

# Экспрессия микроРНК miR-21 и miR-146a у пациентов мужского пола с перекрестным фенотипом бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких

Н.А.Дьяченко, А.С.Улитина, О.В.Лукина, С.Н.Пчелина, В.И.Трофимов, Ж.А.Миронова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

## Информация об авторах

**Дьяченко Николай Александрович** – аспирант кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В.Черноруцкого Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (905) 272-20-35; e-mail: diyachenko\_nickolay@hotmail.com

**Улитина Анна Сергеевна** – к. м. н., старший научный сотрудник отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий научно-исследовательского центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (812) 338-67-23; e-mail: anna.s.ulitina@yandex.ru

**Лукина Ольга Васильевна** – д. м. н., доцент кафедры рентгенологии и радиационной медицины, руководитель отделения рентгеновской компьютерной томографии № 2 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (812) 338-67-46; e-mail: grluk@yandex.ru

**Пчелина Софья Николаевна** – д. б. н., руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий научно-исследовательского центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (812) 338-67-23; e-mail: sopchelina@hotmail.com

**Трофимов Василий Иванович** – д. м. н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В.Черноруцкого Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (812) 338-67-46; e-mail: trofvi@mail.ru

**Миронова Жанна Александровна** – д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В.Черноруцкого Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (905) 252-42-74; (812) 338-78-98, e-mail: zhanmir@mail.ru

## Резюме

Пациенты с сочетанием бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) – перекрестным фенотипом (ПФ) БА и ХОБЛ – представляют собой отдельную нозологическую группу. ПФ БА + ХОБЛ является мультифакторным заболеванием. Существует гипотеза, что генетический контроль над развитием ПФ БА + ХОБЛ на посттранскрипционном уровне осуществляется с помощью регуляции экспрессии генов с участием микроРНК (miR) miR-21 и miR-146a; данные молекулы могут рассматриваться в качестве потенциальных диагностических маркеров ПФ БА и ХОБЛ. **Целью** настоящего исследования явилась оценка экспрессии miR-21, miR-146a у пациентов мужского пола с сочетанием БА и ХОБЛ по сравнению с лицами с изолированными БА и ХОБЛ. **Материалы и методы.** Обследованы пациенты ( $n = 65$ ) мужского пола ( $n = 48$ : 19 – с ПФ БА + ХОБЛ; 14 – БА, 15 – ХОБЛ) и лица контрольной группы ( $n = 17$ ). У всех больных выполнено комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование. Экспрессия miR-21, miR-146a оценена в периферической крови методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. **Результаты.** При ПФ БА + ХОБЛ установлены более низкие уровни miR-21 и miR-146a, чем в группах БА, ХОБЛ и контроля. У больных ПФ БА + ХОБЛ низкие уровни miR-21 и miR-146a, ассоциированные с меньшей длительностью заболевания и наличием коморбидной патологии (гипертоническая болезнь, стенокардия), выявлены у пациентов с дебютом заболевания в более старшем возрасте. Низкий уровень miR-21 ассоциировался с меньшей обратимостью бронхообструкции у этих пациентов, несмотря на эозинофильное воспаление в бронхах. **Заключение.** Продemonстрировано, что в рамках комплексной диагностики ПФ БА + ХОБЛ у мужчин целесообразно оценивать экспрессию miR-146a, miR-21 в периферической крови. МикроРНК miR-146a и miR-21 являются перспективными молекулярными мишенями для фенотип-специфической терапии у пациентов мужского пола с ПФ БА + ХОБЛ.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, перекрестный фенотип бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких, эпигенетика, микроРНК, miR-21, miR-146a, молекулярная диагностика.

Для цитирования: Дьяченко Н.А., Улитина А.С., Лукина О.В., Пчелина С.Н., Трофимов В.И., Миронова Ж.А. Экспрессия микроРНК miR-21 и miR-146a у пациентов мужского пола с перекрестным фенотипом бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология*. 2020; 30 (3): 263–269. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-3-263-269

## MicroRNA miR-21 and miR-146a expression in male with a combination of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease

Nikolay A. D'yachenko, Anna S. Ulitina, Olga V. Lukina, Sofya N. Pchelina, Vasiliy I. Trofimov, Zhanna A. Mironova

Academician I.P.Pavlov First Federal Saint-Petersburg State Medical University, Healthcare Ministry of Russia: ul. L'va Tolstogo 6–8, Saint-Petersburg, 197089, Russia

## Author information

**Nikolay A. D'yachenko**, Postgraduate student, Department of Hospital Therapy with a course of Allergy and Immunology, Academician I.P.Pavlov First Federal Saint-Petersburg State Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (905) 272-20-35; e-mail: diyachenko\_nickolay@hotmail.com  
**Anna S. Ulitina**, Candidate of Medicine, Senior Researcher, Department of Molecular, Genetic and Nanobiological Technologies, Academician I.P.Pavlov First Federal Saint-Petersburg State Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (812) 338-67-23; e-mail: anna.s.ulitina@yandex.ru  
**Olga V. Lukina**, Doctor of Medicine, Associate Professor, Department of Radiology and Radiation Medicine, Academician I.P.Pavlov First Federal Saint-Petersburg State Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (812) 338-67-46; e-mail: griluk@yandex.ru  
**Sofya N. Pchelina**, Doctor of Biology, Head of Department of Molecular, Genetic and Nanobiological Technologies, Academician I.P.Pavlov First Federal Saint-Petersburg State Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (812) 338-67-23; e-mail: sopchelina@hotmail.com  
**Vasily I. Trofimov**, Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Hospital Therapy with a course of Allergy and Immunology, Academician I.P.Pavlov First Federal Saint-Petersburg State Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (812) 338-67-46; e-mail: trofvi@mail.ru  
**Zhanna A. Mironova**, Doctor of Medicine, Professor of Department, Hospital Therapy with a course of Allergy and Immunology, Academician I.P.Pavlov First Federal Saint-Petersburg State Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (905) 252-42-74; (812) 338-78-98; e-mail: zhanmir@mail.ru

## Abstract

Patients with a combination of bronchial asthma (BA) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) crossed phenotype (CP) BA and COPD are a separate nosological group. CP BA and COPD is a multifactorial disease. There is a hypothesis that genetic control of CP BA and COPD development at the posttranscriptional level is carried out by regulation of gene expression involving microRNA (miR) miR-21 and miR-146a; these molecules can be considered as potential diagnostic markers of CP BA and COPD. **The purpose** of this study was to evaluate the expression of miR-21, miR-146a in male with a combination of BA and COPD compared to those with isolated BA and COPD. **Methods.** We examined male patients ( $n = 65$ ) ( $n = 48$ : 19 patients with CP BA and COPD; 14 patients with BA and COPD) and control group ( $n = 17$ ). All the patients underwent a comprehensive clinical-laboratory and instrumental examination. The expression of miR-21, miR-146a was estimated in peripheral blood by a real-time polymerase chain reaction. **Results.** CP BA and COPD have lower levels of miR-21 and miR-146a than the BA, COPD, and control groups. CP BA and COPD patients have low levels of miR-21 and miR-146a associated with shorter duration of the disease and the presence of comorbid pathology (hypertension, angina pectoris), revealed in patients with the disease debut at an older age. Low miR-21 was associated with lower reversibility of bronchial obstruction in these patients, despite eosinophilic inflammation in the bronchi. **Conclusion.** It has been demonstrated that within the framework of complex diagnostics of CP BA and COPD in males it is reasonable to evaluate miR-146a and miR-21 expression in peripheral blood. MicroRNA miR-146a and miR-21 are promising molecular targets for phenotype-specific therapy in males with CP BA and COPD.

**Key words:** bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease, combination of bronchial asthma, and chronic obstructive pulmonary disease, epigenetics, microRNA, miR-21, miR-146a, molecular diagnostics.

For citation: D'yachenko N.A., Ulitina A.S., Lukina O.V., Pchelina S.N., Trofimov V.I., Mironova Zh.A. MicroRNA miR-21 and miR-146a expression in male with a combination of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2020; 30 (3): 263–269 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-3-263-269

Бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) относятся к наиболее распространенным хроническим заболеваниям органов дыхания и различаются по этиологии, патогенезу, клинической картине и стратегиям фармакотерапии. Однако обе нозологические формы иногда сочетаются у одного и того же пациента; в настоящее время признано, что БА и ХОБЛ могут сосуществовать как отдельный, перекрестный фенотип (ПФ) БА и ХОБЛ, выделение и изучение которого важно с позиций как фундаментальной науки, так и практической медицины. Внимание исследователей к фенотипу ПФ БА + ХОБЛ обусловлено несколькими факторами. Во-первых, число пациентов с ПФ БА + ХОБЛ в мире неуклонно возрастает наряду с увеличением распространенности изолированных БА и ХОБЛ. Во-вторых, при ПФ БА + ХОБЛ наблюдаются более частые и тяжелые обострения заболевания. Такие пациенты, как правило, характеризуются наличием выраженной гипоксии из-за необратимой обструкции дыхательных путей; с другой стороны, больные ХОБЛ с астматическим компонентом страдают не только от одышки при физической нагрузке, но нередко и от приступов удушья ночью или рано утром с дистантными хрипами. В-третьих, методы лечения ПФ БА и ХОБЛ, основанные на принципах доказательной медицины, сформированы недостаточно, т. к. пациенты с ПФ БА + ХОБЛ до недавнего времени систематически исключались из клинических испытаний [1].

Таким образом, изучение молекулярных основ патогенеза ПФ БА + ХОБЛ является актуальной научно-практической задачей, поскольку лица с ПФ

БА + ХОБЛ представляют собой отдельную категорию пульмонологических пациентов.

Благодаря значительному прогрессу в изучении взаимосвязей между генами, их продуктами и факторами окружающей среды стала очевидной роль эпигенетической изменчивости — изменений экспрессии генов, не связанных с нарушением структуры ДНК, однако способных устойчиво передаваться в ряду поколений. Существуют 3 уровня эпигенетической регуляции и соответственно 3 ее основных механизма — геномный (метилование ДНК), протеомный (модификация гистонов) и транскриптомный (регуляция посредством РНК, в первую очередь микроРНК). МикроРНК представляют собой обширный класс малых некодирующих молекул РНК длиной 18–25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов путем комплементарного связывания с 3'-нетранслируемыми областями мРНК, в результате чего происходит разрушение молекулы мРНК или угнетение процесса трансляции [2]. МикроРНК участвуют в эпигенетической регуляции физиологических и патологических процессов в организме, в т. ч. органах дыхания [3]. Активность микроРНК, влияющих на состояние бронхов и легких, может изменяться под действием факторов внешней среды — сигаретного дыма, прочих поллютантов, диеты. Разработаны надежные методы детекции микроРНК в различных типах биологических образцов, в т. ч. периферической крови, с помощью которых можно осуществлять мониторинг этих малых молекул [4].

Данные последних лет дают основания полагать, что в патогенезе хронических бронхолегочных

заболеваний задействованы микроРНК miR-21 и miR-146a. Так, британскими исследователями [5] показано, что при увеличении уровня miR-146a снижается уровень интерлейкин (IL)-1b-индуцированного выброса IL-6 и IL-8 гладкомышечными клетками дыхательных путей и альвеолоцитами. Выявлена гиперэкспрессия miR-21 в эпителиальных клетках бронхов у больных БА независимо от лечения [6]. Коллективом китайских ученых под руководством Z.W.Yu [7] выдвинута гипотеза, что взаимное регулирование miR-21 и сигнального пути TGFβ / Smad способствует ремоделированию дыхательных путей. Однако до сих пор в мировой литературе отсутствуют исследования, посвященные роли микроРНК miR-21 и miR-146a в патогенезе ПФ БА и ХОБЛ.

Целью данной работы являлась оценка экспрессии микроРНК miR-146a и miR-21 у пациентов мужского пола с сочетанием БА и ХОБЛ, а также у лиц с изолированными БА и ХОБЛ.

## Материалы и методы

В исследование были включены мужчины-европейцы – жители Северо-Западного региона России в возрасте 20 лет и старше без онкологических заболеваний ( $n = 65$ : 19 пациентов с ПФ БА + ХОБЛ (средний возраст –  $60,6 \pm 10,0$  года); 14 пациентов с атопической БА легкого течения (средний возраст –  $24,1 \pm 5,3$  года); 15 пациентов с ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения (средний возраст –  $65,1 \pm 6,6$  года)). Все больные находились в фазе обострения. Группу контроля ( $n = 17$ ; средний возраст –  $25,8 \pm 3,7$  года) составили лица без хронических заболеваний дыхательной системы в анамнезе, аллерго- и онкопатологии и не являвшиеся курильщиками. Всем пациентам выполнено комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический анализ мокроты, оценку функции внешнего дыхания (ФВД), компьютерную томографию органов грудной клетки, эхокардиографию, анкетирование при помощи международных опросников – оценочного теста по ХОБЛ (*COPD Assessment Test* – САТ), модифицированной шкалы одышки (*Modified Medical Research Council* – mMRC), вопросника по контролю над бронхиальной астмой (*Asthma Control Questionnaire* – АСQ), теста по контролю над астмой (*Asthma Control Test* – АСТ). Диагностика ПФ БА + ХОБЛ осуществлялась на основании Испанских диагностических критериев (2012), а также совместного документа Глобальной инициативы по профилактике и лечению бронхиальной астмы (*Global Initiative for Asthma* – GINA) и Глобальной стратегии по лечению хронической обструктивной болезни легких (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* – GOLD, 2015) [8].

У всех пациентов, а также у лиц контрольной группы выполнялось молекулярно-генетическое исследование для определения экспрессии микроРНК miR-21 и miR-146a в периферической крови. Для этого венозная кровь в объеме 2,5 мл забиралась

в пробирки PAXgene® Blood RNA Tube (Pre Analyti X, Швейцария), выделялась микроРНК с помощью набора реагентов PAXgene® Blood miRNA Kit (QIAGEN, Германия). Определение уровней miR-21 и miR-146a производилось методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с помощью наборов реагентов TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, TaqMan® Universal Master Mix II no UNG, TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-21, TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-146a (*Applied Biosystems*, США) в термоциклере C1000 Touch™ Thermal Cycler с оптическим блоком CFX96™ Real-time System (*Bio-Rad*, США). Для оценки относительной нормализованной экспрессии miR-21 и miR-146a в качестве эндогенных контролей использовалась малая ядерная РНК (snRNA) U6 и малая ядрышковая РНК (snoRNA) U48. Относительная нормализованная экспрессия рассчитывалась методом  $\Delta\Delta Cq$  в программе CFX Manager™ 3.1 (*Bio-Rad Laboratories*, США).

Статистическая обработка данных выполнена в программе SPSS 22.0 (IBM, США). Различия считались значимыми при  $p < 0,050$ . Переменные проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка, а также на однородность дисперсии с помощью критерия Левина. При логнормальном распределении данных использовалось логарифмическое преобразование для приближения распределения к нормальному виду. Переменные с нормальным распределением представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – среднеквадратичное отклонение; для прочих переменных использовалось представление в виде медианы и квартилей. Для показателей, соответствующих критериям нормального распределения, сравнение выборок производилось методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), попарные сравнения выборок выполнялись с помощью Т-критерия Стьюдента, коэффициент корреляции рассчитывался по методу Пирсона. Для анализа показателей, не соответствующих критериям нормального распределения, использовались непараметрические методы – критерии Манна–Уитни и Крускала–Уоллеса, коэффициент корреляции рассчитывался по методу Спирмена. Номинативные (категориальные) переменные сравнивались с помощью критерия  $\chi^2$ ; для сравнения малых выборок использовались критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса и точный критерий Фишера. При множественных попарных сравнениях выборок применялась поправка Бонферрони и критерий достоверно значимой разности Тьюки (HSD-тест).

## Результаты и обсуждение

В данном исследовании впервые проведена оценка эпигенетического регулирования на уровне транскриптома, а именно – экспрессии микроРНК miR-21 и miR-146a у пациентов с ПФ БА + ХОБЛ мужского пола, проживающих в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Ранее в работе [9] описаны гендерные различия в активности микроРНК

в организме человека, поэтому чтобы нивелировать гендерные различия и сделать выборку более однородной, в настоящее исследование принято решение включать только мужчин.

В группе ПФ БА + ХОБЛ у подавляющего большинства пациентов (94,7 %) наблюдалась средняя степень тяжести БА с недостаточным контролем над заболеванием (АСQ =  $2,3 \pm 1,0$ ; АСТ =  $13,8 \pm 4,7$  балла), а в рамках ХОБЛ клинические группы В и D по GOLD регистрировались в 47,4 и 42,1 % случаев соответственно. У всех больных изолированной БА отмечена легкая степень заболевания с частичным контролем над БА (АСQ =  $1,1 \pm 0,8$ ; АСТ =  $19,0 \pm 3,4$  балла), а в группе ХОБЛ – тяжелая и крайне тяжелая степень (клиническая группа D по GOLD). Практически у всех пациентов с ПФ БА + ХОБЛ в анамнезе отмечены профессиональные вредности в виде контакта с горюче-смазочными материалами, металлической стружкой (94,7 %) и табакокурение (89,5 %), при этом средний стаж курения составил 35 пачко-лет.

Результаты сравнительного анализа уровней miR-21 и miR-146a в периферической крови у обследованных лиц приведены в табл. 1. Уровни

микроРНК представлены в относительных (безразмерных) единицах, поскольку в ходе данной работы оценивалась относительная нормализованная экспрессия, т. е. соотношение экспрессии изучаемых микроРНК и малых РНК со стабильными уровнями, выступавших в качестве эндогенного контроля. МикроРНК miR-21 и miR-146a продемонстрировали лог-нормальное распределение уровней, что позволило применить логарифмическое преобразование данных с последующим анализом при помощи параметрических методов статистики.

У пациентов мужского пола с ПФ БА + ХОБЛ уровни miR-21 и miR-146a в периферической крови были ниже, чем в группах БА, ХОБЛ и контроля, что свидетельствует об изменении эпигенетического регулирования при ПФ БА + ХОБЛ на уровне транскриптома. При этом ни для miR-21, ни для miR-146a статистически значимых различий в уровнях экспрессии этих молекул в контрольной группе по сравнению с группами БА и ХОБЛ, а также при сравнении между собой групп БА и ХОБЛ, не выявлено.

В данном исследовании впервые показана ассоциация экспрессии микроРНК miR-21 и miR-146a в периферической крови с патогенетическими и клиническими параметрами, а также с особенностями терапии у пациентов с ПФ БА + ХОБЛ мужского пола. Уровни обеих изученных микроРНК положительно коррелировали друг с другом ( $r = 0,837$ ;  $p < 0,001$ ), и большинство выявленных корреляционных связей оказались однонаправленными для miR-21 и miR-146a.

Обращал на себя внимание тот факт, что дебют заболевания при ПФ БА + ХОБЛ возникал раньше, чем при изолированной ХОБЛ – в возрасте  $44,3 \pm 12,9$  и  $57,3 \pm 8,2$  года соответственно, в то время как БА дебютировала в молодом возрасте –  $17,9 \pm 8,8$  года ( $\chi^2 = 25,32$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Для ПФ БА + ХОБЛ также была характерна большая продолжительность заболевания, чем при изолированной ХОБЛ – 12,0 (9,0; 27,0) и 7,0 (3,0; 12,0) года соответственно ( $U = 74,50$ ;  $p = 0,017$ ). Уровни miR-21 и miR-146a отрицательно коррелировали с возрастом начала заболевания ПФ БА + ХОБЛ ( $r = -0,524$ ;  $p = 0,021$  и  $r = -0,473$ ;  $p = 0,041$  соответственно) и положительно – с продолжительностью заболевания ( $r = 0,529$ ;  $p = 0,020$  и  $r = 0,531$ ;  $p = 0,019$  соответственно).

Таким образом, несмотря на то, что начало заболевания ПФ БА + ХОБЛ возникало раньше по сравнению с изолированными БА и ХОБЛ, отмечена следующая зависимость: чем старше возраст пациентов при дебюте ПФ БА + ХОБЛ и меньше продолжительность болезни, тем меньше уровни miR-21 и miR-146a соответственно.

У 9 пациентов группы ПФ БА + ХОБЛ отмечена гипертоническая болезнь (ГБ) II стадии, у 6 пациентов – III стадии; при этом уровни miR-21 и miR-146a снижались по мере прогрессирования ГБ (ANOVA –  $F = 6,88$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,007$  и  $F = 3,63$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,050$  соответственно). Кроме того, при стенокардии

**Таблица 1**  
**Уровни микроРНК miR-21 и miR-146a в периферической крови у пациентов с перекрестным фенотипом бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких, изолированными бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких, а также у лиц контрольной группы**  
**Table 1**  
**MicroRNA levels of miR-21 and miR-146a in peripheral blood in patients with crossed phenotype bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease, bronchial asthma, and chronic obstructive pulmonary disease, and in the control group**

Группы обследованных лиц	Log <sub>10</sub> (уровень микроРНК в крови), относительные единицы	
	miR-21	miR-146a
ПФ БА и ХОБЛ (n = 19)	-0,41 ± 0,30	-0,35 ± 0,26
БА (n = 14)	0,23 ± 0,33	-0,03 ± 0,18
ХОБЛ (n = 15)	0,19 ± 0,39	-0,05 ± 0,19
Лица контрольной групп, n = 17	-0,07 ± 0,47	0,03 ± 0,19
Анализ одномоментного сравнения всех групп:		
• ANOVA, F	10,23	11,71
• df	3	3
• p	< 0,001	< 0,001
Анализ попарного сравнения групп, p		
ПФ БА и ХОБЛ vs:		
• БА	< 0,001	0,001
• ХОБЛ	< 0,001	0,002
• лиц контрольной группы	0,049	0,001
БА vs:		
• ХОБЛ	0,995	0,994
• лиц контрольной группы	0,185	0,860
ХОБЛ vs лиц контрольной группы	0,257	0,702

Примечание: БА – бронхиальная астма; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; ПФ БА и ХОБЛ – перекрестный фенотип бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких; ANOVA – analysis of variance, дисперсионный анализ.

напряжения наблюдались более низкие уровни miR-21 и miR-146a по сравнению с лицами без таковой ( $T = -2,64$ ;  $p = 0,017$  и  $T = -2,53$ ;  $p = 0,022$  соответственно).

По характеру воспаления группы ПФ БА + ХОБЛ и ХОБЛ были сопоставимы: по данным гемографии, нейтрофильное воспаление отмечено у 73,3 % пациентов с ХОБЛ и 68,4 % лиц с ПФ БА + ХОБЛ; при этом системный воспалительный ответ, оцененный с помощью таких показателей, как скорость оседания эритроцитов, уровень фибриногена и С-реактивного белка, был несколько выше в группе ХОБЛ. Также обращало на себя внимание, что у большинства больных ПФ БА + ХОБЛ наряду с этими изменениями в анализе мокроты выявлен эозинофильный характер воспалительной реакции, в отличие от группы больных ХОБЛ (72,2 и 30,8 % соответственно;  $p = 0,027$ ). Эозинофилия в периферической крови представлена в большей степени в группе изолированной БА vs ПФ БА + ХОБЛ, однако эти различия не достигали уровня статистической значимости. У пациентов с ПФ БА + ХОБЛ с эозинофилией мокроты отмечен более низкий уровень miR-21, чем у лиц без таковой ( $T = -2,64$ ;  $p = 0,018$ ) и наблюдалась отрицательная корреляция уровня miR-21 с содержанием эозинофилов в мокроте ( $r = -0,533$ ;  $p = 0,028$ ).

При ПФ БА + ХОБЛ, так же, как и при изолированной ХОБЛ, характерно наличие обструктивных нарушений с поражением дистальных отделов дыхательных путей; при этом у пациентов с ПФ БА + ХОБЛ обратимость показателей объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ<sub>1</sub>) была выше, чем при изолированной ХОБЛ. Резкие обструктивные нарушения были более характерны для ХОБЛ (93,3 %), чем для ПФ БА + ХОБЛ (68,4 %), а при БА

не выявлены ни у одного пациента ( $\chi^2 = 27,53$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Для пациентов в группах ПФ БА + ХОБЛ и ХОБЛ отмечена обструкция на уровне дистальных отделов бронхов, которая оценивалась по степени снижения максимальной объемной скорости выдоха на уровне 50 % форсированной жизненной емкости легких (МОС<sub>50</sub>) – 10 (9; 2) и 8 (7; 10) %<sub>долж.</sub> – для ПФ БА + ХОБЛ и изолированной ХОБЛ соответственно ( $U = 80,50$ ;  $p = 0,030$ ). При этом для ПФ БА + ХОБЛ, в отличие от изолированной ХОБЛ, наблюдался хороший прирост МОС<sub>50</sub> после приема бронхолитического препарата – 40 (34, 78) и 7 (–8; 41) % соответственно ( $U = 63,00$ ;  $p = 0,005$ ). Наличие бронхоспазма более характерно для больных изолированной БА (92,9 %; средний прирост ОФВ<sub>1</sub> – 12 %) и группы ПФ БА + ХОБЛ (73,7 %; средний прирост ОФВ<sub>1</sub> – 34 %), в то время как для изолированной ХОБЛ бронхоспазм был малохарактерен (33,3 %) ( $\chi^2 = 12,24$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,002$ ). Рестриктивные нарушения, так же, как и обструктивные, в большей степени преобладали в группе больных ХОБЛ (33,3 %), для больных ПФ БА + ХОБЛ они были нехарактерны (5,3 %), а при изолированной БА – отсутствовали ( $\chi^2 = 8,86$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,012$ ).

В данном исследовании впервые описаны корреляции уровней miR-21 и miR-146a с показателями ФВД у пациентов с ПФ БА + ХОБЛ (табл. 2).

Так, у больных ПФ БА + ХОБЛ низкие уровни микроРНК miR-21 и miR-146a ассоциировались с меньшим сопротивлением бронхов на выдохе, но при этом – с меньшим приростом таких показателей, как ОФВ<sub>1</sub>, индекс Тиффно и специфическая проводимость дыхательных путей (*specific airway conductance* –  $sG_{aw}$ ). Эти результаты свидетельствуют о том, что для ПФ БА + ХОБЛ характерно наличие обструктивных нарушений, однако меньшая обратимость бронхоспазма наблюдалась при низких уровнях miR-21 и miR-146a.

Развитие дыхательной недостаточности (ДН) диагностировано у 66,7 % лиц с ПФ БА + ХОБЛ и 53,3 % – с ХОБЛ. У больных ПФ БА + ХОБЛ ( $n = 18$ ) выявлена корреляция ДН с парциальным давлением кислорода (PaO<sub>2</sub>) ( $r = -0,840$ ;  $p < 0,001$ ) и бронхоспазмом ( $n = 18$ ;  $r = 0,492$ ;  $p = 0,038$ ). Потребность в кислородотерапии была выше при ХОБЛ, чем при ПФ БА + ХОБЛ (53,3 и 42,1 % соответственно), а пациенты с БА в кислородотерапии не нуждались вовсе ( $\chi^2 = 10,36$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,006$ ). При ПФ БА + ХОБЛ с низкими уровнями miR-146a наблюдались меньшие значения PaCO<sub>2</sub> в крови ( $r = 0,472$ ;  $p = 0,048$ ). Ассоциаций экспрессии изученных микроРНК с уровнем PaO<sub>2</sub> в группе ПФ БА + ХОБЛ не выявлено. Корреляция установлена лишь в группе ХОБЛ, где с ростом уровня miR-146a снижалось PaO<sub>2</sub> в крови ( $r = -0,518$ ;  $n = 15$ ;  $p = 0,048$ ).

В случае терапии ингаляционными глюкокортикостероидами (иГКС) и антибактериальными препаратами при ХОБЛ тяжелого течения и ПФ БА + ХОБЛ не отмечено статистически значимых различий, однако потребность в системных ГКС (вводимых внутривенно) была несколько выше при

**Таблица 2**  
**Корреляция уровней микроРНК miR-21 и miR-146a в периферической крови с показателями функции внешнего дыхания у пациентов с перекрестным фенотипом бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких**

**Table 2**  
**Correlation of miRNA-21 and miR-146a levels in peripheral blood with respiratory function indicators in patients with crossed phenotype bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease**

Показатель функции внешнего дыхания	Статистическая значимость корреляции ( $n = 19$ )			
	miR-21		miR-146a	
	$r$	$p$	$r$	$p$
Прирост ОФВ <sub>1</sub> , %*	0,523	0,022	0,647	0,003
Прирост индекса Тиффно*, %	0,509	0,026	0,560	0,013
Прирост $sG_{aw}$ *, %	0,606	0,013	0,586	0,017
$R_{aw}$	0,483	0,049	–	> 0,050

Примечание: ПФ – перекрестный фенотип; БА – бронхиальная астма; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха за 1-ю секунду;  $sG_{aw}$  (*specific airway conductance*) – специфическая проводимость дыхательных путей;  $R_{aw}$  (*airway resistance*) – сопротивление бронхиальных путей на выдохе; \* – показатели, измеренные после бронходилатационного теста, %<sub>долж.</sub>

ПФ БА + ХОБЛ. Среднесуточная доза иГКС в пересчете на беклометазон в группах ХОБЛ и ПФ БА + ХОБЛ была одинаковой и составляла 1 140 мкг в сутки. Среднесуточная доза внутривенных ГКС в пересчете на преднизолон составила 38 мг в сутки при ПФ БА + ХОБЛ и 36 мг в сутки у – при ХОБЛ. Наряду с приведенной терапией ГКС большинство пациентов обеих групп получали антибактериальную терапию (84,2 % – при ПФ БА + ХОБЛ и 80 % – при ХОБЛ). У пациентов с БА среднесуточная доза иГКС в пересчете на беклометазон составила 500 мкг. Пациенты с низкими уровнями miR-146a в группе ПФ БА + ХОБЛ ( $n = 19$ ) получали меньшие дозы иГКС ( $r = 0,506$ ;  $p = 0,027$ ) на фоне комбинированной терапии.

Одна из главных причин возросшего в настоящее время интереса к эпигенетике хронических болезней органов дыхания заключается в том, что однонуклеотидным полиморфизмом генов, изучаемым в ходе анализа полногеномных ассоциаций, нельзя объяснить фенотипическую вариабельность, наблюдаемую при БА и ХОБЛ, несмотря на существенную генетическую детерминированность этих заболеваний. Сочетание БА и ХОБЛ до сих пор остается малоизученной нозологией.

Выявлено, что для группы ПФ БА + ХОБЛ характерны следующие особенности: более ранний дебют заболевания, чем при изолированной ХОБЛ, и, соответственно, большая продолжительность самого заболевания. Эти данные находят свое подтверждение и в мировой литературе. Так, по данным [10], пациенты с ПФ БА + ХОБЛ по сравнению с изолированной ХОБЛ склонны к более раннему началу заболевания, большей длительности симптомов с более частыми обострениями. У пациентов мужского пола с ПФ БА + ХОБЛ уровни miR-21 и miR-146a в периферической крови оказались ниже, чем в группах БА, ХОБЛ и контроля, что свидетельствует об изменении эпигенетического регулирования на уровне транскриптома. Низкие уровни miR-21 и miR-146a в периферической крови у больных ПФ БА + ХОБЛ ассоциированы с более старшим возрастом пациентов в дебюте ПФ БА + ХОБЛ и соответственно – с меньшей продолжительностью заболевания. Предполагается, что в рамках группы ПФ БА + ХОБЛ в зависимости от транскриптома, а именно – экспрессии miR-21 и miR-146a, меняются особенности течения заболевания. Кроме того, у лиц с ПФ БА + ХОБЛ в анамнезе выявлены профессиональные вредности и факт табакокурения. Корреляционных связей уровней микроРНК с табакокурением и профессиональными вредностями в данном исследовании не выявлено, однако по данным литературы, окружающая среда способна изменять экспрессию генов через эпигенетический контроль. *F.Schembri* [11] показано, что курение влияет на экспрессию микроРНК в эпителии бронхов, причем 28 микроРНК имели более низкие уровни экспрессии у курильщиков по сравнению с лицами, никогда не курившими. Кроме того, при вдыхании сигаретного дыма снижается экспрессия нескольких

микроРНК, влияющих на транскрипционный фактор NF-κB, что приводит к активации NF-κB и усилению воспаления [12]. Полученные результаты в виде низкой экспрессии miR-146a у больных ПФ БА + ХОБЛ согласуются с данными китайских исследователей [13], описавших снижение экспрессии этих молекул в крови у пациентов с обострением ХОБЛ по сравнению с больными ХОБЛ стабильного течения и группой контроля, и отрицательную корреляцию – при ХОБЛ уровня miR-146a с уровнями фактора некроза опухоли-α, интерлейкинов (IL)-6 и -8 и лейкотриена-4. Кроме того, низкие уровни изученных микроРНК были связаны с коморбидной патологией (ГБ, стенокардия).

По данным ФВД, у пациентов с ПФ БА + ХОБЛ низкий уровень miR-21 ассоциировался с менее выраженными бронхообструктивными нарушениями, но при этом характерна меньшая обратимость бронхообструкции. Кроме того, у больных ПФ БА + ХОБЛ низкий уровень miR-146a ассоциировался с более выраженным эозинофильным воспалением в бронхах и меньшей потребностью в иГКС. При обсуждении этого результата важно иметь в виду возможное влияние терапии ГКС на экспрессию микроРНК. По данным исследования в корейской популяции [14] показано, что экспрессия miR-146a снижалась на фоне лечения дексаметазоном, при этом сделан вывод, что miR-146a может быть ассоциирована с гиперчувствительностью бронхов при аллергической БА и ответом на терапию ГКС. *R.Hammad et al.* полагают, что miR-21 и miR-146a ассоциированы с воспалением при БА. Факт корреляции гиперэкспрессии miR-146a и miR-21 с эозинофильным воспалением нашел свое подтверждение по данным ряда других работ, по мнению авторов которых, эти биомаркеры могут быть использованы для диагностики эозинофильного Th2-ассоциированного эндотипа БА [15, 16]. Нельзя исключить, что miR-21 выполняет свою провоспалительную функцию путем отрицательного регулирования IL-12, который регулирует баланс Th1/Th2; таким образом, при БА снижение экспрессии IL-12 вызывает чрезмерный ответ Th2. Ранее *A.E.Williams et al.* наблюдалась повышенная экспрессия miR-146a в биоптатах дыхательных путей у пациентов с БА легкой степени [17]. К тому же Th2-опосредованные цитокины, являясь факторами воспаления, могут повышать уровень miR-146a в гладких мышцах дыхательных путей [18]. Выявленные корреляционные связи между miR-21 и miR-146a с бронхообструктивными нарушениями при ПФ БА + ХОБЛ косвенно подтверждаются данными литературы, согласно которым, корреляция уровней микроРНК miR-21 и miR-146a с показателем ОФV<sub>1</sub> обнаружена у пациентов с БА молодого возраста – выявлена линейная связь между экспрессией miR-21 и miR-146a с ОФV<sub>1</sub>, причем уровни miR-21 и miR-146a оказались повышенными у детей с БА [15].

Таким образом, экспрессия miR-21 и miR-146a у больных ПФ БА + ХОБЛ ассоциирована с возрастом пациентов, длительностью заболевания и его

патогенетическими механизмами (обратимость бронхообструкции, эозинофильное воспаление), может изменяться под действием факторов внешней среды — сигаретного дыма, прочих поллютантов, а также терапии.

## Заключение

В ходе исследования впервые показана более низкая экспрессия микроРНК miR-21 и miR-146a в периферической крови у пациентов с ПФ БА + ХОБЛ по сравнению с группами БА, ХОБЛ и контроля. Впервые была показана ассоциация экспрессии микроРНК miR-21 и miR-146a в периферической крови с патогенетическими и клиническими параметрами, а также с особенностями терапии у пациентов с ПФ БА + ХОБЛ мужского пола. Низкие уровни miR-21 и miR-146a свойственны пациентам с ПФ БА + ХОБЛ, у которых дебют заболевания возник в более старшем возрасте и, соответственно, был ассоциирован с меньшей продолжительностью заболевания, наличием коморбидной патологии (ГБ, стенокардия). У этих больных низкий уровень микроРНК miR-21 ассоциирован с меньшей обратимостью бронхообструкции, несмотря на эозинофильное воспаление в бронхах.

Методика определения экспрессии микроРНК miR-21 и miR-146a в периферической крови осуществима в условиях лабораторной практики Российской Федерации и позволяет использовать эти показатели в рамках комплексной диагностики ПФ БА + ХОБЛ у лиц мужского пола. В формирование фенотипа ПФ БА + ХОБЛ вносит существенный вклад эпигенетическая изменчивость, поэтому miR-21 и miR-146a могут рассматриваться как диагностические и прогностические молекулярные маркеры в сложных диагностических случаях, а также в качестве мишеней для таргетного фармакологического воздействия в будущем, что перспективно с позиции персонализированного подхода к терапии ПФ БА + ХОБЛ.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование проводилось без участия спонсоров.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest. The study was not supported.

## Литература / References

1. Yanagisawa S., Ichinose M. Definition and diagnosis of asthma-COPD overlap (ACO). *Allergol. Int.* 2018; 67 (2): 172–178. DOI: 10.1016/j.alit.2018.01.002.
2. Vishnoi A., Rani S. MiRNA Biogenesis and regulation of diseases: an overview. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1509: 1–10. DOI: 10.1007/978-1-4939-6524-3\_1.
3. Stolzenburg L.R., Harris A. The role of microRNAs in chronic respiratory disease: recent insights. *Biol. Chem.* 2018; 399 (3): 219–234. DOI: 10.1515/hsz-2017-0249.
4. Pritchard C.C., Cheng H.H., Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13 (5): 358–369. DOI: 10.1038/nrg3198.
5. Perry M.M., Moschos S.A., Williams A.E. et al. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J. Immunol.* 2008; 180 (8): 5689–5698. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5689.
6. Wu X.B., Wang M.Y., Zhu H.Y. et al. Overexpression of microRNA-21 and microRNA-126 in the patients of bronchial asthma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2014; 7 (5): 1307–1312.
7. Yu Z.W., Xu Y.Q., Zhang X.J. et al. Mutual regulation between miR-21 and the TGFβ/Smad signaling pathway in human bronchial fibroblasts promotes airway remodeling. *J. Asthma.* 2019; 56 (4): 341–349. DOI: 10.1080/02770903.2018.1455859.
8. Diagnosis of diseases of chronic airflow limitation: Asthma, COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS). Based on the Global Strategy for Asthma Management and Prevention and the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Updated 2015. Available at: [https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/04/GOLD\\_ACOS\\_2015.pdf](https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/04/GOLD_ACOS_2015.pdf)
9. Cui C., Yang W., Shi J. et al. Identification and analysis of human sex-biased microRNAs. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2018; 16 (3): 200–211. DOI: 10.1016/j.gpb.2018.03.004.
10. Bai J.W., Mao B., Yang W.L. et al. Asthma-COPD overlap syndrome showed more exacerbations however lower mortality than COPD. *QJM.* 2017; 110 (7): 431–436. DOI: 10.1093/qjmed/hcx005.
11. Schembri F., Sridhar S., Perdomo C. et al. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106 (7): 2319–2324. DOI: 10.1073/pnas.0806383106.
12. Rupani H., Sanchez-Elsner T., Howarth P. MicroRNAs and respiratory diseases. *Eur. Respir. J.* 2013; 41 (3): 695–705. DOI: 10.1183/09031936.00212011.
13. Chen B.B., Li Z.H., Gao S. Circulating miR-146a/b correlates with inflammatory cytokines in COPD and could predict the risk of acute exacerbation COPD. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97 (7): e9820. DOI: 10.1097/MD.00000000000009820.
14. Trinh H.K.T., Pham D.L., Kim S.C. et al. Association of the miR-196a2, miR-146a, and miR-499 polymorphisms with asthma phenotypes in a Korean population. *Mol. Diagn. Ther.* 2017; 21 (5): 547–554. DOI: 10.1007/s40291-017-0280-1.
15. Hammad R.H.M., Hamed D.H.E.D., Eldosoky M.A.E.R. et al. Plasma microRNA-21, microRNA-146a and IL-13 expression in asthmatic children. *Innate Immun.* 2018; 24 (3): 171–179. DOI: 10.1177/1753425918763521.
16. Specjalski K., Niedozytko M. MicroRNAs: future biomarkers and targets of therapy in asthma? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2020; 26 (3): 285–292. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000673.
17. Williams A.E., Larner-Svensson H., Perry M.M. et al. MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy. *PLoS One.* 2009; 4 (6): e5889. DOI: 10.1371/journal.pone.0005889.
18. Comer B.S., Camoretti-Mercado B., Kogut P.C. et al. MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2014; 307 (9): L727–734. DOI: 10.1152/ajplung.00174.2014.

Поступила 21.05.20  
Received: May 21, 2020