

УДК 616.24-008.94:616.15-072

DOI: 10.31040/2222-8349-2026-0-3-74-86

СОЗДАНИЕ СПОСОБА ДИАГНОСТИКИ ТЯЖЕСТИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ С ПОМОЩЬЮ МАРКЕРОВ (RUBICON И NOX2) LC3-АССОЦИИРОВАННОГО ФАГОЦИТОЗА

© Б.Р. Ибрагимов, С.Н. Абрамов, И.Д. Решетникова, Е.А. Полякова,
Ю.В. Скибо, М.В. Тихомирова, З.И. Абрамова

Представлен разработанный и валидированный метод объективной оценки степени тяжести атопической бронхиальной астмы (АБА), основанный на молекулярно-генетическом анализе. Целью исследования являлось создание способа диагностики, использующего количественную ОТ-ПЦР для определения уровней экспрессии генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) – ключевых регуляторов LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP). Нарушение этого процесса лежит в основе патогенеза АБА, приводя к накоплению апоптотических клеток и хроническому воспалению.

Методологическая база включала биоинформатический дизайн специфичных праймеров с использованием баз данных Ensembl и программ Primer-BLAST, BioEdit и OligoAnalyzer. Экспериментальная часть охватывала выделение моноцитов из периферической крови здоровых доноров и пациентов с различной степенью тяжести АБА, экстракцию суммарной РНК, обратную транскрипцию и проведение ПЦР-анализа в реальном времени. Валидация метода проводилась путем сопоставления расчетных показателей с клиническими данными, классифицированными согласно рекомендациям GINA.

В ходе работы были определены оптимальные условия реакции: температура отжига +61°C и концентрация DMSO 4%, что обеспечило максимальную чувствительность и специфичность анализа. Статистическая обработка данных выявила статистически значимое снижение соотношения относительной экспрессии *RUBCN/CYBB* по мере утяжеления течения заболевания. На основании полученных результатов были установлены референсные диапазоны для каждой клинической группы: здоровые лица: ≥ 0.250 у.е.; легкая форма АБА: 0.150–0.250 у.е.; среднетяжелая форма АБА: 0.075–0.150 у.е.; тяжелая форма АБА: ≤ 0.075 у.е.

Разработанный подход продемонстрировал диагностическую чувствительность и специфичность. Ключевым преимуществом нового теста является его объективность и независимость от субъективной оценки симптомов пациентом или функциональных проб, требующих длительного мониторинга. Анализ венозной крови позволяет напрямую оценить дисбаланс в системе контроля аутофагии и окислительного стресса, исключая необходимость инвазивных провокационных тестов.

Внедрение данного метода в рутинную клиническую практику открывает перспективы для оптимизации лечебно-диагностических мероприятий. Он позволяет не только точно дифференцировать стадии болезни, но и своевременно выбирать таргетную терапию, контролировать ее эффективность и прогнозировать развитие осложнений, что в конечном итоге способствует улучшению качества жизни пациентов и долгосрочного прогноза.

Ключевые слова: LC3–ассоциированный фагоцитоз, Rubicon, NOX2, ПЦР, мРНК, атопическая бронхиальная астма.

ИБРАГИМОВ Булат Рафисович, Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: ibragimov94@inbox.ru

АБРАМОВ Сергей Николаевич, Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: 007abramov@mail.ru

РЕШЕТНИКОВА Ирина Дмитриевна – д.м.н., Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора,
e-mail: reshira@mail.ru

ПОЛЯКОВА Екатерина Александровна – к.б.н., Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Белорусский государственный медицинский университет,
e-mail: polyakovakat86@gmail.com

СКИБО Юлия Валерьевна – к.б.н., Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: yuliya_ksu@mail.ru

ТИХОМИРОВА Мария Владимировна – к.б.н., Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: mary20011994@mail.ru

АБРАМОВА Зинаида Ивановна – д.б.н., Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: ziabramova@mail.ru

Введение. Эпителиальные клетки, подвергшиеся апоптозу, должны утилизироваться соседними клетками или профессиональными фагоцитами: моноцитами, макрофагами или дендритными клетками [1–3]. Установлено, что фагоцитарная способность макрофагов при легочных заболеваниях нарушена: у больных с астмой они показывали сниженный фагоцитарный ответ [2, 4].

Основным молекулярным механизмом переработки апоптотических клеток является LC3–ассоциированный фагоцитоз (LAP), регулируемый белками Rubicon и NOX2 [1].

Rubicon принимает участие в контроле формирования фagosом и регулирует путь LAP. При данном механизме активация Rubicon индуцирует ускоренную интеграцию LC3–белков в фagosомы, минуя классический каскад аутофагии. Ключевую роль в реализации этого процесса играет ферментативный комплекс PI3KC3, включающий белки Rubicon и UVRAG, чья стабильность и миграция в формирующиеся аутофagosомы определяются присутствием VPS34 [1].

Rubicon напрямую взаимодействует с p22phox NOX2, необходимым для оптимальной продукции активных форм кислорода (АФК). Rubicon выполняет функцию активации и стабилизации комплекса NOX2, поскольку фосфатидилинозитол-3-фосфат, продуцируемый Rubicon–содержащим PI3KC3, способствует сборке комплекса NOX2, а Rubicon связывает и стабилизирует p22phox [1].

Важным компонентом данного пути является НАДФН-оксидаза второго типа (NOX2), ответственная за продукцию АФК и обеспечивающая модификацию мембран фagosом путем присоединения LC3–белков. В области новообразующейся фagosомы NOX2 катализирует перенос электронов от цитоплазматического НАДФН на молекулярный кислород, что приводит к образованию супероксид-анионов. Продукция этих радикалов служит сигналом для интеграции LC3–молекул в стенку фagosомы, усиливая доставку лизосомальных ферментов и последующий быстрый лизис внеклеточных объектов, предотвращая развитие воспалительного процесса [5–8].

Таким образом, Rubicon контролирует синтез аутофagosом, а NOX2 формирует АФК, необходимые для модификации мембраны фagosомы и привлечения LC3–белков. Совокупность взаимодействующих комплексов Rubicon–VPS34–UVRAG и NOX2 создает тонкую систе-

му контроля аутокатаболизма, обеспечивая поддержание тканевого гомеостаза и защитную реакцию организма.

Установлено, что в моноцитах пациентов с atopической бронхиальной астмой (АБА) повышена экспрессия гена NOX2, что приводит к повышенному производству АФК и увеличению окислительного стресса [5, 9].

В то же время экспрессия белка Rubicon в моноцитах у людей с астмой ниже, чем у здоровых людей, что свидетельствует о недостаточной активации LAP–пути в этих клетках [10].

Недостаточность экспрессии белка Rubicon и гиперэкспрессия белка NOX2 нарушают фагоцитарную активность макрофагов и усугубляют течение заболевания.

Использование *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) в клинической практике в качестве маркеров открывает возможности для объективной оценки степени тяжести АБА и оптимизации лечебно-диагностических мероприятий.

Современная диагностика atopической бронхиальной астмы опирается на комплексный подход, включающий оценку клинической картины, функции внешнего дыхания, аллергологический статус и лабораторные маркеры воспаления. Традиционно степень тяжести заболевания определяется по классификации, основанной на частоте дневных и ночных симптомов, потребности в бронхолитиках и показателях пиковой скорости выдоха или объема форсированного выдоха. Однако эти методы имеют ряд существенных ограничений: функциональные тесты (пикфлоуметрия, спирометрия) требуют длительного мониторингирования (не менее месяца базисной терапии) и зависят от сотрудничества пациента, что снижает их объективность и оперативность; иммунологические исследования, такие как определение уровня общего IgE, являются косвенными показателями и не всегда коррелируют со степенью тяжести воспалительного процесса в дыхательных путях; цитохимические и фармакологические тесты (например, определение гликогена в лейкоцитах после введения адреналина) характеризуются низкой чувствительностью и специфичностью, а результат носит полуколичественный характер; методы оценки клеточного иммунитета (соотношение теофиллинрезистентных лимфоцитов, уровни иммуноглобулинов А, М, G) сложны в исполнении, требуют участия специалистов разного профиля и подвержены влиянию человеческого фактора при сборе

анамнеза; дифференциальная диагностика между АБА и хроническим обструктивным бронхитом часто проводится с использованием ингаляционных проб с бронхолитиками (например, беротеком), что несет риски побочных эффектов у пациентов.

В отличие от перечисленных подходов, разработанный нами метод основан на прямой количественной оценке матричной РНК ключевых белков LC3-ассоциированного фагоцитоза (*RUBCN*, *CYBB*) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Этот подход обладает рядом преимуществ перед классическими методами: методика исключает субъективную оценку клинических признаков и результатов функциональных тестов, зависящих от состояния пациента (объективность); анализ экспрессии генов позволяет напрямую оценить дисбаланс в системе контроля аутофагии и окислительного стресса, лежащий в основе патогенеза тяжелой АБА, а не его отдаленные последствия, как в случае с ПСВ или уровнем IgE (молекулярная специфичность); определение уровня мРНК является наиболее простым, быстрым и эффективным способом анализа экспрессии по сравнению с иммуноферментным анализом белка или сложными биохимическими тестами (высокая чувствительность и скорость); для проведения теста требуется лишь стандартный забор венозной крови без необходимости провокационных проб с лекарственными препаратами (отсутствие инвазивных вмешательств).

Использование ОТ-ПЦР для оценки экспрессии специфических генов является общепринятым стандартом в современной медицине для дифференциальной диагностики различных патологий. Так, в инфектологии золотым стандартом диагностики вирусных инфекций (гриппа, COVID-19, ВИЧ) служит выявление вирусной РНК/ДНК методом ПЦР, который благодаря своей высокой чувствительности и специфичности вытеснил классические вирусологические и серологические методы. В онкологии диагностика лейкозов немыслима без цитогенетического анализа и ПЦР-детекции химерных генов (например, *BCR-ABL*), являющихся прямыми молекулярными маркерами и определяющих тактику таргетной терапии. Наконец, в медицинской генетике скрининг наследственных моногенных заболеваний (муковисцидоза, фенилкетонурии) основан на выявлении патогенных мутаций методом ПЦР.

Наиболее близким аналогом (прототипом) данного подхода является способ определения экспрессии гена *PTGDR* (рецептора простагландина D2) методом количественной ПЦР, используемый для прогнозирования астмы. Однако этот метод имеет существенный недостаток: он оценивает экспрессию гена-косвенного участника аллергического каскада, тогда как белки Rubicon и NOX2 являются непосредственными регуляторами фагоцитарной активности макрофагов и генерации активных форм кислорода, определяющих тяжесть течения АБА. Таким образом, наш маркерный профиль более точно отражает ключевые звенья патогенеза заболевания.

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования является создание нового подхода для диагностирования тяжести заболевания АБА на основе ОТ-ПЦР-теста с использованием маркеров LAP: *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2).

Материалы и методы. Выбор участка ДНК и подбор праймеров проводились на участках ДНК, соответствующих экзонам целевых генов. Экзоны представляют собой сегменты ДНК, копии которых сохраняются в зрелых РНК и соответствуют отдельным доменам белка. Процесс подбора праймеров осуществлялся с использованием специализированных программ: Ensembl Genome Browser, Primer-BLAST, BioEdit, OligoAnalyzer [11–15].

Ensembl Genome Browser использовали для идентификации местоположения интересующих генов и выбора оптимального региона (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Primer-BLAST применяли для проверки специфичности праймеров (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

BioEdit предназначалась для ручного дизайна и коррекции последовательности праймеров.

OligoAnalyzer 3.0 использовали для расчета характеристики праймеров (GC-состав, температура плавления и другие показатели) (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Праймеры подбирали исходя из следующих критериев: длина праймера 15–30 нуклеотидов (праймеры, содержащие менее 15 нуклеотидов недостаточно специфичны, а длина свыше 30 нуклеотидов не приводит к улучшению качества реакции); содержание GC-нуклеотидов в пределах 35–65% (предпочтительно 50%); начало праймера (5'-конец) начинается с одного-

двух остатков пуринов; конец праймера (3'-конец) завершается одним-двумя пуриновыми нуклеотидами; температура плавления праймеров (T_m) в интервале от +55 до +65°C (высокая температура повышает риск снижения эффективности амплификации, низкая – способствует образованию неспецифических гибридаций); температура отжига (T_a) ниже на 5–10°C, чем температура плавления праймера (T_m) (стабильная гибридизация праймеров с целевой последовательностью); высокая степень комплементарности целевой матрицы (~100%), низкая гомология (<70%) с другими участками генома; исключали образование димеров и вторичных структур с температурой плавления, равной или превышающей температуру плавления праймера; длина ампликона не превышала 250 пар нуклеотидов. Данная методика позволила повысить точность и воспроизводимость экспериментов, связанных с отбором участков кДНК и выбором оптимальных условий для ОТ-ПЦР-анализа [12].

Для создания пула образцов матричной РНК здоровых доноров и пациентов с подтвержденным диагнозом АБА разной степени тяжести проводили выделение РНК из моноцитов. Выделение моноцитов проводили в два этапа: на первом этапе выделяли общую фракцию лейкоцитов методом центрифугирования в градиенте плотности фикола ($\rho = 1.077$ г/мл), («ПанЭко», Россия); на втором этапе проводили обогащение фракции моноцитов методом адгезии [13].

Образцы лейкоцитов были выданы ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора.

Пациенты, участвовавшие в исследовании, проходили регулярное медицинское наблюдение и на протяжении всего эксперимента не применяли фармакотерапию. Контрольная группа, состоящая исключительно из здоровых респондентов, проживает на территории Татарстана. Клиническая картина каждого случая болезни отличалась индивидуальными характеристиками, зависящими от степени тяжести патологии. Окончательная постановка диагноза атопической бронхиальной астмы и последующая классификация тяжести производились специалистом-пульмонологом, исходя из комплекса факторов, таких как клиника, анамнез и результаты специализированных анализов крови, используя рекомендации организации Global Initiative for Asthma (GINA) [10].

Контрольная выборка, представлявшая собой группу здоровых добровольцев, охватывала возрастную категорию от 25 до 32 лет, количество участников составило 35 человек.

Пациентам с легкопротекающей атопической бронхиальной астмой присущи эпизодические проявления одышки примерно раз в месяц, преимущественно днем, с легким характером проявлений, которые купируются спонтанно или посредством одноразового приема ингаляционных или пероральных бронходилататоров. Количество испытуемых в группе с таким типом течения составило также 35 человек, возраст которых варьировался от 29 до 35 лет.

При среднем течении заболевания отмечается учащенное возникновение эпизодов одышки, повторяющихся чаще одного раза в неделю, однако не ежедневно. Такие приступы сопровождаются нарушением дыхательных функций и нуждаются в одномоментном приеме бронходилатирующих средств или кратковременном введении кортикостероидных препаратов внутривенно. Возраст пациентов группы со средним течением колебался от 33 до 40 лет, общее число исследуемых достигло 35 человек.

Наиболее тяжелое течение характеризуется постоянством симптомов и частыми рецидивами, включая ночные эпизоды затрудненного дыхания. Такие ситуации требуют серьезного терапевтического вмешательства, которое включает инъекционное применение бронходилататоров вместе с введением гормональных препаратов. Пациенты данной категории испытывали значительные ограничения физической активности и нарушение сна. Средний возраст пациентов составил от 25 до 68 лет, численность группы достигла 35 человек.

Суммарную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Выделенные клетки иммунной системы (моноциты) обрабатывали раствором ExtractRNA, подвергались гомогенизации, последующему расщеплению и фракционированию компонентов с использованием хлороформа, с последующим отделением водной фракции, содержащей молекулы РНК. Молекулы РНК осаждали добавлением изопропилового спирта и последующей промывкой этанолом. Полученные образцы РНК растворяли в воде, свободной от РНКаз.

Обратную транскрипцию РНК выполняли посредством использования набора «Реверта-L»

(AmpliSens, Россия). Реакционная смесь состояла из RT-MIX и ревертазы MMIV. Амплификацию проводили при температуре 37°C в течение 30 мин. Полученные образцы кДНК разбавляли буфером в двукратном объеме и хранили при температуре ниже -16°C до дальнейшего использования в постановке ПЦР с исследуемыми праймерами.

Анализ уровня экспрессии маркеров АБА методом полимеразной цепной реакции проводили с использованием компонентов реакционной смеси: 10X Taq Turbo буфер, в объеме 2.5 мкл (PB001, Евроген, Россия); dNTPs 50x (10 mM), в объеме 0.5 мкл (PB006S, Евроген, Россия); Комплементарная ДНК-матрица (1–100 нг на реакцию); ПЦР праймер 1 в объеме 1 мкл (*RUBCN*); ПЦР праймер 2 в объеме 1 мкл (*RUBCN*); Taq ДНК-полимераза (PK113S, Евроген, Россия) в объеме 0.5 мкл; интеркалирующий краситель SYBR Green I, 50x в объеме 0.5 мкл (PB025S, Евроген, Россия); диметилсульфоксид (DMSO) в объеме от 0 до 1.25 мкл (PB025S, Евроген, Россия); доводили H₂O (PB207S, Евроген, Россия) до объема реакционной смеси 25 мкл. Затем готовили аналогичные реакционные смеси для других мишеней *B2M*, и *CYBB*.

Подбор условий амплификации проводили на приборе CFX96 (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, США). Амплификацию проводили, выставив следующие режимы амплификации: предварительная денатурация 1 цикл при температуре t +93°C в течение 3 мин, денатурация / отжиг / элонгация / до 40 циклов: денатурация при t = +93 ... +95°C в течение 15 сек, отжиг праймеров при градиентной t = +59 ... +62°C в течение 20 с, элонгация (визуализация) при t = +72°C в течение 30 с. [14].

Расчет степени отягощенности бронхиальной астмы разработали на основе уровней экспрессии генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2), используя метод порогового цикла (ΔCT) с нормализацией относительно референсного гена. В качестве эталонного гена использовали ген *B2M*. Материалы научных исследований демонстрируют, что *B2M* является хорошим эталонным геном для нормализации экспрессии при АБА [15].

На первом этапе для вычисления относительной экспрессии нормализовали экспрессию *RUBCN* для каждого образца.

$$2^{(CT(B2M) - CT(RUBCN))} = \text{Экспрессия } RUBCN.$$

Затем высчитывали экспрессию *CYBB* (NOX2, НАДФН-оксидаза).

$$2^{(CT(B2M) - CT(CYBB))} = \text{Экспрессия } CYBB.$$

На следующем этапе полученное значение экспрессии *RUBCN* делили на значение экспрессии *CYBB* для определения степени тяжести атопической бронхиальной астмы (АБА) по формуле:

$$\text{Степень тяжести АБА} = \frac{\text{Экспрессия } RUBCN}{\text{Экспрессия } CYBB}.$$

Валидация метода осуществлялась путем сопоставления степени тяжести атопической бронхиальной астмы, рассчитанной на основании экспрессии генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2), с анамнестическими данными обследованных групп пациентов:

Контроль – нет симптомов астмы, нормальное дыхание, отсутствие ограничений физической активности (здоровые доноры).

Легкая АБА – одышка редко, обычно днем, приступы легкие, легко снимаются препаратами, нормальные физические нагрузки, длительные периоды ремиссии.

Средняя АБА – приступы чаще раза в неделю, нарушение функции дыхания, необходимы препараты быстрого действия и иногда гормоны.

Тяжелая АБА – ежедневные симптомы, частые тяжелые приступы, требуются инъекции лекарств и гормонов.

Для статистической обработки данных при определении технических параметров использовали программную среду вычислений Statistica 10.0.

Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием критериев Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. Данные рассматривались как имеющие нормальное распределение, если хотя бы два из трех использованных тестов подтвердили это предположение. Для сравнения медианных значений трех и более групп с ненормальным распределением использовали ранговый непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим post-hoc тестом Данна. Данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха *Me* [*Q1*; *Q3*], с указанием объема выборки *n*. Доверительный уровень значимости был установлен на уровне $p \leq 0.05$.

Результаты. В браузере геномов Ensembl проведен поиск генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2), с которых экспрессируются белки Rubicon и NOX2, ответственные за механизм LAP.

Т а б л и ц а 1

Список синтезированных праймеров к кДНК генов <i>RUBCN</i> (Rubicon) и <i>CYBB</i> (NOX2)				
№	Наименование	Размер шкалы синтеза и последовательность 5'–3'	Дина праймера	Длина продукта амплификации пар оснований
1	RUBCN-Pr3-One1-F (прямой)	GGCTCTGCTGATGAGGTTGA	20 н.	96
	RUBCN-Pr3-One1-R (обратный)	GGACTGGGAGGAAACGAAGG	20 н.	
2	RUBCN-Me2-Pr3-F (прямой)	TGGTGACAAAGAGCCAGAGC	20 н.	123
	RUBCN-Me2-Pr3-R (обратный)	CATTGTTGGGCACGGATTGG	20 н.	
3	RUBCN-Me2-Pr1-F (прямой)	CCAATCCGTGCCCAACAATG	20 н.	89
	RUBCN-Me2-Pr1-R (обратный)	GCCCTCTGCTTTCTTGAGGT	20 н.	
4	RUBCN-Me2-Pr10-F (прямой)	CATTCCTGACTCACTGCCCA	20 н.	90
	RUBCN-Me2-Pr10-R (обратный)	CACTCCAAGTTGCCACGAAC	20 н.	
5	RUBCN-Me2-Pr5-9-F (прямой)	AACGAGGAAAATTGCCGTGG	20 н.	93
	RUBCN-Me2-Pr5-9-R (обратный)	CAGTACCGCAGTCGCTTGAT	20 н.	
6	RUBCN-Me2-Pr3-5-F (прямой)	TGCTGCCATCGAGCTAATGA	20 н.	142
	RUBCN-Me2-Pr3-5-R (обратный)	GTTCTTGGTGCGGATTTGCT	20 н.	
7	NOX2-Pr6-1-7-F (прямой)	AAGCCTTGCTGAAACCCTG	20 н.	79
	NOX2-Pr6-1-7-R (обратный)	TTGAAAATGAAATGCACTCCCCG	23 н.	
8	NOX2-Pr2-2-8-F (прямой)	TGTCAAGTGCCCAAAGGTGT	20 н.	102
	NOX2-Pr2-2-8-R (обратный)	TCCCCAACGATGCGGATATG	20 н.	
9	NOX2-Pr5-3-9-F (прямой)	GGGGTTGAACGTCTTCTCTT	20 н.	273
	NOX2-Pr5-3-9-R (обратный)	AGTGCAATCATCCATGCCAC	20 н.	
10	NOX2-Pr5-3-1-F (прямой)	GGGCTGTTCAATGCTTGTTG	20 н.	80
	NOX2-Pr5-3-1-R (обратный)	GGCCCATCAACCGCTATCTT	20 н.	
11	NOX2-Pr5-3-4-F (прямой)	ACGAATTGTACGTGGGCAGA	21 н.	114
	NOX2-Pr5-3-4-R (обратный)	GCAAACCTGAGGGATTGGGCA	20 н.	
12	NOX2-Pr5-3-6-F (прямой)	AAGTGCCCAAAGGTGTCCAA	20 н.	96
	NOX2-Pr5-3-6-R (обратный)	CCCAACGATGCGGATATGGA	20 н.	

По поиску гена *RUBCN* было обнаружено 11 транскриптов, по гену *CYBB* – 6 транскриптов. Транскрипт NM_014687.4 гена *RUBCN* характеризуется наибольшей степенью документального подтверждения и обозначен статусом MANE Select (ENST00000296343, ENSP00000296343). Транскрипт NM_000397.4 гена *CYBB* классифицирован как MANE Select (соответствует ENST00000378588, ENSP00000367851) и выделяется наибольшим объемом верифицированных данных.

Дальнейший подбор праймеров проводился к комплементарной ДНК (кДНК), синтезированной на матрице зрелой РНК, содержащей только экзоны генов *RUBCN* и *CYBB*. кДНК гена *RUBCN* содержит 2919 нуклеотидов, тогда как комплементарная ДНК гена *CYBB* – 1712 нуклеотидов.

В программе «Primer Blast» найден 131 вариант прямого и обратного праймеров к кДНК гена *RUBCN* (Rubicon) и 111 вариантов к кДНК гена *CYBB* (NOX2).

Дальнейший подбор праймеров к кДНК генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) проводили по следующим критериям:

- отсутствие образования репликативных шпилек: 38 пар праймеров для *RUBCN*, 30 пар праймеров для *CYBB*;
- длина праймеров от 18 до 23 нуклеотидных пар: 125 пар праймеров для *RUBCN*, 101 пара праймеров для *CYBB*;
- размер фрагмента, синтезируемого полимеразой, не превышает 250 нуклеотидных пар: 90 пар праймеров для *RUBCN*, 72 пары праймеров для *CYBB*;
- содержание GC% не превышает 55%: 32 пары праймеров для *RUBCN*, 25 пар праймеров для *CYBB*;
- температура плавления праймеров находится в диапазоне от +55 ... +65°C: 18 пар праймеров для *RUBCN*, 10 пар праймеров для *CYBB*.

Таким образом, общее число подобранных пар праймеров составило соответственно 18 и 10 пар для указанных генов.

В программе Oligoanalyzer был выполнен идентичный поиск праймеров.

Согласно установленным критериям, для каждого исследуемого гена – *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) – было выбрано по шесть пар праймеров, характеризующихся оптимальными параметрами для проведения ПЦР (табл. 1).

В ходе проведенных экспериментов были синтезированы праймеры к кДНК генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) (Евроген, Россия), которые затем использовались в полимеразной

цепной реакции (ПЦР) с последующей визуализацией продуктов амплификации в 1.5%-м агарозном геле. Сравнительный анализ показал, что синтезированные праймеры обладают высокой специфичностью и эффективностью при различных температурах отжига. Исключением стали некоторые пары, для которых наблюдалось появление неспецифичности при определенных условиях. Положительные и отрицательные контроли, представленные на гелях, также подтверждают корректность проведенных экспериментов (рис. 1).

На представленных гелях можно наблюдать четкие и специфические полосы, соответствующие ожидаемым размерам продуктов амплификации для обоих генов. Это свидетельствует о том, что праймеры успешно связываются с целевыми последовательностями ДНК и обеспечивают эффективную амплификацию. Однако у *CYBB* (NOX2) пары праймеров № 11 и № 12 не наблюдается четких видимых полос на гелях, что указывает на низкую эффективность ПЦР с использованием этих праймеров.

У пар праймеров № 1, № 3 и № 4 к кДНК гена *RUBCN* (Rubicon) на гелях были обнаружены множественные полосы, что свидетельствует о неспецифичности амплификации с использованием перечисленных праймеров.

Наилучший продукт амплификации для *RUBCN* (Rubicon) при ПЦР с визуализацией в агарозном геле был получен с праймерами № 2, 5 и 6, а для *CYBB* (NOX2) – праймерами № 7, 8 и 9. Эти результаты могут быть учтены при выборе оптимального протокола для конкретных исследований.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированные праймеры к кДНК генов *RUBCN* и *CYBB* представляют собой надежные инструменты для анализа экспрессии данных генов в различных биологических образцах. Оптимальными для ПЦР с визуализацией в агарозном геле являются праймеры к кДНК гена *RUBCN* (Rubicon): № 2, 5 и 6, а также праймеры к кДНК гена *CYBB* (NOX2): № 7, 8 и 9 при температуре отжига +61°C.

В качестве зонда для ПЦР в режиме реального времени использовали интеркалирующий краситель SYBR Green I. Интенсивность флуоресценции SYBR Green I увеличивается на несколько порядков при встраивании в двухцепочечную ДНК. В ходе ПЦР при накоплении продукта амплификации сигнал флуоресценции возрастает, образуя кривую S-образной формы. Результаты градиентного ПЦР представлены на рис. 2.

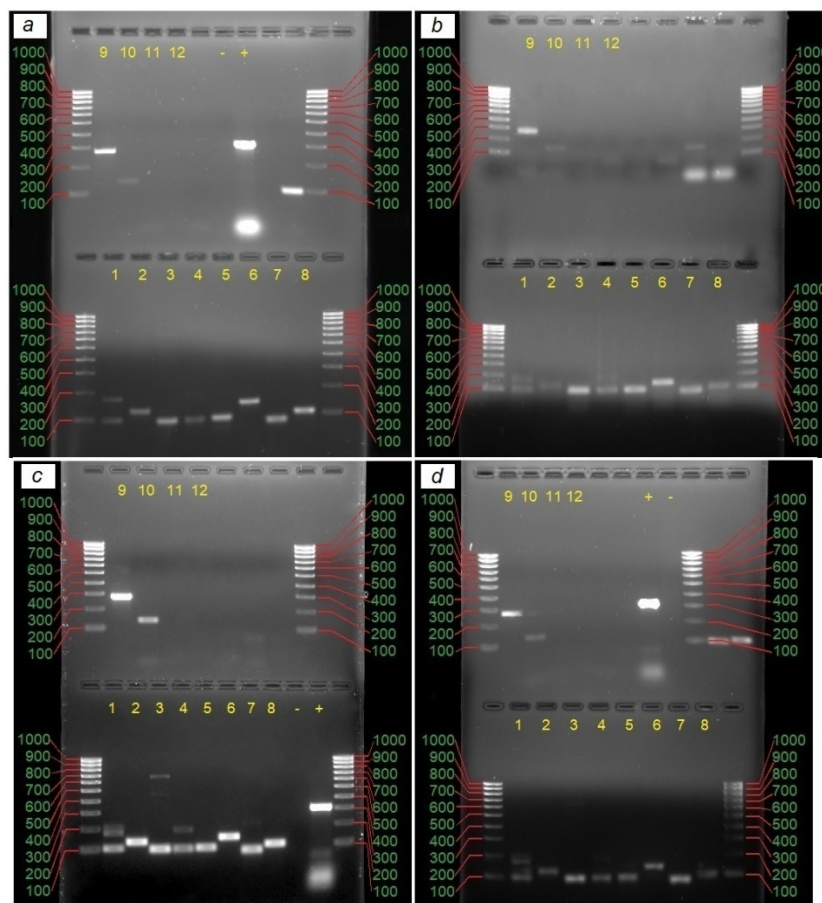


Рис. 1. Результаты ПЦР с использованием синтезированных праймеров к кДНК генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2), визуализированные в 1.5%-м агарозном геле при разных температурах отжига: *a* – +59°C, 20 с; *b* – +60°C, 20 с; *c* – +61°C, 20 с; *d* – +62°C, 20 с. № 1–6 – праймеры кДНК *RUBCN* (табл. 1); № 7–12 – праймеры кДНК *CYBB* (табл.1); «+» – положительный контроль; «-» – отрицательный контроль

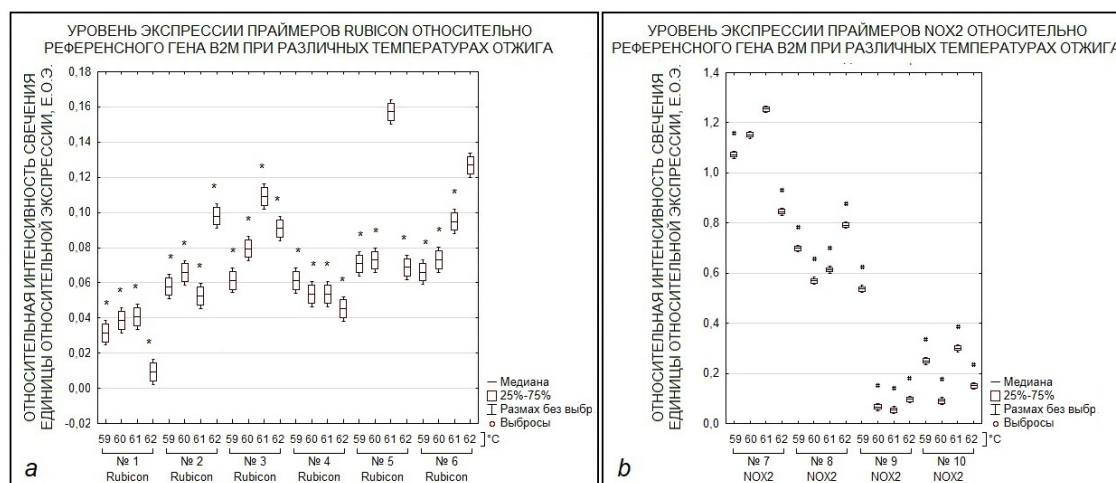


Рис. 2. Результаты градиентного ПЦР в режиме реального времени при различных температурах отжига (от 59 до 62°C) с целью подбора оптимальной температуры для максимальной чувствительности и специфичности: *a* – график амплификации *RUBCN* (Rubicon) относительно референсного гена *B2M*; *b* – график амплификации *CYBB* (NOX2) относительно референсного гена *B2M*. Для оценки различия медианных значений с ненормальным распределением применялся непараметрический критерий Краскела–Уоллиса: * – уровень статистической значимости различий с парой праймеров № 5 *RUBCN* (при температуре отжига + 61°C), $p \leq 0.05$; # – уровень статистической значимости различий с парой праймеров № 7 *CYBB* (при температуре отжига + 61°C), $p \leq 0.05$

При ПЦР в режиме реального времени наилучший сигнал для *RUBCN* (Rubicon) получается у пары праймеров № 5 при температуре отжига 61°C ($p = 0.009$), а для *CYBB* (NOX2) пары праймеров № 7 при такой же температуре отжига ($p = 0.009$). Анализ кривых плавления не выявил неспецифических продуктов амплификации, что подтверждает специфичность подобранных праймеров.

Выбор соотношения экспрессии генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) обоснован их ключевой ролью в процессе LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP), важного для эффективного удаления апоптотических клеток, нарушение

которого связаны с развитием хронического воспаления при АБА.

В ходе сравнительного анализа экспрессии генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) в мононуклеарах периферической крови у пациентов с различными формами атопической бронхиальной астмы (АБА) были рассчитаны соотношения их относительной экспрессии. Статистический анализ продемонстрировал прямую зависимость соотношения экспрессии указанных генов от степени тяжести АБА.

Анализ клинических данных больных АБА различной степени тяжести и результатов экспрессии генов выявил значительную взаимосвязь, представленную на рис. 3.

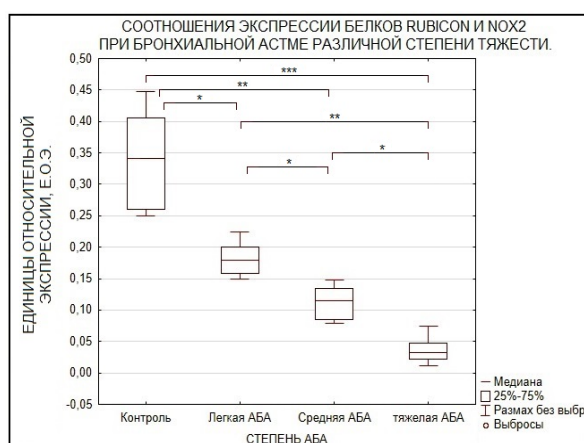


Рис. 3. Соотношения экспрессий *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) при АБА различной степени тяжести. Для оценки различия медианных значений с ненормальным распределением применялся непараметрический критерий Краскела–Уоллиса: * – $p \leq 0.05$ (статистически значимое отличие); ** – $p \leq 0.01$ (высокое статистическое значение); *** – $p \leq 0.001$ (очень высокая статистическая значимость); **** – $p \leq 0.0001$ (особо высокий уровень значимости)

Т а б л и ц а 3

Соотношения экспрессии <i>RUBCN</i> (Rubicon) и <i>CYBB</i> (NOX2) при АБА различной степени тяжести			
СТЕПЕНЬ АБА	Медианное значение (ME), $n = 35$	Интерквартильный размах [Q1; Q3]	Уровень значимости p
Контроль	0.34	0.26; 0.40	$p_{\text{Контроль-Легкая АБА}} = 0.035$ $p_{\text{Контроль-Средняя АБА}} = 0.0031$ $p_{\text{Контроль-Тяжелая АБА}} = 0.001$
Легкая АБА	0.18	0.16; 0.20	$p_{\text{Контроль-Легкая АБА}} = 0.035$ $p_{\text{Легкая АБА-Средняя АБА}} = 0.042$ $p_{\text{Легкая АБА-Тяжелая АБА}} = 0.0071$
Средняя АБА	0.12	0.08; 0.14	$p_{\text{Средняя АБА-Тяжелая АБА}} = 0.0406$ $p_{\text{Контроль-Средняя АБА}} = 0.0031$ $p_{\text{Легкая АБА-Средняя АБА}} = 0.042$
Тяжелая АБА	0.03	0.02; 0.05	$p_{\text{Контроль-Тяжелая АБА}} = 0.001$ $p_{\text{Легкая АБА-Тяжелая АБА}} = 0.0071$ $p_{\text{Средняя АБА-Тяжелая АБА}} = 0.0406$

Примечание: n – количество доноров в каждой группе.

В моноцитах здоровых доноров (контроль) соотношения относительных уровней экспрессии *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) составило 0.34 [0.26; 0.40], в группе с легкой АБА 0.18 [0.16; 0.20], в группе со средней АБА 0.12 [0.08; 0.14], в группе с тяжелой астмой 0.03 [0.02; 0.05].

Анализ показал наличие статистических различий во всех сравниваемых группах

Было подтверждено наличие значимых межгрупповых отличий относительно среднего показателя соотношения экспрессии обоих генов (*RUBCN/CYBB*) в каждой клинической подгруппе (легкая, средняя, тяжелая форма АБА и здоровые лица-доноры). При этом выявлено снижение соотношения относительных уровней экспрессии *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) с увеличением отягощенности заболевания АБА.

Установлены следующие референсные значения экспрессии генов в зависимости от тяжести заболевания:

здоровое состояние: показатель расчетной формулы составляет ≥ 0.250 условных единиц.

АБА легкой формы: значение показателей расчетной формулы находятся в диапазоне от 0.150 до 0.250 условных единиц.

АБА средней тяжести: значение показателей расчетной формулы находится в интервале от 0.075 до 0.150 условных единиц.

АБА тяжелой формы: показатель расчетной формулы ≤ 0.075 условных единиц.

Таким образом, выделены референсные диапазоны экспрессии генов *RUBCN* и *CYBB*, соответствующие каждому типу тяжести АБА.

Обсуждение. Полученные в ходе исследования данные демонстрируют высокую эффективность разработанного молекулярно-генетического подхода для объективной оценки степени тяжести атопической бронхиальной астмы (АБА). Ключевым результатом является не просто констатация различий в экспрессии генов, а установление прямой корреляции между соотношением *RUBCN/CYBB* и клинической тяжестью заболевания, что позволяет рассматривать данный показатель как надежный биомаркер.

Снижение соотношения экспрессии *RUBCN* (Rubicon) к *CYBB* (NOX2) по мере утяжеления течения АБА имеет четкое патогенетическое обоснование. Rubicon выступает в роли негативного регулятора, контролирующего формирование фагосомы, в то время как NOX2 является основным источником активных форм

кислорода (АФК), необходимых для модификации мембраны фагосомы и привлечения LC3-белков. Дисбаланс, выражающийся в относительном снижении Rubicon на фоне стабильно высокой или возрастающей активности NOX2, приводит к нарушению эффективного клиренса апоптотических клеток. Это, в свою очередь, способствует персистенции хронического воспаления в дыхательных путях, что клинически проявляется учащением приступов и снижением контроля над заболеванием. Таким образом, предложенный метод позволяет количественно оценить фундаментальный дефект врожденного иммунитета, лежащий в основе патогенеза тяжелой АБА.

Современная диагностика АБА опирается на комплексный подход, включающий клиническую оценку, функциональные тесты и лабораторные маркеры. Разработанный метод обладает рядом принципиальных преимуществ по сравнению с традиционными подходами.

В сравнении с функциональными тестами (спирометрия, пикфлоуметрия), которые оценивают последствия бронхиальной обструкции и требуют активного участия пациента, анализ экспрессии генов *RUBCN* и *CYBB* направлен на выявление молекулярного базиса заболевания – дисбаланса в системе контроля аутофагии и окислительного стресса.

В отличие от иммунологических маркеров (общий IgE, эозинофилы крови), являющихся косвенными показателями атопии, и определения выдыхаемого оксида азота (FeNO), который отражает лишь текущий уровень локального воспаления, соотношение *RUBCN/CYBB* служит более специфичным индикатором. Этот маркер напрямую отражает тяжесть воспалительного процесса и степень нарушения клиренса клеток в легких, а также может указывать на фундаментальный дефект врожденного иммунитета у пациента. Это делает его ценным инструментом для прогнозирования течения болезни.

Оценка экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР является «золотым стандартом» в современной медицине благодаря высокой чувствительности и специфичности метода. Этот подход вытеснил классические методики и доказал свою незаменимость в различных областях: в онкологии – для ПЦР-детекции химерных генов (например, BCR-ABL) при диагностике лейкозов; в инфектологии – как основной инструмент выявления вирусной РНК/ДНК (грипп, COVID-19); в медицинской генетике – для скрининга наслед-

ственных заболеваний путем идентификации патогенных мутаций (муковисцидоз).

Предложенный метод диагностики АБА полностью соответствует этой парадигме, смещая фокус с оценки симптомов на анализ прямых молекулярных участников патологического процесса.

К ключевым преимуществам подхода относятся его независимость от субъективной оценки пациента или результатов функциональных проб. Анализ венозной крови позволяет напрямую оценить дисбаланс в системе контроля аутофагии и окислительного стресса, что исключает необходимость инвазивных провокационных тестов и длительного мониторинга.

Вместе с тем, для широкого внедрения метода в рутинную клиническую практику необходимо дальнейшее исследование на более обширной и гетерогенной когорте пациентов для окончательной валидации референсных значений. Стандартизация преаналитического этапа (выделение моноцитов) может потребовать адаптации протоколов для лабораторий с разным уровнем оснащения.

Заключение. В ходе проведенного исследования был разработан и предложен для внедрения в клиническую практику новый метод объективной оценки степени тяжести атопической бронхиальной астмы (АБА), основанный на молекулярно-генетическом анализе.

Доказана прямая корреляция между тяжестью течения АБА и соотношением экспрессии генов *RUBCN* (Rubicon) и *CYBB* (NOX2) в моноцитах периферической крови.

Определены и статистически обоснованы референсные диапазоны соотношения *RUBCN/CYBB* для каждой клинической группы: здоровые лица (≥ 0.250 у. е.), легкая (0.150–0.250 у. е.), среднетяжелая (0.075–0.150 у. е.) и тяжелая (≤ 0.075 у. е.) формы АБА.

Разработанный метод ОТ-ПЦР-диагностики позволяет преодолеть ключевые ограничения традиционных подходов, такие как субъективность клинической оценки и зависимость функциональных тестов от усилий пациента. Анализ венозной крови обеспечивает прямую количественную оценку дисбаланса в системе контроля аутофагии и окислительного стресса, лежащего в основе патогенеза заболевания.

Внедрение данного подхода в рутинную клиническую практику открывает перспективы для оптимизации лечебно-диагностических ме-

роприятий: он позволяет не только точно дифференцировать стадии болезни, но и своевременно выбирать таргетную терапию, контролировать ее эффективность и прогнозировать развитие осложнений. Это, в конечном счете, способствует улучшению качества жизни пациентов и долгосрочного прогноза.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Литература

1. Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Аутофагия и LC3-ассоциированный фагоцитоз: сходства и различия // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25. № 2. С. 233–252. DOI: 10.15789/1563-0625-AAL-2569
2. Michaeloudes C., Abubakar-Waziri H., Lakhdar R., Raby K., Dixey P., Adcock I.M. et al. Molecular mechanisms of oxidative stress in asthma // Molecular Aspects of Medicine. 2022. V. 85. e101026. DOI: 10.1016/j.mam.2021.101026
3. Asare P.F., Hurtado P.R., Tran H.B., Perkins G.B., Roscioli E., Hodge S. Reduction in Rubicon by cigarette smoke is associated with impaired phagocytosis and occurs through lysosomal degradation pathway // Clinical and Experimental Medicine. 2023. V. 23(7). P. 4041–4055. DOI: 10.1007/s10238-023-01105-1
4. Liu B., Zu T., Lu Y., Xing C., Gao M., Wu F. et al. The potential of efferocytosis for the treatment of bronchial asthma: A review of current trends, mechanisms and prospects // Biochemistry and Biophysics Reports. 2025. V. 19 (43):102161. DOI: 10.1016/j.bbrep.2025.102161
5. Ammar M., Bahloul N., Amri O., Omri R., Ghazzi H., Kammoun S. et al. Oxidative stress in patients with asthma and its relation to uncontrolled asthma // Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2022. V. 36(5):e24345. DOI: 10.1002/jcla.24345
6. Asrar A., Shameem M., Husain Q. Relation of oxidant antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma // Annals of Thoracic Medicine. 2012. V. 7(4). P. 226–232. DOI: 10.4103/1817-1737.102182
7. Karadogan B., Beyaz S., Gelincik A., Buyukozturk S., Arda N. Evaluation of oxidative stress biomarkers and antioxidant parameters in allergic asthma patients with different level of asthma control // Journal of Asthma. 2022. V. 59(4). P. 663–672. DOI: 10.1080/02770903.2020.1870129
8. Bylund J.J., Brown K.L., Movitz C., Dahlgren C., Karlsson A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? // Free Radical Biology and Medicine. 2010. V. 49(12). P. 1834–1845. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016

9. Ибрагимов Б.Р., Демерцидис А.С., Решетникова И.Д., Скибо Ю.В., Абрамов С.Н., Абрамова З.И. Ассоциация NADPH-оксидазы 2 (NOX2) с развитием atopической бронхиальной астмы // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2025. Т. 8. № 3. С. 1–8. DOI: 10.18097/BMCRM00272

10. Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю.В., Решетникова И.Д., Абрамов С.Н., Даминова А.Г., Евтюгин В.Г. и др. Влияние белка Rubicon на протекание LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах больных тяжелой atopической бронхиальной астмой // *Медицинская иммунология*. 2024. Т. 26. № 6. С. 1213–1222. DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2868

11. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up // *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31(20):e122. DOI: 10.1093/nar/gng122

12. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев А.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А. и др. Разнообразие праймеров для пцр и принципы их подбора // *Биомика*. 2019. Т. 11(1). С. 23–70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmc.2019-04

13. Гассан Д.А., Котова О.О., Наумов Д.Е., Сугайло И.Ю., Горчакова Ю.Г., Синюк А.А. Сравнительная характеристика условий выделения моноцитов адгезивным методом для экспериментов *in vitro* // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2020. Т. 78. С. 128–134. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-128-134

14. Мусин Х.Г., Хисамова Р.Р., Фархутдинов Р.Г., Ямалеева А.А., Кулуев Б.Р. Модифицированный ЦТАБ-метод выделения высококачественной ДНК из липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) для выявления мультилокусного полиморфизма // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2024. № 2. С. 62–76. DOI: 10.31040/2222-8349-2024-0-2-62-76

15. Bantula M., Arismendi E., Picado C., Mullool J., Roca-Ferrer J., Tubita V. Reference Gene Validation for RT-qPCR in PBMCs from Asthmatic Patients with or without Obesity // *Methods and Protocols*. 2022. V. 5(3). E35. DOI: 10.3390/mps5030035

References

1. Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Abramova Z.I. Autofagiya i LC3-assotsiirovanny fagotsitoz: skhodstva i razlichiya // *Meditinskaya immunologiya*. 2023. V. 25(2). P. 233–252. DOI:10.15789/1563–0625–AAL–2569. (In Russian)

2. Michaeloudes C., Abubakar–Waziri H., Lakhdar R., Raby K., Dixey P., Adcock I.M. et al. Molecular mechanisms of oxidative stress in asthma // *Molecular Aspects of Medicine*. 2022. V. 85:e101026. DOI: 10.1016/j.mam.2021.101026

3. Asare P.F., Hurtado P.R., Tran H.B., Perkins G.B., Roscioli E., Hodge S. Reduction in Rubicon by cigarette smoke is associated with impaired phagocytosis and occurs through lysosomal degradation pathway // *Clinical and Experimental Medicine*. 2023. V. 23(7). P. 4041–4055. DOI: 10.1007/s10238-023-01105-1

4. Liu B., Zu T., Lu Y., Xing C., Gao M., Wu F. et al. The potential of efferocytosis for the treatment of bronchial asthma: A review of current trends, mechanisms and prospects // *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2025. V. 19(43):102161. DOI: 10.1016/j.bbrep.2025.102161

5. Ammar M., Bahloul N., Amri O., Omri R., Ghazzi H., Kammoun S. et al. Oxidative stress in patients with asthma and its relation to uncontrolled asthma // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022. V. 36(5):e24345. DOI: 10.1002/jcla.24345.

6. Asrar A., Shameem M., Husain Q. Relation of oxidant antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma // *Annals of Thoracic Medicine*. 2012. V. 7(4). P. 226–232. DOI:10.4103/1817-1737.102182

7. Karadogan B., Beyaz S., Gelincik A., Buyukozturk S., Arda N. Evaluation of oxidative stress biomarkers and antioxidant parameters in allergic asthma patients with different level of asthma control // *Journal of Asthma*. 2022. V. 59(4). P. 663–672. DOI: 10.1080/02770903.2020.1870129

8. Bylund J.J., Brown K.L., Movitz C., Dahlgren C., Karlsson A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? // *Free Radical Biology and Medicine*. 2010. V. 49(12). P. 1834–1845. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016

9. Ibragimov B.R., Demertsidis A.S., Reshetnikova I.D., Skibo Yu.V., Abramov S.N., Abramova Z.I. Assotsiatsiya NADPH–oksidazy 2 (NOX2) s razvitiem atopicheskoy bronkhial'noy astmy // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2025. V. 8(3). P. 1–8. DOI: 10.18097/BMCRM00272 (In Russian)

10. Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Reshetnikova I.D., Abramov S.N., Daminova A.G., Evtyugin V.G., et al. Vliyanie belka Rubicon na protekanie LC3-assotsiirovannogo fagotsitoza v monotsitakh bol'nykh tyazheloy atopicheskoy bronkhial'noy astmoy // *Meditinskaya Immunologiya*. 2024. V. 26(6). P. 1213–1222. DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2868. (In Russian)

11. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up // *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31(20):e122. DOI: 10.1093/nar/gng122

12. Garafutdinov R.R., Baymiev A.H., Maleev G.V., Alekseev Ya.I., Zubov V.V., Chemeris D.A., et al. Raznoobrazie praymerov dlya ptsr i printsipy ikh podbora // *Biomika*. 2019. V. 11(1). P. 23–70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmc.2019-04 (In Russian)

13. Gassan D.A., Kotova O.O., Naumov D.E., Sugaylo I.Yu., Gorchakova Y.G., Sinyuk A.A. Sravnitel'naya kharakteristika usloviy vydeleniya monotsitov adgezivnym metodom dlya ehksperimentov *in vitro* // *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2020. V. 78.

P. 128–134. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-128-134 (In Russian)

14. Musin K.H.G., Khisamova R.R., Farkhutdinov R.G., Yamaleeva A.A., Kuluev B.R. Modifitsirovannyi TSTAB-metod vydeleniya vysokokachestvennoy dnk iz lipy melkolistnoy (*Tilia cordata* Mill.) dlya vyyavleniya mul'tilokusnogo polimorfizma // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra*

RAN. 2024. No. 2. P. 62–76. DOI: 10.31040/2222-8349-2024-0-2-62-76 (In Russian)

15. Bantula M, Arismendi E., Picado C., Mullol J., Roca-Ferrer J., Tubita V. Reference Gene Validation for RT-qPCR in PBMCs from Asthmatic Patients with or without Obesity // *Methods and Protocols*. 2022. V. 5(3). E35. DOI: 10.3390/mps5030035

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ASSESSING THE SEVERITY OF ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA USING MARKERS (RUBICON AND NOX2) OF LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSIS

© B.R. Ibragimov¹, S.N. Abramov¹, I.D. Reshetnikova^{1,2}, E.A. Polyakova^{3,4},
Yu.V. Skibo¹, M.V. Tikhomirova¹, Z.I. Abramova¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University,
18/1, ulitsa Kremliovskaya, 420008, Kazan, Russian Federation

²FBSI Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor
67, ulitsa Bol'shaya Krasnaya, 420015, Kazan, Russian Federation

³Belarusian research center for pediatric oncology, hematology and immunology,
43, ulitsa Frunzenskaya, 223053, Borovlyani, Republic of Belarus

⁴Belarusian State Medical University,
83, ulitsa Dzerzhinskogo, 220116, Minsk, Republic of Belarus

The study presents a developed and validated method for the objective assessment of atopic bronchial asthma (ABA) severity based on molecular genetic analysis. The aim of the research was to create a diagnostic approach utilizing quantitative RT-PCR to determine the expression levels of the *RUBCN* (Rubicon) and *CYBB* (NOX2) genes—key regulators of LC3-associated phagocytosis (LAP). Dysregulation of this process underlies the pathogenesis of ABA, leading to the accumulation of apoptotic cells and chronic inflammation.

The methodological framework included the bioinformatic design of specific primers using the Ensembl database and software tools such as Primer-BLAST, BioEdit, and OligoAnalyzer. The experimental part encompassed the isolation of monocytes from the peripheral blood of healthy donors and patients with varying degrees of ABA severity, total RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR analysis. Method validation was performed by correlating the calculated indicators with clinical data classified according to GINA recommendations.

During the work, optimal reaction conditions were determined: an annealing temperature of +61°C and a DMSO concentration of 4%, which ensured maximum sensitivity and specificity of the analysis. Statistical data processing revealed a statistically significant decrease in the relative expression ratio *RUBCN/CYBB* as the severity of the disease increased. Based on the obtained results, reference ranges were established for each clinical group: healthy individuals: ≥ 0.250 a.u.; mild ABA: 0.150–0.250 a.u.; moderate ABA: 0.075–0.150 a.u.; severe ABA: ≤ 0.075 a.u.

The developed approach demonstrated high diagnostic sensitivity and specificity. A key advantage of the new test is its objectivity and independence from the subjective assessment of symptoms by the patient or functional tests requiring long-term monitoring. Analysis of venous blood allows for a direct evaluation of the imbalance in the autophagy and oxidative stress control system, eliminating the need for invasive provocative tests.

The implementation of this method into routine clinical practice opens prospects for optimizing therapeutic and diagnostic measures. It allows not only for precise differentiation of disease stages but also for the timely selection of targeted therapy, monitoring its effectiveness, and predicting the development of complications, which ultimately contributes to improving patients' quality of life and long-term prognosis.

Keywords: LC3-associated phagocytosis, Rubicon, NOX2, PCR, mRNA, atopic bronchial asthma.