

УДК 616.248:575.17

МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА СИМАКОВА

аспирант кафедры госпитальной терапии им. акад. М. В. Черноруцкого, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Росздрава
Maria.Simakova@gmail.com

ВАСИЛИЙ ИВАНОВИЧ ТРОФИМОВ

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии им. акад. М. В. Черноруцкого, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Росздрава
trofvi@mail.ru

ЖАННА АЛЕКСАНДРОВНА МИРОНОВА

доцент кафедры госпитальной терапии им. акад. М. В. Черноруцкого, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Росздрава
zhanmir@mail.ru

ЕЛЕНА ДМИТРИЕВНА ЯНЧИНА

кандидат медицинских наук, сотрудник отдела молекулярно-генетических технологий НИЦ, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Росздрава
dr-lena@mail.ru

МИХАИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ ДУБИНА

доктор медицинских наук, сотрудник отдела молекулярно-генетических технологий НИЦ, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Росздрава
m.dubina@spmu.rssi.ru

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА С3435Т ГЕНА MDR1
СО СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

Целью работы было оценить встречаемость полиморфизма С3435Т гена множественной лекарственной устойчивости MDR1, кодирующего транспортный белок Р-гликопротеин-170 (Pgp-170) у больных бронхиальной астмой. Получены данные в пользу ассоциации аллеля С3435 и генотипа СС гена MDR1 с астмой тяжелого течения и снижением чувствительности к терапии ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС).

Ключевые слова: фармакогенетика, бронхиальная астма, ген MDR1, глюкокортикостероиды

Прогресс, достигнутый в генетике за последние 20 лет, очевиден. Примером тому является общедоступность каталогов полиморфизмов генов человека. Существенные успехи сделаны в понимании роли генетической изменчивости в определении такого сложного фенотипа, как бронхиальная астма (БА). БА является мультифакториальным заболеванием с полигенным типом наследования, в основе которого лежит хроническое воспаление дыхательных путей, приводящее к повышению гиперреактивности бронхов и развитию обратной бронхообструкции.

Результаты 12 широкогеномных скрининговых исследований пациентов с атопией, атопическим дерматитом и БА показали, что гены, ассоциированные с упомянутыми заболеваниями, расположены в десятки участков генома человека. Наиболее высокая повторяемость результатов этих работ получена для регионов

5q23-31, 6p21.1-p23, 11q13, 12q14-24.33 и 13q11-32 [10]. Однако обращает внимание тот факт, что необходимо учитывать этническую специфику при интерпретации полученных ассоциаций. С помощью метода позиционного картирования и технологии микрочипов для оценки профиля экспрессии генов число наиболее существенных для атопических заболеваний генов было сокращено до 150 [8].

Двумя важными разделами современной генетики, имеющими непосредственное отношение к лечению пациентов, являются фармакогенетика и фармакогеномика [6]. Изучением генетических особенностей пациента, влияющих на фармакологический ответ, занимается фармакогенетика. Эти генетические особенности, как правило, представляют собой полиморфные участки генов, кодирующих белки, которые участвуют в фармакокинетике и фармакодинамике

лекарственных средств. К первой группе относятся гены, кодирующие ферменты биотрансформации лекарственных средств, в частности изоферменты цитохрома P-450 (CYP2E1, CYP1A1, CYP2C19) и ферменты II фазы биотрансформации (N-ацетилтрансферазы, глутатион SH-S-трансферазы и т. д.). Существует несколько российских исследований по оценке распространенности полиморфизмов генов семейства глутатионтрансфераз при БА. В работах исследователей из Новосибирска и Санкт-Петербурга была установлена ассоциация «нулевых» генотипов GSTT1 и GSTM1, приводящих к отсутствию ферментов, с бронхиальной астмой [1], [4]. В последние годы изучается связь фармакокинетики лекарственных средств с полиморфизмами генов транспортеров: переносчиков органических анионов (OATP-C, OAT-1, OAT-3), органических катионов (OCT-1) и транспортного белка P-гликопротеина-170, кодируемого геном MDR1. Ко второй группе объектов изучения фармакогенетики относятся гены, кодирующие «молекулы-мишени» лекарственных препаратов (рецепторы, ферменты, ионные каналы), и гены, продукты которых вовлечены в патогенетические процессы (факторы свертывания крови, аполипопротеины, цитокины, факторы транскрипции и т. д.). Выявлением конкретных аллельных вариантов генов-кандидатов, определением уровня их экспрессии и степени влияния на фармакологический ответ с последующим составлением так называемых маркерных профилей для конкретного человека занимается фармакогеномика. Таким образом, фармакогеномика – это прикладное применение всего генома человека, в котором фармакогенетика исследует взаимодействия отдельного гена с лекарствами. Это позволяет прогнозировать эффективность терапии и является перспективным направлением персонализированной медицины [5].

Согласно современным взглядам, в патогенезе БА ведущая роль принадлежит воспалению. Общеизвестно использование глюкокортикостероидных гормонов (ГКС) в качестве базисной противовоспалительной терапии БА. При этом, согласно опубликованным результатам международных эпидемиологических исследований (AIRE, AIRCEE и др.), контроль над болезнью регистрируется только у 5–30 % пациентов. Данные эпидемиологических исследований, проведенных в Томской области в 2001–2002 годах, свидетельствуют об отсутствии контроля над симптомами БА у 86,1 % пациентов [2]. Одной из причин неконтролируемого течения может быть неэффективность терапии. В связи с этим привлекательным для фармакогенетических исследований у больных астмой является ген MDR1, кодирующий транспортный белок P-гликопротеин-170 (Pgp-170), который осуществляет активный процесс выведения липофильных соединений из клетки. Осуществляя эффлюкс стероидов и неко-

торых цитокинов из клетки, Pgp-170 может оказывать влияние на эффективность лечения и выраженность воспаления [11].

На сегодняшний день идентифицировано 40 полиморфизмов гена MDR1. Установлено, что полиморфизм в 26-м экзоне C3435T гена MDR1 коррелирует с уровнем экспрессии и функционированием Pgp-170 у здоровых людей. Основная масса работ по изучению полиморфизмов и экспрессии гена MDR1 выполнена у больных онкологического профиля и посвящена поиску причин множественной лекарственной резистентности и способов ее преодоления. При изучении воспалительных заболеваний кишечника и ревматоидного артрита выявлена ассоциация аллеля C3435 гена MDR1 со стероидорезистентностью и тяжелым течением заболевания [9]. Кроме того, ведутся поиски механизмов воздействия на активность Pgp-170. Так, в работе Е. Б. Логашенко (2006) предложен способ подавления экспрессии гена MDR1 с помощью малых интерферирующих РНК, расширяющий возможности химиотерапии [3]. В настоящее время проходят клинические испытания препарата P833, который является ингибитором Pgp-170. Таким образом, изучение MDR1 гена расширяет возможности повышения эффективности фармакотерапии в будущем.

Целью нашего исследования была оценка встречаемости аллельных вариантов C3435T гена MDR1 у больных БА и выявление их ассоциации со степенью тяжести заболевания и эффективностью терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-лабораторное обследование больных осуществлялось на базе клиники госпитальной терапии ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Росздрава». В исследование были включены 105 больных бронхиальной астмой, из них 77 (73 %) женщин, 28 (27 %) мужчин. Все обследованные пациенты не состояли в кровном родстве. Обследованная популяция была представлена жителями Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Диагноз ставился согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра с учетом рекомендаций Европейского респираторного общества и Российского руководства по диагностике, лечению и профилактике БА [7]. Для постановки диагноза БА применялись общеклинические и лабораторные методы обследования, включая цитологическое исследование мокроты и исследование функции внешнего дыхания. Среди обследованных было 46 (44 %) пациентов со средней степенью тяжести и 59 (56 %) больных с тяжелым течением заболевания, в возрасте от 19 до 82 лет (средний возраст – $52,13 \pm 1,3$ года). Средний возраст начала заболевания составил $36,52 \pm 1,36$ года.

Группа контроля состояла из 103 человек: 66 (64 %) женщин и 37 (36 %) мужчин. Критерии отбора в контрольную группу были сле-

дующими: 1) возраст от 20 до 75 лет, 2) отсутствие курения в анамнезе, 3) отсутствие хронической бронхолегочной патологии, аутоиммунной и онкопатологии, 4) отсутствие аллергических заболеваний в анамнезе, 5) неотягощенная наследственность в отношении аллергических заболеваний.

Молекулярно-генетические методы исследования: геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции; для идентификации аллельных вариантов гена MDR1 использовали амплификацию соответствующих фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом.

Статистический анализ полученных данных выполняли с использованием пакета статистической программы Statistica 7.0. Средние величины представлены как $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартная ошибка среднего. Сравнение частот аллелей и генотипов оценивалось при помощи критерия χ^2 и точного метода Фишера (Fisher exact test). Для оценки достоверности различий между средними использовался непараметрический тест Манн – Уитни (Mann – Whitney U test). При p менее 0,05 различия между сравниваемыми показателями считались достоверными, при p менее 0,1 различия расценивались как тенденция.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении больных тяжелой и средней степени тяжести БА достоверных различий по распределению сопутствующей патологии (гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, ожирение, ЛОР-патология, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)) между группами не было. У 44 % ($n = 47$) больных БА был отягощенный наследственный анамнез в отношении аллергических заболеваний (БА и атопический дерматит у родственников первой и второй линий). У 47 % ($n = 50$) пациентов в анамнезе существовало указание на профессиональные вредности, у подавляющего большинства (84 % ($n = 89$)) больных БА был отягощенный аллергологический анамнез. Интересно, что в группе больных тяжелой БА чаще встречалось сочетание более трех вариантов сенсибилизации по сравнению с пациентами со средней степенью тяжести: 21 % против 7,3 % ($\chi^2 = 4,08$, $p = 0,041$). При этом у пациентов с тяжелой БА чаще встречалась пыльцевая, пищевая и лекарственная сенсибилизация по сравнению с больными со средней степенью тяжести: 64,6 % против 46 % ($\chi^2 = 3,92$, $p = 0,05$), 46 % против 22 % ($\chi^2 = 5,56$, $p = 0,018$), 75 % против 46 % ($\chi^2 = 7,69$, $p = 0,005$) соответственно. Среди обследованных 38 больных в прошлом были курильщиками, среднее количество пачка/лет составило $14,18 \pm 2,21$. При этом на момент исследования 25 пациентов (24 %) продолжали курить.

Распределение частот аллелей С и Т гена MDR1 в позиции 3435 было различным в группах больных со средней и тяжелой степенью тяжести БА, а также отличалось от группы контроля. Аллель С3435 достоверно чаще встречался в группе БА по сравнению с группой контроля: 53 % против 31 % ($\chi^2 = 21,23$, $p = 0,0001$). При этом в группах больных тяжелой и средней степени тяжести БА аллель С3435 гена MDR1 также встречался чаще по сравнению с контрольной группой: 57 % против 31 % ($\chi^2 = 21,34$, $p = 0,0001$), 47 % против 31 % ($\chi^2 = 8,68$, $p = 0,0032$) соответственно. При сравнении пациентов с разной степенью тяжести БА достоверных различий в распределении частот аллелей не было выявлено.

Оценивая данные по распределению генотипов С3435Т гена MDR1, следует отметить, что гомозиготы по аллелю С3435 были чаще среди больных БА, чем в группе контроля: 29,52 % против 8,74 % ($\chi^2 = 14,48$, $p = 0,0001$). В группе больных БА тяжелого течения, как и у больных со средней степенью тяжести заболевания, чаще встречался генотип СС по сравнению с контрольной группой: 30,43 % против 8,74 % ($\chi^2 = 12,41$, $p = 0,0004$), 26,83 % против 8,74 % ($\chi^2 = 10,21$, $p = 0,001$) соответственно. В то же время гомозиготы по аллелю 3435Т чаще встречались среди больных со средней степенью тяжести БА, чем в группе тяжелой астмы: 32,72 и 16,12 % соответственно ($\chi^2 = 3,96$, $p = 0,036$).

В группе больных тяжелой БА среднее значение объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1) было меньше у носителей генотипа СС $50,32 \pm 4,21\%$ по сравнению с пациентами с генотипами СТ $62 \pm 4\%$ и ТТ $53 \pm 6\%$, однако эти отличия были статистически незначимы. Кроме того, в этой же группе у гомозигот по аллелю С3435 удельное сопротивление бронхов (Sgaw) ($0,046 \pm 0,009$) было достоверно меньше по сравнению с гетерозиготами ($0,103 \pm 0,028$), $p = 0,016$, что свидетельствует о более выраженной обструкции у этой категории лиц. При этом отличий в дозе иГКС между сравниваемыми группами больных тяжелой БА не было: $1350,0 \pm 142$ мкг/сутки – у носителей генотипа СС3435 гена MDR1, $1442,86 \pm 111$ мкг/сутки – у гетерозигот.

У 16 пациентов с тяжелой БА коморбидной патологией была ХОБЛ. Распределение генотипов С3435Т гена MDR1 у этих пациентов было следующим: СС 37 % ($n = 6$), СТ 44 % ($n = 7$), ТТ 19 % ($n = 3$) и не отличалось от распределения генотипов у пациентов с тяжелой астмой без ХОБЛ. Однако в группе больных с сочетанной легочной патологией (БА и ХОБЛ) при наличии генотипа СС гена MDR1 были ниже показатели ОФВ1 ($43,41 \pm 5,34\%$) по сравнению с генотипом СТ ($64,13 \pm 7,21\%$ ($p = 0,045$)) и ЖЕЛ (жизненная емкость легких) ($72,32 \pm 4,2\%$ против $100,13 \pm 7,52\%$ ($p = 0,016$)), что свидетельствовало о более выраженной бронхообструкции у гомозигот по аллелю С3435 гена MDR1.

ВЫВОДЫ

В результате нашего исследования обнаружена ассоциация полиморфных вариантов С3435Т гена MDR1 с БА. Более тяжелое течение заболевания было характерно для лиц с вариантом генотипа СС3435 гена MDR1, тогда как у носителей генотипа ТТ3435 чаще диагностировалась БА средней степени тяжести. При срав-

нении больных тяжелой БА выяснилось, что у носителей генотипа СС гена MDR1 степень выраженности бронхообструктивного синдрома была больше при отсутствии различий в дозах применяемых ИГКС. Этот факт, вероятно, связан с меньшей эффективностью терапии, а аллель С3435 гена MDR1 может рассматриваться в качестве маркера, ассоциированного со снижением чувствительности к терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иващенко Т. Э., Желенина Л. А. Полиморфизм генов семейства глутатион-S-трансферазы (GST) при бронхиальной астме у детей // Аллергология. 2003. Т. 2. С. 13–16.
2. Кобякова О. С. Клинико-патогенетическая характеристика и базисная терапия тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2005. 46 с.
3. Логашенко Е. Б. Подавление экспрессии гена MDR1 с помощью малых интерферирующих РНК: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2006. 20 с.
4. Ляхович В. В., Вавилин В. А., Макарова С. И., Гришанова А. Ю. Экогенетический аспект полифакторных заболеваний // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 3. С. 514–519.
5. Середенин С. Б. Лекции по фармакогенетике. М.: МИА, 2004. 303 с.
6. Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатъев И. В., Кукес В. Г. Клиническая фармакогенетика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 248 с.
7. Трофимов В. И. Руководство по диагностике, лечению и профилактике бронхиальной астмы / Под ред. акад. РАМН А. Г. Чучалина. М., 2005. 51 с.
8. Фрейдин М. Б., Брагина Е. Ю., Огородова Л. М., Пузырев В. П. Генетика атопии: современное состояние // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 3. С. 492–503.
9. Barnes P. J., Adcock I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases // Lancet. 2009. Vol. 373. P. 1905–1917.
10. Cookson W. O. C. Asthma Genetics // Chest. 2002. Vol. 121. P. 7–13.
11. Toshiyuki S. MDR1 Genotype-related Pharmacokinetics: Fact or Fiction? // Drug Metab. Pharmacokinet. 2005. Vol. 20. № 6. P. 391–414.