экспрессию IL-2, крайне необходимого для пролиферации и дифференцировки T-клеток и активно продуцирующегося при стимуляции TCR (T-клеточного рецептора). Введение эктопического T-bet значительно подавляло продукцию IL-2 через NF κ B (ядерный фактор κ B - универсальный фактор транскрипции, влияющий на экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла), контролируя, таким образом, Th1-ассоциированный иммунный ответ (Hwang E.S., Hong J.H., Glimcher L.H., 2005). T-bet воздействует на продукцию, цитокинов, характерных для Th2, а именно IL-

4, IL-5, IL-13 посредством ингибирующего влияния на GATA3. Ожидается, недостаток T-bet вызывает усиление Th2 иммунного ответа (Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L. et al., 2000).

Как неоднократно подтверждено разными исследованиями, основная функция T-bet сводится к роли одного из основных факторов развития Th1 и Th1-ассоциированной экспрессии IFN- γ . Воздействие T-bet на Th2 и Th17 приводило к трансформации клеток такого типа в IFN- γ -продуцирующий Th1 (Lazarevic V., Chen X., Shim J.H. et al., 2011). Как уже упоминалось ранее, экспрессия T-bet в лимфоцитах индуцируется под влиянием IFN- γ -STAT1 и IL12R-STAT4 (а конкретно за счет IL12R β 2-субъединицы) взаимодействий после активации TCR.

Процесс развивается по следующему пути: стимуляция TCR и IL12-STAT5 - сигнального пути блокирует IL12R β 2 субъединицу, что устраняет подавляющее влияние на IL-12R. Далее IL12 через STAT4 индуцирует вторую волну экспрессии T-bet, которая приводит к окончательной стабилизации клетки на Th1 фенотипе.

Возможно, на процесс также влияет аутоактивация *Tbx21* в присутствии T-bet, но, как бы то ни было, установлено, что эндогенная индукция *Tbx21* зависит от IFN γ -сигнала. В целом, на сегодняшний день считается однозначно доказанной только связь экспрессии T-bet с IL-12 и IFN- γ , поэтому, вероятнее всего, процесс аутоактивации протекает с помощью данных цитокинов (Zhu J., Jankovic D., Oler A.J. et al., 2012) (рисунок 1.4).



Nature Reviews | Immunology

Рисунок 1.4. Дифференцировка наивного Т-хелпера. Под воздействием IL-12 и активации Т-клеточного рецептора запускается каскад внутриклеточных взаимодействий с участием STAT1 и STAT4, приводящий к синтезу IFN-γ и началу синтеза мРНК T-bet, который далее поддерживается постоянной продукцией IFN-γ, и обеспечивает формирование и поддержание Th1-фенотипа. Абсолютно по другому механизму и с участием других транскрипционных факторов осуществляется дифференцировка в Th2, где доминирующими участниками процесса являются интерлейкин-4, STAT6, GATA3 (Macain F., 2005).

Каким же образом T-bet влияет на хроматин? Считается, что ацетилирование гистонов H3 и H4, деметилирование лизина приводит к активации транскрипции, а деметилирование гистона H3K27, наоборот, к репрессии (Miller S.A., Mohn S.E., Weinmann A.S. et al., 2010). Одним из основных условий трансформации клетки в Th1 под влиянием T-bet являются высокие уровни транскрипции гена *IFN-γ* после

активации его промотора непосредственным связыванием с T-bet при участии HLX (H2.0-like homeobox protein, транскрипционный фактор, участвующий в висцеральном органогенезе и развитии нервной системы), RUNX3 (Runt – связанный транскрипционный фактор 3 – белок, выступающий как активатор, так и репрессор транскрипции при разных патологических процессах) и CTCF (CCCTC-binding factor – регулятор структуры хроматина). Последующее тирозинное фосфорилирование T-bet способствует блокаде GATA3, а именно нарушает процесс связывания с Th2-ассоциированными генами (Hwang, E.S., Szabo S.J., Schwartzberg P.L. et al., 2005). Кроме того, T-bet индуцирует специфические изменения в хроматине, препятствующие синтезу GATA3 *de novo* (Zhu J., Jankovic D., Oler A.J. et al., 2012).

Показано, что T-bet активирует около 50% ассоциированных генов именно путем непосредственного связывания. Таким образом, несмотря на активирующее влияние самого T-bet, его функции оказываются ингибирующими в отношении аллергических процессов за счет основного влияния именно на Th1 посредством STAT4, ответственного за активацию Th1-ассоциированных энхансеров.

Кроме того, в ряде экспериментов было показано участие T-bet в регуляции активности транскрипционных факторов, ассоциированных с другими T-клеточными популяциями, в частности ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor- γ t, ключевой транскрипционный фактор Th17), BCL6 (B-cell lymphoma-6, специфический репрессор транскрипции, участвующий в IL-4-связанном B-клеточном ответе), что влияет на развитие и активность Th17, Treg, и T_{FH}.

В дополнение к уже рассмотренной экспрессии T-bet в Th1, этот транскрипционный фактор также обнаруживается и в других клетках при различных патологических состояниях. Так в настоящее время неоднократно показана выработка T-bet в дендритных клетках и моноцитах под влиянием стимуляции IFN- γ , что обуславливает роль T-bet в патогенезе ревматоидного артрита, механизмах противопротозойного и противовоспалительного ответа в кишечнике (Wang J., Fathman J.W., Lugo-Villarino G. et al., 2006; Garrett W.S., Lord

G.M., Punit S. et al., 2007). Кроме этого, T-bet участвует в межклеточных взаимодействиях при болезни Крона: транскрипционный фактор является одним из характерных маркеров ILC1, которые имеют сходные с Th1 функции, в отличие от ILC2, которые, как уже упоминалось ранее, экспрессируют GATA3. Вероятнее всего, в этом случае реализация функций T-bet происходит за счет прямой блокады IL-7R (Powell N., Walker A.W., Stolarczyk E. et al., 2012).

Также считается установленным влияние T-bet на CCR3 (C-C рецептор хемокина) и CXCR3 – хемокиновые рецепторы, в последние годы ставшие активным объектом изучения в качестве мишеней фармакотерапии заболеваний, патогенез которых тем или иным образом связан с иммунным ответом. Еще одной возможной сферой участия T-bet в патологических процессах является противоопухолевый иммунитет: совместно с транскрипционным фактором EOMES (eomesodermin) T-bet участвует в развитии и созревании NK-клеток (Gordon S.M., Chaix J., Rupp L.J. et al., 2012). Показано, что при отсутствии T-bet функции NK-клеток нарушаются, что является одним из механизмов нарушения противоопухолевого ответа.

Таким образом, на основании имеющихся на сегодняшний день научных данных, можно утверждать, что T-bet представляет собой один из ключевых транскрипционных факторов, влияющих на Th1-ассоциированный ответ.

1.4 Транскрипционный фактор c-Maf

c-Maf является наименее изученным из рассматриваемых транскрипционных факторов. Представителей семейства Maf принято разделять на подгруппы в зависимости от их молекулярной массы: малые (MafF, MafG, MafK, MafT, MafS) и крупные (MafA, MafB, c-Maf, NLR). Данные белки относятся к семейству bZIP-транскрипционных факторов, включающее в себя несколько представителей: AP-1-комплекс (комбинация протоонкогенов c-Fos и c-Jun), CREB/ATF (комплекс цАМФ-связывающий протеин / активирующий транскрипционный фактор), CNC (cap'n'collar), C/EBP (CCAAT-энхансер-связывающий белок), PAR.

Крупные Maf белки имеют N-концевой домен, ответственный за связывание с ДНК, тогда как у малых белков такой домен отсутствует (Kataoka K., 2007). В то же время C-концевой лейциновый домен обеспечивает связывание с другими bZIP белками. Все Maf-белки характеризуются способностью связываться с фрагментами ДНК, получившими название MARE (Maf-recognition elements), конкретно для рассматриваемого транскрипционного фактора c-Maf описаны два сайта связывания: T-MARE и C-MARE (Kataoka K., 1994). В целом, механизмы, регулирующие экспрессию, c-Maf не ясны, однако убедительно показано, что данный процесс не возможен без фосфорилирования под влиянием активации ERK1/2-киназы (внеклеточная сигнал-регулирующая киназа).

На сегодняшний день в ряде исследований показано участие представителей семейства в различных процессах роста и дифференцировки тканей как у человека, так и у ряда животных. MafA и MafB участвуют в развитии поджелудочной железы, а также стимулируют образование и рост β -клеток у взрослых организмов (Kataoka K., Shioda S., Ando K. et al., 2004). Кроме того, MafB считается необходимым для дифференцировки подоцитов, а c-Maf выявляется в почках у мышей еще на стадии эмбрионального развития (Imaki J., Tsuchiya K., Mishima T. et al., 2004). Мыши-нокауты по c-Maf характеризуются малым размером клеток гепатоцитов и проксимальных канальцев почек.

Также была показана роль c-Maf в дифференцировке мезенхимальных клеток в остеобласты и адипоциты, хондроцитов на поздних стадиях развития (Nishikawa K., Nakashima T., Takeda S. et al., 2010; Hong E., Di Cesare P.E., Haudenschild D.R., 2011). В ряде исследований *in vivo* продемонстрирована связь воспалительных процессов в нервной ткани с активацией мРНК, подавляющих c-Maf, что позволило сделать вывод о влиянии транскрипционного фактора на процессы, протекающие в микроглии (Su W., Aloï M.S., Garden G.A., 2015). Изучение патологических состояний у человека выявило гиперэкспрессию c-Maf при различных опухолевых процессах, особенно при миеломе (Hurt E.M., Wiestner A., Rosenwald A. et al., 2004).

Первоначально предполагалось, что основной ролью c-Maf является регуляция экспрессии IL-4 Th2, однако позднее была обнаружена продукция рассматриваемого транскрипционного фактора другими субпопуляциями Т-лимфоцитов: Th17, T_{FH} (Bauquet A.T., Jin H., Paterson A.M. et al., 2009). В настоящее время считается установленной способность c-Maf влиять на экспрессию IL-21: деплеция гена c-Maf нарушала продукцию IL-21, в то время как его стимуляция приводила к нарастанию числа IL-21 экспрессирующих клеток (Kroenke M.A., Eto D., Locci M. et al., 2012).

Наиболее изученной на сегодняшний день функцией c-Maf является активация транскрипции гена IL-4: после тирозинового фосфорилирования c-Maf приобретает способность связываться с промотором соответствующего гена (Lai C.Y., Lin S.Y., Wu C.K. et al., 2012). Кроме того, в контексте обсуждения влияния c-Maf на Т-лимфоциты определенный интерес приобретает способность этого транскрипционного фактора отрицательно влиять на дифференцировку Th1 путем снижения продукции IFN- γ (Ho I.C., Lo D., Glimcher L.H., 1998). Таким образом, для c-Maf выявлены следующие закономерности: способность усиливать Th2 дифференцировку IL-4-зависимым путем и подавлять Th1 несвязанным с Th2-ассоциированными цитокинами путем.

1.5. Кооперативные взаимодействия транскрипционных факторов Foxp3, c-Maf, GATA3, T-bet при бронхиальной астме

Патогенез бронхиальной астмы представляет собой сложный механизм, требующий вовлечения множества клеточных популяций и сложных межклеточных взаимодействий, реализация которых обеспечивается, в том числе, и деятельностью транскрипционных факторов. Исходя из имеющихся на сегодняшний день данных о существовании аллергической и неаллергической бронхиальной астмы, можно предположить неидентичность патологических процессов, лежащих в основе клинических проявлений при каждой из форм заболевания.

Многообразие известных популяций Т-лимфоцитов, а также их способность экспрессировать строго определенные цитокины обуславливает возможность существования сложных сетей кооперативных взаимодействий не только непосредственно между Т-лимфоцитами, но и их транскрипционными факторами. Вероятнее всего, все составляющие этой иммунной сети связаны между собой напрямую или за счет косвенных многоступенчатых взаимодействий.

В рамках настоящего исследования были изучены транскрипционные факторы Foxp3, GATA3, T-bet и c-Maf, ассоциированные с тремя типами Т-клеток: Т-хелперами 1 и 2 типов, регуляторными Т-клетками (рисунок 1.5). Также оценивались концентрации IL-17 – одного из основных маркеров активности Th17.

Далее будут подробно рассмотрены современные представления о кооперативных взаимодействиях указанных транскрипционных факторов и связанных с ними цитокинов.

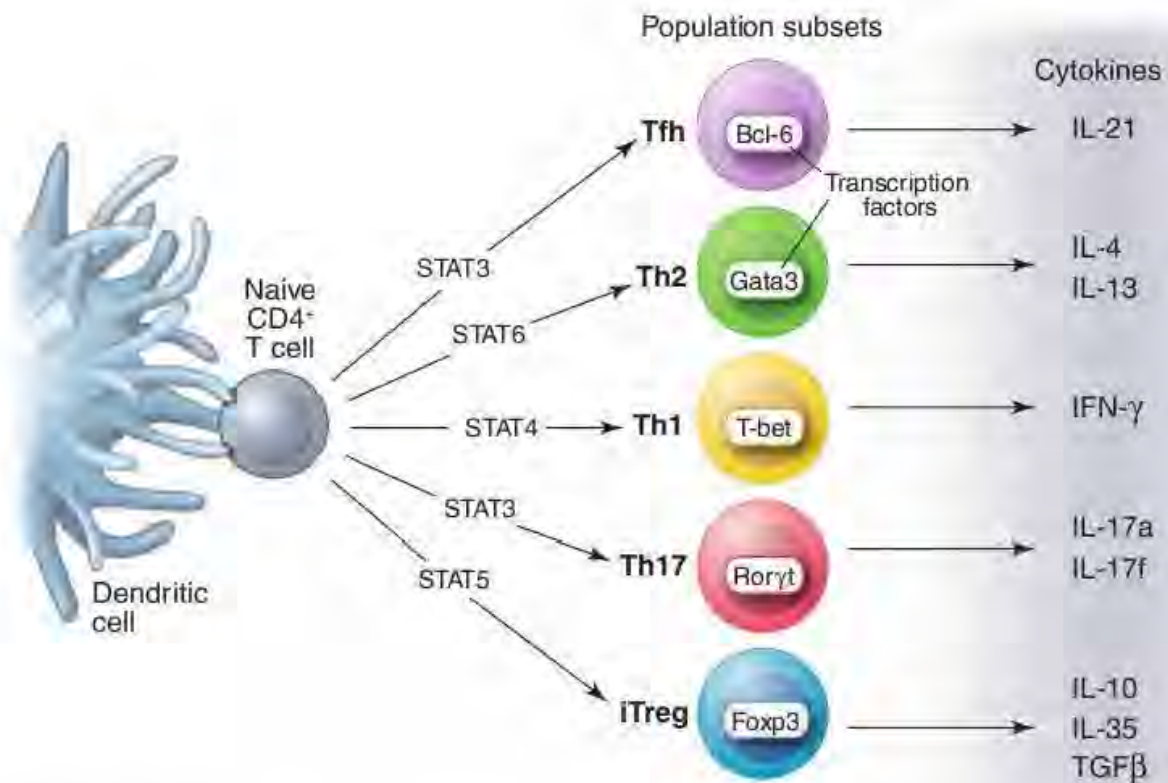


Рисунок. 1.5. Основные популяции Т-лимфоцитов. Посредством функциональной активности STAT-белков наивный Т-лимфоцит дифференцирует в одну из Т-клеточных популяций, характеризующихся экспрессией транскрипционных факторов и цитокинов, специфических для каждого типа клеток (O'Shea J.J., Paul W.E., 2010).

Как уже обсуждалось в соответствующих разделах, GATA3 и T-bet – антагонистичные транскрипционные факторы, характерные для разных субпопуляций Т-лимфоцитов и взаимно ингибирующие друг друга. Исследования их функций при бронхиальной астме ожидаемо подтвердили эти данные, в том числе в многочисленных моделях астмы у мышей (Kiwamoto T., Ishii Y., Morishima Y. et al., 2006; Chen S.M., Tsai Y.S., Lee S.W. et al., 2014).

GATA3, в отличие от T-bet, экспрессируется в наивных Т-лимфоцитах. После активации наивных CD4⁺ клеток происходит неселективное ацетилирование гистонов как Th1, так и Th2 ассоциированных генов, что и определяет дальнейшую дифференцировку клетки (Avni O., Lee D., Macian F. et al., 2002). Скорее всего, именно на этом этапе T-bet блокирует GATA3, приводя к

доминированию именно Th1-программы: под воздействием TCR-сигнала индуцируется экспрессия T-bet, что, в результате, приводит к переключению на Th1-ответ. Кроме того, установлено, что дополнительный механизм, подавляющий Th2-ассоциированный ответ, реализуется за счет за счет фосфорилирования T-bet и более активном подавлении связывания GATA3 с ДНК (Hwang E.S., Szabo S.J., Schwartzberg P.L. et al. 2005).

В настоящее время показано, что GATA3-связывающие сайты содержат фрагменты, сходные по структуре с T-bet-связывающими сайтами, что является косвенным подтверждением непосредственного взаимодействия транскрипционных факторов. Интересно, что ассоциированный с T-bet фактор EOMES (eomesodermin) также оказывает подавляющее воздействие на GATA3 в Т-клетках, а совместное влияние GATA3 и RUNX3 (Runt – связанный транскрипционный фактор 3) в свою очередь подавляет продукцию IFN- γ в Th1, блокируя тем самым продукцию T-bet.

T-bet не является ключевым транскрипционным фактором для регуляторных Т-лимфоцитов, однако обнаружено, что под влиянием T-bet и хемокинового рецептора CXCR3 формируется особый тип Th1-подобных Treg (Kornete M., Mason E.S., Girouard J. et al., 2015). Дефицит T-bet в Treg ведет к нарушению регуляции Th1-ответа, скорее всего за счет нарушения контроля над STAT1. В целом, нарушение экспрессии T-bet Foxp3+ регуляторными Т-клетками не оказывало значимого влияния на течение аутоиммунных заболеваний, что может свидетельствовать о том, что T-bet не способен непосредственно влиять на Treg и Foxp3 и, вероятнее всего, оказывает такое воздействие через другие транскрипционные факторы и цитокины (McPherson R.C., Turner D.G., Mair I. et al., 2015). Исследований взаимных влияний T-bet и c-Maf при бронхиальной астме не проводилось. Однако, исходя из имеющихся на сегодняшний день данных о функциях этих факторов, вероятнее всего, они не взаимодействуют напрямую.

Несмотря на доказанную способность регуляторных Т-клеток экспрессировать T-bet и GATA3, значимость данного явления до сих пор неясна. Нарушение выработки только одного из транскрипционных факторов не влияло

на функции Treg, в то время как их совместная деплеция вызвала серьезные аутоиммуноподобные заболевания. В этом случае также отмечалось значительное снижение уровней транскрипционного фактора Foxp3 (Yu F., Sharma S., Edwards J. et al., 2015). Однако, по мнению исследователей, такой эффект возникал не за счет прямого влияния на Foxp3, а посредством воздействия на транскрипционный фактор ROR γ t, ключевого фактора Th17, ингибирующего экспрессию Foxp3.

Если наличие прямого взаимодействия T-bet и Foxp3 пока не установлено, то для Foxp3 и GATA3 показано формирование комплексов в регуляторных T-клетках при их активации: в Treg GATA3 контролирует экспрессию Foxp3 путем непосредственного связывания с его локусами, в свою очередь Foxp3 также способен связываться с промотором GATA3, при этом транскрипционные факторы усиливают экспрессию друг друга. Кроме того, при развитии воспалительного процесса GATA3 ограничивает экспрессию ROR γ t и, таким образом, влияет на экспрессию специфичных для Treg транскрипционных факторов, в частности Foxp3 (Rudra D., deRoos P., Chaudhry A. et al., 2012).

Сходные результаты получила группа Wolfert et. al. В эксперименте была подтверждено усиление экспрессии Foxp3 под влиянием непосредственного связывания GATA3 с CNS2-регионом в промоторе *foxp3* (Wohlfert E.A., Grainger J.R., Bouladoux N. et al., 2011). Однако в данном исследовании было продемонстрировано критическое влияние деплеции именно GATA3 на функции Treg: в отсутствие GATA3 резко нарушалась продукция цитокинов регуляторными клетками. В целом авторы были склонны связывать данное явление с нарушением экспрессии ROR γ t, но допускали высокую вероятность роли Foxp3 или комбинации транскрипционных факторов.

Поскольку взаимное усиление выработки GATA3 и Foxp3 характерно только для регуляторных T-лимфоцитов и не показано для Th2, представляется маловероятным их одномоментное нарастание при бронхиальной астме именно за счет описанного взаимодействия. Вероятнее всего, увеличение уровней транскрипционных факторов будет проходить независимо друг от друга, причем в случае Foxp3 ведущая роль будет принадлежать влиянию Th17 (Jiang H., Wu X.,

Zhu H. et al., 2015). В подтверждение этому результаты обследования пациентов с различными формами хронического риносинусита показали значимое увеличение экспрессии мРНК GATA3 у пациентов с atopической формой заболевания, мРНК T-bet у пациентов с неатопической формой и мРНК Foxp3 у здоровых лиц группы контроля, демонстрируя тем самым преобладание определенного типа ответа в каждой из популяций (Ba L., Du J., Liu F. et al., 2015).

Обсуждая взаимные влияния GATA3 и Foxp3 необходимо упомянуть результаты более ранних исследований. В исследовании Mantel et al. также показано непосредственное связывание GATA3 с промотором *foxp3*, однако в данном случае были сделаны противоположные выводы (Mantel P.Y., Kuipers H., Boymann O. et al., 2007). IL-4 ассоциированная экспрессия GATA3 присутствовала на всех этапах развития Treg ингибируя Foxp3. По мнению авторов, эти результаты подтверждали данные предыдущих экспериментов, согласно которым, у трансгенных мышей гиперэкспрессирующих GATA3 выявлялось нарушение TGF β -индуцированной экспрессии Foxp3.

В целом, продемонстрированные взаимодействия транскрипционных факторов в регуляторных Т-клетках противоречат основной роли данной клеточной популяции, а именно негативной регуляции воспаления. По всей видимости, усиление экспрессии GATA-3 и Foxp3 имеет односторонний характер и направлено именно на увеличение уровней Foxp3 с целью подавления воспалительного процесса. Так у пациентов с БА, характеризовавшихся сниженным уровнем белка Foxp3, на фоне терапии глюкокортикоидами значения показателя возрастали (Provoost S., Maes T., van Durme Y.M. et al., 2009). Кроме того, неоднократно была показана способность Treg снижать Th2 воспаление при бронхиальной астме. Скорее всего, случаи возрастания уровней Foxp3 у больных могут отмечаться в стадии элиминации воспаления и служить признаком нарастания числа Treg.

Исследования с-Maf дефицитных мышей, показавшие влияние транскрипционного фактора на экспрессию IL-21 в Th17, Tfh, Th2-клетках стали базой для другого эксперимента, подтвердившего способность с-Maf связываться

промотором гена IL-21 и установившего присутствие антагонистического влияния Foxp3 на данный процесс (Wurster A.L., Rodgers V.L., Satoskar A.R., et al., 2002; King C., Tangye S.G., Mackay C.R., 2008; Bauquet A.T., Jin H., Paterson A.M. et al., 2009). В дальнейшем в исследование Foxp3 мутантных мышей были получены аналогичные результаты – дефицит Foxp3 у животных приводил к увеличению числа c-Maf+CD4+T-клеток (Iwamoto T., Suto A., Tanaka S. et al., 2014). Аналогичные исследования у людей не проводились, однако нет оснований предполагать существование другой закономерности. Вероятнее всего, преобладание Th2 ответа и высокая экспрессия c-Maf, будет препятствовать увеличению экспрессии Foxp3.

Рассматривая транскрипционные факторы с позиции их участия в патогенезе БА, нельзя не остановиться на их влиянии на экспрессию основных лекарственных средств для лечения бронхиальной астмы – глюкокортикостероидов. Как уже обсуждалось в соответствующей главе, в основе воздействия глюкокортикостероидов на функции GATA3 лежит подавление переноса транскрипционного фактора в ядро путем индуцирования ингибитора p38MAPK (митоген активированной протеинкиназы), с последующим снижением экспрессии транскрипционного фактора (Maneechotesuwan K., Yao X., Ito K. et al., 2009). Экспрессия T-bet также подавляется на фоне терапии ГКС. Реализация данного механизма осуществляется через глюкокортикоидный рецептор, который взаимодействует с T-bet и снижает как уровни соответствующей мРНК, так и белка (Lieberman A.C., Refojo D., Druker J. et al., 2007).

Для Foxp3 не установлен конкретный механизм воздействия ГКС, однако ряд экспериментов группы Calmett et al. позволяет предположить нарастание уровней транскрипционного фактора на фоне ГКС-терапии. Причем, наиболее вероятно, что данный процесс обусловлен не непосредственным усилением экспрессии транскрипционного фактора, а нарастающей активностью дендритных клеток, в особенности их регуляторной субпопуляции (Calmette J., Ellouze M., Tran T. et al., 101).

Наиболее масштабное исследование, посвященное влиянию кортикостероидов на экспрессию c-Maf, показало способность данной группы препаратов снижать количество белка c-Maf в клетках миеломы, не влияя при этом на уровни мРНК. По мнению исследователей, ГКС ускоряют убиквитин-зависимую деградацию c-Maf (Mao X., Stewart A.K., Hurren R. et al., 2007). Однако неясно, будет ли иметь место аналогичный механизм у пациентов с БА, так как исследование Mao et al. было проведено на патологически измененной клеточной культуре, в которой потенциально возможно значимое влияние на экспрессию c-Maf других сигнальных путей, неактивных при бронхиальной астме.

Таким образом, существование тяжелых и резистентных к терапии форм бронхиальной астмы продемонстрировало необходимость поиска тонких, ранее неизвестных уровней регуляции патологического процесса. Значительное число исследований подтвердило ключевую роль транскрипционных факторов GATA3 и T-bet в формировании воспаления дыхательных путей, однако открытие новых субпопуляций Т-лимфоцитов и ассоциированных с ними белков не исключает присутствия значимых сигнальных путей, связанных с другими транскрипционными факторами.

До сих пор изучение клеточных механизмов патологического процесса носило сугубо фундаментальный характер и не имело применения на практике. Поиски новых вариантов терапии бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний заставили исследователей обратить внимание на возможное использование различных цитокинов в качестве мишеней для лекарственных средств. Успешное применение в клинической медицине моноклонального антитела к IgE, омализумаба, позволило предположить, что меньший эффект будет иметь блокирование Th2-ответа на более ранних стадиях, предшествующих образованию IgE, а именно влияние на интерлейкины -4, -5, -13. Однако результаты опубликованных клинических исследований не позволяют считать такие препараты «панацеей» для больных бронхиальной астмой (Grainge C.L., Maltby S., Gibson P.G. et al., 2016).

В настоящее время предпринимаются попытки непосредственного воздействия на транскрипционный фактор GATA3, как на одну из основных «мишеней» воспалительного процесса. Так были успешно завершены исследования I и II фаз препарата SB010, представляющего собой ингаляционный ингибитор GATA3. В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании принимали участие 40 пациентов с аллергической бронхиальной астмой. Через 28 дней после начала лечения в группе SB010 отмечалось 34% улучшение ОФВ1 по сравнению с исходным уровнем, в то время как в группе плацебо этот показатель составлял 1%. При этом препарат хорошо переносился и не вызывал значимых нежелательных явлений (Krug N., Hohlfeld J.M., Kirsten A.M. et al., 2015).

Таким образом, отсутствие на сегодняшний день лекарственных средств, обладающих эффективностью у больных с разными степенями тяжести и вариантами бронхиальной астмы, позволяет предполагать существование не выявленных на сегодняшний день звеньев патогенеза, обуславливающих неэффективность терапии у части пациентов. Поиск подобных механизмов заставляет обращать внимание в том числе и на внутриклеточные процессы, влияющие в дальнейшем на течение воспалительного процесса, а именно на кооперативные взаимодействия транскрипционных факторов лимфоцитов и регулируемую ими экспрессию цитокинов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клиническая характеристика обследованных больных

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

Все участники исследования подписали форму информированного согласия, утвержденную 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.

Для оценки состояния функции внешнего дыхания производили определение показателей ОФВ₁ и ЖЕЛ, регистрировали максимальную скорость выдоха на различных уровнях ФЖЕЛ: ПОС, МОС₅₀, МОС₇₅, определяли бронхиальное сопротивление (Raw) и структуру общей емкости легких с последующим расчетом удельной проводимости бронхов (SGaw). Данные параметры исследовали при проведении бронхолитического теста в соответствии с критериями ATS/ERS до и после ингаляции сальбутамола (после 15 минутного ожидания) для выявления наличия бронхообструкции, ее характера (обратимая и необратимая) и выраженности.

Диагноз БА устанавливали в соответствии с классификацией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2016).

В исследование было включено 60 (73,17%) женщин и 22 (26,83%) мужчин, страдающих бронхиальной астмой. Возраст обследованных с БА колебался в диапазоне от 18 до 88 лет со средним значением $52,43 \pm 17,36$ года. Продолжительность заболевания у обследованных пациентов колебалась от 1 года

до 50 лет. Наследственность по заболеванию бронхиальной астмой была отягощена у 24 (29,67%) пациентов. Профессиональные вредности, повышающие риск развития легочной патологии, были выявлены у 27 (32,93%) пациентов с БА.

Больные бронхиальной астмой были распределены в две группы в зависимости от варианта течения заболевания: 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.

Распределение пациентов по полу было представлено следующим соотношением: в группу АБА было включено 10 (23,81%) мужчин и 32 (76,19%) женщины, в группу НАБА вошло 12 (30,00%) мужчин и 38 (70,00%) женщин. Средний возраст пациентов в группе АБА составлял $49,79 \pm 17,52$ лет, в группе НАБА - $52,20 \pm 16,97$ года. Медиана продолжительности заболевания в тех же группах составляла 16,00 [9,00-24,00] лет и 7,50 [3,00-17,50] лет соответственно.

У 62 (75,61%) пациентов были выявлены признаки различных аллергических сенсibilизаций. Детальный анализ аллергического анамнеза показал, что чаще всего, у 45 (54,88%) пациентов, встречалась лекарственная непереносимость. Далее по распространенности следовала бытовая сенсibilизация, признаки которой обнаруживались у 41 (50,00%) больных. Практически одинаковой частотой встречаемости характеризовались пыльцевая и пищевая сенсibilизации, выявлявшиеся у 34 (41,46%) и 33 (40,24%) пациентов. И только у 24 (29,27%) пациентов была зафиксирована эпидермальная сенсibilизация.

Анализ патологии ЛОР-органов показал, что аллергический ринит встречался у 23 (28,05%) пациентов, тонзиллит у 9 (10,98%) пациентов, полипоз носа у 7 (8,54%) пациентов. Другие заболевания ЛОР-органов, представленные вазомоторным ринитом, хроническим синуситом и хроническим отитом обнаруживались у 45 (54,88%) пациентов.

Были проанализированы показатели клинического анализа крови у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от варианта течения заболевания (таблица 2.1).

Таблица 2.1

Показатели клинического анализа крови у больных бронхиальной астмой

Показатель	АБА*	НАБА*	Значимость различий**
Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	7,05 (5,65; 9,35)	8,05 (6,10; 10,30)	p= 0,266
Нейтрофилы ($10^9/\text{л}$)	4,04 (3,25; 5,82)	4,36 (2,99; 6,27)	p=0,969
Лимфоциты ($10^9/\text{л}$)	1,70 (1,45; 2,40)	2,35 (1,80; 3,00)	p=0,066
Эозинофилы ($10^9/\text{л}$)	0,153 (0,02; 0,30)	0,12 (0,01; 0,24)	p=0,488
Моноциты ($10^9/\text{л}$)	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

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Не было выявлено достоверных различий ни по одному из исследованных показателей клинического анализа крови. Тем не менее, необходимо отметить, что группа АБА характеризовалась большими абсолютными значениями эозинофилов, в то время как у пациентов с НАБА преобладали другие показатели лейкоцитарной формулы.

Далее рассмотрим клеточный состав мокроты пациентов (таблица 2.2), изученный в ходе цитологического исследования мокроты.

Таблица 2.2

Оценка клеточного состава мокроты у больных бронхиальной астмой

Параметр	АБА*	НАБА*	Значимость различий**
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	19,50	17,50	p=0,247

мокроте (% от общего числа клеток)	(16,00; 27,00)	(13,00; 21,00)	
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

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Анализ результатов цитологического исследования мокроты продемонстрировал значения, сходные с результатами анализа показателей клинического анализа крови: группа АБА характеризовалась бóльшим процентным содержанием эозинофилов в клеточном составе мокроты, в то же время в группе НАБА преобладали нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты.

Следующим этапом оценки исследуемых групп стало определение основных характеристик заболевания и демографических показателей пациентов в двух группах (таблица 2.3).

Таблица 2.3

Основные характеристики бронхиальной астмы.

Признак	АБА	НАБА	Значимость различий
Возраст (годы)	49,79 ± 17,52	55,20 ± 16,97	p=0,292
Рост (см)	166,00 (161,00; 170,00)	165,50 (160,00; 171,00)	p=0,936
Масса тела (кг)	72,00 (68,00; 89,00)	75,00 (65,00; 83,50)	p=0,774
ИМТ (кг/м ²)	27,27 (25,30; 31,64)	27,70 (25,11; 30,26)	p=0,796
Срок заболевания (годы)	16,00 (9,00; 24,00)	7,50 (3,00; 17,50)	p=0,007

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика); для выборок, характеризующихся нормальным распределением, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика);

** - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни); для выборок, характеризующихся нормальным распределением использован двухвыборочный t-критерий для независимых выборок).

Обнаружено, что группы были сопоставимы по всем характеристикам (рост, вес, ИМТ) за исключением продолжительности заболевания, среднее значение которой было больше в группе АБА ($p=0,292$, двухвыборочный t-критерий для независимых выборок).

Далее было установлено число пациентов с разной тяжестью бронхиальной астмы по степеням (таблица 2.4).

Таблица 2.4

Распределение пациентов по тяжести БА в двух исследуемых группах

БА	Степень тяжести течения заболевания						Всего	
	лёгкая		средняя		тяжёлая			
	n	%	n	%	n	%	n	%
АБА	7	16,67	28	66,67	7	16,67	42	100
НАБА	14	35,0	19	47,5	7	17,5	40	100
Всего	21	25,61	47	57,32	14	17,07	82	100

Результаты анализа функционального состояния бронхолегочной системы представлены в таблице (таблица 2.5).

Таблица 2.5

Показатели ФВД у больных бронхиальной астмой

Показатель	АБА	НАБА	Значимость различий
ЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	100,00 (93,00; 110,30)	99,00 (77,90; 110,75)	$p=0,312$
ЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	105,10 (97,60; 119,70)	104,35 (85,05; 111,70)	$p=0,216$
ФЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	94,90 (86,40; 105,30)	85,61 (71,07; 105,15)	$p=0,029$
ФЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	101,90 (93,50; 110,70)	95,50 (79,40; 106,95)	$p=0,020$
ОФВ1 (% от должного до бронхолитика)	83,50 (73,30; 94,80)	78,20 (51,65; 99,10)	$p=0,133$
ОФВ1 (% от должного	96,80	88,45	$p=0,087$

Показатель	АБА	НАБА	Значимость различий
после бронхолитика)	(84,00; 105,50)	(58,20; 108,50)	
ОФВ1/ЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	84,60 (72,80; 94,10)	78,45 (60,05; 92,40)	p=0,182
ОФВ1/ЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	91,22 (79,70; 99,70)	91,00 (69,45; 97,55)	p=0,259
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
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, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Несмотря на то, что достоверность различий между группами была подтверждена только для ФЖЕЛ и ПОС (как до бронхолитика, так и после бронхолитика), представленные результаты наглядно демонстрируют, что группа пациентов с преимущественно неаллергической бронхиальной астмой характеризовалась значительными и резкими изменениями функционального состояния бронхолегочной системы, что отражало существенную обструкцию дыхательных путей.

Дополнительно была проведена оценка данных анамнеза и сопутствующей патологии у пациентов в обеих группах (таблица 2.6).

Как следует из представленных данных, группа АБА характеризовалась достоверно большим числом пациентов с отягощенным аллергологическим анамнезом, в том числе и по частоте встречаемости отдельных типов

сенсibilизации (бытовой, пылевой, эпидермальной, пищевой, лекарственной непереносимости). По другим характеристикам (наследственная предрасположенность к бронхиальной астме, курение, наличие профессиональных вредностей в анамнезе, наличие сопутствующих заболеваний) группы аллергической неаллергической бронхиальной астмы были сопоставимы и характеризовались сходным числом пациентов с тем или иным признаком.

Таблица 2.6

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
Пылевая 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
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

Признак	АБА	НАБА	Значимость различий*
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 Пирсона с поправкой Йетса.

Из всей популяции включенных в исследование больных бронхиальной астмой не получали регулярную терапию ингаляционными кортикостероидами всего 5 пациентов, 31 пациент получал постоянную терапию ингаляционными кортикостероидами и 44 получали терапию парентеральными ГКС.

Последующий подробный анализ получаемой терапии у пациентов с разными степенями тяжести заболевания показал, то все пациенты, не получавшие ГКС терапию, на регулярной основе имели легкую степень тяжести заболевания. В группе пациентов, получавших ингаляционные кортикостероиды, по 6 (17,65%) пациентов характеризовались легким и тяжелым течением бронхиальной астмы, остальные 19 (55,88%) пациентов имели бронхиальную астму средней степени тяжести. Популяция пациентов, получавших терапию парентеральными кортикостероидами, была распределена следующим образом: 28 (63,63%) пациентов характеризовались средней тяжестью бронхиальной астмы, 6 (13,63%) - тяжелым течением, и 10 (22,72%) – легкой степенью тяжести заболевания. Необходимо отметить, что суточная доза ингаляционных глюкокортикостероидов, как и длительность применения парентеральных ГКС, оказалась больше у пациентов с тяжёлым течением заболевания. Терапию антибактериальными препаратами на момент участия в исследовании получали 14,29 % пациентов лёгкого течения, и 39,34% пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением заболевания.

Кроме того, пациенты с различной степенью тяжести болезни отличались друг от друга по характеру получаемой бронходилатационной терапии: β_2 -адреномиметики использовали 76,19 % пациентов с лёгким течением, 93,62 %

пациентов со среднетяжёлым и 100 % пациентов с тяжёлым течением заболевания. Таким образом, бронходилататоры реже применялись у пациентов с легкой тяжестью бронхиальной астмы и чаще – у пациентов со средней тяжестью и тяжёлым течением заболевания.

Далее был проведен анализ функционального состояния дыхательных путей в группах с различной степенью тяжести течения заболевания путем анализа основных показателей функции внешнего дыхания (таблица 2.7). Представленные результаты наглядно демонстрируют, что при увеличении степени тяжести заболевания отмечалось значимое снижение этих показателей.

Таблица 2.7

Анализ функционального состояния бронхолегочной системы при различной тяжести заболевания у обследованных пациентов

Показатель	Лёгкая БА (1)	БА средней тяжести (2)	Тяжёлая БА (3)	Значимость различий
ОФВ ₁ (% от должного)	99,50 (86,30; 108,70)	77,10 (65,65; 92,00)	57,80 (48,70; 67,40)	p=0,0001
ОФВ ₁ (% от должн.) после бронхолитика	105,50 (93,30; 113,30)	94,75 (77,95; 103,25)	67,95 (56,50; 84,00)	p=0,0003
ОФВ ₁ /ЖЕЛ (% от должн.) до бронхолитика	89,80 (84,00; 95,90)	80,22 (70,16; 93,40)	63,95 (56,50; 84,00)	p=0,0024
ОФВ ₁ /ЖЕЛ (% от должн.) после бронхолитика	96,10 (92,40; 101,70)	87,45 (75,55; 97,35)	74,70 (60,80; 86,00)	p=0,0005
МОС ₅₀ (% от должного)	60,30 (55,60; 85,40)	38,40 (25,00; 62,30)	20,75 (12,90; 30,60)	p=0,0002
МОС ₅₀ после бронхолитика (% от должного)	80,50 (67,40; 100,20)	55,85 (38,15; 78,70)	33,65 (19,80; 43,30)	p=0,0002
МОС ₇₅ (% от должного)	45,00 (35,90; 67,20)	30,20 (16,80; 46,60)	15,90 (12,20; 21,75)	p=0,0019
МОС ₇₅ после бронхолитика (% от должного)	64,50 (47,70; 81,30)	39,50 (16,70; 62,30)	21,30 (19,00; 23,60)	p=0,0001

Показатель	Лёгкая БА (1)	БА средней тяжести (2)	Тяжёлая БА (3)	Значимость различий
	82,70)	50,10)	25,80)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса.

Контрольная группа составляла 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).

Все включенные в контрольную группу лица, также подписали форму информированного согласия, утвержденную локальным этическим комитетом.

2.2. Методологическая схема

На рисунке 2.1 представлена методологическая схема проводимого исследования, включающая в себя различные уровни клеточной сигнализации.

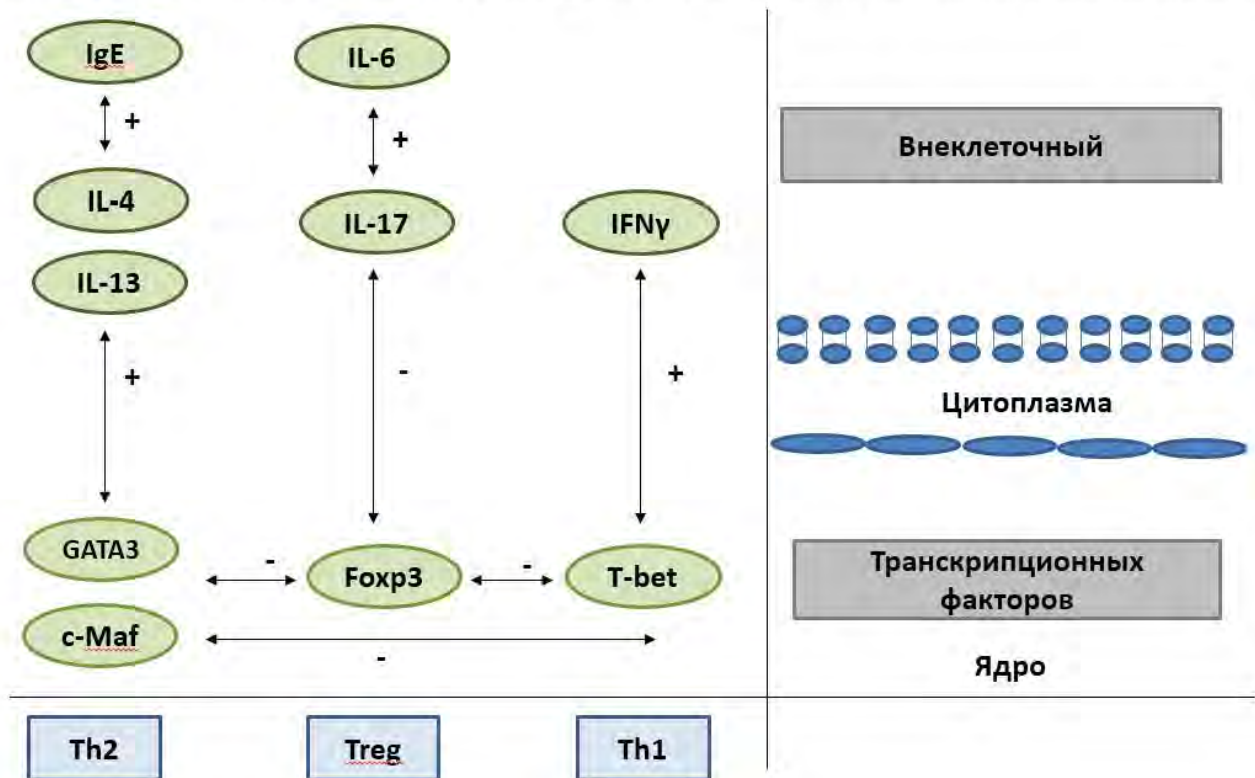


Рисунок 2.1. Методологическая схема исследования по уровням.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Выделение мононуклеаров периферической крови

В качестве модели исследования во всех описанных далее методиках использовались мононуклеары периферической крови.

Непосредственно после забора венозной крови (или не позднее 40 минут) проводили выделение клеток методом центрифугирования в градиенте плотности "Lymphoseparation Medium" (производство "ICN", США), плотность 1,077 г/см³ (Boyum A., 1968). Гепаринизированную кровь наслаивали на 3 мл градиента плотности и центрифугировали 30 минут при 400 g. Образовавшееся после центрифугирования "кольцо" мононуклеаров отбирали пипеткой и помещали в отдельную пробирку. Полученную клеточную взвесь трижды отмывали раствором хлорида натрия (9 г/л, pH=7,2) и доводили концентрацию до 2×10^6 клеток/мл. Жизнеспособность клеток, которую определяли по связыванию трипанового синего, составляла 95-100%. Затем выполнялась инкубация выделенных мононуклеаров в течение 60 минут в среде IMDM при 37 °C в чашках Петри для осаждения моноцитов на пластик.

После инкубации собранные мононуклеары двукратно 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 1 мл среды IMDM.

2.3.2. Исследование экспрессии мРНК методом RT-PCR

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

Экспрессию мРНК транскрипционных факторов GATA3, T-bet, Foxp3, c-Maf оценивали путём проведения RT-PCR (reverse transcription - PCR) с нуклеиновыми кислотами, выделенными из мононуклеаров периферической крови.

ПЦР проводилась в амплификаторе «iCycler» (BIORAD) в следующем режиме: инициация при 95°C в течение 4-х минут, 30 циклов денатурации при 95°C в течение 30 с, отжига при 60 °C в течение 30 с и полимеризации при 70 °C в течение 30 с. Завершающая полимеризация проводилась при 72 °C в течение 7 минут. Продукт амплификации подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле и окраске этидия бромидом.

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'- CTTTCCACACTGCACCCACTT-3'
- GATA3
 5': 5'- CGCCTGCGGGCTCTATC-3'
 3': 5'- CCTTCGCTTGGGCTTAATGA-3'
- c-Maf
 5': 5'- AAGGAGAAATACGAGAAGCTGGTGA-3'
 3': 5'- TGGGATCGCGTGTCACACTCACATG-3'
- β-актин
 5': 5'- TTGTCTTTCAGCAAGGACTGG-3'
 3': 5'- CCACTTAACSTATCTTGGGCTGTG-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.

2.3.3. Определение концентрации иммуноглобулина Е 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».

2.3.4. 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 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).

Порядок проведения анализа:

1. Поверхность нитроцеллюзных фильтров 96-луночной платы смачивалась стандартным промывочным буфером (стандартный wash-buffer). В каждую лунку помещали по 100 мкл промывочного буфера, с последующим его удалением с помощью вакуумного отсоса.

2. Рабочий раствор с микрочастицами и антителами к цитокинам перемешивался на вортексе. Далее смесь в объёме 50 мкл помещали в каждую лунку. С применением вакуумной фильтрации буфер удалялся.

3. По 100 мкл промывочного буфера вносилось в лунки, с последующим удалением буфера с помощью вакуумной фильтрации. Этап выполнялся дважды.

4. Предварительно разведённые стандартные пробы и определяемые образцы вносились по 50 мкл в лунки, инкубировались на термошейкере в течение 30 мин, после чего буфер удалялся с помощью вакуумной фильтрации.
5. Трижды проводилась отмывка платы промывочным буфером.
6. Рабочий раствор антител перемешивали на вортексе и помещали в каждую лунку в количестве 25 мкл, инкубировали в термошейкере в течение 30 мин. С помощью вакуумной фильтрации буфер удалялся из лунок.
7. Трижды проводилась отмывка платы промывочным буфером.
8. По 50 мкл конъюгата стрептавидин/фикоэритрин помещалось в лунки, проводилась инкубация в течение 10 мин на термошейкере. С помощью вакуумной фильтрации буфер удалялся из лунок.
9. Трижды проводилась отмывка платы промывочным буфером.
10. В 125 мкл рабочего буфера ресуспензировались микрочастицы. Для этого плата инкубировалась на термошейкере в течение 30 с.
11. Плата помещалась в рабочую станцию ИФА-анализатора StatFlax 303+ , где выполнялось считывание результатов.

2.4. 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).

Определение числовых характеристик выборок, оценку значимости различия оцениваемых параметров проводили методами параметрической и непараметрической статистики.

Характер статистического распределения определяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова (для больших выборок) и Шапиро-Уилка (для малых выборок). Далее с использованием описательной статистики оценивали 90% и 95%-ные доверительные интервалы, частоты встречаемости признака. При нормальном распределении проводили анализ среднего, стандартного отклонения и средней ошибки среднего; при распределениях, отличающихся от нормального и при малых выборках – вычисление медианы, интерквартильного размаха.

Выявление различий между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента (параметрическая статистика), рангового критерия Манна-Уитни (непараметрическая статистика).

Для проведения множественных сравнений (более двух групп сравнения) применялся метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием в качестве апостериорных критериев значимости: Тьюки (Т), Шеффе (S) – при наличии однородности дисперсий по критерию Ливиня и Геймса-Хоуэлла (G-H) – при отсутствии однородности дисперсий по критерию Ливиня.

Для проведения множественных сравнений (более двух групп сравнения) выборок, характеризующихся отсутствием нормального распределения,

использовались непараметрические критерии Краскела-Уоллиса и Джонкхиера-Терпстры.

Для сравнения парных (связанных) выборок (динамическое наблюдение за больными, определение показателя до и после воздействия) использовали парный t-критерий Стьюдента (параметрическая статистика) и парный критерий Вилкоксона (непараметрическая статистика).

Для сравнения частот применялся двусторонний точный критерий Фишера или критерий Пирсона с поправкой Йетса.

Также использовались методы линейного корреляционного анализа – критерии Пирсона (r) и Спирмана (r_s), для сравнения переменных, одна из которых характеризовалась дихотомическим распределением, применялась точечно-бисериальная корреляция. Для определения вклада независимой переменной в значения зависимой использовался линейный регрессионный анализ.

Критический уровень значимости (достоверности) нулевой статистической гипотезы (об отсутствии различий и влияний) принимали равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме

В отличие от Th2 и Th1, роль которых хорошо изучена при бронхиальной астме, Treg являются относительно «новым» объектом интереса ученых при данной патологии. Тем не менее, Treg и их ключевой транскрипционный фактор Foxp3 ранее неоднократно демонстрировали свою роль в качестве ключевых компонентов поддержания иммунологического гомеостаза при других заболеваниях.

Foxp3 – единственный представитель семейства FOXP из четырех известных, принимающий участие в жизнедеятельности Т-лимфоцитов. На сегодняшний день не подвергается сомнению важнейшая роль Foxp3 в патогенезе онкологических и аутоиммунных заболеваний в качестве основного транскрипционного фактора Treg, а значит и ключевого фактора сохранения иммунологического гомеостаза посредством реализации супрессивных функций (Kawaguchi K., Suzuki E., Yamaguchi A. et al., 2016; Bacchetta R., Barzaghi F., Roncarolo M.G. et al., 2016; Wan Y.Y., Flavell R.A., 2007).

В контексте изучения данного транскрипционного фактора при бронхиальной астме особый интерес представляет его взаимодействие с Th2 и Th17. Foxp3 продемонстрировал способность подавлять экспрессию IL-2, TNF- α , IFN- γ , IgE, IL-17 и IL-4, причем подавление IL-17, вероятнее всего, обусловлено изменением транскрипционной активности ROR γ и ROR α , ключевых транскрипционных факторов Th17 (Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M. et al., 2008; Tao B., Ruan G., Wang D. et al., 2015; Wan Y.Y., Flavell R.A., 2007). В целом, согласно сложившемуся на сегодняшний день представлению, участие Foxp3 в патогенезе бронхиальной астмы аналогично его участию при других патологиях: активация регуляторных Т-клеток служит признаком подавления воспалительного

процесса и предлагается для использования в качестве мониторинга ответа на терапию аллергических заболеваний (Kim do H., Sohn J.H., Park H.J. et al., 2016; Shim J.U., Rhee J.H., Jeong J.U. et al., 2016; Stelmaszczyk-Emmel A., Zawadzka-Krajewska A., Głodkowska-Mrówka E. et al., 2015).

В данной главе представлены результаты изучения экспрессии Foxp3 у целевой популяции пациентов и лиц контрольной группы. Первым этапом анализа полученных данных стала сравнительная оценка уровней Foxp3 у практически здоровых лиц и пациентов с аллергической/неаллергической бронхиальной астмой (результаты представлены в таблице 3.1).

Таблица 3.1

Уровни экспрессии мРНК транскрипционного фактора Foxp3 (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,40 (0,08; 0,64)	1-2-3: $p_1=0,082^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,334^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	0,21 (0,07; 0,63)	1-2: $p=0,240^{***}$ 2-3: $p=0,334^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	0,16 (0,06; 0,45)	1-3: $p=0,025^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2).

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Как видно из представленных результатов, уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора Foxp3 в мононуклеарах периферической крови лиц контрольной группы более чем в два раза превышал таковой у лиц группы АБА и НАБА (статистическая значимость различий выявлена для группы контроля и больных НАБА, $p=0,025$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). У больных

бронхиальной астмой больший уровень экспрессии зафиксирован у лиц с аллергической БА. В целом, полученные результаты подтверждают ранее установленный в экспериментах факт снижения экспрессии мРНК Foxp3 как в модели бронхиальной астмы у животных (Jiang H., Wu X., Zhu H. et al., 2015), так и у пациентов с бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми лицами (Krogulska A., Polakowska E., Wąsowska-Królikowska K. et al., 2015; Tao B., Ruan G., Wang D. et al., 2015).

Анализ зависимости экспрессии Foxp3 от фазы заболевания продемонстрировал разнонаправленную динамику показателя, не имеющую статистической значимости: в группе НАБА больший уровень экспрессии обнаружен у пациентов с обострением БА, в группе АБА – у пациентов в ремиссии (таблица 3.2).

Таблица 3.2

Уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 при БА в зависимости от фазы заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	0,14 (0,07; 0,61)	1-2: p=0,568**
АБА Ремиссия (2) n=26	0,38 (0,08; 0,68)	
НАБА Обострение (1) n=23	0,21 (0,07; 0,47)	1-2: p=0,232**
НАБА Ремиссия (2) n=23	0,07 (0,05; 0,28)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таким образом, экспрессия Foxp3 не имеет четкой зависимости с фазой заболевания (таблица 3.2). Вероятнее всего, экспрессия Foxp3 регулируется генетически детерминированными механизмами, лежащими непосредственно в основе патогенеза заболевания (обуславливающими фенотип БА), и мало связана

с резкими изменениями течения процесса (обострениями). Обращает на себя внимание, что значения экспрессии мРНК Foxp3 при любой фазе БА были меньше, чем значения показателя у группы контроля, что не вступает в противоречие с результатами исследования Хие К. et al., показавших, что уровни мРНК Foxp3 ниже таковых при любой фазе БА, чем у практически здоровых лиц.

Далее был проведен дополнительный анализ с целью выявления возможных различий в экспрессии Foxp3 при разных степенях тяжести бронхиальной астмы. Анализ проводился отдельно для групп АБА и НАБА. Результаты представлены ниже в таблицах 3.3 и 3.4.

Таблица 3.3

Уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 у пациентов с АБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Тяжесть	Значение *	Значимость различий
АБА легкого течения (1) n=7	0,33 (0,17; 0,79)	1-2-3: $p_1=0,007^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,003^{**}$ 1-2: $p=0,493^{***}$ 2-3: $p=0,002^{***}$ 1-3: $p=0,017^{***}$
АБА средней степени тяжести (2) n=28	0,41 (0,92; 0,66)	
АБА тяжелого течения (3) n=7	0,05 (0,02; 0,08)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2).

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.4

Уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 у пациентов с НАБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Тяжесть	Значение *	Значимость различий
---------	------------	---------------------

НАБА легкого течения (1) n=14	0,21 (0,09; 0,48)	1-2-3: $p_1=0,002^{**}$
НАБА средней степени тяжести (2) n=19	0,42 (0,12; 0,50)	1-2-3: $p_2=0,020^{**}$ 1-2: $p=0,423^{***}$ 2-3: $p=0,001^{***}$
НАБА тяжелого течения (3) n=7	0,05 (0,01; 0,06)	1-3: $p=0,0004^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2).

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Как видно из представленных результатов, как группа АБА, так и группа НАБА характеризовались присутствием статистически достоверных различий в уровнях экспрессии Foxp3 в группах при разной тяжести заболевания. В группе аллергической бронхиальной астмы наибольшим уровнем экспрессии Foxp3 характеризовались пациенты со средней тяжестью заболевания.

Несколько меньшей экспрессией транскрипционного фактора характеризовалась подгруппа легкой БА, при этом у пациентов с тяжелой АБА величины экспрессии Foxp3 были в 6-8 раз ниже, чем подгруппах АБА средней тяжести и АБА легкого течения. Статистическая значимость обнаруженных различий подтверждена при попарном межгрупповом сравнении тяжелой АБА с АБА средней тяжести и легкого течения ($p<0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Сходные результаты были получены при анализе группы НАБА. Наибольшими уровнями экспрессии Foxp3 характеризовалась группа НАБА средней тяжести, далее следовала группа НАБА легкого течения, имевшая уровни экспрессии в два раза ниже чем группа НАБА. Минимальные уровни экспрессии Foxp3, как и в случае группы АБА, были выявлены у пациентов с тяжелым течением НАБА.

Ранее в исследованиях было продемонстрировано присутствие нарушения баланса соотношения числе регуляторных Т-клеток и антагонистичных им Th17 при бронхиальной астме (Jiang H., Wu X., Zhu H. et al., 2015), что в совокупности с данными о снижении степени тяжести БА при искусственном увеличении числа Treg (Wan G., Wei B., 2015) свидетельствует о роли данной субпопуляции Т-лимфоцитов в иммунологических механизмах патогенеза бронхиальной астмы.

Представляется наиболее вероятным, что сдвиг Th17/Treg баланса в сторону преобладания Th17 (и, соответственно, снижение Foxp3) является медленно развивающимся процессом, не связанным с быстро формирующимися состояниями (обострениями), и обуславливающим присутствие нарушений общих для всех больных БА независимо от ее типа (АБА/НАБА).

Далее для выявления возможных колебаний уровней Foxp3 на фоне терапии бронхиальной астмы рассмотрим экспрессию Foxp3 в зависимости от получаемой терапии кортикостероидами (таблица 3.5).

Таблица 3.5

Уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 при БА в зависимости от получаемой кортикостероидной терапии (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие иГКС терапию (1) n=36	$0,30 \pm 0,27$	1-2: $p=0,996^{**}$
Больные, получающие терапию парентеральными ГКС (2) n=44	$0,30 \pm 0,28$	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся нормальным распределением, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика); ** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован двухвыборочный t-критерий для независимых выборок).

Далее оценка влияния кортикостероидов на экспрессию Foxp3 проводилась отдельно в группах НАБА и АБА с учетом получаемых доз ГКС (таблицы 3.6 – 3.7).

Таблица 3.6

Уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 при БА у пациентов, не получающих ГКС терапию или получающих иГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=7	0,21 (0,03; 0,69)	1-2-3: $p_1=0,943^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,605^{**}$
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=4	0,42 (0,10; 0,42)	1-2: $p=0,629^{***}$ 2-3: $p=0,786^{***}$
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,62 (0,04; 0,71)	1-3: $p=1,00^{***}$
НАБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=6	0,15 (0,06; 0,36)	1-2-3: $p_1=0,874^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,661^{**}$
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=6	0,18 (0,08; 0,43)	1-2: $p=0,686^{***}$ 2-3: $p=1,00^{***}$
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,31 (0,05; 0,59)	1-3: $p=0,886^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры (p_2) для попарного сравнения между собой более двух групп.

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.7

Уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 при БА у пациентов, получающих терапию парентеральными ГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=13	0,09 (0,08; 0,66)	1-2: p=0,768**
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг(1) n=13	0,19 (0,06; 0,63)	
НАБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=12	0,10 (0,07; 0,33)	1-2: p=0,841**
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг(1) n=9	0,39 (0,04; 0,71)	

Примечание: * - для выборок, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Анализ влияния ГКС терапии на уровни экспрессии Foxp3 в совокупной популяции больных БА показал, что группа пациентов, получающих иГКС терапию, и группа пациентов, получавших парентеральные ГКС, характеризовались сходными значениями экспрессии мРНК Foxp3.

Тем не менее, дальнейший анализ с учетом применявшихся доз ГКС показал нарастание уровней экспрессии мРНК транскрипционного фактора при увеличении дозы ГКС как в группе АБА, так и в группе НАБА. Отмечалось нарастание медиан показателя как у пациентов, получавших терапию иГКС, так и у пациентов, получавших парентеральные ГКС.

Ранее аналогичные результаты были получены в экспериментах, показавших, что у детей с бронхиальной астмой на фоне ГКС терапии происходило нарастание численности Treg и ассоциированный с ним прирост Foxp3 (Bakr S.I., Mahran M.Z., Soliman D.A., 2013; Yüksek M., Erol F., Güloğlu D. et al., 2011). 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.

Для установления возможной связи рассматриваемого транскрипционного фактора и клинико-лабораторных данных больных, был проведен дополнительный анализ (таблица 3.8, представлены только статистически значимые корреляции). Корреляционный анализ экспрессии Foxp3 и исследуемых в рамках настоящего исследования цитокинов и транскрипционных факторов GATA3, T-bet и c-Maf представлен в отдельной главе (глава 3.5 «Характеристика экспрессии цитокинов в периферической крови при бронхиальной астме и кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf»).

Таблица 3.8

Результаты корреляционного анализа уровней экспрессии мРНК транскрипционного фактора Foxp3 и клинико-лабораторных данных у больных БА (представлены только статистически достоверные корреляции)

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
АБА (n=42)			
БА у родственников	0,410*	+	p=0,030
ОФВ1 (% от должного до бронхолитика)	0,399**	+	p=0,043
ООЛ (% от должного до бронхолитика)	0,468**	-	p=0,033
СОС25-75(до бронхолитика)	0,419**	+	p=0,037
СОС25-77 (% от должного до	0,452**	+	p=0,023

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
бронхолитика)			
ПОС (% от должного до бронхолитика)	0,456**	+	p=0,019
МОС50 (до бронхолитика)	0,414**	+	p=0,035
МОС50 (% от должного до бронхолитика)	0,474**	+	p=0,017
Эозинофилы мокроты (%)	0,580**	+	p=0,030
НАБА (n=40)			
Курение в анамнезе	0,506*	+	p=0,014
ЖЕЛ (до бронхолитика)	0,517**	+	p=0,012
ЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	0,437**	+	p=0,037
ЖЕЛ (после бронхолитика)	0,543**	+	p=0,007
ЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	0,464**	+	p=0,026
ФЖЕЛ (до бронхолитика)	0,506**	+	p=0,014
ФЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	0,524**	+	p=0,010
ФЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	0,505**	+	p=0,014
ОФВ1(до бронхолитика)	0,528**	+	p=0,010
ОФВ1(% от должного до бронхолитика)	0,464**	+	p=0,026
СОС25-75 (% от должного после бронхолитика)	0,472**	+	p=0,023
ПОС (до бронхолитика)	0,423**	+	p=0,044
МОС50 (после бронхолитика)	0,474**	+	p=0,022
МОС50 (% от должного после бронхолитика)	0,424**	+	p=0,049
МОС75 (после бронхолитика)	0,526**	+	p=0,010
МОС75 (% от должного после бронхолитика)	0,488**	+	p=0,018
ПОС вд (до бронхолитика)	0,607**	+	p=0,002
ПОС вд (после бронхолитика)	0,434**	+	p=0,039
МОС вд (до бронхолитика)	0,660**	+	p=0,001

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
Макрофаги мокроты (%)	0,719**	-	p=0,045
Моноциты мокроты (%)	0,756**	-	p=0,030

Примечание: * - для оценки переменных, одна из которых является дихотомической, использовалась точечно-бисериальная корреляция;

** - для количественных переменных, закон распределения которых не является нормальным, использован коэффициент корреляции Спирмана; представлен коэффициент корреляции со знаком и уровни значимости.

Обращают на себя внимание положительные корреляции экспрессии мРНК *Foxr3* и показателей ФВД как в группе АБА, так и в группе НАБА. Данные связи представляются закономерными с учетом показанных ранее особенностей экспрессии *Foxr3*: наименьшие уровни мРНК транскрипционного фактора выявляются у пациентов с тяжелым течением бронхиальной астмы, также характеризующихся наихудшими показателями ФВД, поэтому увеличение экспрессии *Foxr3* ожидаемо будет сопровождаться улучшением значений показателей ФВД. Выявленные положительные корреляции с отягощенной наследственностью по БА (в группе АБА) и курением в анамнезе (в группе НАБА), вероятно, указывают на факторы, влияющие на усиление степени тяжести астмы.

Особый интерес представляет выявленные отрицательные корреляции экспрессии *Foxr3* с содержанием макрофагов и моноцитов в мокроте. Установлено, что у мышей с искусственно вызванным IPeX синдромом, заболеванием, обусловленным дефицитом транскрипционного фактора *Foxr3* и соответствующим дефицитом регуляторных Т-клеток отмечались крайне высокие значения числа макрофагов и моноцитов периферической крови (Skuljes J., Cabanski M., Surdziel E. et al., 2016). Нельзя исключать, что у больных с НАБА в дополнение к снижению содержания *Foxr3* в периферической крови, не имеющего достаточной интенсивности для влияния на количество макрофагов крови, присутствует местный дефицит регуляторных Т-клеток в дыхательных путях.

В завершении данной главы, приведем клинические примеры, отражающие изложенные выше положения.

1. Больная Б., 66 лет. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно неаллергическая (инфекционно-зависимая, нервно-психическая, физического усилия), тяжелое течение. Фаза обострения.

Страдает бронхиальной астмой с возраста 48 лет, когда после приема аспирина впервые возник приступ удушья, потребовавший госпитализации. Диагностирована бронхиальная астма, назначены бета2-адреноагонисты длительного действия и ингаляционные ГКС. Настоящее ухудшение самочувствия (одышка смешанного характера при минимальной физической нагрузке, кашель с небольшим количеством слизистой мокроты) – после перенесенного ОРВИ.

При обследовании – в крови выявлен нейтрофильный лейкоцитоз (лейкоциты $10,9 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилы $8,77 \times 10^9/\text{л}$). При осмотре не было выявлено убедительных признаков бытовой, пыльцевой, эпидермальной, пищевой аллергии.

По результатам ФВД: $\text{ОФВ}_1 = 60,7\%$ от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется бронхоспазм. Выявлены значительные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких.

У родственников бронхиальная астма не диагностировалась.

Не курит. Профессиональные вредности отрицает.

Лечение: ежедневно использует Серетид 500/50 мкг 2 раза в день.

Для купирования настоящего обострения применялось внутривенное капельное введение глюкокортикостероидов (дексаметазона), небулайзерной терапии с будесонидом и пульмикортом.

На фоне обострения заболевания у пациентки был произведен забор крови для измерения экспрессии мРНК Foxp3. Выявлен низкий уровень мРНК транскрипционного фактора - 0,0618, что характерно для тяжелой бронхиальной астмы.

2. Больная Н., 68 лет. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно аллергическая (бытовая, пылевая сенсibilизация, лекарственная непереносимость), тяжелое течение. Вне обострения.

Страдает бронхиальной астмой в течение 3 лет, когда впервые стала отмечать приступообразный сухой кашель, приступы удушья и одышки экспираторного характера. Пульмонологом диагностирована бронхиальная астма, назначены бета-адреноагонисты длительного действия и ингаляционные ГКС.

При обследовании – в крови выявлен сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону нейтрофилов (нейтрофилы $6,93 \times 10^9/\text{л}$), а также увеличение СОЭ до 17 мм/час. По результатам ФВД: $\text{ОФВ}_1 = 65,58\%$ от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется выраженный бронхоспазм. Выявлены значительные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких. По сравнению с данными ФВД от 2014 года отмечается отрицательная динамика.

У родственников бронхиальная астма не диагностировалась.

Не курит. Профессиональные вредности отрицает.

Лечение: ежедневно использует Симбикорт 320/9 мкг 2 раза в день.

На фоне ремиссии заболевания у пациентки был произведен забор крови для измерения экспрессии мРНК Foxp3. Выявлен низкий уровень мРНК транскрипционного фактора - 0,0019, что характерно для тяжелого течения бронхиальной астмы.

Выводы по разделу 3.1.

В рамках настоящего исследования были изучены особенности экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 у пациентов группы контроля и практически здоровых лиц.

1. Больные бронхиальной астмой, как аллергической, так и неаллергической, характеризовались меньшей экспрессией рассматриваемого транскрипционного фактора, чем лица группы контроля, что, по-видимому, является результатом нарушения иммунного гомеостаза,

сопровождающегося снижением числа регуляторных Т-лимфоцитов и соответствующим уменьшением содержания Foxp3.

2. Пациенты с тяжелым течением бронхиальной астмы характеризовались выраженным снижением экспрессии Foxp3, причем для групп БА с легким течением и средней тяжестью такой закономерности не выявлялось. Вероятнее всего, это свидетельствует о наибольшей выраженности нарушений Т-клеточного баланса в сторону снижения числа основных регуляторов иммунного ответа, Treg, у пациентов с тяжелым течением БА.
3. На фоне увеличения дозы принимаемых кортикостероидов отмечалось нарастание экспрессии мРНК Foxp3, что отражает еще один терапевтический эффект данной группы препаратов, а именно, восстановление иммунного гомеостаза.
4. Для Foxp3 характерны положительные корреляции с показателями ФВД, что является дополнительным свидетельством связи экспрессии транскрипционного фактора и тяжести бронхиальной астмы.

3.2. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора GATA3 в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме

Несмотря на то, что в целом роль транскрипционного фактора GATA3 в патогенезе аллергических заболеваний считается доказанной и относительно хорошо изученной, некоторые особенности внутриклеточных взаимодействий, приводящих к изменениям экспрессии GATA3, до сих пор остаются неясными.

Так на сегодняшний день не подвергается сомнению ключевая роль GATA3 в формировании Th2-фенотипа (Zhu J., Min B., Hu-Li J. et al., 2004). Установлено, что в недифференцированных Т-клетках GATA3 воздействует на локус *il4* и *il13* генов, вызывая экспрессию соответствующих цитокинов, а также подавляя экспрессию T-bet как посредством связывания с локусом Tbx21 (Wei G., Abraham B.J., Yagi R. et al., 2011), так и посредством подавления экспрессии STAT4 (Yagi R., Junttila I.S., Wei G. et al., 2010). При этом, несмотря на то, что в мононуклеарах периферической крови, а именно в моноцитах, обнаруживаются другие представители семейства GATA (GATA4, GATA6) (Caramori G., Lim S., Ito K. et al., 2001), только GATA3 характеризуется экспрессией в Th2 и способностью влиять на иммунный ответ.

В данной главе будут рассмотрены результаты, полученные при изучении экспрессии транскрипционного фактора GATA3 в мононуклеарах периферической крови больных бронхиальной астмой (аллергической и неаллергической) и практически здоровых лиц (группа контроля).

Как ранее было показано в ряде исследований, более выраженная экспрессия GATA3 характерна для больных БА и достигает своего максимума при аллергической бронхиальной астме (Yong J., Chen G.Q., Huang B. et al., 2011; Shi Y.H., Shi G.C., Wan H.Y. et al., 2013). В таблице 3.9 представлены результаты оценки уровней экспрессии транскрипционного фактора GATA3 (интегрированная плотность по отношению к β -актину) во всех обследованных группах.

Таблица 3.9

Уровни экспрессии мРНК транскрипционного фактора GATA3 (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,19 (0,08; 0,41)	1-2-3: $p_1=0,001^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,006^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	0,49 (0,26; 0,74)	1-2: $p=0,001^{***}$ 2-3: $p=0,006^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	0,33 (0,10; 0,41)	1-3: $p=0,361^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхир-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2).

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Как видно из представленных результатов, наибольшим величинами экспрессии транскрипционного фактора GATA3 характеризовались группы пациентов с бронхиальной астмой, что не вступает в противоречие с имеющимися на сегодня литературными данными (Caramori G., Lim S., Ito K. et al., 2001; Shi Y.H., Shi G.C., Wan H.Y. et al., 2013; Yong J., Chen G.Q., Huang B., Wu S., 2011).

Сравнение между различными вариантами БА показало, что мононуклеары пациентов с АБА характеризуются наибольшими значениями GATA3, при этом обнаружена статистическая достоверность выявленных различий как при сравнении группы АБА с группой контроля, так и при сравнении с группой НАБА ($p<0,05$, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Обнаруженная закономерность являлась ожидаемой исходя из известной роли GATA3 как одного из ключевых регуляторов Th2-ответа, неоднократно подтвержденной в ряде экспериментов (Little F., Center D., 2003; Taha R., Hamid Q., Cameron L. et al., 2003; Ano S.,

Morishima Y., Ishii Y. et al., 2013; Zhu M., Liang Z., Wang T. et al., 2016; Usui T., Preiss J.C., Kanno Y. et al., 2006).

Следующим этапом анализа стало выявление различий в экспрессии GATA3 в зависимости от фазы заболевания (таблица 3.10).

Таблица 3.10

Уровни экспрессии транскрипционного фактора GATA3 при БА в зависимости от фазы заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	0,48±0,28	1-2: p=0,926**
АБА Ремиссия (2) n=26	0,47±0,26	
НАБА Обострение (1) n=23	0,28±0,15	1-2: p=0,035**
НАБА Ремиссия (2) n=23	0,34±0,27	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся нормальным распределением, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика); ** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован двухвыборочный t-критерий для независимых выборок).

Мононуклеары пациентов с аллергической бронхиальной астмой характеризовались практически идентичным уровнем экспрессии GATA3 как в фазе ремиссии, так и в фазе обострения. При этом у пациентов с НАБА уровень экспрессии GATA3 в фазе ремиссии был достоверно больше, чем в фазе обострения ($p < 0,05$, двухвыборочный t-критерий для независимых выборок). Необходимо отметить, что значения экспрессии транскрипционного фактора в группах АБА превышали таковые в группах НАБА независимо от фазы. Вероятнее всего, выявленное увеличение экспрессии мРНК GATA3 в фазе ремиссии у пациентов с НАБА является отражением некоторого снижения выраженности Th1-доминирования при ремиссии НАБА.

Следующим этапом анализа стало выявление различий в экспрессии GATA3 в зависимости от степени тяжести заболевания (таблицы 3.11 – 3.12).

Таблица 3.11

Уровни экспрессии транскрипционного фактора GATA3 у пациентов с АБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
АБА легкого течения (1) n=7	0,29 (0,11; 0,59)	1-2-3: $p_1=0,305^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,189^{**}$ 1-2: $p=0,143^{***}$ 2-3: $p=0,906^{***}$ 1-3: $p=0,295^{***}$
АБА средней степени тяжести (2) n=28	0,50 (0,38; 0,70)	
АБА тяжелого течения (3) n=7	0,56 (0,19; 0,37)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.12

Уровни экспрессии транскрипционного фактора GATA3 у пациентов с НАБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
НАБА легкого течения (1) n=14	0,06 (0,03; 0,15)	1-2-3: $p_1=0,0001^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,0001^{**}$ 1-2: $p=0,0007^{***}$ 2-3: $p=0,021^{***}$ 1-3: $p=0,001^{***}$
НАБА средней степени тяжести (2) n=19	0,36 (0,23; 0,40)	
НАБА тяжелого течения (3) n=7	0,41 (0,40; 0,67)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Обе рассматриваемые группы (группа АБА и группа НАБА) характеризовались одинаковой динамикой экспрессии GATA3 в зависимости от тяжести заболевания, а именно ростом значений GATA3 при «утяжелении» БА. Как в группе АБА, так и в группе НАБА наибольшими величинами экспрессии GATA3 характеризовались мононуклеары пациентов с тяжелым течением заболевания, наименьшими – мононуклеары пациентов с легким течением. Тем не менее, несмотря на сходную направленность выявленных динамик, статистически значимыми описываемые изменения были только в группе НАБА.

Ранее группой Palikhe et al. было показано, что пациенты с тяжелой астмой характеризуются более высокими значениями мРНК GATA3, чем пациенты с легкой БА и БА средней степени тяжести (Palikhe N.S., Laratta C., Nahirney D. et al. 2016). Таким образом, выявленные закономерности являются ожидаемыми и не противоречат результатам, полученным в предыдущих исследованиях.

Для выявления возможного влияния глюкокортикоидной терапии на экспрессию транскрипционного фактора GATA3 был проведен анализ уровней мРНК в зависимости от получаемой пациентом ГКС терапии (таблица 3.13).

Таблица 3.13

Уровни экспрессии транскрипционного фактора GATA3 при БА в зависимости от получаемой кортикостероидной терапии (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие и ГКС терапию (1) n=36	0,37 (0,15; 0,50)	1-2: p=0,103**
Больные, получающие терапию парентеральными ГКС (2) n=44	0,40 (0,29; 0,68)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Далее оценка влияния кортикостероидов на экспрессию GATA3 проводилась отдельно в группах НАБА и АБА с учетом получаемых доз ГКС (таблицы 3.14 – 3.15).

Таблица 3.14

Уровни экспрессии транскрипционного фактора GATA3 при БА у пациентов, не получающих ГКС терапию или получающих иГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=7	0,50 (0,17; 0,69)	1-2-3: $p_1=0,775^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,524^{**}$
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=4	0,42 (0,23; 0,60)	1-2: $p=0,762^{***}$ 2-3: $p=1,00^{***}$
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,38 (0,15; 0,62)	1-3: $p=0,537^{***}$
НАБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=6	0,30 (0,11; 0,55)	1-2-3: $p_1=0,851^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,637^{**}$
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=6	0,22 (0,17; 0,35)	1-2: $p=0,762^{***}$ 2-3: $p=1,00^{***}$
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,21 (0,01; 0,48)	1-3: $p=0,686^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры (p_2) для попарного сравнения между собой более двух групп.

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.15

Уровни экспрессии транскрипционного фактора GATA3 при БА у пациентов, получающих терапию парентеральными ГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=13	0,49 (0,20; 0,76)	1-2: p=1,00**
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг (2) n=13	0,45 (0,27; 0,66)	
НАБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=12	0,35 (0,25; 0,50)	1-2: p=0,829**
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг (21) n=9	0,39 (0,18; 0,53)	

Примечание: * - для выборок, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в целом, моноклеары пациентов с БА, получавших терапию и ГКС и получавших терапию парентеральными кортикостероидами, характеризовались сходным уровнем экспрессии GATA3. Тем не менее, анализ с учетом дозы кортикостероидов продемонстрировал некоторое снижение содержания GATA3 на фоне увеличения дозы ингаляционных ГКС, как в группе АБА, так и в группе НАБА. Для пациентов, получавших парентеральные ГКС, такой закономерности выявлено не было: медианы экспрессии GATA3 имели сходные значения как у пациентов,

получавших ГКС в дозе 8 мг и менее, так и у пациентов, получавших ГКС в дозе более 8 мг.

Известно, что транскрипционный фактор GATA3 содержит в своей структуре ядерный сигнальный фрагмент, чья локализация в ядре или цитоплазме обусловлена фосфорилированием сериновых фрагментов с помощью p38MAPK (mitogen-activated protein kinase). p38MAPK в свою очередь активируется посредством Т-клеточного рецептора. Этот процесс усиливает связывание GATA3 с белком-переносчиком импортином-α и способствует переносу транскрипционного фактора в ядро (Maneechotesuwan K., Xin Y., Ito K. et al. 2007; Furusawa J., Moro K., Motomura Y. et al. 2013). Ранее было показано, что именно эти связи обуславливают механизм влияния глюкокортикостероидов на функции GATA3: в основе находится подавление переноса транскрипционного фактора в ядро путем индуцирования MAPK фосфатазы-1, ингибитора p38MAPK (Maneechotesuwan K., Yao X., Ito K. et al. 2009).

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.

Далее для выявления возможных связей экспрессии GATA3 с клинико-лабораторными данными больных, был проведен корреляционный анализ (таблица 3.16, представлены только статистически значимые корреляции). Корреляционный анализ экспрессии GATA3 и исследуемых в рамках настоящего исследования цитокинов и транскрипционных факторов Foxp3, T-bet и c-Maf представлен в отдельной главе (глава 3.5 «Характеристика экспрессии цитокинов в периферической крови при бронхиальной астме и кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf»).

Результаты корреляционного анализа уровней экспрессии мРНК транскрипционного фактора GATA3 и клинико-лабораторных данных у больных БА (представлены только статистически значимые корреляции)

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
АБА (n=42)			
БА у родственников	0,672*	+	p=0,021
Аллергическая сенсibilизация	0,716*	+	p=0,011
ФОЕ (% от должного после бронхолитика)	0,434**	+	p=0,034
НАБА (n=40)			
ФЖЕЛ (до бронхолитика)	0,324**	-	p=0,047
ФЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	0,350**	-	p=0,031
ОФВ1(до бронхолитика)	0,475**	-	p=0,003
ОФВ1(% от должного до бронхолитика)	0,460**	-	p=0,004
ОФВ1(после бронхолитика)	0,436**	-	p=0,006
ОФВ1(% после должного после бронхолитика)	0,433**	-	p=0,007
СОС25-75 (до бронхолитика)	0,410**	-	p=0,027
СОС25-75 (% от должного до бронхолитика)	0,429**	-	p=0,008
СОС25-75 (после бронхолитика)	0,426**	-	p=0,019
СОС25-75 (% от должного после бронхолитика)	0,441**	-	p=0,006
ОФВ1/ЖЕЛ (до бронхолитика)	0,446**	-	p=0,005
ОФВ1/ЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	0,443**	-	p=0,005
ОФВ1/ЖЕЛ (после бронхолитика)	0,471**	-	p=0,003
ОФВ1/ЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	0,416**	-	p=0,009
ПОС (до бронхолитика)	0,368**	-	p=0,046
ПОС (после бронхолитика)	0,425**	-	p=0,019
ПОС (% от должного после бронхолитика)	0,350**	-	p=0,031
МОС50 (до бронхолитика)	0,457**	-	p=0,004
МОС50 (% от должного до бронхолитика)	0,450**	-	p=0,005

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
МОС50 (после бронхолитика)	0,452**	-	p=0,004
МОС50 (% от должного после бронхолитика)	0,457**	-	p=0,004
МОС75 (до бронхолитика)	0,398**	-	p=0,033
МОС75 (% от должного до бронхолитика)	0,364**	-	p=0,029
МОС75 (после бронхолитика)	0,425**	-	p=0,019
МОС75 (% от должного после бронхолитика)	0,399**	-	p=0,014
ПОС вд (до бронхолитика)	0,406**	-	p=0,012
МОС50 вд (до бронхолитика)	0,426**	-	p=0,008
Raw (после бронхолитика)	0,440**	+	p=0,017
Raw выд (после бронхолитика)	0,394**	+	p=0,034

Примечание: * - для оценки переменных, одна из которых является дихотомической, использовалась точечно-бисериальная корреляция;

** - для количественных переменных, закон распределения которых не является нормальным, использован коэффициент корреляции Спирмана; представлен коэффициент корреляции с знаком и уровни значимости.

Группа НАБА характеризовалась бóльшим числом выявленных отрицательных корреляций экспрессии GATA3 и показателей ФВД. В целом, полученные результаты являются ожидаемыми: наиболее высокие уровни GATA3 выявлялись у пациентов с тяжелой бронхиальной астмой, имеющих более выраженные нарушения по показателям ФВД. Тем не менее, в группе АБА такие связи продемонстрированы не были – обнаружена корреляция GATA3 только с одним показателем ФВД. Вероятнее всего, это связано с более длительным течением патологического процесса в группе АБА, а также продолжительностью ГКС терапии. Как уже указывалось ранее, в группе АБА длительность заболевания была больше, чем в группе НАБА. По-видимому, на фоне длительной терапии кортикостероидами происходила стабилизация воспалительного процесса и вариабельность значений показателей ФВД. Поскольку НАБА имеет мультифакториальный характер усиления воспалительного процесса, а также меньшую длительность течения в исследуемой популяции, в представленных

результатах прослеживается слабовыраженная ожидаемая отрицательная корреляция. Кроме того, отсутствие значимых корреляций в группе АБА может указывать на присутствие генетически-обусловленных дефектов, существующих у всех больных с аллергической бронхиальной астмой вне зависимости от степени ее тяжести.

В завершении данной главы, приведем клинические примеры, отражающие изложенные выше положения.

1. Больной Г., 48 лет. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно аллергическая (бытовая, пыльцевая, эпидермальная сенсibilизация), средней тяжести. Фаза обострения.

Страдает бронхиальной астмой с раннего детского возраста. В течение последних двух лет получал терапию Симбикортом в дозе 320/9 мкг 2 раза в день. Настоящее ухудшение самочувствия (затруднение дыхания вплоть до экспираторного удушья, одышка характера при незначительной физической нагрузке, кашель с небольшим количеством трудноотделяемой слизистой мокроты) – после контакта с шерстью кошки.

При обследовании – в крови выявлена эозинофилия до $0,429 \times 10^9/\text{л}$, ускоренная СОЭ до 16 мм/час. При цитологическом исследовании мокроты выявлен выраженный воспалительный процесс, вероятно аллергического характера, выраженная эозинофилия (29%), умеренная макрофагальная реакция (21%).

По результатам ФВД: $\text{ОФВ}_1 = 73,3 \%$ от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется выраженный бронхоспазм. Обнаружены значительные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких.

При сборе анамнеза отмечает наличие бытовой (домашняя пыль), пыльцевой (полынь, береза), эпидермальной (шерсть животных), сенсibilизации с появлением приступа удушья и кашля. Наследственность отягощена: мать больного страдала бронхиальной астмой. Не курит. Профессиональные вредности отрицает.

Для купирования настоящего обострения применялось внутривенное капельное введение глюкокортикостероидов (дексаметазона), небулайзерной терапии с беродуалом и пульмикортом.

На фоне обострения заболевания у пациента был исследован уровень экспрессии мРНК GATA3. Выявлен высокий уровень мРНК транскрипционного фактора - 0,6829, что характерно для аллергической бронхиальной астмы.

2. Больная Н., 35 лет. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно неаллергическая (инфекционно-зависимая), средней тяжести. Фаза обострения.

Страдает бронхиальной астмой около 1,5 лет. Обратилась к врачу с жалобами на сохраняющийся дыхательный дискомфорт, кашель, одышку после перенесенной пневмонии. Диагностирована бронхиальная астма и назначена терапия препаратом Серетид с положительным эффектом. Настоящее ухудшение самочувствия (одышка экспираторного характера при незначительной физической нагрузке, приступообразный кашель с небольшим количеством трудноотделяемой слизистой мокроты, дыхательный дискомфорт, приступы удушья) – после переохлаждения.

При обследовании отклонений в клиническом и биохимическом анализе крови не выявлено. Рентгенограмма органов грудной клетки без особенностей.

По результатам ФВД: $ОФВ_1 = 75,0$ % от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется умеренный бронхоспазм. Обнаружены умеренные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких.

Наследственность по бронхиальной астме не отягощена. Профессиональные вредности отрицает. Не курит.

Для купирования настоящего обострения применялось внутривенное капельное введение глюкокортикостероидов (дексаметазона), небулайзерной терапии с беродуалом, пульмикортом и муколитиками.

На фоне обострения заболевания у пациентки был исследован уровень экспрессии мРНК GATA3. Выявлен невысокий уровень мРНК

транскрипционного фактора - 0,1249, что характерно для неаллергической бронхиальной астмы.

Выводы по разделу 3.2.

В данной главе представлены результаты исследования транскрипционного фактора GATA3.

1. Наибольшей экспрессией мРНК транскрипционного фактора характеризовались пациенты группы АБА, что свидетельствует о доминировании Th2-ассоциированного воспаления при данном типе БА.
2. Уровни экспрессии GATA3 увеличивались с нарастанием тяжести течения бронхиальной астмы как в группе АБА, так и в группе НАБА, что, вероятнее всего является свидетельством присутствия более выраженного Т-клеточного дисбаланса при усугублении тяжести патологии.
3. При увеличении дозы применяемых кортикостероидов, в целом, зафиксировала тенденция к снижению содержания GATA3, что подтверждает способность данной группы препаратов влиять на экспрессию транскрипционного фактора, снижая тем самым, продукцию Th2-ассоциированных цитокинов.

3.3. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме

Данная глава посвящена результатам исследования экспрессии транскрипционного фактора T-bet.

Известно, что T-bet стимулирует выработку IFN- γ , что в свою очередь способствует дифференцировке клеток-предшественников в Th1. Данный механизм в совокупности со способностью T-bet индуцировать дифференцировку наивных T-лимфоцитов в Th1 и превращать зрелые Th2 в Th1 делает T-bet одним из ключевых регуляторов Th1-ответа, не только при бронхиальной астме, но и при других воспалительных заболеваниях (Schulz E.G., Mariani, L., Radbruch, A. et al. 2009; Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L. et al. 2000; Fan R., Lan Y., Chen J. et al., 2016).

На сегодняшний день считается установленным, что ключевая функция T-bet сводится к роли одного из основных факторов развития Th1 и Th1-ассоциированной экспрессии IFN- γ . Воздействие T-bet на некоторые субпопуляции T-клеток, в норме не экспрессирующих IFN- γ , приводило к их трансформации в IFN- γ -продуцирующий Th1 (Lazarevic V., Chen X., Shim J.H. et al., 2011).

Предполагается, что дисбаланс основных регуляторов формирования Th1 и Th2 фенотипа, T-bet и GATA3, лежит в основе патогенеза бронхиальной астмы и, возможно, других аллергических патологий. При этом интересен тот факт, что указанная особенность выявляется не только у пациентов с выраженным аллергическим компонентом заболевания, но и у пациентов с нервно-психической бронхиальной астмой (Zhu M., Liang Z., Wang T. et al., 2016).

Считается, что разнонаправленная регуляция экспрессии T-bet и GATA3 осуществляется не только за счет их непосредственного влияния друг на друга, но и за счет ряда косвенных механизмов. Неоднократно подтверждалось, что большинство факторов, стимулирующим образом влияющих на GATA3 или T-bet,

оказывают ингибирующее действие на фактор-антагонист (Guihua X., Shuyin L., Jinliang G. et al. 2016; Ma L., Zeng J., Mo B. et al., 2015).

С целью оценки межклеточных взаимодействий основных популяций Th-клеток при бронхиальной астме в рамках данной работы была оценена экспрессия ключевых транскрипционных факторов Th-популяций, в том числе и T-bet, как основного регулятора Th1. Далее будут рассмотрены полученные результаты.

Первым этапом оценки полученных результатов стало сравнение экспрессии T-bet в основных исследуемых группах: группе практически здоровых лиц, группе АБА и группе НАБА (таблица 3.17).

Таблица 3.17

Уровни экспрессии мРНК транскрипционного фактора T-bet (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,46 (0,28; 0,80)	1-2-3: $p_1=0,0000^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,0000^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	0,09 (0,05; 0,20)	1-2: $p=0,0000^{***}$ 2-3: $p=0,0001^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	0,42 (0,32; 0,65)	1-3: $p=0,840^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2).

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии ярко выраженных статистически значимых межгрупповых различий в значениях исследуемого показателя. Если уровни экспрессии T-bet в группе контроля и группе НАБА в основном были сопоставимы и практически не отличались друг от друга, то группа АБА характеризовалась крайне низкими значениями исследуемого показателя по сравнению с двумя другими группами, что в целом, было ожидаемым явлением, исходя из имеющихся сведений о роли T-bet в патогенезе бронхиальной астмы.

Вероятнее всего, обнаруженное значимое снижение экспрессии T-bet у больных АБА, обусловлено присутствием генетически детерминированных дефектов при атопии, определяющих выраженное доминирование Th2-иммунного ответа и персистенцию аллергического воспаления при АБА, что подтверждается результатами исследований, продемонстрировавших снижение экспрессии рассматриваемого транскрипционного фактора у больных БА в клетках

периферической крови (Ko F.W., Lun S.W., Wong C.K. et al., 2007). Также наличием нарушений, более «глубоких», чем Th1/Th2 дисбаланс может объясняться отсутствие выраженной динамики T-bet в фазах обострения и ремиссии у пациентов с АБА (таблица 3.18).

Сходные значения экспрессии T-bet в мононуклеарах периферической крови у больных НАБА и практически здоровых лиц, вероятно, обусловлено отсутствием генетических факторов развития заболевания, присутствующих при аллергической бронхиальной астме.

Далее рассмотрим результаты, полученные при сравнении экспрессии T-bet у пациентов в фазе обострения и ремиссии бронхиальной астмы (таблица 3.18).

Таблица 3.18

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet при БА в зависимости от фазы заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	0,09 (0,04; 0,19)	1-2: p=0,346**
АБА Ремиссия (2) n=26	0,10 (0,07; 0,33)	
НАБА Обострение (1) n=23	0,52±0,29	1-2: p=0,207***
НАБА Ремиссия (2) n=23	0,41±0,17	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика); для выборок, характеризующихся нормальным распределением, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован двухвыборочный t-критерий для независимых выборок).

Группа пациентов с АБА характеризовалась практически идентичными уровнями экспрессии T-bet как при ремиссии, так и при обострении заболевания. При этом в группе НАБА значения показателя в группе обострения превышали

таковые в группе ремиссии (статистически значимых различий не было выявлено).

В таблицах 3.19 и 3.20 представлены результаты исследования экспрессии T-bet у пациентов с разной степенью тяжести бронхиальной астмы.

Таблица 3.19

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet у пациентов с АБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
АБА легкого течения (1) n=7	0,20 (0,11; 0,37)	1-2-3: $p_1=0,255^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,201^{**}$
АБА средней степени тяжести (2) n=28	0,09 (0,05; 0,14)	1-2: $p=0,069^{***}$
АБА тяжелого течения (3) n=7	0,12 (0,01; 0,40)	2-3: $p=0,892^{***}$ 1-3: $p=0,610^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.20

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet у пациентов с НАБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
НАБА легкого течения (1) n=14	0,65 (0,52; 0,82)	1-2-3: $p_1=0,0003^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,0001^{**}$
НАБА средней степени тяжести (2) n=19	0,41 (0,38; 0,44)	1-2: $p=0,003^{***}$ 2-3: $p=0,0003^{***}$
НАБА тяжелого течения (3) n=7	0,19 (0,03; 0,24)	1-3: $p=0,002^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Группы АБА и НАБА продемонстрировали разный характер изменения экспрессии T-bet при разной тяжести бронхиальной астмы. Так в группе АБА не отмечалось четко направленной динамики показателя: наибольшей экспрессией T-bet характеризовалась группа легкой БА, несколько меньшие величины обнаружены в группе тяжелой БА, а наименьшая в экспрессия T-bet выявлялась при БА средней степени тяжести. При этом необходимо отметить, что в целом, все три группы имели сопоставимые значения экспрессии транскрипционного фактора. Статистическая значимость выявленных различий между группами не подтверждена.

Группа НАБА, напротив, характеризовалась присутствием четкой статистически значимой динамики. Уровень экспрессии транскрипционного фактора снижался при нарастании тяжести заболевания и достигал минимума в группе тяжелой БА. В группе БА средней степени тяжести экспрессия T-bet в два раза превышала таковую в группе легкой БА, а в группе тяжелой БА в 3,5 раз. Для каждой исследуемой подгруппы в группе НАБА была подтверждена статистическая достоверность различий как при сравнении всех трех подгрупп, так и при попарном межгрупповом сравнении с применением U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

А теперь рассмотрим изменения экспрессии транскрипционного фактора T-bet на фоне глюкокортикоидной терапии (таблица 3.21).

Таблица 3.21

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet при БА в зависимости от получаемой кортикостероидной терапии (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие иГКС терапию (1) n=36	0,38 (0,11; 0,46)	1-2: p=0,116**
Больные, получающие терапию парентеральными ГКС (2) n=44	0,12 (0,05; 0,47)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Далее оценка влияния кортикостероидов на экспрессию T-bet проводилась отдельно в группах НАБА и АБА с учетом получаемых доз ГКС (таблицы 3.22 – 3.23).

Таблица 3.22

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet при БА у пациентов, не получающих ГКС терапию или получающих иГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=7	0,25 (0,07; 0,69)	1-2-3: p ₁ =0,709** 1-2-3: p ₂ =0,427**
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=4	0,10 (0,09; 0,10)	
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,11 (0,04; 0,40)	1-2: p=0,857*** 2-3: p=0,905*** 1-3: p=0,476***
НАБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=6	0,58 (0,45; 0,71)	1-2-3: p ₁ =0,264** 1-2-3: p ₂ =0,066**

	Значение *	Значимость различий
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=6	0,40 (0,38; 0,47)	1-2: p=0,067*** 2-3: p=0,394***
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,28 (0,21; 0,77)	1-3: p=0,476***

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры (p_2) для попарного сравнения между собой более двух групп.

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.23

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet при БА у пациентов, получающих терапию парентеральными ГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=13	0,13 (0,05; 0,50)	1-2: p=0,177**
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг (2) n=13	0,08 (0,04; 0,14)	
НАБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=12	0,62 (0,42; 0,90)	1-2: p=0,022**
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг (21) n=9	0,26 (0,04; 0,50)	

Примечание: * - для выборок, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В отличие от других рассмотренных ранее транскрипционных факторов при исследовании уровней T-bet в общей популяции больных бронхиальной астмой отмечалось выраженное различие в величине экспрессии мРНК у больных на фоне иГКС-терапии и терапии парентеральными кортикостероидами: применение парентеральной терапии ассоциировалось с более низкими значениями показателя.

Анализ с учетом типа заболевания (АБА/НАБА) продемонстрировал снижение экспрессии мРНК на фоне увеличения дозы кортикостероидов: как в группе АБА, так и в группе НАБА пациенты, получавшие высокие дозы иГКС характеризовались наименьшими значениями экспрессии мРНК T-bet. Аналогичная закономерность выявлена и для парентеральных кортикостероидов, при этом различия в группе НАБА (сравнение больных, получающих парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее, и больных, получающих парентеральные ГКС в дозе более 8 мг) характеризовались статистической достоверностью ($p=0,022$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Ранее было установлено, что глюкокортикоиды подавляют экспрессию T-bet через непосредственное воздействие на промотор транскрипционного фактора, а также посредством его супрессии на уровне мРНК и на уровне экспрессии белка. Также глюкокортикостероидный рецептор (GR α) взаимодействует с T-bet, блокируя GR-зависимую транскрипцию, что в результате ведет к прекращению связывания T-bet с ДНК. Кроме того, в результате взаимодействия GR/T-bet происходит ингибирование транскрипционной активности T-bet на промотор IFN- γ . Таким образом, перечисленные механизмы обуславливают иммуносупрессивные свойства глюкокортикостероидов (Blaser K., 2008).

Рассмотрим корреляционный анализ экспрессии T-bet с клинико-лабораторными данными больных (таблица 3.24, представлены только статистически значимые корреляции). Корреляционный анализ экспрессии T-bet и исследуемых в рамках настоящего исследования цитокинов и транскрипционных факторов Foxp3, GATA3 и c-Maf представлен в отдельной главе (глава 3.5 «Характеристика экспрессии цитокинов в периферической крови при

бронхиальной астме и кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf»).

Таблица 3.24

Результаты корреляционного анализа уровней экспрессии мРНК транскрипционного фактора T-bet и клинико-лабораторных данных у больных БА (представлены только статистически достоверные корреляции)

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
АБА (n=42)			
ФОВЕ (% от должного до бронхолитика)	0,493*	-	p=0,020
ФОВЕ (% от должного после бронхолитика)	0,537*	-	p=0,007
ООЛ (до бронхолитика)	0,456*	-	p=0,033
ОВВ1/ЖЕЛ (после бронхолитика)	0,388*	+	p=0,034
НАБА (n=40)			
ФЖЕЛ (до бронхолитика)	0,394*	+	p=0,035
ФЖЕЛ (после бронхолитика)	0,432*	+	p=0,019
ОВВ1(до бронхолитика)	0,540*	+	p=0,003
ОВВ1(% от должного до бронхолитика)	0,412*	+	p=0,027
ОВВ1(после бронхолитика)	0,532*	+	p=0,003
ОВВ1(% после должного после бронхолитика)	0,443*	+	p=0,016
СОС25-75 (до бронхолитика)	0,445*	+	p=0,020
СОС25-75 (после бронхолитика)	0,548*	+	p=0,002
СОС25-75 (% от должного после бронхолитика)	0,485*	+	p=0,008
ОВВ1/ЖЕЛ (до бронхолитика)	0,398*	+	p=0,033
ОВВ1/ЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	0,395*	+	p=0,034
ОВВ1/ЖЕЛ (после бронхолитика)	0,466*	+	p=0,011
ОВВ1/ЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	0,454*	+	p=0,013
ПОС (до бронхолитика)	0,420*	+	p=0,023
ПОС (после бронхолитика)	0,482*	+	p=0,008
ПОС (% от должного после бронхолитика)	0,393*	+	p=0,035

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
МОС50 (до бронхолитика)	0,530*	+	p=0,003
МОС50 (% от должного до бронхолитика)	0,454*	+	p=0,013
МОС50 (после бронхолитика)	0,547*	+	p=0,002
МОС50 (% от должного после бронхолитика)	0,493*	+	p=0,007
МОС75 (до бронхолитика)	0,407*	+	p=0,035
МОС75 (после бронхолитика)	0,530*	+	p=0,003
МОС75 (% от должного после бронхолитика)	0,550*	+	p=0,006
ПОС вд (до бронхолитика)	0,501*	+	p=0,006
ПОС вд (после бронхолитика)	0,547*	+	p=0,002
МОС50 вд (до бронхолитика)	0,528*	+	p=0,003
МОС50 вд (после бронхолитика)	0,524*	+	p=0,004

Примечание: * - для оценки переменных, одна из которых является дихотомической, использовалась точечно-бисериальная корреляция;

** - для количественных переменных, закон распределения которых не является нормальным, использован коэффициент корреляции Спирмана; представлен коэффициент корреляции с знаком и уровни значимости.

Группа НАБА характеризовалась ожидаемыми положительными корреляциями с показателями ФВД: поскольку в настоящем исследовании было выявлено значительное снижение экспрессии T-bet при нарастании тяжести заболевания особенно выраженное у пациентов с НАБА, обнаруженные связи представляются закономерными. Группа АБА, напротив, демонстрировала слабовыраженные разнонаправленные корреляции единичных показателей ФВД, что, косвенно указывает на возможную регулируемую роль T-bet при АБА как представителя альтернативной регуляторной системы.

В завершении данной главы, приведем клинические примеры, иллюстрирующие изложенные выше положения.

1. Больная Т., 53 года. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно аллергическая (бытовая, эпидермальная сенсibilизация, лекарственная непереносимость), средней тяжести. Вне обострения.

Страдает бронхиальной астмой с раннего детского возраста. С 1981 начала регулярно получать базисную терапию, в течение последних четырех получает терапию препаратом Фостер (200/12 мкг 2 раза в день).

При сборе анамнеза отмечается наличие бытовой (домашняя пыль), эпидермальной (шерсть кошки) сенсibilизации с появлением кашля, одышки, приступов удушья. При цитологическом исследовании мокроты выявлен умеренный воспалительный процесс, вероятно аллергического характера, выраженная эозинофилия (21%). По результатам ФВД: $ОФВ_1 = 65,5 \%$ от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется выраженный бронхоспазм. Обнаружены значительные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких. При сравнении с данными ФВД от 2014 года отмечается отрицательная динамика.

Наследственность по бронхиальной астме отягощена (мать и тетя страдали бронхиальной астмой). Профессиональные вредности отрицает. Не курит.

На фоне ремиссии заболевания у пациентки был исследован уровень экспрессии мРНК T-bet. Выявлен низкий уровень мРНК транскрипционного фактора - 0,0528, что характерно для аллергической бронхиальной астмы.

2. Больная Ф., 61 год. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно неаллергическая (инфекционно-зависимая), средней степени тяжести. Фаза обострения.

Считает себя больной около 20 лет, когда впервые отметила появление приступов резкого сухого кашля, провоцировавшихся табачным дымом и резкими запахами. С 2005 года верифицирована бронхиальная астма, тогда же впервые назначена ингаляционная терапия (Симбикорт в дозе 160/4,5 мкг), которую пациентка принимала не регулярно. Настоящее ухудшение самочувствия (чувство заложенности в грудной клетке, одышка экспираторного характера при умеренной физической нагрузке, приступообразный кашель с небольшим количеством трудноотделяемой белой мокроты, затруднение дыхания) – после перенесенного ОРВИ.

При обследовании – в крови выявлен нейтрофильный лейкоцитоз (лейкоциты $11,3 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилы $6,67 \times 10^9/\text{л}$), а также увеличение абсолютного числа лимфоцитов и моноцитов (лимфоциты $3,3 \times 10^9/\text{л}$, моноциты $1,05 \times 10^9/\text{л}$). Рентгенограммы органов грудной клетки и носовых пазух без особенностей.

По результатам ФВД: $\text{ОФВ}_1 = 76,3 \%$ от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется умеренный бронхоспазм. Обнаружены умеренные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких.

Наследственность по бронхиальной астме не отягощена. Наличие профессиональных вредностей отрицает. Не курит.

Для купирования настоящего обострения применялась небулайзерная терапия с беродуалом, пульмикортом и муколитиками.

На фоне обострения заболевания у пациентки был исследован уровень экспрессии мРНК T-bet. Выявлен высокий уровень мРНК транскрипционного фактора - 0,9013, что характерно для неаллергической бронхиальной астмы.

Выводы по разделу 3.3.

Нами были изучены особенности экспрессии транскрипционного фактора T-bet у пациентов группы контроля и практически здоровых лиц.

1. Больные аллергической бронхиальной астмой характеризовались резким снижением и крайне низкими уровнями экспрессии T-bet. При этом больные НАБА и практически здоровые лица характеризовались сходными значениями показателя, что подтверждает доминирование Th2-ассоциированного воспаления при АБА и антагонистический характер GATA3/T-bet взаимодействия.
2. При нарастании тяжести течения бронхиальной астмы в группе НАБА выявлено снижение уровней T-bet, что в совокупности с ранее продемонстрированным нарастанием экспрессии GATA3 в данной подгруппе свидетельствует о нарастании Т-клеточного дисбаланса в сторону доминирования Th2-лимфоцитов.
3. На фоне увеличения дозы принимаемых кортикостероидов отмечалось достоверное снижение экспрессии мРНК T-bet, что свидетельствует о

модулирующем влиянии глюкокортикоидов на уровни транскрипционного фактора.

3.4. Характеристика экспрессии транскрипционного фактора c-Maf в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме

Транскрипционный фактор c-Maf ранее практически не рассматривался как активный участник патологических процессов при бронхолегочных заболеваниях. В связи с доказанным участием белков-представителей семейства Maf в процессах роста и дифференцировки тканей у животных и человека (Kataoka K., Shioda S., Ando K. et al., 1994; Imaki J., Tsuchiya K., Mishima T. et al., 2004; Nishikawa K., Nakashima T., Takeda S. et al., 2010; Hong E., Di Cesare P.E., Haudenschild D.R., 2011), наибольшее развитие изучение c-Maf получило в направлении онкогематологических заболеваний, сопровождающихся неконтролируемым клеточным ростом.

Согласно имеющимся в настоящее время представлениям о роли c-Maf в межклеточных взаимодействиях, рассматриваемый транскрипционный фактор регулирует плюрипотентные гены мезенхимальных стволовых клеток (Chen P.M., Lin C.H., Li N.T. et al., 2015), а также представляет собой вероятную мишень терапии опухолевых процессов, особенно миеломы, поскольку супрессия c-Maf обладает выраженным ингибирующим влиянием на пролиферацию клеток миеломы (Zhang Z., Tong J., Tang X. et al., 2016).

На сегодняшний день имеется ограниченное число работ, исследующих c-Maf вне онкогематологических заболеваний, при этом чаще всего данные исследования посвящены влиянию c-Maf и тем или иным образом связанных с ним белков на Th1/Th2 баланс (Chae W.J., Ehrlich A.K., Chan P.Y. et al., 2016). Согласно существующей в настоящее время концепции, c-Maf является одним из положительных регуляторов аллергического ответа, непосредственно ассоциированным с IL-4 (Erpenbeck V.J., Hagenberg A., Krentel H. et al., 2006; Sahoo A., Alekseev A., Tanaka K. et al., 2015), что делает его наиболее вероятным участником воспалительного процесса при бронхиальной астме наряду с GATA3.

В данной главе представлены результаты собственных исследований транскрипционного фактора c-Maf.

Рассмотрим экспрессию c-Maf у больных бронхиальной астмой и практически здоровых лиц (таблица 3.25).

Таблица 3.25

Уровни экспрессии мРНК транскрипционного фактора c-Maf (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,16 (0,10; 0,34)	1-2-3: $p_1=0,003^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,015^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	0,33 (0,22; 0,53)	1-2: $p=0,001^{***}$ 2-3: $p=0,015^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	0,16 (0,13; 0,40)	1-3: $p=0,505^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Группа контроля (практически здоровых лиц) и группа НАБА характеризовались практически идентичными уровнями экспрессии транскрипционного фактора c-Maf, в то время как в группе аллергической бронхиальной астмы значения показателя были выше в 2 раза. Статистическая достоверность выявленных различий подтверждена как при сравнении всех трех исследуемых групп ($p<0,05$, критерий Краскала-Уоллеса, критерий Джонкхира-Терпстры), так и при попарном межгрупповом сравнении группы АБА с НАБА и группой контроля ($p<0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В целом, полученные результаты являлись ожидаемыми и соответствуют известной информации о функции c-Maf в регуляции Th-иммунного ответа, а

именно его роли как активатора транскрипции гена IL-4 (Lai C.Y., Lin S.Y., Wu C.K. et al., 2012) и супрессора дифференцировки Th1 (Ho I.C., Lo D., Glimcher L.H. et al., 1998).

В таблице 3.26 представлена оценка экспрессии c-Maf в зависимости от фазы заболевания в группах АБА и НАБА.

Таблица 3.26

Уровни экспрессии транскрипционного фактора с-Maf при БА в зависимости от фазы заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	0,40±0,18	1-2: p=0,272**
АБА Ремиссия (2) n=26	0,32±0,21	
НАБА Обострение (1) n=23	0,17 (0,16; 0,34)	1-2: p=0,331***
НАБА Ремиссия (2) n=23	0,13 (0,11; 0,45)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика); для выборок, характеризующихся нормальным распределением, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован двухвыборочный t-критерий для независимых выборок);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Полученные результаты не вступают в противоречие с представленным ранее анализом экспрессии с-Maf у пациентов с АБА и НАБА (таблица 3.25): как в фазе обострения, так и в фазе ремиссии группа АБА характеризовалась большей экспрессией с-Maf, чем группа НАБА.

Как в группе АБА, так и в группе НАБА большие значения показателя выявлялись в фазе обострения. Тем не менее, группы ремиссии характеризовались в целом сопоставимыми с группой обострения уровнями экспрессии с-Maf. Также не была подтверждена статистическая значимость выявленных различий ($p > 0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Несмотря на отсутствие исследований экспрессии с-Maf при разных фазах бронхиальной астмы, полученные результаты, в целом, являются ожидаемыми. Известно, что с-Maf ассоциирован с экспрессией IL-4, продукция которого в свою очередь связана с функциональной активностью транскрипционного фактора

GATA3 (Kim J.I., Ho I.C., Grusby M.J. et al., 2011). Таким образом, сходная динамика GATA3 и c-Maf при разных фазах течения бронхиальной астмы представляется закономерной.

Рассмотрим характеристики экспрессии c-Maf при разных степенях тяжести бронхиальной астмы (таблицы 3.27 и 3.28).

Таблица 3.27

Уровни экспрессии транскрипционного фактора c-Maf у пациентов с АБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
АБА легкого течения (1) n=7	0,30 (0,21; 0,39)	1-2-3: $p_1=0,433^{**}$
АБА средней степени тяжести (2) n=28	0,39 (0,38; 0,70)	1-2-3: $p_2=0,875^{**}$ 1-2: $p=0,406^{***}$
АБА тяжелого течения (3) n=7	0,56 (0,21; 0,83)	2-3: $p=0,297^{***}$ 1-3: $p=1,00^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.28

Уровни экспрессии транскрипционного фактора c-Maf у пациентов с НАБА в зависимости от тяжести заболевания (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
НАБА легкого течения (1) n=14	0,16 (0,11; 0,30)	1-2-3: $p_1=0,784^{**}$
НАБА средней степени тяжести (2) n=19	0,16 (0,14; 0,44)	1-2-3: $p_2=0,508^{**}$ 1-2: $p=0,613^{***}$
НАБА тяжелого течения (3) n=7	0,20 (0,12; 0,65)	2-3: $p=1,00^{***}$

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
		1-3: $p=0,622^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Группа НАБА характеризовалась сопоставимыми уровнями экспрессии с-Maf вне зависимости от степени тяжести бронхиальной астмы, при этом в группе АБА отмечалось возрастание количества мРНК транскрипционного фактора при увеличении тяжести заболевания. Особенно резко выделяются различия между подгруппой тяжелой БА и БА средней степени тяжести – экспрессия с-Maf различалась в них в 1,5 раза. Тем не менее, несмотря на выраженную динамику, статистическая достоверность различий не была получена.

В основном, полученные результаты повторяли закономерности, выявленные при исследовании экспрессии транскрипционного фактора GATA3 у пациентов с разной тяжестью бронхиальной астмы, что является ожидаемым с учетом имеющейся информации о косвенной взаимосвязи с-Maf и GATA3 (Lai C.Y., Lin S.Y., Wu C.K. et al., 2012).

Далее рассмотрим влияние кортикостероидов на экспрессию с-Maf (таблица 3.29).

Таблица 3.29

Уровни экспрессии транскрипционного фактора с-Maf при БА в зависимости от получаемой кортикостероидной терапии (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие иГКС терапию (1) n=36	0,21 (0,13; 0,42)	1-2: p=0,066**
Больные, получающие терапию парентеральными ГКС (2) n=44	0,30 (0,17; 0,53)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Последующая оценка влияния кортикостероидов на экспрессию с-Maf проводилась отдельно в группах НАБА и АБА с учетом получаемых доз ГКС (таблицы 3.30 – 3.31).

Таблица 3.30

Уровни экспрессии транскрипционного фактора с-Maf при БА у пациентов, не получающих ГКС терапию или получающих иГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=7	0,27 (0,15; 0,27)	1-2-3: p ₁ =0,281** 1-2-3: p ₂ =0,499**
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=4	0,52 (0,24; 0,52)	1-2: p=0,400*** 2-3: p=0,167***

	Значение *	Значимость различий
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,21 (0,10; 0,45)	1-3: p=0,905***
НАБА		
Больные, не получающие постоянную ГКС терапию; больные, получающие низкие дозы иГКС (1) n=6	0,27 (0,13; 0,27)	1-2-3: p ₁ =0,266** 1-2-3: p ₂ =0,090**
Больные, получающие средние дозы иГКС (2) n=6	0,15 (0,12; 0,30)	1-2: p=0,629*** 2-3: p=0,286***
Больные, получающие высокие дозы иГКС (3) n=6	0,10 (0,08; 0,50)	1-3: p=0,250***

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p₁) и критерий Джонкхира-Терпстры (p₂) для попарного сравнения между собой более двух групп;

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.31

Уровни экспрессии транскрипционного фактора c-Maf при БА у пациентов, получающих терапию парентеральными ГКС, по группам АБА/НАБА (интегрированная плотность по отношению к β-актину)

	Значение *	Значимость различий
АБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=13	0,34 (0,23; 0,54)	1-2: p=0,959**
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг (2) n=13	0,30 (0,25; 0,51)	
НАБА		
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе 8 мг и менее (1) n=12	0,16 (0,15; 0,31)	1-2: p=0,250**

	Значение *	Значимость различий
Больные, получающие парентеральные ГКС в дозе более 8 мг (2) n=9	0,20 (0,17; 0,20)	

Примечание: * - для выборок, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В общей популяции больных БА большие значения транскрипционного фактора выявлялись у пациентов, получавших терапию парентеральными ГКС. В то же время анализ в популяциях больных с АБА и НАБА продемонстрировал разнонаправленную динамику с-Maf на фоне ГКС-терапии.

Так группа пациентов с АБА характеризовалась снижением уровней мРНК на фоне увеличения дозы парентеральных ГКС, в то же время у пациентов, получавших только ингаляционные ГКС, такой закономерности выявлено не было: на фоне применения средних доз иГКС регистрировались максимальные значения показателя более чем в 2 раза превышающие таковые для низких и высоких доз иГКС. Четкой динамики не обнаруживалось и у пациентов с НАБА. Если в группе пациентов, получавших парентеральные ГКС, экспрессия транскрипционного фактора несколько нарастала при увеличении дозы, то в группе терапии иГКС, наоборот, фиксировалось снижение с-Maf.

По результатам доступных на сегодняшний день исследований, на фоне терапии ГКС ожидается снижение уровней с-Maf. Так у пациента с парциальной красноклеточной аплазией костного мозга на фоне терапии метилпреднизолоном отмечалось снижение экспрессии мРНК с-Maf (Matsuhashi Y., Tasaka T., Uehara E. et al., 2003). Механизм данного явления, вероятнее всего, связан с влиянием кортикостероидов на убиквитинирование с-Maf. В то же время, эксперимент, проведенный на культуре клеток миеломы, выявил избирательное снижение с-Maf только в клетках, имеющих на своей поверхности определенный клеточный маркер (Mao X., Stewart A.K., Hurren R. et al., 2007).

Таким образом, при экстраполяции результатов Mao X. et al. на результаты проведенных нами исследований необходимо учитывать различие исследуемых нозологий и избирательность выявленного ингибирования c-Maf на фоне ГКС-терапии. Наиболее вероятным для пациентов с БА представляется снижение экспрессии мРНК рассматриваемого транскрипционного фактора при повышении дозы кортикостероидов, которое опосредовано не только убиквитинированием, но и другими неустановленными механизмами, вследствие чего формируется с относительно низкой скоростью (на данный факт указывают небольшие различия в величине экспрессии c-Maf на фоне терапии внутривенными ГКС).

Для установления возможных связей транскрипционного фактора c-Maf и клинико-лабораторных данных больных, был проведен корреляционный анализ (таблица 3.32, представлены только статистически значимые корреляции). Корреляционный анализ экспрессии c-Maf и исследуемых в рамках настоящего исследования цитокинов и транскрипционных факторов GATA3, T-bet и Foxp3 представлен в отдельной главе (глава 3.5 «Характеристика экспрессии цитокинов в периферической крови при бронхиальной астме и кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf»).

Таблица 3.32

Результаты корреляционного анализа уровней экспрессии мРНК транскрипционного фактора c-Maf и клинико-лабораторных данных у больных БА (представлены только статистически достоверные корреляции)

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
АБА (n=42)			
Эозинофилы крови (абс. значения)	0,391**	+	p=0,040
НАБА (n=40)			
Лекарственная непереносимость	0,446*	-	p=0,049

Примечание: * - для оценки переменных, одна из которых является дихотомической, использовалась точечно-бисериальная корреляция;

** - для количественных переменных, закон распределения которых не является нормальным, использован коэффициент корреляции Спирмана; представлен коэффициент корреляции с знаком и уровни значимости.

В отличие от других рассматриваемых транскрипционных факторов, для c-Maf были выявлены только две слабовыраженные корреляционные связи. Данные о функциональной активности c-Maf не позволяют предполагать его значимое влияние на регуляцию уровней эозинофилов, что в совокупности с отсутствием корреляционных связей с другими видами сенсibilизации кроме лекарственной непереносимости, позволяет сделать вывод о том, что, вероятнее всего, обнаруженная положительная корреляция обусловлена влиянием транскрипционного фактора GATA3 (также характеризовавшегося положительной корреляцией с уровнем эозинофилов у пациентов с АБА) и его косвенным взаимодействием с c-Maf через IL-4.

В завершении главы, приведем клинические примеры, отражающие изложенные выше положения.

1. Больная Б., 45 лет. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно неаллергическая (инфекционно-зависимая), средней степени тяжести. Фаза обострения.

Считает себя больной в течение 3 лет, когда после перенесенной пневмонии длительное время сохранялся кашель, одышка и затруднение дыхания. За 1 год до

настоящей госпитализации был установлен диагноз бронхиальная астма. Текущее ухудшение самочувствия (экспираторная одышка при незначительной физической нагрузке, приступообразный кашель с затрудненным отхождением слизистой мокроты в небольших количествах) связывает с переохлаждением.

При обследовании – в крови выявлена ускоренная СОЭ (20 мм/ч). По данным цитологического исследования мокроты – наличие небольшого воспалительного процесса преимущественно за счет нейтрофилов (40%).

По результатам ФВД: ОФВ₁ = 79,4 % от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется умеренный бронхоспазм. Выявлены умеренные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких.

У родственников бронхиальная астма не диагностировалась.

Не курит. Профессиональные вредности отрицает.

Для купирования настоящего обострения проводилась небулайзерная терапия с беродуалом, пульмикортом и муколитиком.

На фоне обострения заболевания у пациентки был произведен забор крови для измерения экспрессии мРНК с-Maf. Выявлен низкий уровень мРНК транскрипционного фактора - 0,1677, что ожидаемо для неаллергической бронхиальной астмы.

2. Больная С., 49 лет. Клинический диагноз: бронхиальная астма, преимущественно аллергическая (эпидермальная, пыльцевая сенсибилизация, лекарственная непереносимость), средней степени тяжести. Фаза обострения.

Считает себя больной с 15 лет, когда стала отмечать появление приступов удушья минимум 1 раз в неделю. В возрасте 23 лет был установлен диагноз бронхиальная астма. С 2008 года пациентке назначены ИГКС в качестве постоянной базисной терапии с положительным эффектом. Настоящее ухудшение самочувствия (одышка экспираторного характера вплоть до удушья, кашель с небольшим количеством слизистой мокротой) после переохлаждения.

При обследовании – в крови выявлена эозинофилия (эозинофилы крови $0,698 \times 10^9/\text{л}$). По результатам цитологического исследования мокроты выявлено наличие выраженного, ближе к умеренному воспалительного процесса,

небольшая эозинофилия (14%). По результатам ФВД: $ОФВ_1 = 76,2 \%$ от должного уровня, при проведении пробы с бронхолитиком выявляется умеренный бронхоспазм. Выявлены значительные обструктивные нарушения вентиляционной способности легких.

При сборе анамнеза отмечает наличие эпидермальной (шерсть животных), пылевой сенсibilизации с появлением приступов затрудненного дыхания и удушья. Имеет отягощенную наследственность по бронхиальной астме.

Не курит. Профессиональные вредности отрицает.

Лечение: ежедневно использует Симбикорт 160/4,5 мкг 2 раза в день.

Для купирования настоящего обострения применялось внутривенное капельное введение глюкокортикостероидов (дексаметазон), небулайзерной терапии с пульмикортом, бронхолитиком и муколитиком.

На фоне обострения заболевания у пациентки был произведен забор крови для измерения экспрессии мРНК с-Maf. Выявлен высокий уровень мРНК транскрипционного фактора - 0,6304, что характерно для тяжелой бронхиальной астмы.

Выводы по разделу 3.4.

Нами был проведен анализ особенностей экспрессии транскрипционного фактора с-Maf у пациентов группы контроля и практически здоровых лиц.

1. Практически здоровые лица и больные НАБА характеризовались сопоставимыми уровнями экспрессии транскрипционного фактора с-Maf, при этом значения показателя у пациентов с АБА были несколько больше. Необходимо отметить, что данные различия были аналогичны таковым, выявленным для транскрипционного фактора GATA3, однако имели менее выраженный характер. Таким образом, можно предположить, что основным положительным регулятором Th2-воспаления является именно GATA3, определяющий экспрессию наибольшего числа Th2-ассоциированных цитокинов, и, вероятнее всего, стимулирующий выработку с-Maf посредством IL-4.

2. Динамика c-Maf у пациентов с БА при разных степенях тяжести имела характер полностью аналогичный динамике GATA3 у тех же пациентов, а именно нарастание экспрессии мРНК при увеличении степени тяжести. Вероятнее всего, данные изменения носят вторичный характер и обусловлены нарастанием концентраций IL-4 в результате функциональной активности GATA3.
3. По совокупности результатов исследования представляется, что c-Maf играет косвенную роль в патогенезе БА. По всей видимости, характер его изменений у пациентов с разными характеристиками БА определяется функциональной активностью GATA3 и продукцией ассоциированных цитокинов, а именно, концентрациями IL-4.

3.5. Характеристика экспрессии цитокинов в периферической крови при бронхиальной астме и кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf

На сегодняшний день не подвергается сомнению важнейшая роль различных цитокинов в патогенезе бронхиальной астмы. Они рассматриваются не только как конечный продукт жизнедеятельности клеток иммунной системы, но и как соединения, самостоятельно регулирующие течение патологического процесса по путям положительной и отрицательной обратной связи, а также обладающие непосредственным влиянием на ткани организма.

Большинство цитокинов, участвующих в патологических процессах при бронхиальной астме, характеризуется специфичностью принадлежности к тем или иным клеточным популяциям, а также однонаправленностью вызываемого типа иммунного ответа.

В данном разделе представлен анализ концентраций цитокинов (IFN- γ , IL-4, IgE, IL-13, IL-17, IL-6) у пациентов в трех исследуемых группах (контроль, АБА, НАБА), а также представлен корреляционный анализ экспрессии транскрипционных факторов с концентрациями цитокинов у пациентов с бронхиальной астмой.

Интерферон-гамма (IFN- γ). Является одним из наиболее изученных цитокинов, ассоциированных с функциональной активностью Th1, в том числе и при бронхиальной астме.

В таблицах 3.33-3.34. приведены результаты определения концентраций IFN- γ у больных бронхиальной астмой и практически здоровых лиц, а также концентрации IFN- γ у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от фазы заболевания.

Таблица 3.33

Концентрации IFN- γ (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	6,71 (3,61; 11,21)	1-2-3: $p_1=0,0003^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,0001^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	4,01 (2,43; 9,68)	1-2: $p=0,146^{***}$ 2-3: $p=0,0002^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	23,72 (4,65; 70,78)	1-3: $p=0,002^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);.

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Наименьшие значения показателя были выявлены в группе больных АБА. Несколько большими, но, в целом, сопоставимыми значениями характеризовалась группа контроля. Максимальные величины концентраций IFN- γ , превосходящие другие группы в 4-5 раз, выявлены у пациентов с неаллергической бронхиальной астмой.

Достоверность обнаруженных различий подтверждена как при сравнении всех исследуемых групп ($p<0,05$, критерий Краскала-Уоллеса, критерий Джонкхира-Терпстры), так и при попарном межгрупповом сравнении группы НАБА с группой АБА и группой контроля ($p<0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.34

Концентрации IFN- γ (пг/мл) у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от фазы заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
------	------------	---------------------

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	3,41 (2,76; 14,03)	1-2: p=0,795**
АБА Ремиссия (2) n=26	6,51 (1,98; 8,78)	
НАБА Обострение (1) n=23	24,11 (4,51; 71,20)	1-2: p=0,750**
НАБА Ремиссия (2) n=23	23,72 (5,06; 56,77)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Оценка концентрации IFN-γ показала сопоставимые значения показателя в группах НАБА в несколько раз превышающие таковые в обеих группах АБА. При этом у пациентов с АБА в фазе ремиссии обнаруживались большие значения IFN-γ, чем у пациентов в фазе обострения.

Полученные результаты ожидаемы исходя из имеющихся данных об активности Th-ассоциированных транскрипционных факторов-антагонистов, а именно GATA3 и T-bet (Finotto S., Neurath M.F., Glickman J.N. et al., 2002; Kanhere A., Hertweck A., Bhatia U. et al., 2012). Некоторое повышение концентраций IFN-γ при АБА в фазе ремиссии и его приближение к значению показателя у практически здоровых лиц может объясняться кратковременным восстановлением Th1/Th2 баланса на фоне уменьшения проявления патологического процесса в фазе ремиссии.

Интерлейкин-4 (IL-4). Рассмотрим величины концентраций IL-4 у пациентов в трех исследуемых группах (таблицы 3.35-3.36).

Таблица 3.35

Концентрации IL-4 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица)	1,23 (0,71; 1,62)	1-2-3: p ₁ =0,0002**

n=47 (1)		1-2-3: $p_2=0,035^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	3,22 (1,58; 14,43)	1-2: $p=0,0000^{***}$ 2-3: $p=0,0000^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	1,75 (1,02; 3,22)	1-3: $p=0,002^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхир-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Результаты статистического анализа позволяют утверждать, что концентрации IL-4 характеризовались наличием достоверных различий между группами. Согласно полученным данным, наибольшие уровни IL-4, как и ожидалось, были выявлены у пациентов с аллергической бронхиальной астмой, наименьшие у лиц группы контроля, что не вступает в противоречие с результатами исследований, продемонстрировавших нарастание концентрации IL-4 у пациентов с бронхиальной астмой, в том числе и по отношению к величине показателя у здоровых лиц (Kirstein F., Nieuwenhuizen N.E., Jayakumar J. 2015; Al-Daghri N.M., Abd-Alrahman S., Draz H. et al., 2014).

Таблица 3.36

Концентрации IL-4 (пг/мл) у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от фазы заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	4,32 (1,66; 19,48)	1-2: $p=0,552^{**}$
АБА Ремиссия (2) n=26	2,83 (1,56; 4,32)	
НАБА Обострение (1) n=23	1,56 (0,82; 2,31)	1-2: $p=0,186^{**}$
НАБА Ремиссия (2) n=23	2,38 (1,43; 4,33)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Оценка концентрации рассматриваемого цитокина при разных фазах астмы показала, что пациенты группы АБА в фазе обострения характеризуются наибольшими значениями концентрации IL-4, наименьшими - пациенты группы НАБА в фазе обострения, что может объясняться высокой функциональной активностью транскрипционных факторов GATA3 и T-bet при обострении заболевания.

Бóльшие значения концентраций обнаруживались у пациентов с АБА. Несколько меньшими уровнями цитокина характеризовались пациенты с ремиссией НАБА ($p > 0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Тем не менее, в целом группы характеризовались сопоставимыми величинами концентраций, что свидетельствует о некотором восстановлении Th1/Th2 баланса у пациентов в фазе ремиссии.

Аналогичные результаты получены и при изучении концентраций иммуноглобулина Е (IgE) и интерлейкина-13 (IL-13).

Так, обе группы больных БА характеризовались более высокими значениями концентраций IgE, чем практически здоровые лица. При этом максимальные значения показателя обнаруживались у пациентов с АБА (таблица 3.37). Статистический анализ выявил достоверность различий как при сравнении всех трех исследуемых групп ($p < 0,05$, критерий Джонкхира-Терпстры/ критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса), так и при попарном межгрупповом сравнении ($p < 0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.37

Концентрации IgE (МЕ/мл) у практически здоровых лиц и больных БА

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа	64,11 (39,73; 89,64)	1-2-3: $p_1=0,0000^{**}$

(практически здоровые лица) n=47 (1)		1-2-3: $p_2=0,037^{**}$ 1-2: $p=0,0000^{***}$
Больные АБА n=42 (2)	554,00 (82,07; 893,23)	2-3: $p=0,037^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	156,32 (82,72; 394,61)	1-3: $p=0,000^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличным от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхир-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Оценка концентраций IgE при разных фазах заболевания показала некоторое снижение показателя у пациентов в фазе ремиссии (как в группе АБА, так и в группе НАБА) (таблица 3.38). Пациенты с АБА (как в фазе обострения, так и в фазе ремиссии) характеризовались большими значениями концентраций чем пациенты с НАБА, что свидетельствует о более высоких базальных уровнях данного иммуноглобулина при аллергической бронхиальной астме.

Таблица 3.38

Концентрации IgE (МЕ/мл) у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от фазы заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	599,03 (70,74; 952,64)	1-2: $p=0,725^{**}$
АБА Ремиссия (2) n=26	521,36 (89,12; 734,56)	
НАБА Обострение (1) n=23	176,21 (95,20; 540,20)	1-2: $p=0,106^{**}$
НАБА Ремиссия (2) n=23	106,68 (52,15; 209,32)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Результаты исследования концентраций IL-13 представлены в таблицах 3.39-3.40.

Таблица 3.39

Концентрации IL-13 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	3,31 (1,30; 6,53)	1-2-3: $p_1=0,0000^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,003^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	12,31 (7,20; 49,80)	1-2: $p=0,0000^{***}$ 2-3: $p=0,003^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	5,32 (2,43; 17,50)	1-3: $p=0,087^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Известно, что IL-13 наряду с IL-4 является одним из ключевых цитокинов Th2 (Grunig G., Warnock M., Wakil A.E. et al., 1998), тесно связанных с функциональной активностью GATA3 (Liang H.E., Reinhardt R.L., Bando J.K. et al., 2011). Этим фактом объясняется сходная динамика двух цитокинов в исследуемых группах. Как и IL-4, IL-13 характеризовался наименьшими значениями концентраций в группе практически здоровых лиц. Несколько большее содержание цитокина обнаруживалось у пациентов с НАБА. Максимальные концентрации, превышавшие таковые практически в 2,5 раза, выявлялись в группе АБА ($p<0,05$, критерий Джонкхира-Терпстры/ критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса).

Исследование концентраций IL-13 у пациентов при разных фазах бронхиальной астмы также продемонстрировало динамику, аналогичную таковой при анализе уровней IL-4 (таблица 3.40).

Таблица 3.40

Концентрации IL-13 (пг/мл) у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от фазы заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	13,43 (7,86; 41,24)	1-2: p=0,706**
АБА Ремиссия (2) n=26	11,03 (6,75; 54,30)	
НАБА Обострение (1) n=23	4,93 (2,87; 6,75)	1-2: p=0,550**
НАБА Ремиссия (2) n=23	5,43 (2,43; 26,53)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

А теперь рассмотрим значения концентраций **интерлейкинов-17 и -6 (IL-17, IL-6)** у пациентов, страдающих бронхиальной астмой, и практически здоровых лиц.

Концентрации IL-6 характеризовались большими значениями у пациентов с бронхиальной астмой (таблица 3.41). При этом величины показателя в группе НАБА были меньше чем в группе АБА (статистическая значимость показана только для различий между группой контроля и АБА (p<0,05, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.41

Концентрации IL-6 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица)	7,11 (3,54; 14,99)	1-2-3: p=0,307**

n=47 (1)		1-2-3: p=0,509**
Больные АБА n=42 (2)	10,43 (4,21; 32,14)	1-2: p=0,121*** 2-3: p=0,509***
Больные НАБА n=40 (3)	9,37 (3,62; 20,84)	1-3: p=0,471***

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2).

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Исследование концентраций IL-6 в сыворотке пациентов с БА не выявило доминирования группы ремиссии НАБА по содержанию цитокина: обе подгруппы НАБА характеризовались сопоставимыми значениями показателя (таблица 3.41). При этом медианы концентраций цитокина у пациентов в подгруппе ремиссии АБА были несколько больше (а в группе обострения АБА несколько меньше), чем медианы групп НАБА.

Таблица 3.42

Концентрации IL-6 (пг/мл) у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от фазы заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	7,42 (4,21; 32,14)	1-2: p=0,857**
АБА Ремиссия (2) n=26	10,84 (4,66; 32,98)	
НАБА Обострение (1) n=23	9,53 (3,21; 22,31)	1-2: p=0,746**
НАБА Ремиссия (2) n=23	9,32 (6,54; 14,21)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

IL-17 характеризовался присутствием сходных закономерностей (в сравнении с IL-6) при анализе концентраций в трех исследуемых группах: выявлено, что наибольшими уровнями IL-17, характеризовалась группа АБА (таблица 3.40). Несколько меньшие значения концентраций показаны для группы НАБА, в то время в группе контроля (практически здоровых лиц) выявлялись самые низкие значения показателя.

Таблица 3.43

Концентрации IL-17 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА

Группа	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	85,96 (19,51; 568,04)	1-2-3: $p_1=0,081^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,307^{**}$
Больные АБА n=42 (2)	211,85 (15,82; 1574,89)	1-2: $p=0,261^{***}$ 2-3: $p=0,307^{***}$
Больные НАБА n=40 (3)	194,30 (61,20; 4682,86)	1-3: $p=0,024^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В целом повышение уровней как IL-6 так и IL-17 у больных бронхиальной астмой является ожидаемым: ранее в исследованиях было показано увеличение содержания данных цитокинов при аллергических заболеваниях, в том числе и при бронхиальной астме (Tao B., Ruan G., Wang D. et al., 2015).

При анализе концентраций IL-17 у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от фазы обращают на себя внимание высокие значения показателя в группе ремиссии НАБА (таблица 3.42). По результатам ранее проведенных исследований, высокий уровень IL-17 зачастую ассоциирован с высоким содержанием нейтрофилов (Murcia R.Y., Vargas A., Lavoie J.P. et al., 2016) и

характерен для тяжелой бронхиальной астмы, резистентной к терапии (Green R., Brightling C., Woltmann G. et al., 2002).

Таблица 3.44

Концентрации IL-17 (пг/мл) у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от фазы заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА Обострение (1) n=26	399,04 (36,14; 932,35)	1-2: p=0,397**
АБА Ремиссия (2) n=26	61,42 (11,87; 3210,54)	
НАБА Обострение (1) n=23	116,43 (61,20; 605,21)	1-2: p=0,208**
НАБА Ремиссия (2) n=23	2578,13 (104,64; 5003,74)	

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

С учетом имеющихся данных об особенностях патологических процессов с участием IL -17 и -6, был проведен дополнительный анализ их концентраций у пациентов с разной тяжестью бронхиальной астмы.

В таблицах 3.45-3.46 представлены результаты исследования концентраций IL-17 у пациентов с АБА и НАБА в зависимости от тяжести течения заболевания.

Таблица 3.45

Концентрации IL-17 (пг/мл) у пациентов с АБА в зависимости от тяжести заболевания

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
АБА легкого течения (1) n=7	93,20 (12,37; 507,30)	1-2-3: p ₁ =0,005**
АБА средней степени тяжести (2) n=28	42,75 (14,89; 591,05)	1-2-3: p ₂ =0,004**
АБА тяжелого течения (3) n=7	4994,79 (1505,32; 10360,48)	1-2: p=0,762*** 2-3: p=0,001*** 1-3: p=0,009***

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличным от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.46

Концентрации IL-17 (пг/мл) у пациентов с НАБА в зависимости от тяжести заболевания

Степень тяжести	Значение *	Значимость различий
НАБА легкого течения (1) n=14	132,30 (47,19; 539,31)	1-2-3: $p_1=0,002^{**}$ 1-2-3: $p_2=0,015^{**}$
НАБА средней степени тяжести (2) n=19	81,67 (54,41; 319,86)	1-2: $p=0,541^{***}$ 2-3: $p=0,001^{***}$
НАБА тяжелого течения (3) n=7	5215,82 (4072,13; 11531,83)	1-3: $p=0,0004^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи;

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Представленные данные свидетельствуют о том, что как в группе АБА, так и в группе НАБА концентрации IL-17 демонстрировали разнонаправленную динамику при изменении степени тяжести бронхиальной астмы. Так наименьшие концентрации цитокина обнаруживались в группе пациентов с бронхиальной астмой средней степени тяжести вне зависимости от варианта заболевания (аллергическая/неаллергическая). Несколько большими значениями характеризовалась группа легкой БА (значимость выявленных различий не подтверждена при статистическом сравнении групп, $p>0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Среди рассматриваемых групп резко выделялись пациенты с тяжелой астмой, у которых концентрации IL-17 в десятки раз превосходили таковые у остальных пациентов. При этом была выявлена статистическая значимость данных различий, как при сравнении с группой БА легкого течения, так и при

сравнении с группой БА средней тяжести ($p < 0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Аналогичные результаты были получены при исследовании IL-6 у пациентов с разными степенями тяжести бронхиальной астмы. Было проведено отдельное сравнение по указанным параметрам в группах АБА и НАБА (таблицы 3.47-3.48).

Таблица 3.47

Концентрации IL-6 (пг/мл) у пациентов с АБА в зависимости от тяжести заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
АБА легкого течения (1) n=7	15,42 (7,31; 15,42)	1-2-3: $p_1=0,001^{**}$
АБА средней степени тяжести (2) n=28	5,97 (3,21; 16,33)	1-2-3: $p_2=0,029^{**}$ 1-2: $p=0,128^{***}$
АБА тяжелого течения (3) n=7	56,03 (34,03; 67,79)	2-3: $p=0,0000^{***}$ 1-3: $p=0,167^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.48

Концентрации IL-6 (пг/мл) у пациентов с НАБА в зависимости от тяжести заболевания

Фаза	Значение *	Значимость различий
НАБА легкого течения (1) n=14	9,32 (3,42; 15,32)	1-2-3: $p=0,057^{**}$
НАБА средней степени тяжести (2) n=19	7,62 (1,95; 13,37)	1-2-3: $p=0,156^{**}$ 1-2: $p=0,695^{***}$ 2-3: $p=0,027^{***}$
НАБА тяжелого течения (3) n=7	25,17 (15,14; 490,76)	1-3: $p=0,038^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В целом IL-6 демонстрировал сходный характер изменений при разных степенях тяжести БА (как аллергической, так и неаллергической). Группы тяжелой БА характеризовались ярко выраженным превалированием значений концентраций рассматриваемого цитокина над другими группами ($p < 0,05$, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, критерий Краскала-Уоллеса, критерий Джонкхира-Терпстры).

Ранее было показано, что пациенты с бóльшим количеством Th17 и, соответственно, высокими концентрациями IL-17 характеризуются высокой гиперреактивностью дыхательных путей и тяжелыми обструктивными изменениями в сравнении с другими больными бронхиальной астмой (Chiarella S.E., Budinger G.R., Mutlu G.M., 2015). При этом выявлявшиеся у таких пациентов Th2/Th17 клетки обладали способностью индуцировать продукцию IL-6, что также вело к повышению его концентрации на фоне «утяжеления» патологического процесса.

С учетом выявления крайне высоких значений концентраций IL-17 у пациентов как при АБА, так и при НАБА (таблицы 3.45-3.46), а также на основании имеющихся данных об особенностях течения бронхиальной астмы у больных с высоким содержанием IL-17 в крови (Al-Ramli W., Préfontaine D., Chouiali F. et al., 2009), нами была выделена группа лиц, характеризовавшихся значениями концентраций IL-17 1000 пг/мл и более, и проведен дополнительный анализ основных исследуемых показателей (таблицы 3.49.- 3.58).

Таблица 3.49

Уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 у практически здоровых лиц и больных БА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,47 (0,24; 0,67)	1-2-3-4: $p_1=0,0000^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,0000^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	0,42 (0,10; 0,71)	1-2: $p=0,491^{***}$ 1-3: $p=0,185^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	0,40 (0,16; 0,50)	1-4: $p=0,0001^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	0,05 (0,03; 0,06)	2-3: $p=0,553^{***}$ 2-4: $p=0,0001^{***}$ 3-4: $p=0,0001^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Обращает на себя внимание резкое снижение экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 у пациентов, характеризовавшихся высокими уровнями концентраций IL-17, что может свидетельствовать о существовании выраженного Th17/Treg сдвига в сторону Th17 в данной группе лиц.

Оценка экспрессии транскрипционного фактора GATA3 показала, что при АБА, как было показано ранее (глава 3, таблица 3.9), уровни экспрессии данного транскрипционного фактора значимо выше, чем во всех остальных группах БА, в том числе и в группе больных с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (таблица 3.50). При этом в группе практически здоровых лиц обнаруживались более низкие уровни экспрессии, что не противоречит ранее представленным результатам (таблица 3.9), согласно которым наименьшими уровнями транскрипционного фактора GATA3 характеризовалась именно группа контроля. Важно отметить, что

при АБА и в группе больных с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл уровни экспрессии GATA3 значимо не различались, что позволяет предполагать существенную роль данного транскрипционного фактора в возникновении сигнального дисбаланса в этих группах.

Таблица 3.50

Уровни экспрессии транскрипционного фактора GATA3 у практически здоровых лиц и больных БА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,17 (0,07; 0,40)	1-2-3-4: $p_1=0,0000^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,019^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	0,49 (0,26; 0,68)	1-2: $p=0,001^{***}$ 1-3: $p=0,511^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	0,31 (0,07; 0,39)	1-4: $p=0,001^{***}$ 2-3: $p=0,003^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	0,41 (0,26; 0,79)	2-4: $p=0,714^{***}$ 3-4: $p=0,004^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Интересно, что оценка экспрессии T-bet и c-Maf показала «промежуточное» положение больных БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл в сравнении с другими группами по анализируемым параметрам (таблицы 3.51-3.52). Так группа НАБА и группа контроля характеризовались сопоставимыми уровнями экспрессии T-bet, значительно превышающими таковые в группе АБА. В то же время, лица с высокими концентрациями IL-17 продемонстрировали уровни мРНК транскрипционного фактора ниже чем в группах контроля и НАБА, но выше чем в группе АБА, что заставляет предполагать различный спектр

нарушений сигнализации в этих трех группах БА, что в совокупности с данными таблицы 3.49 указывает на ключевую роль транскрипционного фактора Foxp3 в формировании нарушений сигнализации в группе больных с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл.

Таблица 3.51

Уровни экспрессии транскрипционного фактора T-bet у практически здоровых лиц и больных БА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,58 (0,29; 0,82)	1-2-3-4: $p_1=0,0000^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,046^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	0,09 (0,05; 0,15)	1-2: $p=0,0001^{***}$ 1-3: $p=0,797^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	0,50 (0,40; 0,74)	1-4: $p=0,001^{***}$ 2-3: $p=0,0001^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	0,21 (0,03; 0,40)	2-4: $p=0,145^{***}$ 3-4: $p=0,000^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Сходная закономерность показана и для транскрипционного фактора c-Maf: в группе пациентов с высокими концентрациями IL-17 экспрессия c-Maf была ниже чем в группе АБА, но превышала таковую в группах НАБА и контроля (таблица 3.52).

Таблица 3.52

Уровни экспрессии транскрипционного фактора c-Maf
у практически здоровых лиц и больных БА (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	0,15 (0,08; 0,36)	1-2-3-4: $p_1=0,003^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,145^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	0,34 (0,23; 0,56)	1-2: $p=0,001^{***}$ 1-3: $p=0,475^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	0,16 (0,13; 0,34)	1-4: $p=0,082^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	0,26 (0,15; 0,37)	2-3: $p=0,008^{***}$ 2-4: $p=0,151^{***}$ 3-4: $p=0,239^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличным от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Также был выполнен дополнительный анализ концентраций исследуемых цитокинов.

Так концентрации IFN- γ характеризовались наибольшими значениями в группе НАБА, а наименьшими в группе АБА, что не противоречит ранее полученным результатам, представленным в таблице 3.33. В группе лиц с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл обнаруживались значения концентраций цитокина меньше, чем в группе НАБА, но превышающие таковые в группе контроля (и тем более АБА). Вероятнее всего, это свидетельствует о меньшей роли сдвига Th1/Th2 баланса в сторону Th1-клеток у больных с высокими концентрациями IL-17 (таблица 3.53).

Таблица 3.53

Концентрации IFN- γ (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА
(интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа	5,70 (3,27; 11,60)	1-2-3-4: $p_1=0,0001^{**}$

(практически здоровые лица) n=47 (1)		1-2-3-4: $p_2=0,012^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	3,41 (1,98; 8,35)	1-2: $p=0,035^{***}$ 1-3: $p=0,006^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	21,75 (4,71; 63,71)	1-4: $p=0,038^{***}$ 2-3: $p=0,0001^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	8,90 (5,21; 29,61)	2-4: $p=0,001^{***}$ 3-4: $p=0,588^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Для IL-4 и IgE был показан сходный характер различий концентраций между группами: минимальные значения показателя были зафиксированы в группе контроля, максимальные — в группе АБА. Величины концентраций в группе НАБА несколько превышали таковые в группе пациентов с высокими уровнями IL-17, однако, в целом, были сопоставимы (таблицы 3.54-3.55).

Таблица 3.54

Концентрации IL-4 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА
(интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость Различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	1,36 (0,79; 2,04)	1-2-3-4: $p_1=0,0001^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,803^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	3,87 (1,99; 25,01)	1-2: $p=0,0001^{***}$ 1-3: $p=0,296^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	1,64 (0,82; 3,21)	1-4: $p=0,856^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	1,52 (0,60; 2,90)	2-3: $p=0,001^{***}$ 2-4: $p=0,003^{***}$ 3-4: $p=0,573^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.55

Концентрации IgE (МЕ/мл) у практически здоровых лиц и больных БА
(интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость Различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	68,07 (40,54; 93,67)	1-2-3-4: $p_1=0,0001^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,002^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	463,80 (85,60; 953,11)	1-2: $p=0,0001^{***}$ 1-3: $p=0,002^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	138,45 (53,44; 394,61)	1-4: $p=0,004^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	127,83 (58,58; 588,34)	2-3: $p=0,076^{***}$ 2-4: $p=0,078^{***}$ 3-4: $p=0,972^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличным от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В то же время сравнение концентраций IL-13 у пациентов с НАБА и пациентов с высокими уровнями IL-17 показало наличие различий в величине показателя между этими группами, а именно: в группе НАБА значения были в три раза ниже (таблица 3.56). В других группах характер значений концентраций соответствовал таковому у IL-4 и IgE: минимальные величины выявлялись у группы контроля, максимальные – у пациентов с АБА.

Таблица 3.56

Концентрации IL-13 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА
(интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость Различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	3,11 (1,22; 5,54)	1-2-3-4: $p_1=0,0001^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,003^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	12,31 (7,64; 41,24)	1-2: $p=0,0001^{***}$ 1-3: $p=0,458^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	3,23 (2,11; 6,70)	1-4: $p=0,0001^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	9,44 (5,07; 58,55)	2-3: $p=0,0001^{***}$ 2-4: $p=0,746^{***}$ 3-4: $p=0,001^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличным от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Представленные результаты свидетельствуют о присутствии выраженного сдвига в сторону Th2-ответа у пациентов с АБА. По всей видимости, у пациентов с концентрациями IL-17 1000 пг/мл и более, также имеется смещение в сторону экспрессии Th2-ассоциированных цитокинов, менее выраженное в сравнении с группой АБА.

Далее по аналогичному принципу был проведен анализ концентраций IL-6 во всех четырех рассматриваемых группах (таблица 3.57).

Таблица 3.57

Концентрации IL-6 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА
(интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	6,81 (2,79; 13,97)	1-2-3-4: $p_1=0,0001^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,0001^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	6,22 (3,33; 18,42)	1-2: $p=0,587^{***}$ 1-3: $p=0,960^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	6,54 (2,67; 14,21)	1-4: $p=0,0001^{***}$ 2-3: $p=0,690^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	25,17 (15,30; 49,63)	2-4: $p=0,0001^{***}$ 3-4: $p=0,0001^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В представленных результатах резко выделяется группа лиц с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл, также характеризовавшаяся высокими концентрациями IL-6, превышающие значения показателя в других группах более чем в 4 раза, что было ожидаемым исходя из имеющейся информации и

способности IL-6 влиять на дифференцировку Th17 с последующим нарастанием IL-17 (Camporeale A., Poli V., 2012).

Таблица 3.58

Концентрации IL-17 (пг/мл) у практически здоровых лиц и больных БА
(интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	42,10 (15,93; 101,56)	1-2-3-4: $p_1=0,0001^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,0001^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	42,75 (13,90; 399,04)	1-2: $p=0,688^{***}$ 1-3: $p=0,197^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	91,54 (52,14; 194,30)	1-4: $p=0,0001^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	4840,24 (2203,99; 6498,82)	2-3: $p=0,505^{***}$ 2-4: $p=0,0001^{***}$ 3-4: $p=0,0001^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Поскольку по результатам ранее проведенных исследований, высокий уровень IL-17 часто сопровождается высоким содержанием нейтрофилов (Murcia R.Y., Vargas A., Lavoie J.P., 2016), нами была проведена оценка клеточного состава мокроты и показателей клинического анализа крови в трех группах больных бронхиальной астмой.

Таблица 3.59

Показатели клинического анализа крови у больных АБА (динамика обострение-ремиссия)

Показатель	АБА обострение*	АБА ремиссия*	Значимость различий**
------------	-----------------	---------------	-----------------------

Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	10,15 (6,83; 12,10)	9,80 (6,35; 13,05)	$p > 0,05$
Нейтрофилы ($10^9/\text{л}$)	5,99 (3,80; 7,94)	4,20 (3,35; 8,71)	$p > 0,05$
Лимфоциты ($10^9/\text{л}$)	2,40 (2,20; 2,95)	2,20 (1,75; 2,90)	$p > 0,05$
Эозинофилы ($10^9/\text{л}$)	0,208 (0,038; 0,239)	0,099 (0,019; 0,185)	$p > 0,05$
Моноциты ($10^9/\text{л}$)	0,900 (0,553; 1,073)	0,690 (0,520; 1,010)	$p > 0,05$
СОЭ, мм/час	10,50 (4,25; 13,00)	14,00 (9,00; 19,50)	$p > 0,05$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.60

Показатели клинического анализа крови у больных НАБА (динамика обострение-ремиссия)

Показатель	НАБА обострение*	НАБА ремиссия*	Значимость различий**
Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	6,65 (5,80; 9,10)	6,30 (5,40; 9,40)	$p > 0,05$
Нейтрофилы ($10^9/\text{л}$)	3,93 (3,05; 6,80)	3,93 (3,29; 7,18)	$p > 0,05$
Лимфоциты ($10^9/\text{л}$)	1,80 (1,28; 2,60)	1,70 (1,40; 2,50)	$p > 0,05$
Эозинофилы ($10^9/\text{л}$)	0,224 (0,062; 0,356)	0,049 (0,008; 0,164)	$p > 0,05$
Моноциты ($10^9/\text{л}$)	0,555 (0,403; 0,705)	0,500 (0,360; 0,650)	$p > 0,05$
СОЭ, мм/час	9,50 (3,00; 17,00)	12,00 (6,00; 23,00)	$p > 0,05$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.61

Показатели клинического анализа крови у лиц с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (динамика обострение-ремиссия)

Показатель	Обострение*	Ремиссия*	Значимость различий**
Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	11,00 (7,15; 11,88)	8,30 (5,88; 9,63)	$p > 0,05$
Нейтрофилы ($10^9/\text{л}$)	7,55 (4,34; 9,26)	4,43 (3,13; 5,56)	$p > 0,05$
Лимфоциты ($10^9/\text{л}$)	1,85 (1,58; 2,40)	2,35 (1,58; 3,50)	$p > 0,05$
Эозинофилы ($10^9/\text{л}$)	0,062 (0,008; 0,303)	0,242 (0,061; 0,479)	$p > 0,05$
Моноциты ($10^9/\text{л}$)	0,585 (0,385; 0,858)	0,700 (0,603; 0,905)	$p > 0,05$
СОЭ, мм/час	17,50 (11,75; 24,75)	11,50 (6,25; 14,25)	$p > 0,05$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Как видно из таблиц 3.59-3.61 именно группа пациентов с высокими концентрациями IL-17 характеризовалась наибольшим числом нейтрофилов как в фазе обострения, так и в фазе ремиссии бронхиальной астмы.

Результаты оценки клеточного состава мокроты в трех группах больных бронхиальной астмой представлены в таблицах 3.62-3.64.

Таблица 3.62

Оценка клеточного состава мокроты у больных АБА

Параметр	АБА обострение*	АБА ремиссия*	Значимость различий**
Уровень нейтрофилов в мокроте (% от общего числа клеток)	38,00 (22,00; 55,00)	34,50 (30,00; 48,50)	p> 0,05
Уровень макрофагов в мокроте (% от общего числа клеток)	17,00 (9,00; 37,00)	20,50 (13,75; 28,50)	p> 0,05
Уровень эозинофилов в мокроте (% от общего числа клеток)	21,00 (16,00; 21,00)	19,50 (14,00; 29,25)	p> 0,05
Уровень лимфоцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	8,00 (6,00; 12,00)	7,00 (6,50; 10,25)	p> 0,05
Уровень моноцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	0,00 (0,00; 3,00)	0,00 (0,00; 2,25)	p> 0,05

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.63

Оценка клеточного состава мокроты у больных бронхиальной астмой

Параметр	НАБА обострение*	НАБА ремиссия*	Значимость различий**
Уровень нейтрофилов в мокроте (% от общего числа клеток)	41,50 (30,00; 49,00)	36,50 (33,00; 43,75)	p> 0,05
Уровень макрофагов в мокроте (% от общего числа клеток)	19,00 (11,00; 28,50)	19,00 (13,50; 28,25)	p> 0,05
Уровень эозинофилов в	25,50	17,00	p> 0,05

мокроте (% от общего числа клеток)	(18,25; 33,50)	(13,50; 20,50)	
Уровень лимфоцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	10,00 (6,25; 11,50)	8,00 (6,25; 9,50)	p> 0,05
Уровень моноцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	0,50 (0,00; 1,00)	0,50 (0,00; 2,50)	p> 0,05

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таблица 3.64

Оценка клеточного состава мокроты у лиц с концентрациями IL-17 более 1000

пг/мл

Параметр	Обострение*	Ремиссия*	Значимость различий**
Уровень нейтрофилов в мокроте (% от общего числа клеток)	47,00 (46,55; 48,75)	44,50 (23,75; 49,50)	p> 0,05
Уровень макрофагов в мокроте (% от общего числа клеток)	15,00 (13,25; 16,00)	18,00 (6,75; 27,75)	p> 0,05
Уровень эозинофилов в мокроте (% от общего числа клеток)	16,00 (11,50; 17,00)	13,50 (7,00; 23,00)	p> 0,05
Уровень лимфоцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	11,00 (9,00; 13,50)	8,00 (5,50; 20,25)	p> 0,05
Уровень моноцитов в мокроте (% от общего числа клеток)	2,00 (0,00; 4,00)	0,00 (0,00; 12,75)	p> 0,05

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Среди всех больных бронхиальной астмой именно группа пациентов с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл характеризовалась наибольшим процентным содержанием нейтрофилов в клеточном составе мокроты. Необходимо отметить, что значения показателя в указанной группе в фазе ремиссии превышали таковые для групп АБА и НАБА в фазе обострения.

В связи с тем, что уровень IL-17 имел четкую связь с тяжестью заболевания, нами было проведено исследование корреляционных связей концентраций цитокина и показателей ФВД (таблица 3.65).

Таблица 3.65

Результаты корреляционного анализа концентраций IL-17 (пг/мл) и показателей функции внешнего дыхания (представлены только статистически значимые корреляции)

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
АБА (n=42)			
ООЛ (% от должного до бронхолитика)	0,521*	+	p=0,015
ОФВ1/ЖЕЛ (до бронхолитика)	0,528*	-	p=0,006
ОФВ1/ЖЕЛ (после бронхолитика)	0,580*	-	p=0,002
ПОС (% от должного до бронхолитика)	0,419*	-	p=0,033
ПОС (% от должного после бронхолитика)	0,430*	-	p=0,028
МОС50 (до бронхолитика)	0,417*	-	p=0,034
МОС50 (% от должного до бронхолитика)	0,457*	-	p=0,022
МОС75 (% от должного до бронхолитика)	0,409*	-	p=0,042
НАБА (n=40)			
ЖЕЛ (до бронхолитика)	0,547*	-	p=0,007
ЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	0,489*	-	p=0,018
ЖЕЛ (после бронхолитика)	0,554*	-	p=0,006
ЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	0,464*	-	p=0,026
ФЖЕЛ (до бронхолитика)	0,524*	-	p=0,010
ФЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	0,564*	-	p=0,005
ФЖЕЛ (после бронхолитика)	0,572*	-	p=0,004
ФЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	0,541*	-	p=0,008
ОФВ1 (до бронхолитика)	0,535*	-	p=0,008
ОФВ1 (% от должного до	0,475*	-	p=0,022

Показатель	Коэффициент корреляции	Знак связи	Значимость различий
бронхолитика)			
ОФВ1 (после бронхолитика)	0,558*	-	p=0,006
ОФВ1 (% после должного после бронхолитика)	0,556*	-	p=0,006
ПОС (до бронхолитика)	0,442*	-	p=0,035
МОС50 (до бронхолитика)	0,415*	-	p=0,049
МОС50 (после бронхолитика)	0,478*	-	p=0,021
МОС50 (% от должного после бронхолитика)	0,442*	-	p=0,035
МОС75 (до бронхолитика)	0,425*	-	p=0,049
МОС75 (после бронхолитика)	0,516*	-	p=0,012
МОС75 (% от должного после бронхолитика)	0,484*	-	p=0,019
ПОС вд (до бронхолитика)	0,649*	-	p=0,001
ПОС вд (после бронхолитика)	0,470*	-	p=0,024
МОС50 вд (до бронхолитика)	0,712*	-	p=0,0001
МОС50 вд (после бронхолитика)	0,433*	-	p=0,039

Примечание: * - для оценки переменных, одна из которых является дихотомической, использовалась точечно-бисериальная корреляция;

* - для количественных переменных, закон распределения которых не является нормальным, использован коэффициент корреляции Спирмана; представлен коэффициент корреляции с знаком и уровни значимости.

Обращает на себя внимание наличие большого числа статистически значимых отрицательных корреляций с показателями ФВД, как в группе АБА, так и в группе НАБА, что, по-видимому, является подтверждением ранее обнаруженных закономерностей, а именно, выявление наибольших концентраций IL-17 у пациентов с тяжелой БА.

Из рассматриваемых транскрипционных факторов только для GATA3 показана способность напрямую взаимодействовать с Foxp3 и блокировать его экспрессию (Chapoval S., Dasgupta P., Dorsey N.J. et al., 2010), что, вероятнее всего, является одним из основных механизмов нарушения Т-клеточного баланса и иммунного гомеостаза у пациентов с бронхиальной астмой.

С целью дополнительной характеристики баланса транскрипционных факторов Foxp3 и GATA3 у больных БА, нами был проанализирован

коэффициент Foxp3/GATA3 в обследованных группах, в том числе и в группе пациентов с высокими концентрациями IL-17. Результаты этого анализа представлены в таблице 3.66.

Таблица 3.66

Значения коэффициента Foxp3/GATA3 в обследованных группах

Фаза	Значение *	Значимость различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n=47 (1)	3,31 (1,01; 7,99)	1-2-3-4: $p_1=0,0000^{**}$ 1-2-3-4: $p_2=0,0000^{**}$
Больные АБА n=35 (2)	0,68 (0,17; 1,51)	1-2: $p=0,001^{***}$
Больные НАБА n=27 (3)	2,37 (1,03; 5,46)	1-3: $p=0,872^{***}$ 1-4: $p=0,0001^{***}$
Больные БА с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл (4) n=20	0,11 (0,06; 0,17)	2-3: $p=0,008^{***}$ 2-4: $p=0,0001^{***}$ 3-4: $p=0,0001^{***}$

Примечание: * - для выборок, характеризующихся распределением отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** - для распределения отличного от нормального использован критерий независимых выборок Краскала-Уоллеса (p_1) и критерий Джонкхира-Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп (p_2);

*** - уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Как видно из представленных данных, наибольшими значениями коэффициента характеризовались лица группы контроля. Снижение Foxp3/GATA3 соотношения в группах пациентов с бронхиальной астмой может быть обусловлено не только нарастанием экспрессии GATA3, но и снижением содержания мРНК Foxp3, что особенно выражено в группе лиц с высокими концентрациями IL-17.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существовании Т-клеточного дисбаланса у пациентов с бронхиальной астмой, затрагивающего не только основные регуляторные аспекты Th2-клеток, но и Treg, обеспечивающие поддержание иммунного гомеостаза. Наиболее выраженными нарушениями

характеризуются пациенты группы АБА и пациенты, с высоким содержанием IL-17, что вероятно, является отражением присутствия генетических нарушений, обуславливающих особенности течения заболевания у данных больных, в том числе и тяжесть БА.

Поскольку основной целью данного исследования является изучение экспрессии транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf, нами был проведен корреляционный анализ уровней мРНК транскрипционных факторов и цитокинов, как одних из основных маркеров активности и направленности иммунологических изменений при бронхиальной астме. Исследование корреляций между уровнями экспрессии мРНК и концентрациями цитокинов было проведено отдельно у пациентов с АБА и НАБА. Результаты представлены в таблицах 3.67-3.68.

Таблица 3.67

Результаты корреляционного анализа концентраций исследуемых цитокинов и уровней экспрессии мРНК транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf у пациентов с АБА (n=42, представлены коэффициенты корреляции и уровни значимости).

Показатель **	IFN- γ	IL-4	IgE	IL-17	IL-6	IL-13	Foxp3	GATA3	T-bet	c-Maf
IFN- γ	-	-0,433 p=0,017	-0,154 p=0,362	0,359 p=0,061	0,298 p=0,103	-0,019 p=0,917	-0,377 p=0,048	-0,046 p=0,793	0,128 p=0,485	-0,260 p=0,173
IL-4	-0,433 p=0,017	-	0,358 p=0,052	-0,145 p=0,508	-0,090 p=0,699	0,271 p=0,163	0,110 p=0,610	0,202 p=0,294	-0,343 p=0,080	0,924 p=0,000*
IgE	-0,154 p=0,362	0,358 p=0,052	-	-0,005 p=0,978	-0,118 p=0,529	0,155 p=0,389	0,082 p=0,678	0,064 p=0,715	-0,061 p=0,739	0,392 p=0,035
IL-17	0,359 p=0,061	-0,145 p=0,508	-0,005 p=0,978	-	0,799 p=0,000*	0,217 p=0,287	-0,941 p=0,000*	0,244 p=0,221	-0,204 p=0,338	0,229 p=0,293
IL-6	0,298 p=0,103	-0,090 p=0,699	-0,118 p=0,529	0,799 p=0,000*	-	0,307 p=0,106	-0,783 p=0,000*	0,157 p=0,399	-0,045 p=0,822	0,158 p=0,449
IL-13	-0,019 p=0,917	0,271 p=0,163	0,155 p=0,389	0,217 p=0,287	0,307 p=0,106	-	-0,379 p=0,051	0,924 p=0,000*	-0,898 p=0,000*	0,438 p=0,020
Foxp3	-0,377 p=0,048*	0,110 p=0,610	0,082 p=0,678	-0,941 p=0,000*	-0,783 p=0,000*	-0,379 p=0,051	-	-0,368 p=0,054	0,255 p=0,218	-0,271 p=0,200
GATA3	-0,046 p=0,793	0,202 p=0,294	0,064 p=0,715	0,244 p=0,221	0,157 p=0,399	0,924 p=0,000*	-0,368 p=0,054	-	-0,965 p=0,000*	0,338 p=0,037
T-bet	0,128 p=0,485	-0,343 p=0,080	-0,061 p=0,739	-0,204 p=0,338	-0,045 p=0,822	-0,898 p=0,000*	0,255 p=0,218	-0,965 p=0,000*	-	-0,369 p=0,053
c-Maf	-0,260 p=0,173	0,924 p=0,000*	0,392 p=0,035	0,229 p=0,293	0,158 p=0,449	0,438 p=0,020	-0,271 p=0,200	0,388 p=0,037	-0,369 p=0,053	-

Примечание: * - корреляция значима на уровне 0,01;

** - для количественных переменных, закон распределения которых не является нормальным, использован коэффициент корреляции Спирмана; представлен коэффициент корреляции со знаком и уровни значимости.

Таблица 3.68

Результаты корреляционного анализа концентраций исследуемых цитокинов и уровней экспрессии мРНК транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, T-bet, c-Maf у пациентов с НАБА (n=40, представлены коэффициенты корреляции и уровни значимости).

Показатель **	IFN- γ	IL-4	IgE	IL-17	IL-6	IL-13	Foxp3	GATA3	T-bet	c-Maf
IFN- γ	-	0,340 p=0,097	0,347 p=0,052	0,024 p=0,914	0,307 p=0,113	0,338 p=0,085	-0,028 p=0,900	0,066 p=0,730	0,108 p=0,576	0,299 p=0,200
IL-4	0,340 p=0,097	-	0,261 p=0,207	0,298 p=0,245	0,322 p=0,155	0,406 p=0,055	-0,266 p=0,302	0,477 p=0,021	-0,350 p=0,111	0,657 p=0,002*
IgE	0,347 p=0,052	0,261 p=0,207	-	0,216 p=0,321	0,137 p=0,487	0,381 p=0,050	-0,155 p=0,480	0,204 p=0,281	-0,012 p=0,949	0,060 p=0,801
IL-17	0,024 p=0,914	0,298 p=0,245	0,216 p=0,321	-	0,611 p=0,003*	0,654 p=0,002*	-0,995 p=0,000*	0,594 p=0,003*	-0,706 p=0,000*	0,314 p=0,274
IL-6	0,307 p=0,113	0,322 p=0,155	0,137 p=0,487	0,611 p=0,003*	-	0,402 p=0,051	-0,626 p=0,002*	0,375 p=0,049	-0,286 p=0,156	0,267 p=0,284
IL-13	0,338 p=0,085	0,406 p=0,055	0,381 p=0,050	0,654 p=0,002*	0,402 p=0,051	-	-0,627 p=0,001*	0,451 p=0,021	-0,376 p=0,070	0,281 p=0,244
Foxp3	-0,028 p=0,900	-0,266 p=0,302	-0,155 p=0,480	-0,995 p=0,000*	-0,626 p=0,002*	-0,627 p=0,001*	-	-0,583 p=0,004*	0,690 p=0,001*	-0,336 p=0,221
GATA3	0,066 p=0,730	0,477 p=0,021	0,204 p=0,281	0,594 p=0,003*	0,375 p=0,049	0,451 p=0,021	-0,583 p=0,004*	-	-0,891 p=0,000*	0,293 p=0,210
T-bet	0,108 p=0,576	-0,350 p=0,111	-0,012 p=0,949	-0,706 p=0,000*	-0,286 p=0,156	-0,376 p=0,070	0,690 p=0,001*	-0,891 p=0,000*	-	-0,205 p=0,414
c-Maf	0,299 p=0,200	0,657 p=0,002*	0,060 p=0,801	0,314 p=0,274	0,267 p=0,284	0,281 p=0,244	-0,336 p=0,221	0,293 p=0,210	-0,205 p=0,414	-

Примечание: * - корреляция значима на уровне 0,01;

** - для количественных переменных, закон распределения которых не является нормальным, использован коэффициент корреляции Спирмана; представлен коэффициент корреляции со знаком и уровни значимости.

В целом, статистически значимые корреляции были выявлены для всех исследуемых транскрипционных факторов.

Транскрипционный фактор Foxp3 характеризовался присутствием достоверных отрицательных корреляций с IL-6 и -17 как у пациентов с АБА, так и у пациентов с НАБА, при этом значения коэффициента корреляции характеризовали связь как выраженную. Исходя из данных о взаимодействии регуляторных Т-клеток и Th17, основных продуцентов IL-17, а именно об их антагонистической роли в патологических процессах (Ji N.F., Xie Y.C., Zhang M.S. et al., 2014), а также исходя из известной информации о выраженной синергической связи IL-6 и -17 преимущественно у больных тяжелой бронхиальной астмой (Li J., Dong X., Zhao L. et al., 2016), выявленные закономерности являются ожидаемыми.

Также для транскрипционного фактора Foxp3 были выявлены следующие значимые корреляции:

- отрицательная корреляция с концентрациями IFN- γ у пациентов с АБА;
- отрицательная корреляция с концентрациями IL-13 у пациентов с НАБА;
- отрицательная корреляция с экспрессией мРНК GATA3 у пациентов с НАБА;
- положительная корреляция с экспрессией мРНК T-bet у пациентов с НАБА.

Аналогичная закономерность, свидетельствовавшая об отрицательной корреляции транскрипционного фактора Foxp3 с величинами концентраций IFN- γ и Th2-ассоциированных цитокинов ранее была продемонстрирована в исследованиях Li et. al, 2016 и Wilson A.D., Hicks C., 2016. Корреляционный анализ экспрессии мРНК Foxp3 и GATA3 у всех включенных в исследование больных бронхиальной астмой (n=82) показал наличие отрицательной корреляционной связи между рассматриваемыми транскрипционными факторами (коэффициент корреляции Спирмена – 0,574, $p=0,047$), что согласуется с результатами исследования Shi Y.H. et al., 2013, продемонстрировавшего отрицательную корреляционную связь числа регуляторных Т-клеток и Th2 (Shi Y.H., Shi G.C., Wan H.Y. et al., 2013).

Для транскрипционного фактора T-bet ранее было показано наличие как положительной, так и отрицательной корреляционной связи с экспрессией Foxp3 (Lu Y., Malmhäll C., Sjöstrand M. et al., 2011), причем характер связи зависел от исследуемой клеточной популяции (CD4+CD25+ или CD4+CD25-). Кроме того, данные, свидетельствующие о повышении экспрессии T-bet у больных НАБА, позволяют предполагать наличие сложных взаимодействий между транскрипционными факторами, обуславливающих возможность разнонаправленного характера их динамики.

Вполне закономерным, представляется в этой связи выявленная нами положительная корреляционная связь средней силы между уровнями экспрессии T-bet и Foxp3 в группе больных НАБА (таблица 3.68). В то же время у больных АБА такая связь была слабой и статистически не значимой (таблица 3.67), что, по-видимому, указывает на снижение регуляторного вклада Treg-клеток у больных с атопией.

Транскрипционный фактор GATA3 демонстрировал выраженные положительные корреляции с концентрациями IL-13 (у пациентов с АБА и НАБА), IL-4 (у пациентов с НАБА) и отрицательную корреляцию с экспрессией T-bet (у пациентов с АБА и НАБА), что подтверждает концепцию, определяющую GATA3 как основной транскрипционный фактор Th2 клеток, антагонистичный T-bet.

Кроме того, были показаны следующие значимые корреляции:

- положительная корреляция с экспрессией транскрипционного фактора c-Maf в группе АБА;
- положительная корреляция с концентрациями интерлейкинов -17 и -6 в группе НАБА.

Корреляции GATA3 с данными показателями в других группах имели аналогичный характер, однако не демонстрировали статистической значимости ($p > 0,05$). Предполагается, что регуляция экспрессии c-Maf осуществляется независимо от GATA3, то есть под влиянием других транскрипционных факторов

(Xiao Y., Motomura S., Deyev V. et al., 2011). Тем не менее, показана тесная связь с-Maf и интерлейкина-4, цитокина, непосредственно зависящего от функциональной активности GATA3. Таким образом, выявленная положительная корреляция, вероятнее всего, осуществляется через IL-4, что также подтверждается обнаружением выраженной положительной корреляции цитокина с экспрессией с-Maf.

Кроме того, по данным литературы ранее была установлена способность GATA3 участвовать в дифференцировке Th17, основных клеток, продуцирующих IL-17, что в итоге приводило к увеличению концентрации данного цитокина (van Hamburg J.P., de Bruijn M.J., Ribeiro de Almeida C. et al., 2008). Данный факт согласуется с выявленными нами корреляционными связями в группе НАБА между GATA3 и IL-17 (положительная средней силы) и между GATA3 и Foxp3 (отрицательная средней силы) (таблица 3.67). При этом заметим, что Treg и Th17 могут рассматриваться как компоненты альтернативной регуляции, находясь в норме в антагонистических взаимодействиях, на что указывают полученные нами сильные отрицательные корреляционные связи, как при АБА, так и при НАБА (таблицы 3.67 и 3.68). В то же время, в группе АБА указанные выше корреляционные связи между GATA3 и IL-17 и между GATA3 и Foxp3 оказывались слабыми и статистически не значимыми (таблица 3.67). Основываясь на данных фактах, можно предположить, что при АБА, в отличие от НАБА, указанный механизм кооперативной регуляции нарушен. Сходную динамику отражает и корреляция GATA3 с IL-6. Последний, как хорошо известно, способен повышать экспрессию IL-17 (Nagashima H., Okuyama Y., Asao A. et al. 2014).

Транскрипционный фактор с-Maf характеризовался ожидаемыми положительными корреляционными с концентрациями IL-4 в двух исследуемых группах, положительной корреляцией с концентрациями IL-13 и IgE (в группе АБА), вероятнее всего обусловленной косвенными взаимодействиями транскрипционного фактора и цитокина, реализуемыми через транскрипционный фактор GATA3. Наличие выявленных корреляционных связей с-Maf при БА

представляется вполне закономерным, учитывая, что c-Maf является высокоселективным промотором гена *il-4*. Тем не менее, необходимо обратить внимание, что характер и спектр корреляционных связей при АБА и НАБА был различным и, по-видимому, иллюстрировал особенности кооперативных взаимодействий в этих группах. Так, представляется интересным анализ направленности корреляционной связи между c-Maf и IFN- γ (таблицы 3.67 и 3.68). Если при НАБА она является слабо положительной, что является вполне закономерным, учитывая существование нормального баланса Th1/Th2, то при АБА она становится слабо отрицательной, что косвенно может указывать на вероятное нарушение альтернативной регуляции у этой группы больных. При этом важно, что в группе АБА корреляционная связь между T-bet и c-Maf была также отрицательной и большей силы, чем в группе НАБА.

Исследование **транскрипционного фактора T-bet** обнаружило отрицательные корреляции экспрессии мРНК T-bet и GATA3, а также концентрациями IL-13 в группе АБА, что подтверждает роль T-bet как негативного регулятора Th2-ответа. В группе НАБА выявлялась негативная корреляционная связь между T-bet и IL-17, являющаяся вполне ожидаемой, исходя из существующих в норме кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов T-bet и Foxp3, которые характеризуются наличием положительной корреляционной связи между Foxp3 и T-bet. Отметим, что при АБА корреляционная связь между T-bet и IL-17 была слабой и статистически не значимой.

Также были выявлены следующие значимые корреляции:

- отрицательная корреляция концентраций IL-4 и IFN- γ в группе АБА;
- положительная корреляция концентраций IL-6 и интерлейкина-17 в группах АБА и НАБА;
- положительная корреляция концентраций IL-13 и IL-17 в группе НАБА;

Данные связи также являются ожидаемыми, исходя из имеющихся данных о функциональной активности транскрипционных факторов, регулирующих

экспрессию данных цитокинов, а также исходя из данных о непосредственной регуляции продукции IL-17 и IL-6 (Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R. et al., 2006).

С учетом выявления значимых корреляционных связей между исследуемыми транскрипционными факторами и цитокинами нами был выполнен регрессионный анализ для определения вклада отдельных независимых переменных в вариацию зависимой.

Оценка экспрессии Foxp3 с применением метода линейной регрессии продемонстрировала значимый вклад в значение показателя таких факторов как экспрессия GATA3, концентрации IFN- γ , IgE, IL-17, -6, -13 у пациентов с АБА, и экспрессии GATA3, концентраций IgE, IL-17 у больных с НАБА (таблица 3.69). Необходимо отметить, что для всех факторов связь носила отрицательный характер, что подтверждает способность Foxp3 влиять на избыточные концентрации воспалительных цитокинов и подавлять экспрессию GATA3, причем при АБА для поддержания баланса в сигнальных системах транскрипционному фактору Foxp3 необходимо влияние на большее количество факторов, чем при НАБА. Следует отметить, что при АБА отмечалось существенное влияние транскрипционного фактора Foxp3 на уровни IFN- γ , IL-13 и IL-6, чего не наблюдалось при НАБА. Важным, на наш взгляд, является и то, что при АБА вклад в значение показателя фактора IgE был примерно в 2 раза меньше, а IL-17 в 2 раза больше, чем при НАБА, что, по-видимому, отражает особенности регуляции клеточной сигнализации при этих вариантах БА.

Таблица 3.69

Результаты регрессионного анализа экспрессии Foxp3 (представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
Экспрессия GATA3	-0,292	p=0,012
Концентрации IFN- γ	-17,143	p=0,006
Концентрации IgE	-726,470	p=0,011
Концентрации IL-17	-8294,109	p=0,009
Концентрации IL-6	-66,020	p=0,001
Концентрации IL-13	-11,352	p=0,045
НАБА (n=40)		
Экспрессия GATA3	-0,235	p=0,027
Концентрации IgE	-1559,962	p=0,026
Концентрации IL-17	-4886,311	p=0,034

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Транскрипционные факторы GATA3 и T-bet ожидаемо характеризовались наличием отрицательных связей не только друг с другом, но и с соответствующими цитокинами (таблицы 3.70-3.71). Так для экспрессии T-bet выявлен отрицательный вклад концентраций IL-13 и IgE в значения показателя, в то время как концентрации IFN- γ вносили положительный вклад в переменную.

Таблица 3.70

Результаты регрессионного анализа экспрессии GATA3 (представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
Экспрессия Foxp3	-0,148	p=0,022
Экспрессия T-bet	-0,743	p=0,0001
Концентрации IL-4	19,724	p=0,048
Концентрации IL-13	201,543	p=0,002

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
НАБА (n=40)		
Экспрессия Foxp3	-0,137	p=0,018
Экспрессия T-bet	-0,707	p=0,0001
Концентрации IL-13	183,797	p=0,042

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Таблица 3.71

Результаты регрессионного анализа экспрессии T-bet (представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
Экспрессия GATA3	-0,906	p=0,0001
Концентрации IL-13	-170,797	p=0,037
НАБА (n=40)		
Экспрессия GATA3	-0,893	p=0,0001
Концентрации IFN- γ	239,345	p=0,022
Концентрации IgE	-1791,622	p=0,007

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Согласно результатам статистического анализа, экспрессия транскрипционных факторов GATA3, T-bet и Foxp3 не вносила значимого вклада в уровни мРНК c-Maf (таблица 3.72). Тем не менее, показан положительный вклад концентраций IL-4, что подтверждает роль c-Maf как одного из регуляторов экспрессии данного цитокина.

Таблица 3.72

Результаты регрессионного анализа экспрессии c-Maf (представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
Концентрации IFN- γ	-19,841	p=0,027

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
Концентрации IL-4	83,422	p=0,0001
Концентрации IgE	1750,823	p=0,0001
НАБА (n=40)		
Концентрации IL-4	136,957	p=0,004
Концентрации IL-13	270,541	p=0,014

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Для выявления возможного вклада экспрессии транскрипционных факторов в нарушение функции дыхательных путей при бронхиальной астме был выполнен регрессионный анализ уровней мРНК Foxp3, T-bet, GATA3, c-Maf и показателей ФВД (таблицы 3.73-3.76).

Таблица 3.73

Результаты регрессионного анализа экспрессии Foxp3 и показателей ФВД
(представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
ОФВ1 (% от должного до бронхолитика)	+23,592	p=0,026
ОФВ1 (% от должного после бронхолитика)	+15,999	p=0,045
СОС27-75 (до бронхолитика)	+1,546	p=0,013
МОС50 (до бронхолитика)	+36,423	p=0,041
НАБА (n=40)		
ЖЕЛ (до бронхолитика)	+2,233	p=0,010
ЖЕЛ (% от должного до бронхолитика)	+61,591	p=0,029
ФЖЕЛ (до бронхолитика)	+2,706	p=0,044
ОФВ1 (до бронхолитика)	+2,315	p=0,044
СОС25-75 (до бронхолитика)	+1,283	p=0,022
ПОС (до бронхолитика)	+2,964	p=0,032
МОС50 (после бронхолитика)	+1,607	p=0,042
МОС50 (% от должного после бронхолитика)	+80,229	p=0,011
МОС75 (после бронхолитика)	+1,360	p=0,020
ПОС вд (до бронхолитика)	+3,356	p=0,013
ПОС вд (после бронхолитика)	+2,087	p=0,014

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Таблица 3.74

Результаты регрессионного анализа экспрессии GATA3 и показателей ФВД
(представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
ОФВ1 (% от должного до бронхолитика)	-53,222	p=0,047
ОФВ1 (% от должного после бронхолитика)	-49,723	p=0,042
СОС25-75 (до бронхолитика)	+1,199	p=0,006
МОС50 (до бронхолитика)	-116,036	p=0,036
НАБА (n=40)		
ЖЕЛ (до бронхолитика)	-2,808	p=0,027
ЖЕЛ (после бронхолитика)	-2,393	p=0,021
ФЖЕЛ (до бронхолитика)	-2,842	p=0,019
ФЖЕЛ (% от должного после бронхолитика)	-11,487	p=0,047
ОФВ1 (после бронхолитика)	-2,188	p=0,018
СОС25-75 (после бронхолитика)	-1,509	p=0,033
ПОС (до бронхолитика)	+1,398	p=0,037
МОС50 (после бронхолитика)	-0,772	p=0,014
МОС75 (после бронхолитика)	-1,958	p=0,027
ПОС вд (до бронхолитика)	-3,891	p=0,032
ПОС вд (после бронхолитика)	-1,389	p=0,025

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Таблица 3.75

Результаты регрессионного анализа экспрессии T-bet и показателей ФВД
(представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
ОФВ1/ЖЕЛ (до бронхолитика)	+11,532	p=0,041
ОФВ1/ЖЕЛ (после бронхолитика)	+3,706	p=0,023
НАБА (n=40)		

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
ФЖЕЛ (до бронхолитика)	+0,734	p=0,032
ФЖЕЛ (после бронхолитика)	+0,931	p=0,040
ОФВ1 (до бронхолитика)	+0,850	p=0,042
ОФВ1 (после бронхолитика)	+0,953	p=0,047
ОФВ1/ЖЕЛ (до бронхолитика)	+18,033	p=0,024
ОФВ1/ЖЕЛ (после бронхолитика)	+14,399	p=0,046
СОС25-75 (до бронхолитика)	+1,592	p=0,039
СОС25-75 (после бронхолитика)	+2,645	p=0,023
ПОС (после бронхолитика)	+4,546	p=0,021
МОС50 (до бронхолитика)	+4,075	p=0,018
МОС50 (после бронхолитика)	+4,263	p=0,033
МОС75 (до бронхолитика)	-29,571	p=0,025
ПОС вд (до бронхолитика)	-0,063	p=0,019

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Таблица 3.76

Результаты регрессионного анализа экспрессии c-Maf и показателей ФВД
(представлены только значимые различия)

Показатель	Коэффициент регрессии*	Значимость различий
АБА (n=42)		
ОФВ1 (% от должного до бронхолитика)	+29,673	p=0,029

Примечание: * - использован метод линейной регрессии, представлены нестандартизированные коэффициенты.

Представленные данные свидетельствуют о том, что наибольший вклад в значения показателей ФВД вносила экспрессия таких транскрипционных факторов как Foxp3, GATA3 и T-bet. Для транскрипционного фактора c-Maf, напротив, практически не показано связей с показателями ФВД.

Обращает на себя внимание четкая направленность выявленных связей. Так экспрессия мРНК Foxp3 вносила положительный вклад в значения показателей ФВД, что, в целом, является ожидаемым, исходя роли Treg как основных регуляторов иммунного гомеостаза и выявления максимальной экспрессии Foxp3

у практически здоровых лиц. Транскрипционный фактор T-bet оказывал наибольшее положительное влияние на значения показателей ФВД в группе НАБА, что дополнительно отражает функциональную активность T-bet как ключевого регулятора Th1-воспаления. GATA3 характеризовался наличием преимущественно отрицательного влияния, что соответствует полученным результатам, демонстрирующим максимальную экспрессию мРНК GATA3 у пациентов с тяжелым течением бронхиальной астмы.

Выводы по разделу 3.5.

Проведен корреляционный анализ экспрессии исследуемых транскрипционных факторов и концентраций цитокинов у больных бронхиальной астмой по группам (АБА/НАБА).

1. Характер экспрессии цитокинов соответствует доминирующему типу воспаления: пациенты с АБА характеризовались достоверным повышением Th2-ассоциированных цитокинов (IL-4, -13, IgE), пациенты с НАБА – достоверным повышением Th1-ассоциированного цитокина (IFN- γ).
2. IL-17 и -6 демонстрировали значимую связь с тяжестью течения бронхиальной астмы. Таким образом, можно заключить, что тяжелая астма (как аллергическая, так и неаллергическая) сопровождается повышением концентраций данных цитокинов и ассоциированным снижением уровней Foxp3.
3. Показана роль альтернативной негативной регуляции транскрипционных факторов GATA3 и T-bet, а также ассоциированных с ними цитокинов.
4. Показана положительная взаимосвязь экспрессии мРНК c-Maf с IL-4 у больных АБА и НАБА, что подтверждает роль данного транскрипционного фактора как одного из регуляторов продукции IL-4. Положительная связь c-Maf с GATA3 и IL-13 (группа НАБА), вероятнее всего также обусловлена влиянием IL-4.
5. Транскрипционный фактор Foxp3 негативно коррелировал с концентрациями IL -17 и -6, что является свидетельством антагонистических взаимодействий

регуляторных Т-клеток и Th17 у пациентов с бронхиальной астмой независимо от ее варианта (АБА/НАБА).

6. Обнаружена положительная корреляция транскрипционного фактора T-bet с экспрессией мРНК Foxp3 (группы АБА и НАБА) и концентрациями IL-17 (группа НАБА), не являющаяся ожидаемой, но, тем не менее, описанной в ограниченном количестве статей, что указывает на возможность существования некоторых косвенных взаимодействий данных транскрипционных факторов (Rudra D., deRoos P., Chaudhry A. et al., 2012).
7. Проведенный корреляционный анализ указывает на наличие сложной сети кооперативных взаимодействий рассматриваемых нами транскрипционных факторов и цитокинов, вовлеченных в процесс регуляции баланса Th1/Th2/Th17. 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В современных представлениях о патогенезе бронхиальной астмы (Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.А., 2011) особое место отводится кооперативным взаимодействиям транскрипционных факторов, а также формируемым в результате этих взаимодействий микросетям.

Известно, что основные звенья патогенеза бронхиальной астмы реализуются за счет активности цитокинов, продуцируемых Th1 и Th2 (Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., 2006), однако в последнее время все активнее обсуждается роль и других субпопуляций Т-лимфоцитов, в частности регуляторных Т-клеток (Treg) (Wei B., Zhang H., Li L. et al. 2011). На сегодняшний день считается установленной ключевая роль таких транскрипционных факторов как GATA3 и T-bet в дифференцировке и функциональной активности Т-хелперов. Так, не подвергается сомнению участие GATA3 в формировании Th2-фенотипа и поддержании продукции Th2-ассоциированных цитокинов (Zhu J., Min B., Hu-Li J. et al., 2004), в то время как T-bet способствует дифференцировке клеток-предшественников в Th1 (Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., et al., 2000; Schulz E.G., Mariani L., Radbruch A. et al., 2009; Fan R., Lan Y., Chen J. et al., 2016).

Специфичность экспрессии определенных транскрипционных факторов к отдельным популяциям Т-лимфоцитов позволила рассматривать их как мишень для таргетной терапии. Так, успешное завершение исследования I и IIa фаз препарата SB010, представляющего собой ингаляционный ингибитор GATA3 (Krug N., Hohlfield J.M., Kirsten A.M. et al., 2015), свидетельствует о возможности создания нового класса препаратов для лечения бронхиальной астмы.

Однако кроме упоминавшихся Th1 и Th2 в последнее время все больше внимания уделяется такой популяции лимфоцитов как Т-регуляторные клетки. Treg широко изучались у пациентов с онкологическими и аутоиммунными заболеваниями и считаются одними из основных супрессивных регуляторов иммунной системы, функциональная активность которых реализуется

посредством транскрипционного фактора Foxp3 (Wan Y.Y., Flavell R.A., 2007). Предполагается, что при бронхиальной астме Treg действуют антагонистично Th17, популяции Т-лимфоцитов, продуцирующих воспалительный цитокин IL-17 (Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M. et al., 2008).

Основываясь на результатах предыдущих исследований (Минеев В.Н., Сорокина, Л.Н., Нёма М.А., Трофимов В.И., 2010), мы полагали, что комплексное изучение кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов при бронхиальной астме, могло охарактеризовать особенности их влияния друг на друга, и, по-видимому, позволило бы прогнозировать клинические особенности бронхиальной астмы при преобладании одного из транскрипционных факторов.

Наш интерес к изучению микросети транскрипционных факторов был обусловлен рядом причин. Среди них основное место занимает недостаточная изученность взаимодействий нескольких транскрипционных факторов и обусловленных их совместной функциональной активностью особенностей клинической картины заболевания.

Как указывалось выше, в обзоре литературы, в настоящее время предполагается, что для патогенеза бронхиальной астмы характерно антагонистическое взаимодействие двух транскрипционных факторов, ключевых регуляторов Th1- и Th2-воспаления, T-bet и GATA3. Доминирование одного из них не только блокирует дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в противоположный тип Т-хелпера, но и подавляет выработку ассоциированных с ним цитокинов.

Транскрипционный фактор Foxp3 отражает функциональную активность Treg, антагонистичную активности Th17. С учетом результатов исследования экспрессии Foxp3 при других заболеваниях, можно предположить его роль как ключевого регулятора иммунного гомеостаза, в том числе и при бронхиальной астме. C-Maf, наиболее изученный при онкологической патологии, как регулятор клеточной дифференцировки, представляет определенный интерес при бронхиальной астме в связи со способностью стимулировать выработку IL-4.

Несмотря на то, что на сегодняшний день выявлены непосредственные взаимодействия только между ограниченным числом указанных транскрипционных факторов (GATA3/T-bet, GATA3/Foxp3), можно предполагать существование микросети транскрипционных факторов, формируемой в том числе и косвенными взаимодействиями посредством выработки цитокинов.

В связи с вышеизложенным, крайне важным представляется изучение особенностей экспрессии четырех транскрипционных факторов и ассоциированных с ними цитокинов у пациентов с разными вариантами бронхиальной астмы.

В качестве патогенетически обоснованной и адекватной модели для исследования клеточной сигнализации были использованы мононуклеары периферической крови.

Разработанный ранее в нашей научной группе методологический подход дал возможность применить многоуровневый принцип оценки кооперативных взаимодействий транскрипционных факторов лимфоцитов в периферической крови больных бронхиальной астмой.

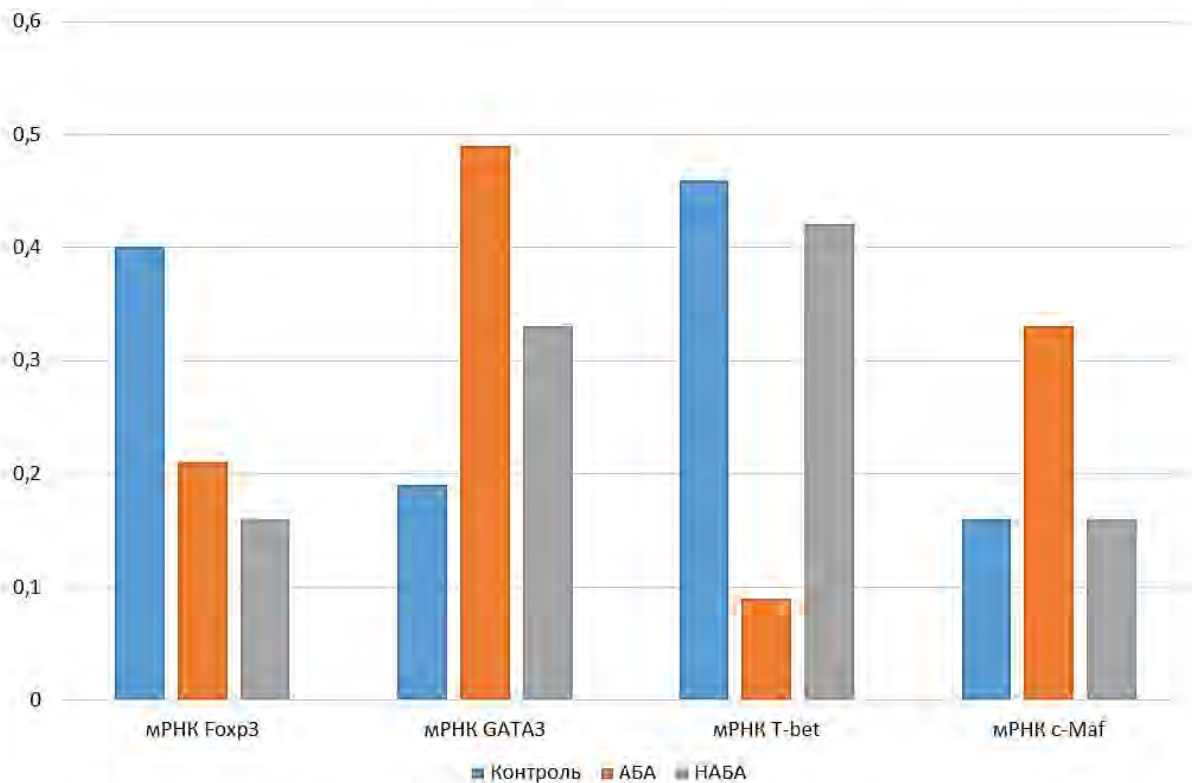
Впервые в этой работе была предпринята попытка определения роли Foxp3 в патогенезе бронхиальной астмы и его связи с клиническими особенностями заболевания, проведено исследование c-Maf в мононуклеарах периферической крови у больных АБА и НАБА в сравнении с группой практически здоровых лиц в зависимости от клинико-патогенетических особенностей заболевания, а также установлен характер комплексного кооперативного действия транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, c-Maf, T-bet в регуляции функций Т-лимфоцитов при бронхиальной астме.

Перейдем к обсуждению полученных нами результатов исследований.

Для обобщения результатов изучения экспрессии транскрипционных факторов Foxp3, GATA3, c-Maf и T-bet нами составлена диаграмма, позволяющая систематизировать сформированные представления (рисунок 4.1).

Рисунок 4.1

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



Как видно из рисунка 4.1, больные АБА характеризуются выраженным преобладанием экспрессии GATA3 и c-Maf, то есть транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию Th2-ассоциированных цитокинов. 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. 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 4.1.

Таблица 4.1

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	↑↑*	↑**
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 4.1 свидетельствует, что цитокиновый спектр каждой из исследуемых групп соответствовал доминирующему транскрипционному фактору. Так наибольшие концентрации IFN-γ выявлялись в группе НАБА; IL-4, IL-13 и IgE – 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 на сегодняшний день 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. В то же время для Foxp3 обнаружена обратная закономерность – наименьшей экспрессией мРНК транскрипционного фактора характеризовалась именно группа тяжелой БА.

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, а именно:

- для АБА характерно повышение экспрессии мРНК Th2-специфичных транскрипционных факторов GATA3 и c-Maf в совокупности с повышением IL-4, IL-13 и IgE по сравнению с практически здоровыми лицами и больными НАБА;
- для НАБА характерны уровни мРНК T-bet практически идентичные экспрессии T-bet у практически здоровых лиц и концентрации IFN- γ , превышающие таковые в других исследуемых группах;
- во всех группах БА обнаружено снижение транскрипционного фактора Foxp3 особенно ярко выраженное при тяжелом течении БА, что в совокупности с высокими концентрациями IL-6 и IL-17 свидетельствует о снижении регуляторной функции Treg при БА в целом, усугубляющейся у пациентов с тяжелым течением заболевания.

Необходимо отметить, что полученные результаты не вступают в противоречие с имеющимися на сегодняшний день представлениями о роли транскрипционного фактора GATA3 как одного из ключевых регуляторов Th2-воспаления (Zhu J., Min B., Hu-Li J. et al., 2004; Yong J., Chen G.Q., Huang B. et al., 2011; Shi Y.H., Shi G.C., Wan H.Y. et al., 2013) и T-bet как основного транскрипционного фактора Th1 (Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L. et al., 2000; Schulz E.G., Mariani L., Radbruch A. et al., 2009; Fan R., Lan Y., Chen J. et al., 2016).

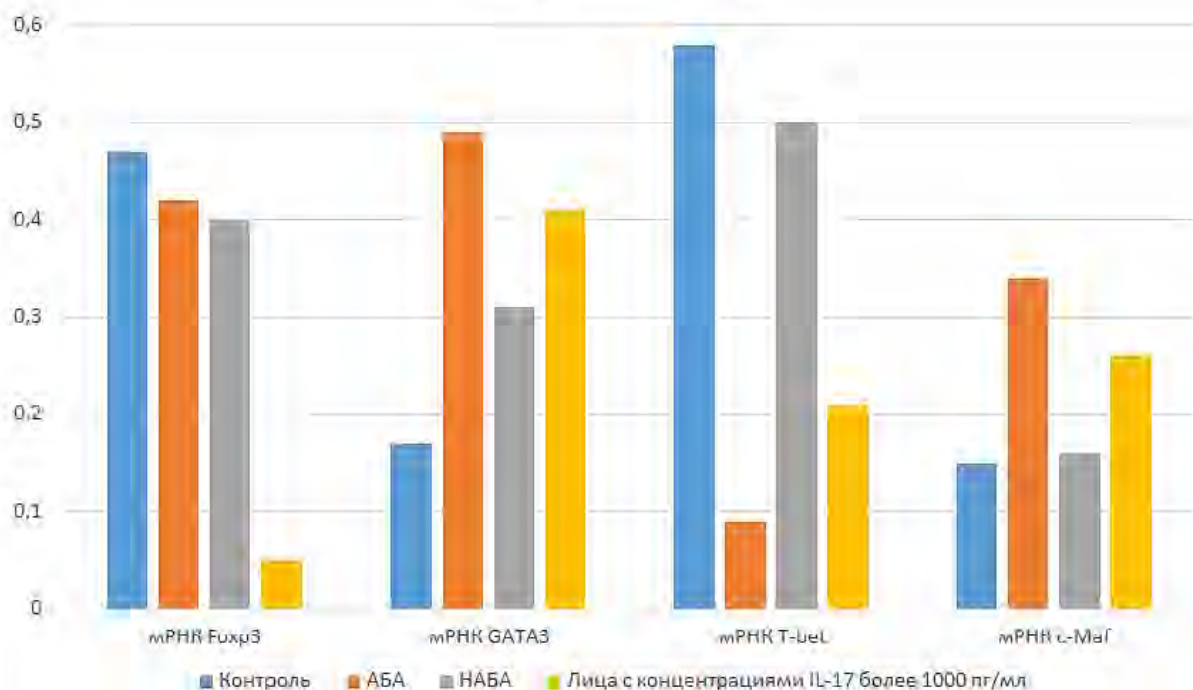
Исследование изменения экспрессии этих транскрипционных факторов в зависимости от тяжести заболевания показало, что уровни транскрипционного фактора GATA3 нарастают в зависимости от тяжести течения заболевания во всех группах БА, достигая максимальных значений при тяжелом течении заболевания. Особенно этот факт интересен в связи с показанной ранее способностью GATA3 непосредственно подавлять экспрессию Foxp3 (Chapoval 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. 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, 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 4.2).

Рисунок 4.2

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.



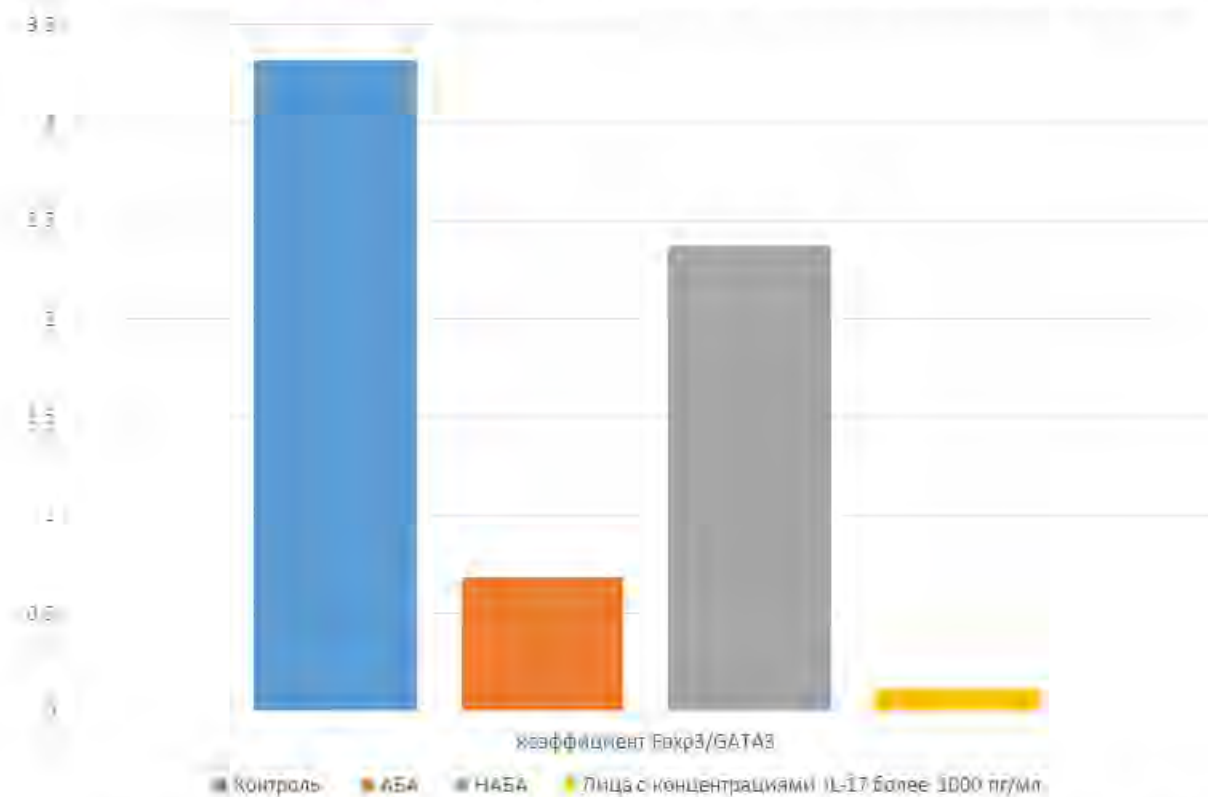
В представленных результатах необходимо обратить внимание на крайне низкие уровни экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 у лиц с концентрациями IL-17 более 1000 пг/мл. В то же время для этой же группы была

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 4.3).

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, 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 заключить, 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. 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 целом, исходя из ранее представленных результатов, данная закономерность является ожидаемой поскольку:

- прогрессирующее снижение экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 отмечалось у всех пациентов с БА при увеличении тяжести заболевания;
- снижение экспрессии T-bet, особенно выраженное в группе НАБА, также зафиксировано у пациентов с тяжелым течением заболевания.

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 имеет ключевую роль в патогенезе бронхиальной астмы.

С учетом результатов предшествующих 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. На сегодняшний день

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 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. Ранее аналогичные результаты были получены в работах Bakr S.I., Mahran M.Z., Soliman D.A., 2013, Yüksek M., et al. 2011, показавших, 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 T-клеток.

Характер динамики транскрипционного фактора GATA3 обусловлен подавлением переноса транскрипционного фактора в ядро путем индуцирования MAPK фосфатазы-1, ингибитора p38MAPK (Maneechotesuwan K., Yao X., Ito K. et al., 2009). Кроме того, ранее было установлено, что глюкокортикоиды подавляют экспрессию T-bet через непосредственное воздействие на промотор транскрипционного фактора, а также посредством его супрессии на уровне мРНК и на уровне экспрессии белка. Глюкокортикостероидный рецептор (GR α) взаимодействует с T-bet, блокируя GR-зависимую транскрипцию, что в результате

ведет к прекращению связывания T-bet с ДНК. Таким образом, в результате взаимодействия GR/T-bet происходит ингибирование транскрипционной активности T-bet на промотор IFN- γ (Blaser K., 2008).

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. Вероятнее всего, полученные результаты являются отражением тенденции, реализующиеся 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 4.2. представлены обобщенные результаты регрессионного анализа.

Таблица 4.2

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 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, что отражает иммуносупрессивное действие указанной группы препаратов на клеточную сигнализацию.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. // Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Келембет Н.А., Гембицкая Т.Е., Иващенко Т.Э., Лаврова О.В. Ассоциация полиморфизма генов IL-4 и IL-4R α с развитием аллергической бронхиальной астмы. // Болезни органов дыхания. – 2008. – №1. – С.36-41.
3. Кокосов А.Н. Пневмология в пожилом и старческом возрасте. // СПб.: МЕДМАСС МЕДИА. – 2005. – 712 с.
4. Минеев В.Н. Концепция бронхиальной астмы как мембрано-рецепторной патологии. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2005. – №3. – С.68-85.
5. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Трофимов В.И. Экспрессия транскрипционного фактора GATA-3 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. - 2010. – Т.12, № 1-2. – С. 21-28.
6. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И. Фундаментальные и клинические аспекты JAK-STAT-сигнализации. // СПб.: ВВМ, 2010. – 120 с.
7. Саногенез. // Под ред. А.Н. Кокосова. – СПб.: «ЭЛБИ-СПб». – 2009. – 237с.
8. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И. Бронхиальная астма. - СПб: Нордмедиздат, 2006 – 308 с.
9. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Петрова М.Г. Многоликая бронхиальная астма. Диагностика, лечение и профилактика // С-Пб Нордмедиздат. - 2011. - 344 с.
10. Чучалин А.Г., Илькович М.М. Справочник по пульмонологии // ГЭОТАР-Медиа. – 2009. - 932 с.
11. Al-Daghri N.M., Abd-Alrahman S., Draz H., Alkharfy K., Mohammed A.K., Clerici M.S., Alokail M.S. Increased IL-4 mRNA expression and poly-aromatic hydrocarbon concentrations from children with asthma. // BMC Pediatr. – 2014. – Vol.14, №17.

12. Al-Muhsen S., Letuve S., Vazquez-Tello A., Pureza M.A., Al-Jahdali H., Bahammam A.S., Hamid Q., Halwani R. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils. // *Respir. Res.* - 2013. – Vol.14. – P.34.
13. Al-Ramli W., Préfontaine D., Chouiali F., Martin J.G., Olivenstein R., Lemièrre C., Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. // *J.Allergy. Clin.Immunol.* – 2009. – Vol.123. – P.1185–1187.
14. Ali A., Christie P.T., Grigorieva I.V., Harding B., Van Esch H., Ahmed S.F., Bitner-Glindzicz M., Blind E., Bloch C., Christin P., Clayton P., Gecz J., Gilbert-Dussardier B., Guillen-Navarro E., Hackett A., Halac I., Hendy G.N., Lalloo F., Mache C.J., Mughal Z., Ong A.C., Rinat C., Shaw N., Smithson S.F., Tolmie J., Weill J., Nesbit M.A., Thakker R.V. Functional characterization of GATA3 mutations causing the hypoparathyroidism-deafness-renal (HDR) dysplasia syndrome: insight into mechanisms of DNA binding by the GATA3 transcription factor. // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. – Vol.16, №3. – P.265-275.
15. Amin N.M., Shi H., Liu J. The FoxF/FoxC factor LET-381 directly regulates both cell fate specification and cell differentiation in *C. elegans* mesoderm development // *Development.* – 2010. – Vol. 137, №. 9. – P.1451–1460.
16. Amsen D., Antov A., Jankovic D., Sher A., Radtke F., Souabni A., Busslinger M., McCright B., Gridley T., Flavell R.A. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. // *Immunity.* – 2007. – Vol.27, №1. – P.89-99.
17. Ano S., Morishima Y., Ishii Y., Yoh K., Yageta Y., Ohtsuka S., Matsuyama M., Kawaguchi M., Takahashi S., Hizawa N. Transcription factors GATA-3 and ROR γ t are important for determining the phenotype of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol.190, №3. – P.1056-1065.
18. Antebi Y.E., Reich-Zeliger S., Hart Y., Mayo A., Eizenberg I., Rimer J., Putheti P., Pe'er D., Friedman N. Mapping differentiation under mixed culture conditions reveals a tunable continuum of T cell fates. // *PLoS Biol.* – 2013. – Vol.11, №7.

19. Avni O., Lee D., Macian F., Szabo S.J., Glimcher L.H., Rao A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. // *Nat Immunol.* – 2002. - Vol. 3, № 7. – P.643-651.
20. Ba L., Du J., Liu F., Yang F., Han M., Liu S., Lin P., Li H. Distinct inflammatory profiles in atopic and nonatopic patients with chronic rhinosinustis accompanied by nasal polyps in Western china. // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2015. – Vol.7, №4. – P.346-358.
21. Bacchetta R., Barzaghi F., Roncarolo M.G. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. // *Ann. N.Y. Acad Sci.* – 2016.
22. Bakr S.I., Mahran M.Z., Soliman D.A. Role of regulatory CD4+CD25+ Foxp3 T cells in bronchial asthma in Egyptian children. // *Egypt J. Immunol.* - 2013. – Vol.20, №2. – P.29-38.
23. Banerjee A., Northrup D., Boukarabila H., Jacobsen S.E., Allman D. Transcriptional repression of Gata3 is essential for early B cell commitment. // *Immunity.* – 2013. – Vol.38, №5. – P.930-942.
24. Barnes J.P. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. // *J. Nature Reviews, Immunology.* – 2008. – Vol.8. – P.183-192.
25. Bauquet A.T., Jin H., Paterson A.M., Mitsdoerffer M., Ho I.C., Sharpe A.H., Kuchroo A.V. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and Th-17 cells. // *Nat. Immunol.* – 2009. – Vol. 10. – P.167–175.
26. Bettelli E., Dastrange M., Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 2005. – Vol. 102, № 14. - P.5138 – 5143.
27. Blaser K. Role of T-cell subtypes in allergic inflammations.// *Chem. Immunol. Allergy.* – 2008. – Vol.94.
28. von Boehmer H., Nolting J. What turns on Foxp3? // *Nat. Immunol.* – 2008. - Vol. 9. – P.121 – 122.

29. Burchill M.A., Goetz C.A., Prlic M., O'Neil J.J., Harmon I.R., Bensinger S.J., Turka L.A., Brennan P., Jameson S.C., Farrar M.A. Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171, №11. – P.5853-5864.
30. Cai S., Lee C.C., Kohwi-Shigematsu T. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol.38, №11. – P.1278-1288.
31. Campbell D.J., Koch M.A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2011. - Vol.11, №2. – P.119-130.
32. Camporeale A., Poli V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? // *Front.Biosci. (Landmark Ed).* – 2012. – Vol.17. – P.2306-2326.
33. Calmette J., Ellouze M., Tran T., Karaki S., Ronin E., Capel F., Pallardy M., Bachelerie F., Krzysiek R., Emilie D., Schlecht-Louf G., Godot V. Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion in vivo. // *J. Immunol.* – 2014. – Vol.193, №12. – P.5863-5872.
34. Caramori G., Lim S., Ito K., Tomita K., Oates T., Jazrawi E., Chung K.F., Barnes P.J., Adcock I.M. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. // *Eur. Respir J.* – 2001. – Vol. 18, №3. – P. 466-473.
35. Chae W.J., Ehrlich A.K., Chan P.Y., Teixeira A.M., Henegariu O., Hao L., Shin J.H., Park J.H., Tang W.H., Kim S.T., Maher S.E., Goldsmith-Pestana K., Shan P., Hwa J., Lee P.J., Krause D.S., Rothlin C.V., McMahon-Pratt D., Bothwell A.L. The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. // *Immunity.* – 2016. – Vol.44, №2. – P.246-258.
36. Chapoval S., Dasgupta P., Dorsey N.J., Keegan A.D. Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6. // *J. Leukoc. Biol.* – 2010. – Vol.87, №6. – P.1011-1018.

37. Chen P.M., Lin C.H., Li N.T., Wu Y.M., Lin M.T., Hung S.C., Yen M.L. C-Maf regulates pluripotency genes, proliferation/self-renewal, and lineage commitment in ROS-mediated senescence of human mesenchymal stem cells. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol.6, №34. – P.35404-35418.
38. Chen S.M., Tsai Y.S., Lee S.W., Liu Y.H., Liao S.K., Chang W.W., Tsai P.J. Astragalus membranaceus modulates Th1/2 immune balance and activates PPAR γ in a murine asthma model. // *Biochem. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 92, № 5. – P.397 - 405.
39. Chiarella S.E., Budinger G.R., Mutlu G.M. B2-Agonist therapy may contribute to the air pollution and IL-6-associated risk of developing severe asthma with dual-positive TH2/TH17 cells. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. – Vol.135, №1. – P.290-291.
40. Christodoulopoulos P., Cameron L., Nakamura Y., Lemi re C., Muro S., Dugas M., Boulet L.P., Laviolette M., Olivenstein R., Hamid Q. Th2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2001. – Vol.107, № 4. – P.586-591.
41. Chuchalin A.G., Khaltayev N., Antonov N.S., Galkin D.V., Manakov L.G., Antonini P., Murphy M., Solodovnikov A.G., Bousquet J., Pereira M.H.S., Demko I.V. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2014. – Vol.9. – P.963-974.
42. Cote-Sierra J., Foucras G., Guo L., Chiodetti L., Young H.A., Hu-Li J., Zhu J., Paul W.E. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol.101, №11. – P.3880-3885.
43. Dragon S., Rahman M.S., Yang J., Unruh H., Halayko A.J., Gounni A.S. IL-17 enhances IL-1 β -mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2007. – Vol.292. – P.1023–1029.

44. Duan M.C., Zhang J.Q., Liang Y., Liu G.N., Xiao J., Tang H.J., Liang Y. Infiltration of IL-17-Producing T Cells and Treg Cells in a Mouse Model of Smoke-Induced Emphysema. // *Inflammation*. - 2016.
45. Elyaman W., Bassil R., Bradshaw E.M., Orent W., Lahoud Y., Zhu B., Radtke F., Yagita H., Khoury S.J. Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. // *Immunity*. – 2012. – Vol.36, №4. – P.623-634.
46. Erpenbeck V.J., Hagenberg A., Krentel H., Discher M., Braun A., Hohlfeld J.M., Krug N. Regulation of GATA-3, c-maf and T-bet mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells and bronchial biopsies after segmental allergen challenge. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2006. – Vol.139, №4. – P.306-316.
47. Fan R., Lan Y., Chen J., Huang Y., Yan Q., Jiang L., Song S., Li Y. T-bet expression in CD8+ T cells associated with chronic hepatitis B virus infection. // *Virol J.* – 2016. – Vol.13, №1. – P.14.
48. Fang M., Xie H., Dougan S.K., Ploegh H., van Oudenaarden A. Stochastic cytokine expression induces mixed T helper cell states. // *PLoS Biol.* – 2013. – Vol.11, №7.
49. Farahnik B., Beroukhim K., Zhu T.H., Abrouk M., Nakamura M., Singh R., Lee K., Bhutani T., Koo J. Ixekizumab for the Treatment of Psoriasis: A Review of Phase III Trials. // *Dermatol. Ther. (Heidelb)*. – 2016. - Feb 24.
50. Finotto S., Neurath M.F., Glickman J.N., Qin S., Lehr H.A., Green F.H., Ackerman K., Haley K., Galle P.R., Szabo S.J., Drazen J.M., De Sanctis G.T., Glimcher L.H. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. // *Nat. Commun.* – 2012. – Vol.3. – P.1268.
51. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. // *Nat. Immunol.* – 2003. – Vol.4, №4. – P.330-336.
52. Fujiwara Y., Browne C.P., Cunniff K., Goff S.C., Orkin S.H. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking

- transcription factor GATA-1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol.93, №22. – P.12355-12358.
53. Furusawa J., Moro K., Motomura Y., Okamoto K., Zhu J., Takayanagi H., Kubo M., Koyasu S. Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol.191, №4. – P.1818-1826.
 54. Garrett W.S., Lord G.M., Punit S., Lugo-Villarino G., Mazmanian S.K., Ito S., Glickman J.N., Glimcher L.H. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. // *Cell.* – 2007. – Vol.131, №1. – P.33-45.
 55. Georas S.N., Guo J., De Fanis U., Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease // *Eur. Respir. J.* - 2005. – Vol. 26, №6. - P.1119-1137.
 56. Gordon S.M., Chaix J., Rupp L.J., Wu J., Madera S., Sun J.C., Lindsten T., Reiner S.L. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. // *Immunity.* – 2012. – Vol.36, №1. – P.55-67.
 57. Grainge C.L., Maltby S., Gibson P.G., Wark P.A., McDonald V.M. Targeted therapeutics for severe refractory asthma: monoclonal antibodies. // *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* – 2016. – P.1-15.
 58. Green R., Brightling C., Woltmann G., Parker D., Wardlaw A., Pavord I. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. // *Thorax.* – 2002. – Vol.57, №10. – P. 875–879.
 59. Grunig G., Warnock M., Wakil A.E., Venkayya R., Brombacher F., Rennick D.M., Sheppard D., Mohrs M., Donaldson D.D., Locksley R.M., Corry D.B. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. // *Science.* – 1998. – Vol.282. – P.2261–2263.
 60. Guihua X., Shuyin L., Jinliang G., Wang S. Naringin protects ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. // *Inflammation.* - 2016. – Vol.39, №2. – P.891-899.
 61. Halim T.Y., Steer C.A., Mathä L., Gold M.J., Martinez-Gonzalez I., McNagny K.M., McKenzie A.N., Takei F. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the

- initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. // *Immunity*. – 2014. – Vol.40, №3. – P.425-445.
62. van Hamburg J.P., de Bruijn M.J., Ribeiro de Almeida C., van Zwam M., van Meurs M., de Haas E., Boon L., Samsom J.N., Hendriks R.W. Enforced expression of GATA3 allows differentiation of IL-17-producing cells, but constrains Th17-mediated pathology. // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – Vol.38, №9. – P.2573-2586.
 63. Hendriks R.W., Nawijn M.C., Engel J.D., van Doorninck H., Grosveld F., Karis A. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – Vol.29, №6. – P.1912-1918.
 64. Ho I.C., Lo D., Glimcher L.H. C-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol.188, №10. – P.1859-1866.
 65. Hong E., Di Cesare P.E., Haudenschild D.R. Role of c-Maf in Chondrocyte Differentiation: A Review. // *Cartilage*. – 2011. – Vol.2, №1. – P. 27-35.
 66. Hosoya T., Kuroha T., Moriguchi T., Cummings D., Maillard I., Lim K.C., Engel J.D. GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol.206, №13. – P.2987-3000.
 67. Hurt E.M., Wiestner A., Rosenwald A., Shaffer A.L., Campo E., Grogan T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M., Staudt L.M. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. // *Cancer Cell*. – 2004. – Vol.5, №2. – P.191-199.
 68. Hwang E.S., Hong J.H., Glimcher L.H. IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol.202, №9. – P.1289-1300.
 69. Hwang E.S., Szabo S.J., Schwartzberg P.L., Glimcher L.H. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. // *Science*. – 2005. – Vol.307. – P. 430–433.

70. Imaki J., Tsuchiya K., Mishima T., Onodera H., Kim J.I., Yoshida K., Ikeda H., Sakai M. Developmental contribution of c-maf in the kidney: distribution and developmental study of c-maf mRNA in normal mice kidney and histological study of c-maf knockout mice kidney and liver. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 320. – P.1323-1327.
71. Iwamoto T., Suto A., Tanaka S., Takatori H., Suzuki K., Iwamoto I., Nakajima H. Interleukin-21-producing c-Maf-expressing CD4⁺ T cells induce effector CD8⁺ T cells and enhance autoimmune inflammation in scurfy mice. // *Arthritis Rheumatol.* – 2014. – Vol.66, №8. – P.2079-2090.
72. Ji N.F., Xie Y.C., Zhang M.S., Zhao X., Cheng H., Wang H., Yin K.S., Huang M. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model. // *Int. Immunopharmacol.* – 2014. – Vol.21, №1. – P.76-81.
73. Jiang H., Wu X., Zhu H., Xie Y., Tang S., Jiang Y. FOXP3(+)Treg/Th17 cell imbalance in lung tissues of mice with asthma. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol.8, №3. – P.4158-4163.
74. Kanhere A., Hertweck A., Bhatia U., Gökmen M.R., Perucha E., Jackson I., Lord G.M., Jenner R.G. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. // *Science.* – 2002. – Vol.295, №5553. – P.336-338.
75. Kaplan M.H. Th9 cells: differentiation and disease. // *Immunol. Rev.* – 2013. – Vol.252, №1. – P.104-115.
76. Kataoka K. Multiple mechanisms and functions of maftranscription factors in the regulation of tissue-specific genes. // *J. Biochem.* – 2007. – Vol.141. – P.775-781.
77. Kataoka K., Noda M., Nishizawa M. Maf nuclear oncoproteinrecognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimerswith both Fos and Jun. // *Mol. Cell Biol.* – 1994. – Vol.14. – P.700-712.
78. Kataoka K., Shioda S., Ando K., Sakagami K., Handa H., Yasuda K. Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet alpha- and beta-cells. // *J. Mol. Endocrinol.* – 2004. – Vol.32. –P. 9-20.

79. Kawaguchi K., Suzuki E., Yamaguchi A., Yamamoto M., Morita S., Toi M. Altered expression of major immune regulatory molecules in peripheral blood immune cells associated with breast cancer. // *Breast Cancer*. Mar 4.
80. Kim do H., Sohn J.H., Park H.J., Lee J.H., Park J.W., Choi J.M. CpG oligodeoxynucleotide inhibits cockroach-induced asthma via induction of IFN- γ^+ Th1 cells or Foxp3 $^+$ regulatory T cells in the lung. // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2016. – Vol.8, №3. – P.264-275.
81. Kim J.I., Ho I.C., Grusby M.J., Glimcher L.H. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. // *Immunity*. – 1999. – Vol.10, №6. – P.745-751.
82. King C., Tangye S.G., Mackay C.R. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol.26. – P.741–766.
83. Kirstein F., Nieuwenhuizen N.E., Jayakumar J., Horsnell W.G., Brombacher F. Role of IL-4 receptor α -positive CD4 $^+$ T cells in chronic airway hyperresponsiveness. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2016. – Vol.137, №6. – P.1852-1862.
84. Kishikawa H., Sun J., Choi A., Miaw S.C., Ho I.C. The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. // *J. Immunol.* – 2001. – Vol.167, №8. – P.4414-4420.
85. Kiwamoto T., Ishii Y., Morishima Y., Yoh K., Maeda A., Ishizaki K., Iizuka T., Hegab A.E., Matsuno Y., Homma S., Nomura A., Sakamoto T., Takahashi S., Sekizawa K. Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol.174, №2. – P.142-151.
86. Ko F.W., Lun S.W., Wong C.K., Szeto C.C., Lam C.W., Leung T.F., Hui D.S. Decreased T-bet expression and changes in chemokine levels in adults with asthma. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2007. – Vol.147, №3. – P.526-532.
87. Ko L.J., Engel J.D. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. // *Mol. Cell Biol.* – 1993. – Vol.13, №7. – P. 4011–4022.

88. Kornete M., Mason E.S., Girouard J., Lafferty E.I., Qureshi S., Piccirillo C.A. Th1-Like ICOS⁺ Foxp3⁺ Treg cells preferentially express CXCR3 and home to β -islets during pre-diabetes in BDC2.5 NOD mice. // *PLoS One*. – 2015. – Vol.10, №5.
89. Kroenke M.A., Eto D., Locci M., Cho M., Davidson T., Haddad E.K., Crotty S. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. // *J. Immunol.* – 2012. – Vol.188.- P. 3734–3744.
90. Krogulska A., Polakowska E., Wąsowska-Królikowska K., Małachowska B., Młynarski W., Borowiec M. Decreased FOXP3 mRNA expression in children with atopic asthma and IgE-mediated food allergy. // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2015. – Vol.115, №5. – P.415-421.
91. Krug N., Hohlfeld J.M., Kirsten A.M., Kornmann O., Beeh K.M., Kappeler D., Korn S., Ignatenko S., Timmer W., Rogon C., Zeitvogel J., Zhang N., Bille J., Homburg U., Turowska A., Bachert C., Werfel T., Buhl R., Renz J., Garn H., Renz H. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase. // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol.372, №21. – P.1987-1995.
92. Kwan M., Powell D.R., Nachman T.Y., Brown M.A. An intron GATA-binding site regulates chromatin accessibility and is essential for IL-4 gene expression in mast cells. // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – Vol.35, №4. – P.1267-1274.
93. Lai C.Y., Lin S.Y., Wu C.K., Yeh L.T., Sytwu H.K., Miaow S.C. Tyrosine phosphorylation of c-Maf enhances the expression of IL-4 gene. // *J.Immunol.* – 2012. – Vol.189, №4. – P.1545-1550.
94. Lazarevic V., Chen X., Shim J.H., Hwang E.S., Jang E., Bolm A.N., Oukka M., Kuchroo V.K., Glimcher L.H. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol.12, №1. – P.96-104.
95. Lee D.U., Rao A. Molecular analysis of a locus control region in the T helper 2 cytokine gene cluster: a target for STAT6 but not GATA3. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol.101, №45. – P.16010-16015.

96. Li F., Xie X., Li S., Ke R., Zhu B., Yang L., Li M. Interleukin-6 gene -174G/C polymorphism and bronchial asthma risk: a meta-analysis // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol.8, №8. – P.12601–12608.
97. Li J., Dong X., Zhao L., Wang X., Wang Y., Yang X., Wang H., Zhao W. Natural killer cells regulate Th1/Treg and Th17/Treg balance in chlamydial lung infection. // *J. Cell Mol. Med.* - 2016.
98. Liang H.E., Reinhardt R.L., Bando J.K., Sullivan B.M., Ho I.C., Locksley R.M. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol.13, №1. – P.58-66.
99. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F., Arzt E. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. // *FASEB J.* – 2007. – Vol.21, №4. – P.1177-1188.
100. Lin J.X., Leonard W.J. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. // *Oncogene.* – 2000. – Vol.19, №21. – P.2566-2576.
101. Ling K.W., Ottersbach K., van Hamburg J.P., Oziemlak A., Tsai F.Y., Orkin S.H., Ploemacher R., Hendriks R.W., Dzierzak E. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. // *J. Exp. Med.* – 2004. – Vol. 200, №7. – P.871-82.
102. Little F.F., Center D.M. Induced sputum analysis for T helper type 2 cell regulation: closing the loop. // *Chest.* – 2003. – Vol.123, №6. – P.1786-1788.
103. Lu M.M., Li S., Yang H., Morrissey E.E. Foxp4: a novel member of the Foxp subfamily of winged-helix genes co-expressed with Foxp1 and Foxp2 in pulmonary and gut tissues // *Mech. Dev.* – 2002 – Vol. 119, № 1. – P. 197-202.
104. Lu Y., Malmhäll C., Sjöstrand M., Rådinger M., O'Neil S.E., Lötvall J., Bossios A. Expansion of CD4(+) CD25(+) and CD25(-) T-Bet, GATA-3, Foxp3 and RORγt cells in allergic inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression. // *PLoS One.* – 2011. – Vol.6, №5.
105. Ma L., Zeng J., Mo B., Wang C., Sun Y., Zhang M., Liu S., Xiang X., Wang C.Y. ANP/NPRA signaling preferentially mediates Th2 responses in favor of

- pathological processes during the course of acute allergic asthma. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol.8, №4. – P.5121-5128.
106. Ma L., Zeng J., Mo B., Wang C., Huang J., Sun Y., Yu Y., Liu S. High mobility group box 1: a novel mediator of Th2-type response-induced airway inflammation of acute allergic asthma. // *J. Thorac. Dis.* – 2015. – Vol.7, №10. – P.1732-1741.
 107. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol.5, №6. - P.472-484.
 108. Maek A.W., Buranapraditkun S., Klaewsongkram J., Ruxrungtham K. Increased interleukin-17 production both in helper T cell subset Th17 and CD4-negative T cells in human immunodeficiency virus infection. // *Viral Immunol.* – 2007. – Vol.20, №1. – P.66–75.
 109. Maneechotesuwan K., Xin Y., Ito K., Jazrawi E., Lee K.Y., Usmani O.S., Barnes P.J., Adcock I.M. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, № 4. – P.2491-2498.
 110. Maneechotesuwan K., Yao X., Ito K., Jazrawi E., Usmani O.S., Adcock I.M., Barnes P.J. Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. // *PLoS Med.* – 2009. – Vol.6, №5.
 111. Mantel P.Y., Kuipers H., Boyman O., Rhyner C., Ouaked N., Rückert B., Karagiannidis C., Lambrecht B.N., Hendriks R.W., Cramer R., Akdis C.A., Blaser K., Schmidt-Weber C.B. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. // *PLoS Biol.* – 2007.- Vol 5, №12. - e329.
 112. Mao X., Stewart A.K., Hurren R., Datti A., Zhu X., Zhu Y., Shi C., Lee K., Tiedemann R., Eberhard Y., Trudel S., Liang S., Corey S.J., Gillis L.C., Barber D.L., Wrana J.L., Ezzat S., Schimmer A.D. A chemical biology screen identifies glucocorticoids that regulate c-maf expression by increasing its proteasomal degradation through up-regulation of ubiquitin. // *Blood.* – 2007. – Vol.110, №12. – P.4047-4054.

113. Marie J.C., Letterio J.J., Gavin M., Rudensky A.Y. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol.201, №7. – P.1061-1067.
114. Matsushashi Y., Tasaka T., Uehara E., Fujimoto M., Tamura T., Nagai M., Ishida T. Increased expression of c-maf in pure red cell aplasia secondary to plasma cell dyscrasia. // *Leuk. Lymphoma.* – 2003. – Vol.44, №3. – P.523-524.
115. McPherson R.C., Turner D.G., Mair I., O'Connor R.A., Anderton S.M. T-bet expression by Foxp3(+) T regulatory cells is not essential for their suppressive function in CNS autoimmune disease or colitis. // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol.6. – P.69.
116. Miller S.A., Mohn S.E., Weinmann A.S. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. // *Mol. Cell.* – 2010. – Vol. 40, №4. – P.594-605.
117. Molkentin J.D., Lin Q., Duncan S.A., Olson E.N. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. // *Genes Dev.* – 1997. – Vol.11, №8. – P.1061-1072.
118. Molkentin J.D., Tymitz K.M., Richardson J.A., Olson E.N. Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – Vol.20, №14. – P.5256-5260.
119. Morrissey E.E., Tang Z., Sigrist K., Lu M.M., Jiang F., Ip H.S., Parmacek M.S. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. // *Genes Dev.* – 1998. – Vol.12, №22. P.3579-3590.
120. Murcia R.Y., Vargas A., Lavoie J.P. The Interleukin-17 induced activation and increased survival of equine neutrophils is insensitive to glucocorticoids. // *PLoS One.* – 2016. – Vol.11, №5.
121. Nagashima H., Okuyama Y., Asao A., Kawabe T., Yamaki S., Nakano H., Croft M., Ishii N., So T. The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4(+) T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. // *Nat. Immunol.* – 2014. – Vol.15, №5. – P.449-456.

122. Neveu W.A., Allard J.L., Raymond D.M., Bourassa L.M., Burns S.M., Bunn J.Y., Irvin C.G., Kaminsky D.A., Rincon M. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. // *Respir. Res.* – 2010. – Vol.11. – P.28.
123. Nishikawa K., Nakashima T., Takeda S., Isogai M., Hamada M., Kimura A., Kodama T., Yamaguchi A., Owen M.J., Takahashi S., Takayanagi H. Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol.120. – P.3455-3465.
124. Nosratabadi R., Rastin M., Sankian M., Haghmorad D., Mahmoudi M. Hyperforin-loaded gold nanoparticle alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing Th1 and Th17 cells and upregulating regulatory T cells. // *Nanomedicine.* – 2016. – Vol.12, №7. – P.1961-1971.
125. O'Shea J.J., Paul W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. // *Science.* – 2010. – Vol.327, №5969. – P.1098-1102.
126. Ouyang W., Löhning M., Gao Z., Assenmacher M., Ranganath S., Radbruch A., Murphy K.M. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. // *Immunity.* – 2000. – Vol.12, №1. – P.27-37.
127. Owen C.J., Jennings C.E., Imrie H., Lachaux A., Bridges N.A., Cheetham T.D., Pearce S.H. Foxp3 forkhead domain mutation and regulatory T cells in the IPEX syndrome. // *N.Engl.J.Med.* – 2009. – Vol. 361, №17. – P.1710-1713.
128. Palikhe N.S., Laratta C., Nahirney D., Vethanayagam D., Bhutani M., Vliagoftis H., Cameron L. Elevated Levels of Circulating CD4⁺ CRTh2⁺ T cells Characterize Severe Asthma. // *Clin. Exp. Allergy.* – 2016.
129. Papp K.A., Reich K., Paul C., Blauvelt A., Baran W., Bolduc C., Toth D., Langley R.G., Cather J., Gottlieb A.B., Thaçi D., Krueger J.G., Russell C.B., Milmont C.E., Li J., Klekotka P.A., Kricorian G., Nirula A. A prospective phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. // *Br. J. Dermatol.* – 2016.

130. Parelho V., Hadjur S., Spivakov M., Leleu M., Sauer S., Gregson H.C., Jarmuz A., Canzonetta C., Webster Z., Nesterova T., Cobb B.S., Yokomori K., Dillon N., Aragon L., Fisher A.G., Merkenschlager M. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. // *Cell*. - 2008. – Vol.132, №3. – P.422-433.
131. Pasare C., Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. // *Science*. – 2003. – Vol.299, №5609. – P.1033-1036.
132. Paul W.E., Zhu J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P.225-235.
133. Pisarska M.D., Kuo F.-T., Tang D., Zarrini P., Khan S., Ketefian A. Expression of forkhead transcription factors in human granulosa cells // *Fertility and Sterility*. – 2009. – Vol. 91, № 4. – P. 1392-1394.
134. Powell N., Walker A.W., Stolarczyk E., Canavan J.B., Gökmen M.R., Marks E., Jackson I., Hashim A., Curtis M.A., Jenner R.G., Howard J.K., Parkhill J., MacDonald T.T., Lord G.M. The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells. // *Immunity*. – 2012. – Vol.37, №4. – P.674-684.
135. Provoost S., Maes T., van Durme Y.M., Gevaert P., Bachert C., Schmidt-Weber C.B., Brusselle G.G., Joos G.F., Tournoy K.G. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. // *Allergy*. – 2009. – Vol.64, №10. – P.1539-1546.
136. Raby B.A., Hwang E.S., Van Steen K., Tantisira K., Peng S., Litonjua A., Lazarus R., Giallourakis C., Rioux J.D., Sparrow D., Silverman E.K., Glimcher L.H., Weiss S.T. T-bet polymorphisms are associated with asthma and airway hyperresponsiveness. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol.173, №1. – P.64-70.
137. Ray A., Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway Inflammation // *J. Clin. Invest.* - 1999. – Vol. 104, №8. - P.985–993.

138. Ribeiro de Almeida C., Heath H., Krpic S., Dingjan G.M., van Hamburg J.P., Bergen I., van de Nobelen S., Sleutels F., Grosveld F., Galjart N., Hendriks R.W. Critical role for the transcription regulator CCCTC-binding factor in the control of Th2 cytokine expression. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol.182, №2. – P.999-1010.
139. Rodrigues N.P., Tipping A.J., Wang Z., Enver T. GATA-2 mediated regulation of normal hematopoietic stem/progenitor cell function, myelodysplasia and myeloid leukemia. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2012. – Vol.44, №3. – P.457-460.
140. Rudra D., deRoos P., Chaudhry A., Niec R.E., Arvey A., Samstein R.M., Leslie C., Shaffer S.A., Goodlett D.R., Rudensky A.Y. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol.13, №10. – P.1010-1019.
141. Sahoo A., Alekseev A., Tanaka K., Obertas L., Lerman B., Haymaker C., Clise-Dwyer K., McMurray J.S., Nurieva R. Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells. // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol.6. – P.7997.
142. Schmitz J., Thiel A., Kühn R., Rajewsky K., Müller W., Assenmacher M., Radbruch A. Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells. // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol.179, №4. – P.1349-1353.
143. Schulz E.G., Mariani L., Radbruch A., Hofer T. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. // *Immunity.* – 2009. - № 30. – P.673–683.
144. Shi Y.H., Shi G.C., Wan H.Y., Ai X.Y., Zhu H.X., Tang W., Ma J.Y., Jin X.Y., Zhang B.Y. An increased ratio of Th2/Treg cells in patients with moderate to severe asthma. // *Chin. Med. J. (Engl).* – 2013. – Vol.126, №12. – P.2248-2253.
145. Shim J.U., Rhee J.H., Jeong J.U., Koh Y.I. Flagellin Modulates the Function of Invariant NKT Cells From Patients With Asthma via Dendritic Cells. // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2016. – Vol.8, №3. – P.206-215.
146. Skuljec J., Cabanski M., Surdziel E., Lachmann N., Brenning S., Pul R., Jirno A.C., Habener A., Visic J., Dalüge K., Hennig C., Moritz T., Happel C., Hansen G.

- Monocyte/macrophage lineage commitment and distribution are affected by the lack of regulatory T cells in scurfy mice. // *Eur. J. Immunol.* - 2016.
147. Stelmaszczyk-Emmel A., Zawadzka-Krajewska A., Głodkowska-Mrówka E., Demkow U. FoxP3 Tregs response to sublingual allergen specific immunotherapy in children depends on the manifestation of allergy. – *J. Immunol. Res.* - 2016.
 148. Su W., Aloï M.S., Garden G.A. MicroRNAs mediating CNS inflammation: small regulators with powerful potential. // *Brain, Behavior, and Immunity.* – 2016. – Vol.52. – P. 1-8.
 149. Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. // *Cell.* – 2000. – Vol.100, №6. – P.655-669.
 150. Taha R., Hamid Q., Cameron L., Olivenstein R. T helper type 2 cytokine receptors and associated transcription factors GATA-3, c-MAF, and signal transducer and activator of transcription factor-6 in induced sputum of atopic asthmatic patients. // *Chest.* – 2003. – Vol.123, №6. – P.2074-2082.
 151. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol.192, №2. – P.303-310.
 152. Takemoto N., Kamogawa Y., Jun Lee H., Kurata H., Arai K.I., O'Garra A., Arai N., Miyatake S. Cutting edge: chromatin remodeling at the IL-4/IL-13 intergenic regulatory region for Th2-specific cytokine gene cluster. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol.165, №12. – P.6687-6691. Tamauchi H., Terashima M., Ito M., Maruyama H., Ikewaki N., Inoue M., Gao X., Hozumi K., Habu S. Evidence of GATA-3-dependent Th2 commitment during the in vivo immune response // *Int. Immunol.* - 2004. - Vol. 16, № 1. - P.179–187.
 153. Tanaka S., Motomura Y., Suzuki Y., Yagi R., Inoue H., Miyatake S., Kubo M. The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Il4 transcription in T(H)2 cells. // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol.12, №1. – P.77-85.

154. Tao B., Ruan G., Wang D., Li Y., Wang Z., Yin G. Imbalance of peripheral Th17 and regulatory T cells in children with allergic rhinitis and bronchial asthma. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* – 2015. – Vol.14, №3. – P.273-279.
155. Usui T., Preiss J.C., Kanno Y., Yao Z.J., Bream J.H., O'Shea J.J., Strober W.J. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. // *Exp. Med.* – 2006. – Vol.203, №3. – P.755-766.
156. Vang K.B., Yang J., Mahmud S.A., Burchill M.A., Vegoe A.L., Farrar M.A. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol.181, №5. – P.3285-3290.
157. Virchow J.C. Jr, Kroegel C., Walker C., Matthys H. Inflammatory determinants of asthma severity: mediator and cellular changes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe asthma. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1996. - Vol.98. – P.27-33.
158. Wan Y.Y., Flavell R.A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. // *Nature.* – 2007. – Vol. 445, № 7129. – P.766-770.
159. Wan G., Wei B. Erythropoietin regulates Treg cells in asthma through TGF β receptor signaling. // *Am. J. Transl. Res.* – 2015. – Vol.7, №11. – P.2305-2315.
160. Wang J., Fathman J.W., Lugo-Villarino G., Scimone L., von Andrian U., Dorfman D.M., Glimcher L.H. Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells. // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol.116, №2. – P.414-421.
161. Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R., Gavrieli M., Murphy K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. // *Immunity.* – 2006. Vol.24, №6. – P.677-688.
162. Weaver C.T., Hatton R.D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. - Vol.9, №12. – P.883-889.

163. Wei B., Zhang H., Li L., Li M., Shang Y. T helper 17 cells and regulatory T-cell imbalance in paediatric patients with asthma. // J. Int. Med. Res. – 2011. – Vol 39, №4. – P.1293-1305.
164. Wei G., Abraham B.J., Yagi R., Jothi R., Cui K., Sharma S., Narlikar L., Northrup D.L., Tang Q., Paul W.E., Zhu J., Zhao K. Genome-wide analyses of transcription factor GATA3-mediated gene regulation in distinct T cell types. // Immunity. – 2011. – Vol.35, №2. – P.299-311.
165. Wierenga E.A., Walchner M., Kick G., Kapsenberg M.L., Weiss E.H., Messer G.I. Evidence for suppressed activity of the transcription factor NFAT1 at its proximal binding element P0 in the IL-4 promoter associated with enhanced IL-4 gene transcription in T cells of atopic patients. // Int. Immunol. - 1999. - Vol. 11, № 2. - P.297–306.
166. Wilson A.D., Hicks C. Both tumour cells and infiltrating T-cells in equine sarcoids express FOXP3 associated with an immune-suppressed cytokine microenvironment. // Vet. Res. – 2016. – Vol.47, №1. – P.55.
167. Wilson V., Conlon F.L. The T-box family. // Genome Biol. – 2002. Vol.3, №6.
168. Wohlfert E.A., Grainger J.R., Bouladoux N., Konkel J.E., Oldenhove G., Ribeiro C.H., Hall J.A., Yagi R., Naik S., Bhairavabhotla R., Paul W.E., Bosselut R., Wei G., Zhao K., Oukka M., Zhu J., Belkaid Y.J. GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice. // Clin. Invest. – 2011. – Vol.121, №11. – P.4503-4515.
169. Wu Y., Borde M., Heissmeyer V., Feuerer M., Lapan A.D., Stroud J.C., Bates D.L., Guo L., Han A., Ziegler S.F., Mathis D., Benoist C., Chen L., Rao A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. // Cell. – 2006. – Vol.126, №2. – P. 375-387.
170. Wurster A.L., Rodgers V.L., Satoskar A.R., Whitters M.J., Young D.A., Collins M., Grusby M. J. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon -producing Th1 cells. // J. Exp. Med. – 2002. – Vol.196. – P.969–977.

171. Xiao Y., Motomura S., Deyev V., Podack E.R. TNF superfamily member 13, APRIL, inhibits allergic lung inflammation. // *Eur. J. Immunol.* – 2011. – Vol.41, №1. – P.164-171.
172. Xue K., Zhou Y., Xiong S., Xiong W., Tang T. Analysis of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and Foxp3 mRNA in the peripheral blood of patients with asthma. // *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* – 2007. – Vol.27, №1. – P.31-33.
173. Yagi R., Junttila I.S., Wei G., Urban J.F. Jr., Zhao K., Paul W.E., Zhu J. The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon-gamma. // *Immunity.* – 2010. – Vol.32, №4. – P.507-517.
174. Yamane H., Zhu J., Paul W.E. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4⁺ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol.202, №6. – P.793-804.
175. Yang X., Jiang Y., Wang C. Does IL-17 Respond to the Disordered Lung Microbiome and Contribute to the Neutrophilic Phenotype in Asthma? // *Mediators Inflamm.* - 2016.
176. Yang X.O., Angkasekwinai P., Zhu J., Peng J., Liu Z., Nurieva R., Liu X., Chung Y., Chang S.H., Sun B., Dong C. Requirement for the basic helix-loop-helix transcription factor Dec2 in initial TH2 lineage commitment. // *Nat. Immunol.* – 2009. – Vol.10, №12. – P.1260-1266.
177. Yong J., Chen G.Q., Huang B., Wu S. Correlation between the ratio of T-bet/GATA-3 and the levels of IL-4 and IFN- γ in patients with allergic asthma. // *Mol. Med. Rep.* – 2011. Vol.4, №4. – P.663-666.
178. Yu F., Sharma S., Edwards J., Feigenbaum L., Zhu J. Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance. // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, № 2. – P.197-206.
179. Yüksek M., Erol F., Güloğlu D., Doğu F., Elhan A.H., Babacan E., İkinciogullari A. Regulatory T cell levels in children with asthma. // *Turk. J. Pediatr.* – 2011. – Vol.53, №5. – P.532-536.

180. Zhang D.H., Yang L., Ray A. Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161, №8. – P.3817-3821.
181. Zhang Z., Tong J., Tang X., Juan J., Cao B., Hurren R., Chen G., Taylor P., Xu X., Shi C.X., Du J., Hou J., Wang G., Wu D., Stewart A.K., Schimmer A.D., Moran M.F., Mao X. The ubiquitin ligase HERC4 mediates c-Maf ubiquitination and delays the growth of multiple myeloma xenografts in nude mice. // *Blood.* – 2016. – Vol.127, №13. – P.1676-1686.
182. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., Victora G.D., Shen Y., Du J., Rubtsov Y.P., Rudensky A.Y., Ziegler S.F., Littman D.R. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. // *Nature.* – 2008. – Vol.453, №7192. – P.236-240.
183. Zhu J., Jankovic D., Oler A.J., Wei G., Sharma S., Hu G., Guo L., Yagi R., Yamane H., Punkosdy G., Feigenbaum L., Zhao K., Paul W.E. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. // *Immunity.* – 2012. – Vol.37, №4. – P. 660-673.
184. Zhu J., Min B., Hu-Li J., Watson C.J., Grinberg A., Wang Q., Killeen N., Urban J.F. Jr., Guo L., Paul W.E. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. // *Nat. Immunol.* – 2004. – Vol. 5, № 11. – P.1157 - 1165.
185. Zhu M., Liang Z., Wang T., Chen R., Wang G., Ji Y. Th1/Th2/Th17 cells imbalance in patients with asthma with and without psychological symptoms. // *Allergy Asthma Proc.* – 2016. – Vol.37, №2. – P. 148-156.
186. Ziegler S.F., Buckner J.H. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. // *Microbes Infect.* – 2009. – Vol.11, №5. – P.594-598.