

На правах рукописи

Тихонович Элла Леонидовна

Оценка роли полиморфизма генов TNF α , FOXP3 и мРНК генов каспаз 3,6,9 в
прогрессировании и рецидивировании саркоидоза.

14.01.25 – пульмонология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург 2019

Работа выполнена на кафедре госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого с клиникой ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Василий Иванович Трофимов.

Официальные оппоненты:

Харитонов Михаил Анатольевич-доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, профессор 1 кафедры(терапии усовершенствования врачей).

Собченко Светлана Александровна-доктор медицинских наук, профессор, кафедра пульмонологии ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный университет.

Защита состоится «___» _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д.208.090.02 при Первом Санкт-Петербургском Государственном медицинском университете имени академика И.П.Павлова (197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена 12, зал заседаний Ученого Совета).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П.Павлова по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6-8 и на сайте <http://www.1spbgmu.ru/>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Александров Альберт Леонидович.

Общая характеристика работы

Актуальность темы.

В России распространенность саркоидоза колеблется от 22 до 47 чел. на 100 тыс населения. В Республике Карелия распространенность составляет 73 чел на 100 тыс населения, т.е. чаще, чем в среднем по стране. В последние десятилетия наблюдается неуклонный рост заболеваемости саркоидозом. Рецидивирующее течения саркоидоза отмечено в 15-68% случаев. Чем дольше наблюдение, тем чаще удаётся диагностировать рецидив (Визель А.А., Визель И.Ю, 2016).

Специфичные биомаркеры помогут фенотипировать пациентов с саркоидозом, обладают значимой ценностью, так как способствуют выделению пациентов с повышенным риском осложненного саркоидоза и позволяют проводить целенаправленную терапию для предотвращения прогрессирующего течения.

В основе патогенеза заболевания лежит каскад различных цитокинов и дисбаланс Т-клеточного иммунитета. TNF-альфа считают ключевым цитокином, участвующим в формировании гранулемы при саркоидозе, изучено его влияние на апоптоз. Одновременно при саркоидозе имеет место дефицит регуляторных Т-клеток за счет снижения экспрессии гена FOXP3.

С учетом высокой распространенности саркоидоза в Республике Карелия является актуальным изучение влияния генетических маркеров на predisposition и течение саркоидоза.

Степень разработанности проблемы.

Генетические исследования по проблеме саркоидоза в России малочисленны, а в Республике Карелия они отсутствуют.

Несмотря на накопленные данные, остается до конца не ясным роль генетических факторов в формировании различных фенотипов саркоидоза. На результаты анализа влияют такие факторы, как размер выборки, этническая принадлежность людей, включенных в исследование (Culver et al., 2007). Также малоизученными остаются вопросы о вкладе тех или иных по-

лиморфных вариантов генов-кандидатов в этиологию и патогенез данного заболевания, что могло бы выяснить конкретные мишени их влияния и разработать методы таргетной терапии.

Цель исследования

Целью исследования было оценить влияние полиморфизма генов *TNFA*, *FOXP3*, уровня мРНК генов каспаз, *TNFA*, *FOXP3* на развитие и прогрессирование саркоидоза и возможность использования генетических маркеров в прогнозировании течения заболевания.

Задачи исследования:

1. Выявить клинические и функциональные особенности пациентов саркоидозом в Республике Карелия, динамику заболевания. Оценить особенности различного течения саркоидоза (прогрессирующее, стационарное (стабильное) и рецидивирующее).
2. Определить частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров -308 G>A (rs1800629), -238 G>A (rs361525) гена *TNF* и -3279 C>A (rs3761548) гена *FOXP3* у больных саркоидозом. Выявить риск развития данного заболевания у носителей разных генотипов по исследуемым полиморфным маркерам гена *TNF* и *FOXP3*
3. Выявить вклад вышеперечисленных генетических детерминант на особенности течения заболевания (прогрессирующее, стационарное (стабильное) и рецидивирующее)
4. Определить уровень мРНК генов *TNF* и *FOXP3* в лейкоцитах периферической крови у больных саркоидозом в зависимости от генотипов по исследуемым полиморфным маркерам гена *TNF* и *FOXP3*.
5. Оценить уровень мРНК генов *TNF* и *FOXP3*, каспаз 3,6,9 в лейкоцитах периферической крови у больных с разным течением саркоидоза.
6. Оценить уровень транскриптов генов иницирующей (*CASP9*) и эффекторных каспаз (*CASP3*, *CASP6*) в лейкоцитах периферической крови здоровых людей в зависимости от носительства аллельных вариаций гена *TNF*.

Научная новизна

Создан регистр пациентов с саркоидозом в Республике Карелия. Проанализированы эпидемиологические и клинические данные, варианты течения и исходы заболевания за 14 -летний период наблюдения.

Впервые определен генетический профиль, включающий аллели генов -308 G>A (rs1800629), -238 G>A (rs361525) гена *TNF* и -3279 C>A (rs3761548) гена *FOXP3*, у пациентов с морфологически верифицированным саркоидозом.

Впервые изучен полиморфизм генов -308 G>A (rs1800629), -238 G>A (rs361525) гена *TNF* и -3279 C>A (rs3761548) гена *FOXP3*, уровень транскриптов генов каспаз 3,6,9, *TNF* и *FOXP3* и их влияние на развитие и течение заболевания у больных саркоидозом в Республике Карелия.

Теоретическая и практическая значимость работы.

1. Разработан регистр пациентов с саркоидозом, что позволило проводить многолетнее наблюдение за больными, собрать унифицированные данные об этих пациентах, оценить течение, эффективность терапии и исходы заболевания, усовершенствовать качество медицинских услуг.
2. Проведенная работа представляет практический интерес в области клеточной биологии и генетики. Полученные данные позволяют понять молекулярно-генетические механизмы этиологии и патогенеза данного заболевания.
3. Показана необходимость оценки полиморфизма -3279 C>A гена *FOXP3*, -308G>A и -238 G>A гена *TNF* больных саркоидозом, что актуально для создания маркерного профиля, прогнозирования течения саркоидозного процесса и контроля лечения пациентов.
4. Выявленные генетические маркеры, ассоциированные с характером течения заболевания, открывают возможности использования новых мишеней для воздействия таргетной терапии, внедрения новых препаратов, основанных на регулировании экспрессии генов.

Методология и методы диссертации

Объектом исследования являлись больные саркоидозом. Предметом исследования послужили клинико-рентгенологические, функциональные и иммуногенетические показатели больных с разными вариантами течения заболевания.

Работа состояла из четырех этапов. На первом этапе в Республике Карелия был сформирован регистр больных саркоидозом и в течение 14 лет проводились сбор, фиксация и анализ данных.

На втором этапе анализировались данные анамнеза, клинико-лабораторные данные, рентгенологические и функциональные показатели, длительность проводимой терапии и ее эффективность.

На третьем этапе проводилось генетическое исследование у пациентов с различным течением морфологически верифицированного саркоидоза по сравнению с группой контроля. Определялась частота аллелей и генотипов генов *TNF-α*, *FOXP3*, уровень транскриптов генов каспаз 3,6,9, *TNF-α*, *FOXP3*.

На четвертом этапе работы сравнивались группы пациентов с рецидивирующим (прогрессирующим) и стабильным течением заболевания. Определялось влияние вышеуказанных генетических маркеров на течение заболевания.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Создание и ведение регистра пациентов с саркоидозом в течение длительного времени позволяет динамично оценивать уровень заболеваемости, мониторировать обострения и рецидивы, усовершенствовать качество медицинских услуг.

2. Саркоидоз является мультифакторным заболеванием, генетические черты которого имеют популяционные особенности. Однако генетические маркеры генов *TNFα*, *FOXP3*, каспаз 3,6,9 не позволяют определить предрасположенность к развитию саркоидоза.

3. Возможно использование генетических маркеров генов *TNF-α*, *FOXP3* в прогнозировании рецидивирующего и прогрессирующего течения, мониторинговании эффективности лечения саркоидоза.

4. Различные варианты течения саркоидоза (прогрессирующее, стабильное и рецидивирующее) отличаются друг от друга генетическими маркерами, клинико-функциональными особенностями.

Степень достоверности и апробация диссертационной работы

Тема диссертационного исследования утверждена на заседании проблемной комиссии №7 ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», протокол № 29 от 26.04.2017 года.

Апробация диссертационной работы проведена на XXVII Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания 17 – 20 октября 2017г., г. Санкт-Петербург, на XXVIII Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания 16-19 октября 2018г., г. Москва, региональной научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы внутренних болезней 2018 » 30-31 октября 2018 г. г. Петрозаводск.

Информированное согласие было получено у всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» и этическим комитетом ФГБОУ ВО Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 работ в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации основных положений диссертаций на соискание научных степеней.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 131 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекоменда-

ций и списка литературы. Работа иллюстрирована 22 таблицами и 1 рисунком. Библиография содержит 277 источников, в том числе 45 отечественных и 232 зарубежных авторов.

Содержание работы.

Материалы и методы.

За 14-летний период наблюдения саркоидоз диагностирован у 524 человек. Диагноз саркоидоз легких устанавливался на основании клинко- рентгенологических и лабораторных изменений, соответствовал международным критериям выявления этого гранулёматоза [Baughman R.P., Culver D.A., Judson M.A., 2011]. У 74% пациентов диагноз был верифицирован морфологически. Все включенные в исследование люди были русской национальности, проживающие на территории Республики Карелия. Для проведения исследований была сформирована выборка из 216 человек, которые были разделены на 2 группы: 100 больных с морфологически подтвержденным диагнозом саркоидоза (ср.возраст– $45,41 \pm 1,31$ года) и 116 человек, которые вошли в контрольную группу (здоровые доноры) (ср. возраст - $42,06 \pm 1,30$ года).

Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, аллергологического анамнеза, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, курение, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥ 28 кг/м.

В дальнейшем исследовании (4 этап) 100 пациентов были разделены на 2 группы: первая группа со стационарным (стабильным) течением, без ухудшений и рецидивов в анамнезе, которые никогда не получали иммуносупрессивную терапию. Вторая группа включала себя пациентов с рецидивирующим и прогрессирующим саркоидозом, получающими глюкокортикоидную терапию.

Всем пациентам выполнялись спирография, бодиплетизмография с исследованием диффузионной способности легких для окиси углерода методом

единичного вдоха. Стадия заболевания оценивалась по данным рентгенографии органов грудной клетки в двух проекциях.

Генетические методы исследования.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) с помощью набора «Analytik jena», следуя протоколу фирмы производителя. Генотипирование полиморфных вариантов -308G>A (rs1800629), -238G>A (rs361525) гена *TNF*, а также -3279C>A гена *FOXP3* (rs3761548) осуществляли с помощью метода ПЦР-ПДРФ (с оценкой полиморфизма длин рестрикционных фрагментов). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на приборе iQ5. Для амплификации использовали наборы «HS-Screen mix» и праймеры производства фирмы «Евроген».

Для амплификации использовали наборы «HS-Screen mix». Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала: 50 нг ДНК исследуемых образцов, 100 пМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл готовой смеси для ПЦР HS-Screen mix. Условия ПЦР: денатурация - 95°C 5 мин – 1 цикл, повторяющиеся циклы (35): денатурация – 30 с при 95°C, отжиг – 30 с при 60°C (61°C для гена *FOXP3*), элонгация – 30 с при 72°C; достраивание фрагментов – 10 мин при 72°C.

Гидролиз продуктов амплификации проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции: NcoI для rs1800629, MspI для rs361525 и PstI для rs3761548. Рестрикционный анализ выполнялся в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя. К 20 мкл реакционной смеси, содержащей 8 мкл продукта ПЦР, добавляли 2 мкл соответствующего буфера, 10 мкл ddH₂O и 1 мкл (1 ед. а) соответствующей эндонуклеазы рестрикции. Реакционную смесь инкубировали в течение 3 часов при температуре 37°C. Фрагменты ДНК, полученные после обработки соответствующими эндонуклеазами рестрикции, разделяли в 8% полиакриламидном или 2% агарозном геле, используя трис-ацетатный буфер. Гели окрашивали водным раствором бромистого этидия

(0,5 мкг/мл). Фрагменты ДНК и визуализировали в проходящем УФ-свете и анализировали с помощью программы Kodak 1D.

Тотальную РНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) с помощью набора «Ахуprep Multisource Total RNA Miniprep Kit». Концентрацию и качество тРНК определяли на спектрофотометре «SmartSpect Plus». Первую цепь кДНК синтезировали используя набор «MMLV RT kit» («Евроген», Россия). Уровень экспрессии мРНК генов *TNF*, *CASP3*, *CASP6*, *CASP9*, *FOXP3*, *GAPDH* определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler iQ5 с оптической приставкой. Для амплификации использовали наборы «qPCRmix-HS SYBR» и праймеры производства фирмы «Евроген». Для каждого исследуемого образца реакцию ПЦР-РВ ставили не менее трех раз. Гены *GAPDH* и *18sRNA* использовали в качестве референсных. Относительный уровень экспрессии (ОУЭ) определяли по формуле: $ОУЭ = 2^{-\Delta C_T}$, где ΔC_T – разница между значениями пороговых циклов для референсного и таргетного генов (Livak, Schmittgen, 2001).

Статистическая обработка результатов.

Тестирование выборочных распределений переменных на статистически значимое различие с нормальным законом распределения вероятностей проводилось с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае отклонения гипотезы при статистически значимом различии данные соответствующей переменной были представлены в виде среднего значения $\pm$ среднеквадратического отклонения ($M \pm StD$), сравнение средних между двумя группами проводили с помощью t-критерия Стьюдента, сравнение средних между 3 и более группами проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA. Данные переменных, выборочные распределения которых статистически значимо отклонялись от нормального закона, представлены в виде медианы с интерквартильным размахом [$Me (Q_{25}; Q_{75})$]. Для сравнения выборок таких переменных между группами использовались методы непараметрической статистики. В частности, статистическую достоверность различия распределе-

ния частот аллелей и генотипов между группами оценивали с помощью критерия χ^2 и точного критерия Фишера. Статистическую достоверность различия уровня транскриптов гена между группами исследования и контроля оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки влияния генотипов на уровень транскриптов генов использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса. Для оценки влияния нескольких независимых переменных на переменную отклика использовали метод линейной регрессии. Для анализа и оценки ассоциативной взаимосвязи между мутантным аллелем и риском развития заболевания рассчитывали отношение шансов (ОШ) по четырехпольной таблице сопряженности признаков (мутантный/немутантный аллель–наличие/отсутствие признака). Уровень статистической значимости для принятия гипотезы о различии выборочных средних и распределений частот, а также статистической значимости всех рассчитываемых параметров и оценок, был принят равным 0,05. Статистическую обработку данных проводили в программной среде пакета «StatGraphics 2.1».

Результаты исследования и их обсуждение

За 2004-2018г.г. наблюдения саркоидоз диагностирован у 524 человек. Таким образом, распространенность саркоидоза в Карелии составила 73 чел на 100 тыс. населения. При первичном обращении возраст больных колебался от 18 до 75 лет (средний возраст 45.8 ± 3.2 лет). Среди них 189 (35%) мужчин и 335 (65%) женщин.

Клиническая характеристика пациентов с саркоидозом

При первичном обращении 0 стадия была констатирована у 2 (1 %) больных, I стадия – у 138 (26 %) , II стадия – у 323чел (62 %) , III стадия – у 49 (9 %) , IV стадия – у 12 (2 %) больных. У 41 пациента (7.9 %) было отмечено острое и подострое течение заболевания с развернутой картиной синдрома Лефгрена. 74 % больных саркоидоз был верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. В остальных случаях диагноз уста-

навливался посредством клинико–рентгенологических данных и исключения других заболеваний.

Клинико- функциональная характеристика сравниваемых групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением представлена в таблице 1.

Таблица 1 Клинико- функциональная характеристика групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением

	Стабильное течение, n=50	Прогрессирующее течение, n=50	p
Возраст	35.3±1.13	48.44±3.37	
Пол муж	21\0.42	14\0.28	p>0.05
жен	29\0.58	36\0.72	
Стадии первая	21\0.42	8\0.16	p<0.01
вторая	25\0.5	25\0.5	
третья	4\0.08	16\0.32	
четвертая	0\0	1\0.02	
Количество больных с обструктивными нарушениями	0\0	5\0.1	p<0.05
Количество больных с рестриктивными нарушениями	1\0.02	2\0.04	p=0,56
Количество больных с нарушением диффузионной способности легких	3\0.06	9\0.18	p=0,066

В группе пациентов со стабильным течением чаще встречается первая и вторая стадии заболевания. В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением превалируют вторая и третья стадии саркоидоза, отмечена тенденция к более частому нарушению функции внешнего дыхания. Экстраторакальные проявления при сравнении групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением показаны в таблице 2. В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением достоверно чаще отмечалось поражение кожи по типу узлов и бляшек ,lupus

репнiо.В данной группе чаще регистрировалось поражение печени (гепатомегалия, очаговые поражения), глаз (передний и задний увеит), нервной системы (нейросаркоидоз с бульбарными нарушениями, периферическая нейропатия), селезенки (спленомегалия, гиперспленизм).

Таблица 2 Экстраторакальные проявления при сравнении групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением.

Внелегочные проявления	Стабильное течение , n=50	Прогрессирующее течение, n=50	p
Лимфаденопатия	7\0.14	15\0.3	p>0,05
Поражение кожи	12\0.24	4\0.08	p<0.05
Поражение печени	0\0	5\0.1	p<0.05
Поражение глаз	0\0	5\0.1	p<0.05
Поражение сердца	0\0	2\0.04	p>0,05
Поражение нервной системы	0\0	6\0.12	p<0.05
Поражение почек	0\0	3\0.06	p>0,05
Поражение слюнных желез	0\0	2\0.04	p>0,05
Поражение селезенки	0\0	5\0.1	p<0.05
Поражение суставов	1\0.02	2\0.04	p>0,05

Достоверно значимых различий коморбидной патологии в сравниваемых группах не выявлено.

Анализ течения заболевания.

При наблюдении положительная клинико-лабораторная и рентгенологическая динамика (спонтанная регрессия и регрессия в процессе лечения) была отмечена у 312 (59%) пациентов. Прогрессирующее течение отмечалось у 8 % (40 пациентов). Стабилизация состояния (спонтанная, в процессе или после терапии) была достигнута у 30% (158 больных). Рецидивы заболевания через 1 год после окончания основного курса лечения или после спонтанной регрессии отмечались у 14 пациентов (12.4 % всех пациентов, получавших иммуносупрессивную терапию).

Факторы, способствующие прогрессированию заболевания.

Наиболее часто рецидивирующее течение саркоидоза отмечалось:

- у пациентов старше 45 лет (средний возраст 49.5 ± 3.2 лет),

- с отягощенным коморбидным фоном (42.6%, 23 человека из 54 пациентов с рецидивирующим и прогрессирующим течением).
- женщины составили 71 % (38 чел),
- у 80% (40 пациентов) наблюдались внелегочные проявления саркоидоза.

Анализ ассоциации полиморфных маркеров вариантов -308G>A и -238G>A гена *TNF* с риском развития саркоидоза.

В проведенном нами исследовании мы проанализировали частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов -308G>A и -238G>A гена *TNF* в группе больных саркоидозом и в контрольной группе. В результате, нами не установлены достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного маркера -308G>A гена *TNF* ($p=0.39$) и -238G>A гена *TNF* ($p>0,05$) в контрольной группе и в группе больных саркоидозом

В нашем исследовании мы изучили распределение аллелей по -308G>A полиморфному варианту гена *TNF* в группах больных с благоприятным и рецидивирующим течением саркоидоза легких (таблица 3)

Таблица 3. Встречаемость аллелей по -308 G>A полиморфному варианту гена *TNF* в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением.

Аллели	Больные с саркоидозом без рецидивов, n=50	Больные с рецидивирующим саркоидозом, n=50	Контроль, n=50	Точный критерий Фишера, p
G	90 (0,9)	100 (1,0)	92 (0,92)	0,002
A	10 (0,1)	0 (0,0)	8 (0,08)	

ОШ (95%ДИ) 0.116 (0.015;0.922)). Показано, что частоты аллелей по -308G>A полиморфному варианту гена *TNF* отличаются в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением. Установлено, что аллель А исследуемого полиморфного варианта гена *TNF* -308G>A встречается только в группе больных с благоприятным течением заболевания).

При сравнении распределения аллелей и генотипов по -238G>A

полиморфному варианту гена *TNFA* у больных саркоидозом и в контрольной группе достоверно значимых различий не получено.

Мы изучили распределение генотипов и аллелей по -238G>A полиморфному варианту гена *TNFA* в группах больных с благоприятным и рецидивирующим течением саркоидоза (таблица 4).

Таблица 4. Встречаемость аллелей по -238G>A варианту гена *TNFA* в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением.

Аллели	Больные с саркоидозом без рецидивов, n=50	Больные с рецидивирующим саркоидозом, n=50	Контроль, n=50	Точный критерий Фишера
G	98 (0,98)	88(0,88)	96 (0,96)	p= 0,01
A	2 (0,2)	12 (0,12)	4 (0,04)	

ОШ (95%ДИ) 8.227 (2.26; 29.05).

Показано, что носительство аллеля А по указанному маркеру ассоциировано с риском развития рецидивирующего (прогрессирующего) течения заболевания.

Таким образом, в проведенном нами исследовании не установлена связь полиморфных вариантов -308G>A и -238G>A гена *TNFA* с риском развития саркоидоза в общей выборке. Однако, данные маркеры ассоциированы с клинической формой указанной патологии (саркоидоз со стабильным и рецидивирующим течением).

Нами был изучен уровень мРНК гена *TNFA* в ЛПК у людей контрольной группы и в группе больных саркоидозом. По результатам анализа установлено значимое повышение количества транскриптов гена *TNF* в лейкоцитах крови больных саркоидозом по сравнению с контролем($p<0,05$).

Мы изучили уровень мРНК (отн. ед.) гена *TNFA* в ЛПК здоровых людей и больных саркоидозом с разным течением заболевания (таблица 5).

Таблица 5. Уровень мРНК (отн. ед.) гена *TNF* в ЛПК здоровых людей и больных саркоидозом.

Группы	Средние значения, отн. ед.	Me (Q1;Q3)
Контрольная группа (n=23)	0.062±0.007	0.048(0.042;0.078)
Больные с саркоидозом без рецидивов (n=30)	0.086±0.04*	0,066 (0,047; 0,098)
Больные саркоидозом с рецидивами (на терапии) (n=14)	0.050±0.005**	0,055 (0,038; 0,067)

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с контрольной группой (p=0.032) **Различия достоверны по сравнению с группой больных на терапии (p=0.019)

Отмечается значимое увеличение уровня транскриптов гена *TNFα* у пациентов со стабильным саркоидозом в сравнении с группой контроля и снижение у пациентов, получающих глюкокортикостероидную терапию.

Мы решили уточнить уровень транскриптов гена *TNFα* в лейкоцитах периферической крови у людей контрольной группы и в группе больных саркоидозом с разными генотипами по исследуемым полиморфным маркерам гена *TNFα*. Количество транскриптов гена *TNF* было значимо выше в группе контроля у лиц, имеющих GA и AA генотипы по -238G>A полиморфному варианту гена *TNF*. Нами не обнаружено достоверных различий в уровне транскриптов гена *TNFα* у носителей разных генотипов по полиморфному маркеру -308G>A гена *TNF* как в контрольной группе, так и группе больных саркоидозом.

Анализ ассоциации полиморфного маркера -3279C>A гена *FOXP3* с развитием саркоидоза легких

По результатам проведенного исследования не установлено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного маркера -3279C>A гена *FOXP3* в группе больных саркоидозом и в контрольной группе (p>0,05).

Нами проанализирована встречаемость генотипов по указанному полиморфному маркеру в группе больных с саркоидозом без рецидивов и в группе больных с рецидивирующим течением. Было установлено, что частоты аллелей и генотипов по rs3761548 не различаются в двух группах сравнения. На данный момент нельзя утверждать о связи указанного полиморфного варианта гена *FOXP3* с предрасположенностью и характером течения саркоидоза.

Мы оценили содержание мРНК указанного гена у пациентов с саркоидозом рецидивирующего и стабильного характера (таблица 6)

Таблица 6. Уровень мРНК гена *FOXP3* в ЛПК здоровых людей и больных саркоидозом.

Группы	Средние значения, отн. ед.	Me (Q1;Q3)
Контрольная группа (n=17)	0.239±0.036	0.195(0.134;0.343)
Больные с саркоидозом без рецидивов (n=15)	0.215±0.032*	0,172 (0,131; 0,323)
Больные с рецидивирующим саркоидозом, на терапии (n=12)	0.107±0.032**	0,121 (0,067; 0,206)

Примечание: *Различия не достоверны по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$). **Различия достоверны по сравнению с группой больных без рецидивов ($p < 0,05$). Количество транскриптов гена *FOXP3* в лейкоцитах периферической крови больных саркоидозом, не получающих противовоспалительных препаратов, и в контрольной группе значимо не различалось (таблица 6). Однако в ЛПК больных, находящихся на терапии, содержание мРНК указанного гена было достоверно ниже, чем у пациентов без терапии. Следовательно, можно предположить, что противовоспалительная терапия способствовала уменьшению количества Treg клеток.

Анализ уровня транскриптов генов каспаз в лейкоцитах периферической крови здоровых людей и больных саркоидозом .

Мы изучили содержание мРНК эффекторных (каспаза 3, 6) и иницирующей (каспаза 9) каспаз в ЛПК здоровых доноров и больных саркоидозом. Установлено, что уровень транскриптов генов каспаз пациентов с разным течением саркоидоза значимо не различался. Однако необходимо отметить тенденцию снижения содержания мРНК указанных генов в группе больных по сравнению с контрольной группой. Не доказана возможность использования уровня транскрипционной активности генов эффекторных (3, 6) и иницирующей (9) каспаз в ЛПК как диагностический маркер клинических форм саркоидоза и эффективности проводимой терапии.

Мы проанализировали содержание мРНК генов *CASP3*, *CASP6*, *CASP9* в ЛПК здоровых доноров, носителей разных аллелей и генотипов по -238G>A и -308G>A полиморфных вариантов гена *TNF α* . Показано, что уровень транскриптов гена каспазы 3 и гена каспазы 6 в ЛПК достоверно выше у носителей аллеля A по -308 G>A полиморфному маркеру гена *TNF α* , по сравнению с носителями генотипа GG ($p < 0.05$). Уровни экспрессии генов каспаз в ЛПК носителей разных генотипов по маркеру -238G>A гена *TNF α* в контрольной группе не различались. Следовательно, полиморфизм гена *TNF α* может влиять на транскрипционную активность генов каспаз и определять генетическую предрасположенность людей к развитию саркоидоза.

Выводы.

1. При длительном наблюдении положительная клиничко-лабораторная и рентгенологическая динамика была отмечена у 312 (59%) пациентов. Прогрессирующее течение отмечалось у 8 % (40 пациентов). Стабилизация состояния была достигнута у 30% (158 больных). Рецидивы заболевания отмечались у 14 пациентов (12.4 % всех пациентов, получавших иммуносупрессивную терапию). Относительно литературных данных, в нашем наблюдении редко регистрировались экстраторакальные поражения и функциональные нарушения. В группе пациентов со стабильным течением

чаще встречаются первая и вторая стадии заболевания. В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением превалируют вторая и третья стадии саркоидоза, отмечена тенденция к более частому нарушению функции внешнего дыхания, чаще отмечались экстраторакальные проявления саркоидоза.

2. Не выявлена связь носительства аллельных вариаций -308G>A и -238G>A гена *TNF α* и -3279 C>A гена *FOXP3* у обследованных лиц с наследственной предрасположенностью к саркоидозу.

3. Выявлена ассоциация носительства аллелей по указанным полиморфным вариантам гена *TNF α* с характером течения заболевания. Аллель A -308 G>A гена *TNF α* встречается только в группе больных со стабильным течением, тогда как аллель A -238G>A гена *TNF α* ассоциируется с повышенным риском развития рецидивирующего и прогрессирующего течения заболевания.

4. Не обнаружено достоверных различий в уровне мРНК генов *TNF* и *FOXP3* в лейкоцитах периферической крови у больных саркоидозом по сравнению с контрольной группой у носителей разных генотипов по исследуемым полиморфным маркерам гена *TNF* и *FOXP3*. Количество транскриптов гена *TNF* было значимо выше в группе контроля у лиц, имеющих GA и AA генотипы по -238G>A полиморфному варианту гена *TNF*.

5. Определяется достоверное повышение количества транскриптов гена *TNF* в лейкоцитах крови больных саркоидозом по сравнению с контролем. Глюкокортикостероидная терапия у пациентов с рецидивирующим и прогрессирующим течением способствует снижению содержания мРНК гена *TNF* и, вероятно, содержанию самого цитокина в плазме крови. Обнаружены значимые различия в содержании транскриптов гена *FOXP3* в лейкоцитах крови пациентов с саркоидозом без глюкокортикостероидной терапии и находящихся на терапии. У больных с рецидивирующим и прогрессирующим саркоидозом наблюдается более низкий уровень транскриптов гена *FOXP3*, что свидетельствует о снижении

пула Т-регуляторных клеток у больных под влиянием глюкокортикостероидных препаратов. Уровень транскриптов генов каспаз 3,6,9 у пациентов с разным течением саркоидоза значимо не различался.

6. Выявлено влияние генотипа по -308G>A полиморфному варианту гена *TNF* на содержание мРНК генов эффекторных (3, 6) каспаз. Уровень транскриптов гена каспазы 3 и гена каспазы 6 в лейкоцитах периферической крови достоверно выше у носителей аллеля А по -308 G>А полиморфному маркеру гена *TNF*, что обуславливает более высокую транскрипционную активность генов каспаз.

Практические рекомендации .

1. Целесообразно ведение регистра пациентов с саркоидозом для динамичного наблюдения. Возможно прогнозирование рецидивирующего течения заболевания у женщин, пациентов старше 50 лет, с отягощенным коморбидным фоном, при наличии внелегочных проявлений.

2. Рекомендовано для оценки риска рецидивирующего (прогрессирующего) течения определение носительства аллелей по полиморфным маркерам -308G>А и -238G>А гена *TNF*.

3. При контроле эффективности глюкокортикостероидной терапии рекомендовано определение транскриптов генов *TNF* и *FOXP3* в динамике.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Кузнецова Т.Ю., Татарко Н.И., Тихонович Э.Л. Саркоидоз с поражением сердца//Актуальные проблемы терапии. Материалы Республиканской научно-практической конференции терапевтов 19-20 апреля 2001г. - Петрозаводск. -С.42-43.

2. Кочетова Е.В., Зильбер Э.К., Тихонович Э.Л. , Люлю И.В. Осложнения видеоторакографии у больных саркоидозом легких//Сборник трудов 19 Национального Конгресса по болезням органов дыхания. - Москва, 10-13 ноября 2009 г.- С. 427.

3. Малышева И.Е., Тихонович Э.Л., Топчиева Л.В., Барышева О.Ю., Волкова Т.О. Экспрессия МРНК генов каспаз в лейкоцитах периферической крови при саркоидозе. // Современная медицина :21 век. Сборник научных статей сотрудников Петрозаводского государственного университета.- 2015г.-С 71-74.
4. Малышева И.Е, Топчиева Л.В., Тихонович Э.Л., Барышева О.Ю., Волкова Т.О. Анализ ассоциации полиморфизма -238G>A гена TNF с саркоидозом легких у русского населения Республики Карелия.//Иммунопатология, аллергология, инфектология.-2016 г.-, №2.-С 23-27.
5. Малышева И.Е, Топчиева Л.В., Тихонович Э.Л. Анализ ассоциации полиморфизма -308G>A гена TNF с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.//Терапевтический архив.- 2017г.- №3.-С 61 -64.
6. Малышева И.Е., Топчиева Л.В., Тихонович Э.Л., Курбатова И.В., Балан О.В. Анализ ассоциации полиморфизма -3279 C>A гена FOXP3 с риском развития саркоидоза легких//Терапевтический архив.- 2017.- №89(12).-С.64-67.
7. Малышева И.Е., Балан О.В., Тихонович Э.Л., Волкова Т.О. Экспрессия генов DRGNA и DICER в лейкоцитах периферической крови при саркоидозе. Терапевтический архив. 2018.-N 3.-С.21-24
8. Тихонович Э.Л. Саркоидоз в Карелии //Материалы 25 Национального Конгресса по болезням органов дыхания 13-16 октября 2015г. - Москва.-С .200-201.
9. Тихонович Э.Л., Везикова Н.Н., Маркелова О.А., Малышева И.Е. Эпидемиология, особенности клиники, диагностики и лечения саркоидоза в Карелии. //Ученые записки Петрозаводского государственного университета.- 2015г. -С 67-72.

Список сокращений.

ЛПК-лейкоциты периферической крови

FOXP3-forkhead box transcription factor p3

TNF α - фактор некроза опухоли альфа