

В.А. Петров, И.В. Салтыкова, К.В. Невская, Ю.Б. Дорофеева, С.П. Лежава, Н.А. Кириллова,  
Е.С. Куликов, А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Российская Федерация

# Исследование цитокинового профиля и экспрессии генов *FYN*, *ZAP-70* и *LAT* при стимуляции конканавалином А у пациентов с терапевтически резистентной bronхиальной астмой

**Обоснование.** Бронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных хронических бронхолегочных заболеваний. Это заболевание характеризуется полифенотипичностью и гетерогенностью течения: существуют фенотипы астмы, связанные с резистентностью к терапии, представляющие серьезную клиническую проблему. В качестве основного механизма развития лекарственной резистентности у больных на данный момент предполагается «переключение» иммунного ответа с Th2 на альтернативные варианты, однако причины этого недостаточно понятны. Согласно результатам исследований транскриптома, гены *ZAP-70*, *FYN* и *LAT* могут играть роль в развитии резистентности к лечению. **Цель исследования** — выявление характерных паттернов изменения цитокиновой секреции и экспрессии генов (*ZAP-70*, *FYN* и *LAT*) интактных лимфоцитов и при стимуляции конканавалином А при терапевтической резистентности у больных БА. **Методы.** В исследование было включено по 10 пациентов с терапевтически резистентной БА и тяжелой БА, а также 10 здоровых человек контрольной группы. Все пациенты на момент забора образцов получали лечение по поводу БА. У каждого пациента проводили забор венозной крови и выделение клеток лимфоцитарной фракции, которые культивировали с конканавалином А и без него. После культивирования определяли концентрации цитокинов IL2, IL12, TNF $\alpha$ , IL4, IL5 и IL6 с помощью иммуноферментного анализа, а также экспрессию генов *LAT*, *ZAP-70* и *FYN* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты.** Установлена ассоциация заболевания и профиля секреции лимфоцитов без стимуляции конканавалином А. В клетках пациентов с резистентной БА повышалась концентрация IL2 и IL4 по сравнению с тяжелой БА. Лимфоциты пациентов с резистентной БА демонстрировали незначительный цитокиновый ответ на стимуляцию: отмечалось повышение продукции лишь IL5 и TNF $\alpha$ , тогда как в клетках пациентов с тяжелой БА повышалась продукция всех цитокинов за исключением IL12, в контрольной группе — за исключением IL12 и IL2. Установлено повышение экспрессии *FYN* в лимфоцитах пациентов с резистентной БА вне зависимости от режима стимуляции по сравнению с пациентами с тяжелой БА и группой контроля и снижение экспрессии данного гена в контроле по сравнению с тяжелой БА. Также отмечалось повышение экспрессии *ZAP-70* в клетках пациентов с резистентной БА по сравнению с контролем при стимуляции конканавалином А. **Заключение.** Лимфоцитарная фракция клеток пациентов с резистентной БА характеризуется слабым ответом на стимуляцию конканавалином А, измененным профилем цитокиновой секреции и генетической экспрессии, характерным для клеток с низкой чувствительностью к проапоптотическим стимулам. Ген *FYN* является перспективной мишенью для поиска подходов по преодолению резистентности к стероидным препаратам при БА.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, терапевтическая резистентность, *FYN*, *ZAP*, *IL4*, *IL2*.

**(Для цитирования:** Петров В.А., Салтыкова И.В., Невская К.В., Дорофеева Ю.Б., Лежава С.П., Кириллова Н.А., Куликов Е.С., Сазонов А.Э., Огородова Л.М. Исследование цитокинового профиля и экспрессии генов *FYN*, *ZAP-70* и *LAT* при стимуляции конканавалином А у пациентов с терапевтически резистентной бронхиальной астмой. *Вестник РАМН*. 2018;73(5):321–329. doi: 10.15690/vramn928)

## Обоснование

Бронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных хронических бронхолегочных заболеваний, которое сопряжено со значительным социальным и экономическим ущербом. Более 300 млн человек по всему миру страдает бронхиальной астмой [1], что приводит как к высоким прямым, так и косвенным затратам ресурсов здравоохранения [2]. Болезнь характеризуется полифенотипичностью и гетерогенностью течения: наряду с классическими формами БА, обусловленными активацией Th2 иммунного ответа и эозинофилией, существуют фенотипы астмы, связанные с резистентностью к терапии. К такому типу, в частности, относится глюкокортикостероидрезистентная БА, для которой характерны активация Th1 звена иммунного ответа и персистирующая нейтрофилия [3, 4]. Отсутствие терапевтического ответа на лечение глюкокортикоستيоидами является серьезной

клинической проблемой. До 24% больных тяжелой БА резистентны к стероидным препаратам, более того, достаточно сложно клинически определить резистентность больного к такой терапии до ее назначения [5]. В качестве основного механизма развития лекарственной резистентности у больных БА на данный момент предполагается переключение иммунного ответа с Th2 на альтернативные варианты — Th1, Th17 и иные формы иммунного ответа, однако причины такого процесса недостаточно понятны [6, 7]. Ввиду этого актуален поиск механизмов, опосредующих развитие резистентности при БА [4].

Ранее нами проведено исследование по анализу дифференциальной экспрессии генов у больных терапевтически резистентной БА. Было показано, что при терапевтической резистентности у больных БА по сравнению с пациентами с тяжелой контролируемой формой заболевания повышается экспрессия целого ряда генов, относящихся в том числе и к сигнальному пути Т-клеточного

рецептора [8]. Среди них можно отметить несколько генов, представляющих особый интерес, — *LAT*, *FYN* и *ZAP-70*.

Одним из возможных белков, участвующих в процессе поляризации иммунного ответа, является *LAT* (от англ. linker for activation of T-cells — линкер активации Т-клеток). *LAT* представляет собой адаптерный белок иммунной системы, переключающий иммунный ответ между Th1 и Th2, причем при повышении функциональной активности этого белка происходит переключение на Th1 иммунный ответ, а при недостаточной его активности наблюдается поляризация Th2 [9–11]. Экспрессию линкера активации Т-клеток координирует тирозинкиназа *ZAP-70*, рост экспрессии которой связан со снижением активности *LAT* [12]. Другим важнейшим компонентом начального участка Т-клеточного сигнального пути является тирозинкиназа *FYN*, регулирующая процессы роста и клеточного цикла [13]. Оценка этих факторов позволяет определять «поведение» гена *LAT*.

Предполагается, что изменение экспрессии данных генов нарушает проведение сигнала через Т-клеточный рецептор. Это может быть одной из причин дисбаланса секреции Th1- и Th2-зависимых цитокинов (IL2, IL12, TNF $\alpha$ , IL4, IL5 и IL6) и неадекватного ответа клетки на терапию, что является отличительной особенностью терапевтически резистентной БА. При изучении иммунозависимых заболеваний с целью оценки способности лимфоцитов адекватно отвечать на стимулы используется агонист Т-клеточного рецептора митоген конканавалин А, представляющий собой лектин, получаемый из канавалии мечевидной (*Canavalia ensiformis*) [14]. Иссле-

дование цитокиновой секреции и генетической экспрессии *LAT*, *FYN* и *ZAP-70* у пациентов с терапевтической резистентностью по сравнению с тяжелой контролируемой БА и контрольной группой на интактных лимфоцитах и при стимуляции позволит определить паттерны, характерные именно для резистентности и не встречающиеся у здоровых людей и пациентов с контролируемой формой заболевания.

**Цель исследования** — выявление характерных паттернов изменения цитокиновой секреции и экспрессии генов (*ZAP-70*, *FYN* и *LAT*) интактных лимфоцитов и при их стимуляции конканавалином А на фоне терапевтически резистентной БА.

## Методы

### Дизайн исследования

Проведено одномоментное одноцентровое выборочное наблюдательное неконтролируемое сравнительное исследование в параллельных группах пациентов с тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмой, тяжелой бронхиальной астмой и здоровых добровольцев. Всего в исследование вошли 30 человек, по десять в каждой группе.

### Критерии соответствия

В группу пациентов с тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмой и тяжелой бронхиальной астмой включали лиц, для которых ранее проводилось исследование по анализу дифференциальной экспрессии [8].

V.A. Petrov, I.V. Saltykova, K.V. Nevskaya, Yu.B. Dorofeeva, S.P. Lezhava, N.A. Kirillova, E.S. Kulikov, A.E. Sazonov, L.M. Ogorodova

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

## Cytokine Profile and Expression of *FYN*, *ZAP-70* and *LAT* During Concanavalin A Stimulation in Patients with Resistant Bronchial Asthma

**Background:** Bronchial asthma (BA) is one of the most spreading chronic lung pathology in the world. The disease is characterized by high heterogeneity of clinical phenotypes including resistant forms which provoke significant clinical problem. Immune shift from Th2 to alternative immunological response is considered to be a mechanism of drug-resistance in BA treatment but this issue is not considerably studied yet. **Aims:** Detection of distinctive patterns in cytokine secretion and genetic expression (*ZAP-70*, *FYN* and *LAT*) of naïve and concanavalin A stimulated lymphocytes in patients with resistant BA. **Materials and methods:** The study enrolled ten patients in each group: subjects with treatment resistant BA, severe BA, and controls (30 in total). During the experiment, all patients with BA received treatment according to the condition. For each participant lymphocytes isolation from venous blood was performed. Cells were cultured with concanavalin A and without stimulation. Concentrations of cytokines IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, and IL-6 in supernatants were measured with ELISA. Reverse transcription polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of *LAT*, *ZAP-70*, and *FYN* genes. **Results:** Significant disease contribution to the lymphocyte secretion profile was established without concanavalin A stimulation: increased levels of IL-2 and IL-4 was observed in lymphocytes of patients with resistant BA if compared to the results of group with severe BA. Patients with resistant BA were characterized by weak cytokine response to the stimulation: only TNF- $\alpha$  and IL-5 levels were significantly increased whereas in group with severe BA all cytokines concentrations increased except IL-12, in controls — except IL-12 and IL-2. Significant *FYN* upregulation was identified in resistant BA group if compared with other groups, and in severe BA patients if compared with controls. The concanavalin A-stimulated cells showed increased expression of *ZAP-70* in cells of patients with resistant BA compared to control group. **Conclusions:** Lymphocytes from patients with resistant BA are characterized by lack of cytokine response to concanavalin A stimulation, alteration of cytokine secretion, and genetic expression profile similar to cells with low sensitivity to apoptosis. The *FYN* gene is a perspective target for finding approaches to overcome resistance to steroid drugs in bronchial asthma.

**Key words:** bronchial asthma, treatment resistance, *FYN*, *ZAP*, IL-4, IL-2.

(**For citation:** Petrov VA, Saltykova IV, Nevskaya KV, Dorofeeva YuB, Lezhava SP, Kirillova NA, Kulikov ES, Sazonov AE, Ogorodova LM. Cytokine Profile and Expression of *FYN*, *ZAP-70* and *LAT* During Concanavalin A Stimulation in Patients with Resistant Bronchial Asthma. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2018;73(5):321–329. doi: 10.15690/vramn928)

**Критерии включения:**

- пациенты обоего пола в возрасте от 18 до 80 лет;
- наличие подписанного информированного согласия;
- диагноз тяжелой БА, установленный в соответствии с критериями Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы (англ. Global Initiative for Asthma, GINA);
- наличие резистентности к терапии, определенной в соответствии с оценкой эффективности терапии и критериями Американского торакального общества [15] (для группы пациентов с резистентной БА), либо отсутствие таковой (для группы пациентов с тяжелой БА);
- отсутствие иных тяжелых соматических заболеваний по данным анамнеза и осмотра.

Все пациенты на момент забора образцов получали базисную терапию комбинированными препаратами агонистов бета2-адренорецепторов длительного действия и ингаляционных глюкокортикостероидов в высоких дозах (более 500 мкг по флутиказону пропионату).

В группу контроля включали здоровых добровольцев обоего пола старше 18 лет, подписавших информированное согласие и не имеющих признаков бронхиальной астмы, атопии, а также тяжелых соматических заболеваний по данным анамнеза и осмотра.

**Продолжительность исследования**

Набор пациентов в исследование и экспериментальные работы проведены в ноябре 2016 г. Анализ результата экспериментальных работ осуществлен в 2017 г.

**Описание медицинского вмешательства и анализ в подгруппах**

Для каждого пациента выполняли физикальный осмотр и забор периферической венозной крови в объеме 30 мл по стандартной методике. Сравнение концентрации цитокинов в кондиционных средах и уровня генетической экспрессии в лимфоцитах периферической венозной крови проводилось между клетками, полученными у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмой, тяжелой бронхиальной астмой и контрольной группы; внутри групп пациентов сравнивали концентрации цитокинов до и после стимуляции лимфоцитов конканавалином А.

**Исходы исследования**

В рамках исследования оценивали показатели секреции интерлейкинов (interleukin, IL) 2, 12, 4, 5, 6 и фактора некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha, TNF $\alpha$ ), а также уровни экспрессии генов *LAT*, *ZAP-70* и *FYN* интактными лимфоцитами и при их стимуляции конканавалином А.

**Методы регистрации исходов**

Определяли концентрации шести цитокинов (IL2, IL12, TNF $\alpha$ , IL4, IL5 и IL6) до и после стимуляции конканавалином А. Для получения лимфоцитарной фракции крови использовали метод градиентного центрифугирования с использованием градиентов фиколла (пл. 1,077 г/см<sup>3</sup>, ПанЭко, Россия) и перколла (пл. 1,131 г/см<sup>3</sup>, Sigma, США). Клетки от каждого донора рассаживали на 10 лунок в концентрации 1 млн/мл в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (NuClone, США), L-глутамин (ПанЭко, Россия), пирувата натрия (ПанЭко, Россия), пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия), b-меркаптоэтанола (Sigma, США).

Для стимуляции лимфоцитов использовали стандартный митоген конканавалин А. В половину лунок с клетками, полученными от пациентов разных групп, добавляли конканавалин А в концентрации 5 мкг/мл, оставшиеся 5 лунок использовали в качестве контроля. Культивирование проводили в течение 4 сут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Направленность иммунного ответа в кондиционных средах образцов изучалась путем определения концентрации цитокинов при помощи наборов eBioscience для иммуноферментного анализа (ИФА), согласно рекомендациям производителя, на анализаторе Sunrise (Tecan, Австрия).

Исследовали экспрессию трех генов — *LAT*, *ZAP-70* и *FYN*. Для выделения суммарной РНК из снятой с плашки культуры лимфоцитов, ресуспендированных в полной питательной среде RPMI-1640, клетки осаждались центрифугированием. Выделение суммарной РНК проводили реагентом TRIzol Reagent по стандартному протоколу производителя. Концентрацию полученной суммарной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Для синтеза комплементарной ДНК использовали набор реактивов RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Подбор праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени производили с использованием программы CLC Bio 6 (США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали 5X готовую реакционную смесь с интеркалирующим красителем SYBR Green I qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Полимеразную цепную реакцию проводили на планшетном анализаторе для ПЦР в режиме реального времени CFX96 Bio-Rad. Уровень экспрессии мРНК генов цитокинов выражали по отношению к экспрессии мРНК  $\beta$ -актина.

**Этическая экспертиза**

Протокол клинического исследования был одобрен Локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России (выписка № 4948 от 31.10.2016).

**Статистический анализ**

Размер выборки предварительно не рассчитывали. Статистическая обработка проводилась с использованием языка программирования R [16]. Для оценки вклада состояния пациентов (здоров, тяжелая БА, резистентная БА) в совокупный профиль цитокиновой секреции использовалось неметрическое многомерное шкалирование. Для этого проводился расчет расстояний между пациентами в метрике Брея–Кертиса, в качестве «координат» пациента использовали логарифм значений концентрации цитокинов. Для подтверждения влияния состояния пациента на цитокиновую секрецию применяли непараметрический дисперсионный анализ с использованием пакета *vegan* [17]. Корреляция между матрицами расстояний до и после стимуляции конканавалином А оценивалась с использованием прокрустового анализа и теста Мантела. Для попарного корреляционного анализа использовалась ранговая корреляция Спирмена, реализованная в пакете *base* языка R [16]. Визуализация выполнена в пакете *ggplot2* [18].

Для статистического анализа генетической экспрессии использовали показатели кратности различия (Fold change), концентрации цитокинов логарифмировали по основанию два. Для оценки различий в концентрациях цитокинов и генетической экспрессии в трех группах в зависимости от заболевания последовательно использовались критерии Краскела–Уоллиса и U-тест Манна–

Таблица 1. Участники исследования

Показатель	Контроль (n=10)	ТБА (n=10)	ТРБА (n=10)
Рост, см	169,7±9,3	162,3±7,7	163,2±9,2
Вес, кг	60,6±12	80,6±12,6*	90,0±25,5*
Возраст, лет	24±5,5	57±12,5*	60,8±8,1*
Соотношение полов, м/ж	1/9	1/9	2/8

Примечание. ТБА — тяжелая бронхиальная астма, ТРБА — терапевтически резистентная бронхиальная астма, контроль — контрольная группа. \* — различия по сравнению с контролем  $p < 0,05$  ( $p$ -значения приведены после применения поправки по Бенджамини–Хохбергу).

Уитни–Вилкоксона, при анализе связанных выборок (до и после стимуляции) использовался критерий Вилкоксона. Коррекция значений  $p$  на множественное сравнение проводилась при помощи метода Бенджамини–Хохберга, различия считались достоверными при значениях  $p < 0,05$  после применения поправки. Значения приведены в виде медианы ([Q1; Q3] пг/мл).

### Результаты

#### Объекты (участники) исследования

В исследование были включены 30 человек, из них 10 пациентов экспериментальной группы (тяжелая терапевтически резистентная бронхиальная астма) и 10 — группы сравнения (тяжелая бронхиальная астма без резистентности), принимавшие участие в исследовании ранее [8], а также 10 добровольцев контрольной группы без проявлений бронхиальной астмы и атопии (табл. 1).

#### Основные результаты исследования

При оценке связи состояния (здоров, тяжелая БА, резистентная БА) индивида и цитокиновой секреции была установлена ассоциация фенотипа болезни и профиля секреции нестимулированных лимфоцитов ( $R^2=0,17$  и  $p=0,009$ ; рис. 1, А). Однако при анализе группы стимулированных конканавалином лимфоцитов вклад фенотипа болезни в вариабельность концентрации цитокинов отсутствовал ( $R^2=0,12$  и  $p=0,12$ ; рис. 1, Б). При этом была установлена корреляция между концентрациями цитокинов в кондиционных средах интактных и стимулирован-

ных клеток (прокрустов анализ:  $R^2=0,42$  и  $p=0,011$ ; тест Мантела:  $R^2=0,33$  и  $p=0,004$ ).

При сравнении уровней секреции лимфоцитами отдельных цитокинов было установлено, что в лимфоцитах, полученных от пациентов с терапевтически резистентной бронхиальной астмой, наблюдалась повышенная продукция IL2 ( $p=0,008$ ; рис. 2, А) и IL4 ( $p=0,008$ ; рис. 2, Б) по сравнению с пациентами с тяжелой бронхиальной астмой. В то же время добавление конканавалина А в культуральную среду лимфоцитов не приводило к увеличению секреции этих цитокинов клетками пациентов с резистентной БА.

При сравнении цитокиновой секреции лимфоцитов внутри групп в зависимости от стимуляции было замечено, что у клеток пациентов с тяжелой БА наблюдался наиболее выраженный ответ на стимуляцию конканавалином А. Так, в этой группе отмечалось повышение концентраций 5 из 6 исследованных цитокинов — IL6, IL4, IL2, IL5, а также TNF $\alpha$  (табл. 2). При стимуляции лимфоцитов, полученных в контрольной группе, отмечалась повышенная продукция 4 из 6 цитокинов — IL6, IL4, IL5 и TNF $\alpha$  (см. табл. 2). Лимфоциты пациентов с терапевтически резистентной БА в ответ на стимуляцию демонстрировали повышение лишь TNF $\alpha$  и IL5 (см. табл. 2).

В ходе оценки генетической экспрессии в лимфоцитах пациентов с резистентной БА была установлена повышенная экспрессия гена *FYN* как в интактных, так и в стимулированных конканавалином А клетках. В лимфоцитах пациентов контрольной группы определялся наиболее низкий уровень экспрессии этого гена (табл. 3). При стимуляции конканавалином А отмечается повышение

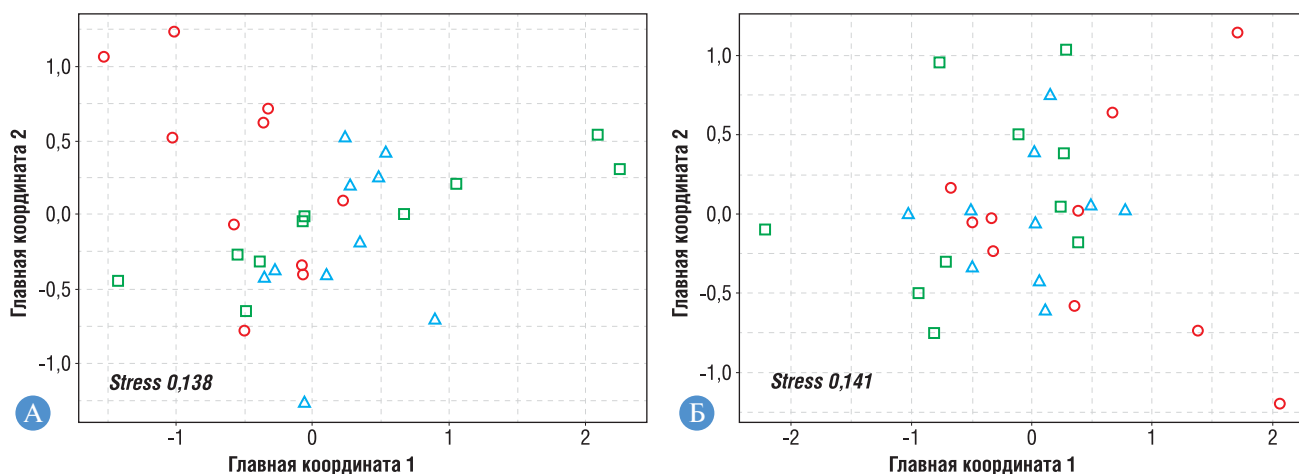


Рис. 1. Графики неметрического многомерного шкалирования пациентов до (А) и после (Б) стимуляции конканавалином А на основе информации о концентрациях цитокинов

Примечание. Синим треугольником обозначены лица контрольной группы, красным кругом — пациенты с резистентной бронхиальной астмой, зеленым квадратом — пациенты с тяжелой бронхиальной астмой.

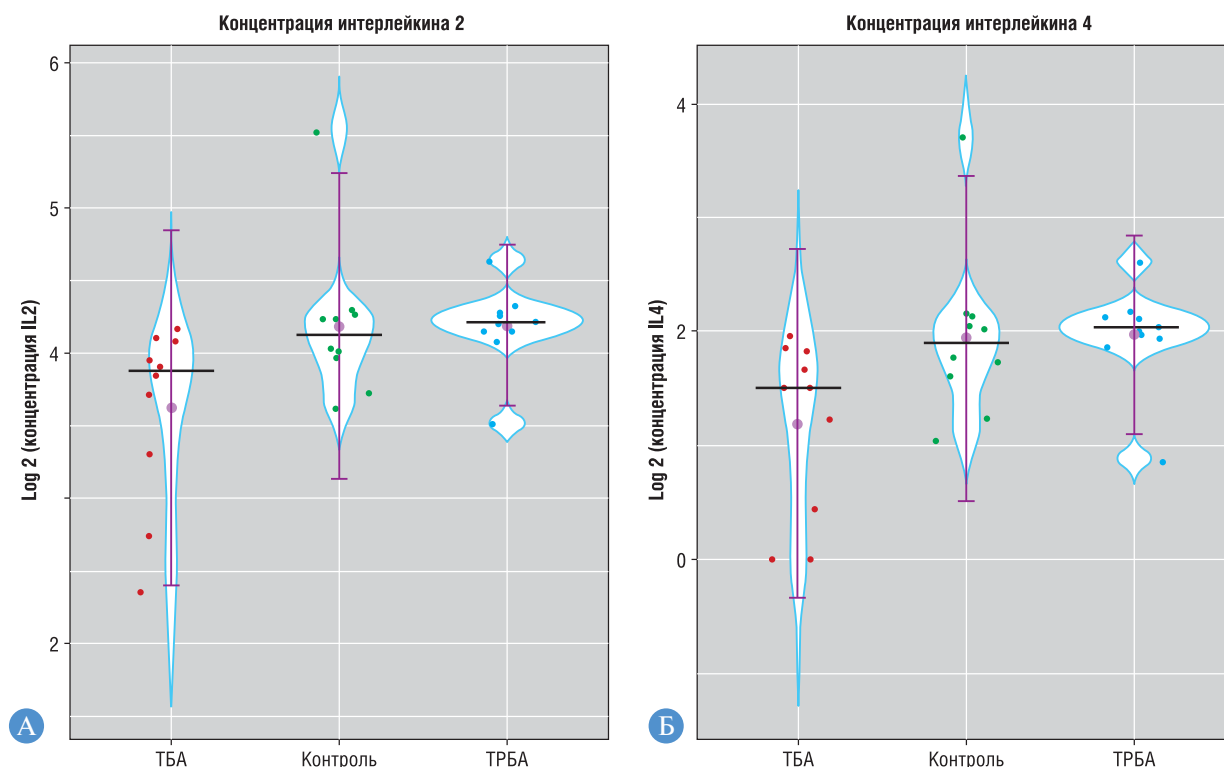


Рис. 2. Концентрации IL2 (А) и IL4 (Б) в клетках пациентов без стимуляции конканавалином А

Примечание. На графике точками обозначены логарифмированные значения концентрации цитокинов в клетках отдельных пациентов, вертикальной чертой — медианы концентраций по группе, фиолетовой точкой — среднее арифметическое по группе, фиолетовым разбросом — стандартное отклонение; границы графика показывают плотность распределения значений концентрации цитокинов. ТБА — тяжелая бронхиальная астма, ТРБА — терапевтически резистентная бронхиальная астма, контроль — контрольная группа.

Таблица 2. Цитокиновая секреция до и после стимуляции конканавалином А

Цитокин		IL2	IL4	IL5	IL6	IL12	TNF $\alpha$
Заболевание	Контроль						
	До стимуляции	16,45 [14,67; 18,23]	2,72 [2,16; 3,29]	0,64 [0,25; 1,02]	3,61 [1,70; 5,69]	0,15 [0,09; 0,58]	0,45 [0,23; 3,38]
	После стимуляции	23,96 [19,61; 26,93]	5,1 [3,72; 6,04]	4,29 [2,74; 11,42]	14,31 [7,93; 18,44]	0,34 [0,23; 0,56]	26,71 [14,88; 52,75]
	<i>p</i> *	0,058	0,041	0,004	0,004	0,625	0,004
ТБА	До стимуляции	13,68 [9,73; 15,66]	1,85 [0,60; 2,47]	0,64 [0,30; 0,86]	0,77 [0,63; 2,08]	0,32 [0,32; 0,47]	1,10 [0,17; 1,97]
	После стимуляции	22,78 [14,67; 30,29]	4,72 [2,16; 7,10]	5,84 [2,74; 11,75]	5,52 [3,16; 13,77]	0,46 [0,32; 0,63]	21,94 [5,66; 28,34]
	<i>p</i> *	0,015	0,015	0,006	0,006	0,726	0,015
ТРБА	До стимуляции	17,64 [16,85; 18,43]	3,10 [2,85; 3,35]	1,19 [0,86; 1,47]	2,22 [0,59; 28,34]	0,46 [0,36; 1,01]	1,10 [0,34; 6,20]
	После стимуляции	20,01 [17,24; 21,99]	3,85 [2,97; 4,47]	7,27 [3,07; 70,22]	13,63 [8,56; 24,14]	0,70 [0,51; 0,94]	22,15 [13,25; 64,58]
	<i>p</i> *	0,234	0,234	0,029	0,097	0,146	0,029

Примечание. ТБА — тяжелая бронхиальная астма, ТРБА — терапевтически резистентная бронхиальная астма, контроль — контрольная группа. \* — *p*-значения приведены после применения поправки по Бенджамини–Хохбергу.

Таблица 3. Экспрессия генов FYN и ZAP-70 в группах

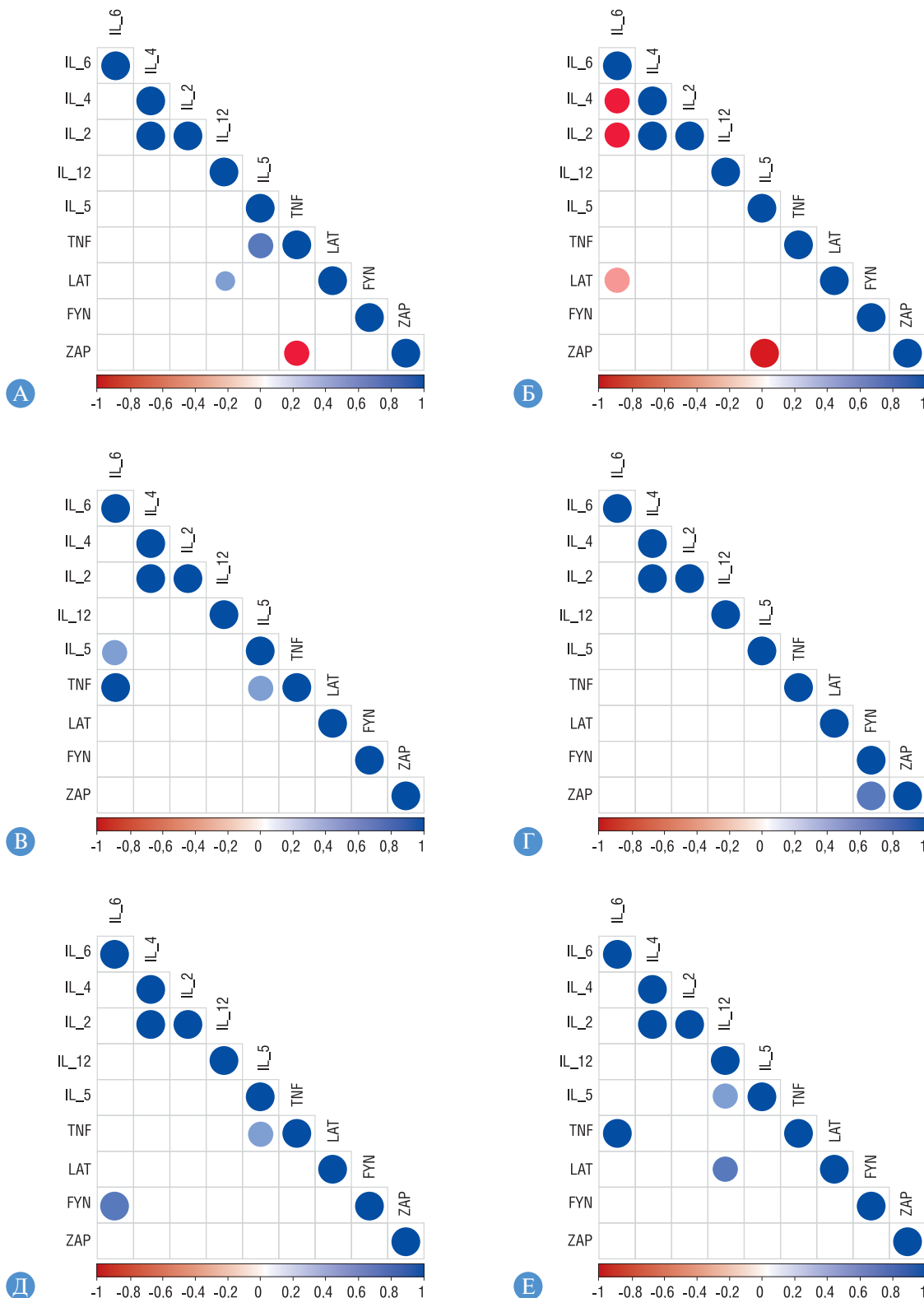
Экспрессия гена	Группа сравнения	До стимуляции		После стимуляции	
		Кратность различия	<i>p</i> *	Кратность различия	<i>p</i> *
FYN	ТРБА-контроль	56,4 [37,8; 87,3]	0,006	45,7 [29,2; 88,1]	0,0003
	ТРБА-ТБА	10,1 [6,8; 15,6]	0,006	14,8 [9,4; 28,5]	0,009
	ТБА-контроль	6,1 [4,2; 11,1]	0,006	3,6 [1,9; 6,5]	0,02
ZAP-70	ТРБА-контроль	6,8 [2,2; 22,2]	0,077	4,9 [2,8; 8,5]	0,012
	ТРБА-ТБА	1,1 [0,4; 3,7]	0,888	2,8 [1,6; 4,9]	0,218
	ТБА-контроль	5,2 [2,9; 16,8]	0,089	1,5 [1,2; 2,7]	0,517

Примечание. ТБА — тяжелая бронхиальная астма, ТРБА — терапевтически резистентная бронхиальная астма, контроль — контрольная группа. \* — *p*-значения приведены после применения поправки по Бенджамини–Хохбергу.

экспрессии гена *ZAP-70* в лимфоцитах пациентов с резистентной БА по сравнению с контролем (см. табл. 3).

При оценке корреляции между уровнями генетической экспрессии и секрецией цитокинов установ-

лено, что во всех группах отмечается положительная корреляция между концентрациями цитокинов IL2 и IL4 в кондиционных средах как при наличии, так и при отсутствии стимуляции (рис. 3). Положительная



**Рис. 3.** Корреляции между цитокиновой секрецией и генетической экспрессией при стимуляции конканавалином А и без таковой в клетках пациентов контрольной группы (А, Б), пациентов с тяжелой бронхиальной астмой (В, Г) и пациентов с терапевтически резистентной бронхиальной астмой (Д, Е) соответственно

*Примечание.* Точками на графике отмечены статистически достоверные попарные корреляции ( $p < 0,05$ ); цвет точек показывает направление корреляции (красные оттенки — отрицательная, синие оттенки — положительная); насыщенность цвета и размер точек демонстрируют силу корреляции (чем больше точка и темнее цвет, тем выше значение).

корреляция между IL5 и TNF $\alpha$  наблюдалась в кондиционных средах лимфоцитов пациентов всех групп при добавлении конканавалина А. В кондиционных средах пациентов с терапевтически резистентной БА без стимуляции наблюдалась корреляция между IL6 и TNF $\alpha$ , что было характерно и для пациентов с тяжелой БА при наличии стимуляции. Также при терапевтически резистентной БА в отсутствие стимуляции наблюдалась корреляция между IL12 и LAT, что свойственно лимфоцитам группы здорового контроля при стимуляции (см. рис. 3).

## Обсуждение

### Резюме основного результата исследования

Установлен достоверный вклад состояния индивида (здоров, тяжелая БА, резистентная БА) в профиль секреции лимфоцитов без стимуляции конканавалином А за счет увеличения продукции цитокинов IL4 и IL2 клетками пациентов с терапевтической резистентностью по сравнению с больными тяжелой БА. В лимфоцитах пациентов с резистентной БА отмечался слабый цитокиновый ответ на стимуляцию конканавалином по сравнению с пациентами других групп. Наблюдалось повышение экспрессии гена *FYN* в ряду «здоровые – тяжелая БА – резистентная БА». Также отмечалось повышение экспрессии *ZAP-70* в клетках от пациентов с резистентной БА по сравнению с контролем при стимуляции конканавалином А.

### Обсуждение основного результата исследования

Таким образом, в эксперименте *ex vivo* нами подтверждено, что лимфоцитарная фракция анализируемых групп при отсутствии дополнительных стимулов имеет разный профиль секреции цитокинов. Различия в уровне экспрессии цитокинов клетками крови здоровых и больных БА являются установленным фактом [19]. В данном исследовании дифференциальная экспрессия цитокинов, ассоциированная с резистентностью, обусловлена повышением секреции цитокинов IL4 и IL2. Полученные данные согласуются с ранее опубликованными материалами: повышение секреции IL2 и IL4 Т-лимфоцитами является одним из характерных признаков наличия стероидной резистентности у пациентов с БА [19]. Добавление сочетания IL2 и IL4 к Т-лимфоцитам человека *in vitro* индуцирует стероидную резистентность на клетках здоровых доноров и у пациентов с терапевтически чувствительной астмой [19, 20].

Характерной особенностью терапевтически резистентной астмы является незначительное изменение цитокинового профиля лимфоцитов в ответ на стимулятор конканавалин А. В клетках здоровых доноров под действием конканавалина А отмечалось повышение продукции 4 из 6 цитокинов — IL6, IL4, IL5 и TNF $\alpha$ . У лимфоцитов пациентов с тяжелой БА при стимуляции конканавалином А повышалась секреция 5 из 6 исследованных цитокинов — IL6, IL4, IL2, IL5, а также TNF $\alpha$ . В группе резистентных в ответ на конканавалин вовлекались только TNF $\alpha$  и IL5. При этом во всех группах для концентраций этих двух цитокинов характерна положительная корреляция при добавлении конканавалина А, что может говорить о повышении concentra-

ции TNF $\alpha$  и IL5 как о результате неспецифического воздействия митогена, реализуемого вне зависимости от диагноза. Учитывая вышеперечисленное, а также исчезновение различий в цитокиновой секреции под воздействием конканавалина А, можно предположить, что Т-лимфоциты пациентов с резистентной бронхиальной астмой слабо отвечают на стимуляцию, что, возможно, и является причиной нечувствительности больных к стероидным препаратам.

Ранее было показано, что повышение экспрессии *ZAP-70*, скоординированное со снижением экспрессии *LAT*, характерно для терапевтически чувствительной БА [12]. Нами установлен рост экспрессии данного гена у пациентов с резистентной БА в присутствии конканавалина А, однако описанного ранее снижения активности гена *LAT* не наблюдается, что дополнительно свидетельствует о слабовыраженном ответе на стимулы при терапевтически резистентной БА.

Установлено повышение экспрессии гена *FYN* при резистентной БА как на интактных, так и на стимулированных конканавалином А клетках по сравнению с пациентами с тяжелой БА и группой здоровых. В клетках пациентов с терапевтически чувствительной БА также отмечается увеличение экспрессии данного гена по сравнению с контролем при всех режимах стимуляции. Тирозинкиназа *FYN* выступает одним из регуляторов апоптоза в злокачественных опухолях многих тканей человека, в частности она опосредует ингибирование апоптоза Т-клеток при опухолях крови [21]. Наряду с измененной экспрессией гена *FYN* вклад в угнетение апоптоза оказывает и повышение секреции IL4 и IL2 [22–24], также отмеченное нами у пациентов с терапевтически резистентной БА. Снижение темпов апоптоза Т-клеток и эозинофилов свойственно БА и является одним из механизмов нарушения чувствительности к стероидным препаратам [24, 25]. Ввиду этого на данный момент *FYN* является перспективной мишенью для дальнейшего изучения механизмов стероидной резистентности при БА. Изменение экспрессии данного гена с помощью молекулярно-биологических либо фармакологических подходов потенциально позволит модифицировать чувствительность клетки к стероидной терапии.

### Ограничения исследования

Учитывая небольшой объем выборки, необходимо дальнейшее изучение роли тирозинкиназы *FYN* в развитии терапевтической резистентности при бронхиальной астме, в том числе с использованием подходов по изменению экспрессии данного гена у пациентов.

## Заключение

Лимфоцитарная фракция клеток пациентов с терапевтически резистентной БА характеризуется слабым изменением цитокинового профиля при стимуляции митогеном конканавалином А по сравнению с группами больных БА и здоровыми индивидами. Терапевтическая резистентность при БА характеризуется профилем цитокиновой секреции и генетической экспрессии, который характерен для клеток с низкой чувствительностью к проапоптотическим стимулам. Ген *FYN* является перспективной мишенью для поиска подходов для преодоления резистентности к стероидным препаратам при БА.

**Источник финансирования**

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол\_а № 16-34-00778 «Исследование направленности иммунного ответа и генетической экспрессии у больных с тяжелой терапевтически-резистентной бронхиальной астмой».

**Конфликт интересов**

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**Участие авторов**

В.А. Петров, Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов — дизайн исследования; Е.С. Куликов, Н.А. Кириллова — набор образцов и клиническое исследование; И.В. Салтыкова, К.В. Невская, Ю.Б. Дорофеева, С.П. Лежава — лабораторное исследование; В.А. Петров — анализ данных; В.А. Петров, И.В. Салтыкова, К.В. Невская — текст статьи. Все авторы принимали значимое участие в проведении исследования и подготовке статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol.* 2015;16(1):45–56. doi: 10.1038/ni.3049.
2. Loddenkemper R, Gibson GJ, Sibille Y. The burden of lung disease in Europe: why a European White Book on lung disease? *Eur Respir J.* 2003;22(6):869. doi: 10.1183/09031936.03.00107803.
3. Lo CY, Michaeloudes C, Bhavsar PK, et al. Increased phenotypic differentiation and reduced corticosteroid sensitivity of fibrocytes in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(5):1186–1195.e1–6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.031.
4. Kim RY, Rae B, Neal R, et al. Elucidating novel disease mechanisms in severe asthma. *Clin Transl Immunology.* 2016;5(7):e91. doi: 10.1038/cti.2016.37.
5. Clemmer GL, Wu AC, Rosner B, et al. Measuring the corticosteroid responsiveness endophenotype in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(2):274–281.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.029.
6. Choy DF, Hart KM, Borthwick LA, et al. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci Transl Med.* 2015;7(301):301ra129. doi: 10.1126/scitranslmed.aab3142.
7. Gauthier M, Chakraborty K, Oriss TB, et al. Severe asthma in humans and mouse model suggests a CXCL10 signature underlies corticosteroid-resistant Th1 bias. *JCI Insight.* 2017;2(13):e94580. doi: 10.1172/jci.insight.94580.
8. Куликов Е.С., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., и др. Динамика генной экспрессии у больных тяжелой терапевтически резистентной астмой на фоне терапии // Бюллетень сибирской медицины. — 2014. — Т.13. — №1 — С. 47–55. [Kulikov YeS, Ogorodova LM, Freidin MB, et al. Gene expression dynamics in patients with severe therapy-resistant asthma during treatment period. *BSM.* 2014;13(1):47–55. (In Russ).]
9. Miyaji M, Kortum RL, Surana R, et al. Genetic evidence for the role of Erk activation in a lymphoproliferative disease of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(34):14502–14507. doi: 10.1073/pnas.0903894106.
10. Li CY, Peng J, Ren LP, et al. Roles of histone hypoacetylation in LAT expression on T cells and Th2 polarization in allergic asthma. *J Transl Med.* 2013;11:26. doi: 10.1186/1479-5876-11-26.
11. Kunii N, Zhao Y, Jiang S, et al. Enhanced function of redirected human T cells expressing linker for activation of T cells that is resistant to ubiquitylation. *Hum Gene Ther.* 2013;24(1):27–37. doi: 10.1089/hum.2012.130.
12. Guo XJ, Li J, Ni PH, et al. [The transcription levels of linker for activation of T cell and its upstream regulatory factors in T cells of asthmatic patients. (In Chinese).] *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2008;31(2):125–128.
13. Szczepankiewicz A, Sobkowiak P, Rachel M, et al. Multilocus analysis of candidate genes involved in neurogenic inflammation in pediatric asthma and related phenotypes: a case-control study. *J Asthma.* 2012;49(4):329–335. doi: 10.3109/02770903.2012.669442.
14. Chikanza IC, Kozaci D, Chernajovsky Y. The molecular and cellular basis of corticosteroid resistance. *J Endocrinol.* 2003;179(3):301–310. doi: 10.1677/joe.0.1790301.
15. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(6):2341–2351. doi: 10.1164/ajrccm.162.6.ats9-00
16. R Core Team (2016) [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.r-project.org/>
17. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, et al. *Ordination methods, diversity analysis and other functions for community and vegetation ecologists* [Internet]. Vegan: Community Ecology Package; 2017 [cited 2018 Jul 29]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
18. Wickham H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. New York, USA: Springer-Verlag New York; 2009. 213 p. doi: 10.1007/978-0-387-98141-3.
19. Goleva E, Li LB, Leung DY. IFN-gamma reverses IL-2 and IL-4-mediated T-cell steroid resistance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(2):223–230. doi: 10.1165/rcmb.2007-0327OC.
20. Liang Q, Guo L, Gogate S, et al. IL-2 and IL-4 stimulate MEK1 expression and contribute to T cell resistance against suppression by TGF-beta and IL-10 in asthma. *J Immunol.* 2010;185(10):5704–5713. doi: 10.4049/jimmunol.1000690.
21. Laurenzana I, Caivano A, Trino S, et al. A Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine compound inhibits Fyn phosphorylation and induces apoptosis in natural killer cell leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(40):65171–65184. doi: 10.18632/oncotarget.11496.
22. Brunetti M, Martelli N, Colasante A, et al. Spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes. *Blood.* 1995;86(11):4199–4205.
23. Xie H, Seward RJ, Huber BT. Cytokine rescue from glucocorticoid induced apoptosis in T cells is mediated through inhibition of IkappaBalpha. *Mol Immunol.* 1997;34(14):987–994. doi: 10.1016/s0161-5890(97)00128-4.
24. Pazdrak K, Straub C, Maroto R, et al. Cytokine-induced glucocorticoid resistance from eosinophil activation: protein phosphatase 5 modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and signaling. *J Immunol.* 2016;197(10):3782–3791. doi: 10.4049/jimmunol.1601029.
25. Pace E, Gagliardo R, Melis M, et al. Synergistic effects of fluticasone propionate and salmeterol on in vitro T-cell activation and apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(5):1216–1223. doi: 10.1016/j.jaci.2004.07.052.



## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**\*Петров Вячеслав Алексеевич [Vyacheslav A. Petrov];** адрес: 634001, Томск, ул. Московский тракт, д. 2 г, стр. 18 [address: 2g bld.18, Moskovskiy trakt, 634001 Tomsk, Russia]; **e-mail:** vyacheslav.a.petrov@mail.ru, **SPIN-код:** 9635-2243, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5205-9739>

**Салтыкова Ирина Владимировна [Irina V. Saltykova];** e-mail: ira.saltikova@mail.ru, **SPIN-код:** 9432-3873, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0457-5392>

**Невская Ксения Владимировна [Ksenia V. Nevskaya];** e-mail: nevskayaksenia@gmail.com, **SPIN-код:** 1405-0472, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

**Дорофеева Юлия Борисовна [Julia B. Dorofeeva];** e-mail: julia.dorofeeva25@gmail.com, **SPIN-код:** 9890-8870, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9301-4465>

**Лежава София Паатавна [Sofiya P. Lezhava];** e-mail: lezhavasofiya@gmail.com; **SPIN-код:** 9629-7318, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8806-8231>

**Кириллова Наталья Александровна [Natalya A. Kirillova];** e-mail: kirillova.natalya@gmail.com, **SPIN-код:** 8308-5833, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9549-9614>

**Куликов Евгений Сергеевич,** д.м.н., профессор [Evgeny S. Kulikov, MD, PhD, professor]; **e-mail:** evgeny.s.kulikov@gmail.com, **SPIN-код:** 9934-1476, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0088-9204>

**Сазонов Алексей Эдуардович [Alexey E. Sazonov];** e-mail: sazonov\_al@mail.ru, **SPIN-код:** 6177-6729, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8611-5770>

**Огородова Людмила Михайловна,** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАМН [Ludmila M. Ogorodova, MD, PhD, Professor]; **e-mail:** lm-ogorodova@mail.ru, **SPIN-код:** 4362-8431, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2962-1076>