

УДК 616.248-079.4:575.117.2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

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

¹ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, e-mail: evgeny.s.kulikov@gmail.com;

²ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск, e-mail: mfreidin@rambler.ru

Введение. В настоящее время доминирующие механизмы тяжелой формы и терапевтической резистентности при астме пока не определены. Целью нашего исследования была оценка дифференциальной экспрессии генов при тяжелой бронхиальной астме. Методы. Проведено проспективное интервенционное исследование в параллельных группах с продолжительностью лечебного периода 24 недели. Апостериорно в соответствии с критериями ATS группа пациентов с тяжелой астмой была разделена на терапевтически чувствительных и резистентных пациентов. Глобальный уровень экспрессии генов определен в лимфоцитах периферической крови с помощью микрочипа Affymetrix HuGene ST1.0. Результаты. Исходно в сравниваемых группах больных БА идентифицированы 1388 генов, экспрессия которых статистически значимо различалась. К окончанию периода наблюдения (24 недели) на фоне базисной противовоспалительной терапии их количество достигло 4041 гена. Также к окончанию лечебного периода зарегистрировано 1209 генов, характеризующихся отличием в уровне экспрессии у больных ТРБА по сравнению с пациентами других сравниваемых групп. Заключение. Исходно сравниваемые группы характеризуются различными профилями экспрессии генов, а в течение периода наблюдения на фоне базисной противовоспалительной терапии эти различия нарастают преимущественно за счет изменения экспрессии в группе ТРБА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, терапия, тяжелая бронхиальная астма, терапевтическая резистентность, экспрессия генов

COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN SEVERE ASTHMA

¹Kulikov E.S., ¹Ogorodova L.M., ²Freydin M.B., ¹Saltikova I.V.,
¹Deev I.A., ¹Selivanova P.A.

¹Siberian State Medical University, Tomsk, e-mail: evgeny.s.kulikov@gmail.com;

²Research Institute of Medical Genetics SB RAMS, Tomsk, e-mail: mfreidin@rambler.ru

Background and objective: The leading mechanisms and causes of severe and therapy resistant asthma are poorly understood. The aim of this study was to define differential gene expression in severe asthma. Methods: Performed 24-week prospective interventional study in parallel groups. Severe asthma patients was aposterior divided at therapy sensitive and resistant patients according to ATS criteria. Global transcriptome profile was characterized using the Affymetrix Hu Gene ST1.0 chip. Results: 1388 genes were differentially expressed in one or several compared groups – mild, severe and therapy resistant asthma. At the end of treatment period (basis therapy) amount of differentially expressed genes were 4041. 1209 genes were differentially expressed in therapy resistant asthma compare to other groups, these result supported the view that therapy resistant asthma characterized by a unique set of genes compared with the other two groups. Conclusion: Mild, severe and therapy resistant asthma characterized by different gene expression profiles and during treatment period these differences increased, predominantly in therapy resistant asthma group.

Keywords: bronchial asthma, therapy, severe bronchial asthma, therapy resistance, gene expression

Тяжелая астма составляет 18% в общей структуре заболевания [4]. Наряду с высокими показателями потребления ресурсов здравоохранения тяжелая бронхиальная астма (БА) ассоциирована с частыми жизнеугрожающими состояниями и высоким риском смерти, что позволяет отнести ее к одной из наиболее актуальных проблем современной медицины [2].

В течение последнего десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении молекулярных механизмов тяжелой БА. Так, в многочисленных доказательных исследованиях определены наиболее вероятные причинные факторы и молекулы, лежащие в основе формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности, которые могли бы быть использованы как в диагно-

стических целях, так и стать новыми таргетными мишенями терапии БА [8].

В то же время утверждать, что сегодня имеется полное понимание механизмов формирования тяжелой астмы и терапевтической резистентности, не представляется возможным.

Большинство опубликованных исследований обладает рядом ограничений, во-первых, они разнородны по своим целям и задачам, выполнены на неоднородных выборках пациентов с точки зрения степени тяжести и/или уровне контроля болезни субъектов, все это не позволяет объединить результаты этих исследований и сформировать полную теоретическую концепцию.

Во-вторых, опубликовано ограниченное количество работ, в которых в качестве

субъектов выступали пациенты с тяжелой терапевтически резистентной БА или представители фенотипов тяжелой астмы.

В этой связи представляется актуальным планирование и выполнение транскриптомного исследования тяжелой астмы, которое позволит оценить профили экспрессии генов, что даст возможность определить механизмы формирования терапевтической резистентности.

Материалы и методы исследования

Было спланировано и проведено по единому протоколу проспективное интервенционное исследование в параллельных группах с продолжительностью лечебного периода 24 недели. Протокол исследования был разработан в соответствии со стандартом ICH GCP и прошел этическую экспертизу.

Диагноз БА был установлен в соответствии с критериями GINA [1]. Было сформировано 2 группы пациентов – легкая персистирующая и тяжелая БА. Клиническое течение заболевания на момент включения в исследование в соответствии с критериями контроля должно было быть расценено как неконтролируемое. В рамках исследования в соответствии с протоколом пациенту назначались следующие фармакотерапевтические режимы: легкая персистирующая БА – флутиказона пропионат (ФП) 250 мкг/сут, тяжелая астма – сальметерол/ФП – 1000 мкг/сут по ФП.

По окончании лечебного периода, в соответствии с оценкой эффективности терапии и критериями ATS (2000), группа пациентов с тяжелой БА апостериорно

разделена на терапевтически чувствительных (ТЧБА) и резистентных пациентов (ТРБА) [6]. Клиническая характеристика представлена в таблице.

Глобальный уровень экспрессии генов определен в лимфоцитах периферической крови у исследованных больных с помощью микрочипа Affymetrix HuGene ST1.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA), содержащего пробы для 28875 генов. Выделение РНК, пробоподготовку, гибридизацию и сканирование микрочипов проводили в соответствии с протоколами Affymetrix. Гибридизация, окрашивание, промывка и сканирование микрочипов выполнена с помощью устройства GeneTitan. Полученные после сканирования изображения микрочипов конвертировали в экспрессионные сигналы с помощью программного обеспечения компании Affymetrix. Эти файлы затем использовали для оценки качества мечения и гибридизации микрочипов, а также препроцессинга, включающего коррекцию на фон, квантильную нормализацию и суммирование экспрессионных сигналов с помощью программы Affymetrix Power Tools 1.12.0. Последующий анализ проводили в программной среде R. Уровень экспрессии генов в различных группах сравнивали путем построения линейных моделей с помощью пакета limma [7], включая анализ линейных контрастов между сравниваемыми группами (легкая БА, ТЧБА, ТРБА). Поправку на множественные сравнения проводили с помощью подхода False Discovery Rate (FDR) [3].

Для построения перечня генов с дифференциальной экспрессией значение $p < 0,05$ после поправки на множественные сравнения расценивали как статистически значимое в любом из трех сравниваемых контрастов.

Клиническая характеристика групп сравнения

Показатель	Легкая БА ($n = 5$)	ТЧБА ($n = 20$)	ТРБА ($n = 20$)
Возраст (лет)	53,80 ± 0,97	47,15 ± 3,20	51,40 ± 2,52
Кол-во дневных симптомов за последние 7 дней	6,00 ± 1,97	12,45 ± 1,51	21,35 ± 2,13*
Кол-во ночных симптомов за последние 7 дней	0,80 ± 0,20	2,55 ± 0,47	5,05 ± 1,15
Стаж заболевания (лет)	9,00 ± 2,24	9,75 ± 1,94	16,65 ± 1,88*
Частота вызовов скорой помощи за последние 12 мес.	–	0,15 ± 0,15	2,60 ± 1,23*
ОФВ1 (%)	99,36 ± 5,57	68,10 ± 1,89	61,97 ± 1,97*
РС20 (мг/мл)	4,01 ± 3,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
АСТ-тест (балл)	20,40 ± 0,98	15,30 ± 0,58	12,40 ± 0,89*

Примечание. * – $p < 0,05$ – в сравнении с ТЧБА.

Результаты исследования и их обсуждение

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

Согласно полученным данным, наибольшее число генов со специфичной дифференциальной экспрессией зарегистрировано между ТРБА и легкой персистирующей БА ($n = 1201$). Значительно меньшее количество генов со специфичной экспрессией зарегистрировано при сравне-

нии ТЧБА и ТРБА ($n = 18$), а также ТЧБА и легкой БА ($n = 49$).

Для 43 генов установлены различия в уровне экспрессии одновременно при сравнении ТЧБА и ТРБА, а также резистентной формой и легкой БА. Таким образом, ТРБА специфическим образом характеризуется отличием в уровне экспрессии 43 генов от других исследованных групп. Также по результатам проведенного анализа установлено, что ТЧБА и легкая персистирующая астма характеризуются отличием в уровне экспрессии 22 и 55 генов соответственно (рис. 1).

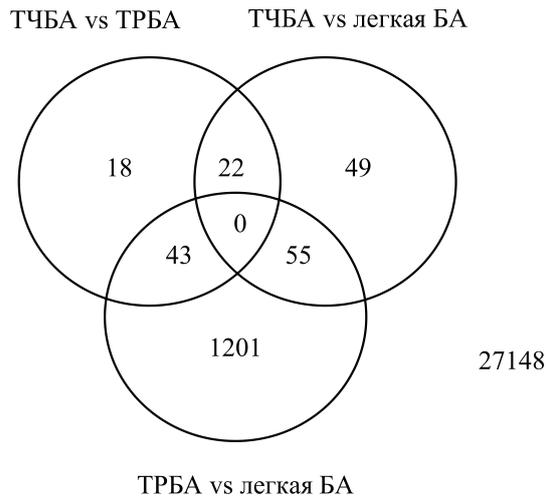


Рис. 1. Количество генов с отличающейся экспрессией на Визите 1 ($p < 0,05$)

Анализ транскриптома образцов, полученных на Визите 4 (24 недели терапии), идентифицировал 4041 ген, экспрессия которых статистически значимо различалась между сравниваемыми группами.

Согласно полученным данным, наибольшее число генов со специфичной дифференциальной экспрессией зарегистрировано между ТЧБА и ТРБА ($n = 1664$). Меньшее количество генов со специфичной экспрессией зарегистрировано между ТРБА и легкой БА ($n = 1035$) и ТЧБА и легкой БА ($n = 39$).

Для 1209 генов установлены различия в уровне экспрессии одновременно при сравнении ТЧБА и ТРБА, а также ТРБА и легкой БА. Таким образом, ТРБА специфическим образом характеризуется отличием в уровне экспрессии 1209 генов от других исследованных групп. Также по результатам проведенного анализа установлено, что ТЧБА и легкая персистирующая астма характеризуются отличием в уровне экспрессии 44 и 45 генов соответственно (рис. 2).

Заключение

В рамках данного исследования исходно в сравниваемых группах больных БА идентифицированы 1388 генов, экспрессия которых статистически значимо различалась. Необходимо отметить, что такая «количественная» характеристика различий сопоставима с результатами исследования Orsmark-Pietras С., проведенного в 2013 году, которое выполнено на детской популяции [5].

Наблюдаемые в нашем исследовании различия в количестве генов со специфичной экспрессией, вероятно, могут свиде-

тельствовать о том, что легкая и тяжелая форма болезни отличаются большим количеством возможных механизмов, лежащих в основе формирования тяжести, а в основе формирования терапевтической резистентности в группе тяжелой астмы лежит значительно меньшее количество вероятных механизмов.

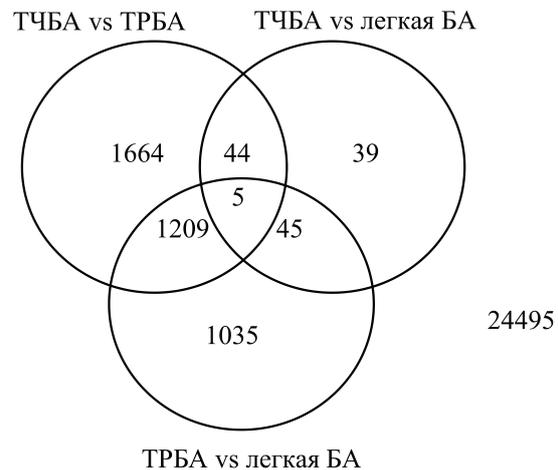


Рис. 2. Количество генов с отличающейся экспрессией на Визите 4 (24 недели) ($p < 0,05$)

В течение периода наблюдения (24 недели) общее количество генов с дифференциальной экспрессией изменялось и к окончанию периода наблюдения на фоне базисной противовоспалительной терапии их количество достигло 4041 гена. Необходимо отметить, что к окончанию лечебного периода зарегистрировано 1209 генов, характеризующихся отличием в уровне экспрессии у больных ТРБА по сравнению с пациентами других сравниваемых групп.

Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что исходно сравниваемые группы характеризуются различными профилями экспрессии генов, а в течение периода наблюдения на фоне базисной противовоспалительной терапии эти различия нарастают преимущественно за счет изменения экспрессии в группе ТРБА.

Список литературы

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / под ред. А.С. Белевского. – М.: Российское респираторное общество, 2012. – 108 с., ил.
2. Чучалин А.Г., Пыжева Е.С., Колганова Н.А. Социально-экономическая значимость заболеваемости бронхиальной астмой и ее стоимостное определение // Экономика здравоохранения. – 1997. – № 4–5. – С. 29–37.
3. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // J R Stat Soc B. – 1995. – 57. P 289–300.
4. Bergquist P., Crompton G.K. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study // Eur Respir J. – 2001. – Jul;18(1). – P. 248.

5. Orsmark-Pietras C., James A., Konradsen J.R. et al. Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics // *Eur Respir J.* – 2013. – 42(1). – P. 65–78.

6. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions // American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med.* – 2000. – Dec;162(6). – P. 2341–2351.

7. Smyth, G. K. (2005). Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, New York, P. 397–420.

8. Voelkel N., Spiegel S. Why is effective treatment of asthma so difficult? An integrated systems biology hypothesis of asthma // *Immunol Cell Biol.* – 2009. – 87 (8). – P. 601–605.

References

1. Global'naja strategija lechenija i profilaktiki bronhial'noj astmy / Pod red. A.S. Belevskogo. M.: Rossijskoe respiratornoe obshhestvo, 2012. 108 P., illustrated.

2. Chuchalin A.G., Pyzheva E.S., Kolganova N.A. *Jekonomika zdravoohraneniya.* 1997. no. 4–5. pp. 29–37.

3. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *J R Stat Soc B.* 1995. 57. pp. 289–300.

4. Bergquist P., Crompton G.K. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study // *Eur Respir J.* 2001. Jul;18(1). pp. 248.

5. Orsmark-Pietras C., James A., Konradsen J.R. et al. Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics // *Eur Respir J.* 2013. 42(1). pp. 65–78.

6. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions // American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000. Dec; 162(6). pp. 2341–2351.

7. Smyth G.K. (2005). Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, New York, pp. 397–420.

8. Voelkel N., Spiegel S. Why is effective treatment of asthma so difficult? An integrated systems biology hypothesis of asthma // *Immunol Cell Biol.* 2009. 87 (8). pp. 601–605.

Рецензенты:

Кобякова О.С., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой общей врачебной практики и поликлинической терапии, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск;

Федорова О.С., д.м.н., профессор кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 15.01.2014.