ISSN 1728-2918

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

2013
2

www.rusvrach.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА
Научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

2/2013

ПЕРЕДОВАЯ СТАТЬЯ

Пальцев М.А., Кветной И.М., Ильницкий А.Н., Прощаев К.И., Кветная Т.В., Совенко Г.Н., Бессарабов В.И.
Ожирение: молекулярные механизмы и оптимизация таргетной терапии 3

ОБЗОР

Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Буйкин С.В., Пузырев В.П.
Плейотропные эффекты генов предрасположенности многофакторным заболеваниям 13

Куликов Е.С., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Деев И.А., Селиванова П.А., Федосенко С.В., Кириллова Н.А.
Молекулярные механизмы тяжелой бронхиальной астмы 24

Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л.
Характеристика протеома биологических жидкостей при плоскоклеточных карциномах головы и шеи 33

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хубутия М.Ш., Боровкова Н.В., Доронина Н.В., Шмарина Н.В., Сторожев Р.В., Чудакова Л.В.
Определение антилейкоцитарных донор-специфических антител в раннем посттрансплантационном периоде 38

Волознев Л.В., Клементьева О.Е., Корсунский В.Н., Лысенко Н.П.
Экспериментальная оценка функциональной пригодности радиофармацевтического препарата ^{188}RE-золедроновая кислота 42

Шкловский В.М., Вильянов В.Б., Фукалов Ю.А., Ременник А.Ю., Скипетрова Л.А., Кобозев Г.Н., Орлов И.Ю., Петрушевский А.Г., Кудряшов А.В., Кокорева М.Е.
Полиморфизм Val66Met BDNF у больных с высоким риском летальности в результате инсульта и тяжелой черепно-мозговой травмы 46

Грознова И.Е., Чикало А.О., Бердникова Н.Г., Сычев Д.А., Кукес В.Г.
Ассоциация полиморфизма гена *IL-4Rα* с развитием реакций гиперчувствительности немедленного типа на β-лактамные антибиотики 51

Серебренникова С.В., Петров А.А., Витковский Ю.А.
Генетический полиморфизм эндотелина-1 (*Lys198Asn*) у пациентов с периферической витреохориоретинальной дистрофией в Забайкальском крае 54

Гальбинур Т.П.
Оценка риска развития хориоидальной неоваскуляризации при возрастной макулярной дегенерации 57

Новости науки 62

Главный редактор
М.А. Пальцев
академик РАН и РАМН

Редколлегия журнала

ответственный секретарь
Н.Н. Белушкина д.б.н., профессор

К.В. Анохин чл.-корр. РАН и РАМН
А.В. Васильев д.б.н., профессор
А.И. Григорьев академик РАН и РАМН
А.Д. Дурнев чл.-корр. РАМН
И.М. Кветной д.м.н., профессор
В.И. Киселев чл.-корр. РАМН
Л.С. Коков чл.-корр. РАМН
Н.Е. Кушлинский чл.-корр. РАМН
Е.М. Пальцева д.м.н.
В.О. Попов чл.-корр. РАН
Е.С. Северин чл.-корр. РАН
С.Е. Северин чл.-корр. РАМН
Д.А. Сычев д.м.н., профессор

Редакционный совет

А.И. Арчаков академик РАМН
В.А. Быков академик РАМН
А.Н. Коновалов академик РАН и РАМН
В.П. Скулачев академик РАН
В.Н. Смирнов академик РАМН, чл.-корр. РАН
В.А. Ткачук академик РАН и РАМН
А.А. Тотолян чл.-корр. РАМН
Р.М. Хаитов академик РАН и РАМН
Н.А. Яицкий академик РАМН

Решением Президиума ВАК журнал «Молекулярная медицина» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.
Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации **ПИ №ФС77-50064** от **04.06.12**
Редакция не имеет возможности возвращать рукописи
За содержание рекламных материалов редакция ответственности не несет.
Журнал выходит 6 раз в год

Учредитель и издатель
Издательский дом «Русский врач»
Генеральный директор Г.С. Зольникова

Редактор **Г.А. Суворова**
Корректор **М.Е. Щербакова**
Верстка **Р.Р. Саргсян**
Компьютерный набор **Е.А. Козловская**

Выход в свет 9.04.13.
Формат 60×90/8.
Заказ 78
Цена свободная

Отпечатано в ООО «Офсет Принт», 127550, Москва, Дмитровское ш., д. 39, корп. 1.

Адрес редакции и издателя:
119048, Москва, ул. Усачева, 11, корп. 17 *(1-й этаж)*

E-mail: belushkina@rambler.ru
E-mail: verstka@rusvrach.ru
Секретариат: 8-499-246-81-90
Отдел подписки: 8-499-246-79-83
Web-site: www.rusvrach.ru

Подписной индекс по каталогу Роспечать
для индивидуальных подписчиков 82141
для организаций 82142

MOLECULAR MEDICINE
Scientific journal

CONTENT

2/2013

EDITORIAL

Paltsev M.A., Kvetnoy I.M., Ilnitski A.N., Prashchayeu K.I., Kvetnaia T.V., Sovenko G.N., Bessarabov V.I.
The obesity: the molecular mechanisms and the optimization of target therapy 3

REVIEW

Kucher A.N., Babushkina N.P., Buikin S.V., Puzyrev V.P.
Pleiotropic effects of multifactorial disease susceptibility genes 13

Kulikov E.S., Ogorodova L.M., Freidin M.B, Deev I.A., Selivanova P.A., Fedosenko S.V., Kirillova N.A.
Molecular mechanisms of severe asthma 24

Kakurina G.V., Kondakova I.V., Choinzonov E.L.
Proteomic patterns of biological fluids in patients with head and neck squamous cell carcinoma 33

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Khubutia M.Sh., Borovkova N.V., Doronina N.V., Shmarina N.V., Storozhev R.V., Chudakova L.V.
Determination of donor specific HLA antibodies in the early post-transplant period 38

Voloznev L.V., Klementyeva O.E., Korsunsky V.N., Lysenko N.P.
Experimental evaluation of functionality radiopharmaceutical ^{188}Re-zoledronic acid 42

Shklovsky V.M., Vilyanov V.B., Fukalov Yu.A., Remennik A.Yu., Skipetrova L.A., Kobozev G.N., Orlov I.Yu., Petruschevsky A.G., Kudryashov A.V., Kokoreva M.E.
Val66Met BDNF polymorphism in patients with a high risk of mortality due to stroke and severe traumatic brain injury 46

Groznova I.E., Chikalo A.O., Berdnikova N.G., Sychev D.A., Kukes V.G.
Association of *IL-4Rα* polymorphism with the development of immediate hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics 51

Serebrennikova S.V., Petrov A.A., Vitkovsky Yu.A.
Endothelin-1 (*Lys198Asn*) gene polymorphism in patients with peripheral vitreoretinal degeneration in Transbaikalia. 54

Galbinur T.P.
The risk assessment of development of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration 57

News of Science 62

Editor-in-chief
M.A. Paltsev
acad. of RAS, RAMS

Editorial board

Executive secretary
N.N. Belushkina professor

K.V. Anokhin corr. memb. of RAS, RAMS
A.V. Vasilev professor
A.I. Grigorev acad. of RAS, RAMS
A.D. Durnev corr. memb. of RAMS
I.M. Kvetnoy professor
V.I. Kiselev corr. memb. of RAMS
L.S. Kokov corr. memb. of RAMS
N.E. Kushlinsky corr. memb. of RAMS
E.M. Paltseva d. med. s.
V.O. Popov corr. memb. of RAS
E.S. Severin corr. memb. of RAS
S.E. Severin corr. memb. of RAMS
D.A. Sychev professor

Editorial committee

A.I. Archakov acad. of RAMS
V.A. Bykov acad. of RAMS
A.N. Konovalov acad. of RAS, RAMS
V.P. Skulachev acad. of RAS
V.N. Smirnov acad. of RAMS, corr. memb. of RAS
V.A. Tkachuk acad. of RAS, RAMS
A.A. Totolyan corr. memb. of RAMS
R.M. Khaitov acad. of RAS, RAMS
N.A. Yaitsky acad. of RAS, RAMS

On Decision of the Presidium of HAC the Journal «Molecular Medicine» is included in the list of master/peer-reviewed/ scientific journals and publications, in which the main results of theses for the degree of doctor and candidate of sciences should be published
Indexed in Russian Research Citing Index

The journal was registered by the Press Committee of the Russian Federation under №ФС77-50064 on June 04, 2012
Reproduction of materials elsewhere or duplication of the materials published in the journal, in whole or in part, is not permitted without the written consent of the Russkiy Vrach (Russian Physician) Publishing House. The editors have no opportunityof returning manuscripts. The editors provide no warrantyas to the contents of advertisements.
Published 6 times a year

Publishing House «Russkiy Vrach»
General Director G.S. Zolnikova

Editor **G.A. Suvorova**
Proof-reader **M.Ye. Scherbakova**
Maker-up **R.R. Sargsyan**
Computerized compositor **Ye.A. Kozlovskaya**

Signed for publication 9.04.13.
Format 60x90/8.
Order 78
Uncontrolled price

Printed at the «Ofset Print» printing-house:
39, Dmitrovskoe chausse, Moscow, 127550

Address of the editorial office and publisher
Address: 119048, Moscow,
11, Usacheva St., corp. 17 *(1st floor)*

E-mail: belushkina@rambler.ru
E-mail: verstka@rusvrach.ru
Secretariat: 8-499-246-81-90
Subscription department: 8-499-246-79-83
Web-site: www.rusvrach.ru

Rospechat catalogue subscription index
for individual subscribers 82141
for organisations 82142

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616-056.52-092:[612.6.05:577.21]-085

ОЖИРЕНИЕ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

М.А. Пальцев[1], академик РАН и РАМН, профессор, **И.М. Кветной**[2], доктор медицинских наук, профессор, **А.Н. Ильницкий**[3], доктор медицинских наук, **К.И. Прощаев**[3, 4], доктор медицинских наук, профессор, **Т.В. Кветная**[5], доктор биологических наук, профессор, **Г.Н. Совенко**[3, 4], кандидат медицинских наук, **В.И. Бессарабов**[3], кандидат химических наук

[1]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва;
[2]НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, СЗО РАМН, Санкт-Петербург;
[3]НИМЦ «Геронтология», Москва;
[4]Белгородский государственный национальный исследовательский университет;
[5]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, Санкт-Петербург

E-mail: prashchayeu@yandex.ru

В статье представлен обзор современных данных об участии сигнальных молекул в патогенезе ожирения. Детально описывается функциональная морфология жировой ткани как мощного эндокринного и иммунного органа. Показано, что при ожирении происходит дисбаланс в продукции про- и противовоспалительных агентов, что делает жировую ткань средой поддержания хронического иммунного воспаления, которое патогенетически связано с инсулинорезистентностью и метаболическим синдромом, а также сердечно-сосудистой и другой патологией. Определение уровней и динамики ряда сигнальных молекул у пациентов с ожирением и сочетанной соматической патологией поможет в оптимизации назначения специальной таргетной терапии при указанных полиморбидных состояниях. Рассматривается возможность разработки новых подходов для оптимизации таргетной терапии ожирения с позиций персонифицированной медицины.

Ключевые слова: *ожирение, сигнальные молекулы, нейроиммуноэндокринология, персонализированная медицина*

THE OBESITY: THE MOLECULAR MECHANISMS AND THE OPTIMIZATION OF TARGET THERAPY

M.A. Paltsev[1], I.M. Kvetnoy[2], A.N. Ilnitski[3], K.I. Prashchayeu[3, 4], T.V. Kvetnaia[5], G.N. Sovenko[3, 4], V.I. Bessarabov[3]

[1]National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation; [2]The Research Institute of Obstetrics and Gynecology named after D.O. Ott of the North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation; [3]Independent Non-commercial Organization «Researching Medical Center «Gerontology», Moscow, Russian Federation; [4]National Researching University «Belgorod State University», Belgorod, Russian Federation; [5]Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology of the North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

The article reviews modern data on the participation of signaling molecules in the pathogenesis of obesity. This review provides the detailed description of the functional morphology of adipose tissue as the major endocrine and immune organ. The imbalance in production of pro- and anti-inflammatory agents was shown to turn the adipose tissue into the medium maintaining chronic immune inflammation, pathogenetically connected with insulin resistance and metabolic syndrome, as well as cardiovascular and other disorders. Determination levels and monitoring dynamics of a number of signaling molecules levels in patients with obesity and concomitant somatic pathology can optimize the prescription of special targeted therapy for these conditions of polymorbidity. The possibility of delivery of new approaches to optimize the targeted therapy of obesity is considered from the point of view of the personalized medicine.

Key words: *obesity, signal molecules, neuroimmunoendocrinology, personalized medicine*

Ожирение и ассоциированные с ним заболевания – артериальная гипертензия, дислипопротеинемия, сахарный диабет (СД) типа 2 – являются актуальной медико-социальной проблемой современного общества. Ключевую роль в их патогенезе играют сигнальные молекулы, продуцируемые жировой тканью, которая является не только пассивным аккумулятором жирных кислот, но и мощным эндокринным и иммунным органом [1, 2].

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭНДОКРИННОЙ И ИММУННОЙ ФУНКЦИЯХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Согласно современным представлениям, жировая ткань рассматривается как эндокринный орган, который продуцирует субстанции с локальным (аутокринным) и системным (эндокринным) эффектами [44].

При этом она представляет собой потенциальный локус воспаления, в процессе которого проис-

ходит активация рецепторов TLR липополисахаридами, увеличивается продукция провоспалительных цитокинов, что вносит вклад в развитие СД типа 2 и сердечно-сосудистой патологии [15]. Увеличение объема висцеральной жировой ткани приводит к системному высвобождению белка резистина и проатерогенных, провоспалительных интерлейкинов (ИЛ).

Такое повышение уровня циркулирующих цитокинов задействовано в патогенезе инсулинорезистентности мышечной ткани [11]. Любопытно, что эти провоспалительные изменения зависят от преимущественной локализации жировой ткани.

Так, при изучении характера взаимоотношений между распределением жировой ткани (по данным магнитно-резонансной томографии) и функцией микроциркуляторного русла (видеомикроскопически) выявлено, что провоспалительный статус ассоциирован с обеднением микроциркуляторного русла, причем это связано именно с висцеральным ожирением.

Изучалась роль подкожного жира в регуляции инсулинорезистентности и синтеза фактора некроза опухолей (ФНОα) висцеральной жировой тканью на примере мышей, подвергшихся подкожной липэктомии. После частичной субкутальной липэктомии у животных опытной группы увеличивался объем висцеральной жировой ткани, что сопровождалось повышением уровня плазменного инсулина и уменьшением содержания глюкозы после нагрузки глюкозой и инсулином по сравнению с показателем в контроле.

На фоне липосакции отмечались увеличение объема жировой части адипоцитов, повышенная продукции ФНОα в висцеральных жировых отложениях. При последующей трансплантации жировой ткани описанные изменения претерпевали обратное развитие. Таким образом, можно сделать вывод, что подкожные жировые отложения участвуют в регуляции системной чувствительности к инсулину, возможно, путем регуляции запасов жира и продукции ФНОα висцеральной жировой тканью. Нарушение баланса между подкожным и висцеральным жиром служит одним из факторов патогенеза инсулинорезистентности и метаболического синдрома.

Белая жировая ткань продуцирует ряд пептидов – биологически активных молекул, в том числе адипокины, которые ответственны за контроль объема потребляемой пищи, энергетический баланс и массу тела (лептин), гомеостаз глюкозы (адипонектин, резистин, адипонутрин), метаболизм липидов (ретинолсвязывающий протеин, протеин, транспортирующий этерифицированный холестерин), ангиогенез (сосудистый эндотелиальный фактор роста – VEGF), фибринолиз (ингибитор активатора плазминогена-1), про- и противовоспалительные эффекты (ФНОα, ИЛ6), сексуальное развитие и репродукцию (лептин).

Изменение объема белой жировой ткани (ожирение или липоатрофия) вызывает нарушения продукции указанных сигнальных молекул [33]. В настоящее время достоверно известно, что белая жировая ткань играет центральную роль в формировании умеренно-выраженного воспаления при ожирении. Она является резервуаром аккумуляции калорий, которые находятся в адипоцитах в виде триглицеролов. При недостаточном питании последние мобилизуются из адипоцитов в виде свободных жирных кислот.

При ожирении на фоне увеличения объемов жировой ткани происходит рост количества кровеносных сосудов, фибробластов, особенно макрофагов. Кроме того, жировая ткань является центральным местом продукции провоспалительных цитокинов, причем они синтезируются не самими адипоцитами, а клетками воспаления, за исключением лептина и адипонектина. Адипоциты же способны продуцировать ингибитор активатора плазминогена-1, протеин, стимулирующий миграцию макрофагов (MSP), ИЛ6, 8, а также амилоид плазмы-1 и 2, гаптоглобин, фактор роста нервов, фактор, ингибирующий миграцию макрофагов.

Другие сигнальные молекулы, синтезируемые адипоцитами, составляют не более 12% от продуцируемых другими клетками жировой ткани (ИЛ1β, 6, 8, 10, MSP-1, VEGF, трансформирующий фактор роста – TGF, ФНОα, фактор роста гепатоцитов – HGF, резистин, С-реактивный белок). Висцеральная жировая ткань продуцирует в основном резистин, VEGF, ИЛ6, 8, 10, в этом ее отличие от подкожной жировой ткани. Таким образом, на современном этапе развития науки жировая ткань расценивается как эндокринный орган, в котором синтезируются не только специфические нейроиммуноэндокринные факторы (такие, как лептин и адипонектин, свободные жирные кислоты), но и ряд эндо- и паракринных факторов [21].

Адипоциты способны продуцировать факторы, вносящие вклад в провоспалительный статус, характерный для ожирения. Были изучены секреция белков и экспрессия mRNA (мРНК) культивированными адипоцитами разного размера, которые были выделены при проведении пластической хирургии у 30 пациентов. Значения величины адипоцитов, которые были разделены на 4 фракции, колебались в пределах от 205±146 пл до 983±87 пл.

Выявлена четкая положительная корреляция между размерами адипоцитов и продукцией лептина, ИЛ6, 8, ФНОα, MSP, пептида, тормозящего моторику желудка (MIP), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), ИЛ1ra и адипонектина. Наибольшая разность показателей выявлена при сопоставлении суммарной активности клеток «очень больших» и «малых» в отношении лептина, ИЛ6, MSP, G-CSF. При этом продукция противовоспалительных факторов – ИЛ1ra и адипонектина – не зависела от фракции адипоцитов. С увеличением размеров клеток снижалась также продукция ИЛ10. Таким образом, размеры адипоцитов – важная детерминанта продукции адипокинов, которые наиболее активно

синтезируются в гипертрофированных клетках большого размера [40].

Накопление макрофагов в жировой ткани, общее происхождение макрофагов и адипоцитов, преимущественное наличие периферических мононуклеаров, апоптозных клеток является в совокупности клеточной основой воспаления при СД типа 2. Патогенетическое значение при этом имеют ФНОα, ИЛ6, лептин, моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1, резистин, адипонектин [30].

Важный вклад преадипоцитов в развитие воспаления подтверждено степенью дифференциации их в культуре от 0 до 90%. Липополисахаридиндуцированное воспаление и продукция провоспалительных цитокинов/хемокинов уменьшаются по мере повышения степени дифференциации. Липополисахаридиндуцированная экспрессия цитокинов предадипоцитами ассоциирована с пониженной способностью к адипогенезу, уменьшением инсулинстимулированного потребления глюкозы.

Доказана важная роль сфигнолипидов в формировании провоспалительного и протромбогенного статуса жировой ткани при ожирении, что играет немаловажную роль в последующем развитии сердечно-сосудистой патологии [39].

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ОЖИРЕНИЯ

Генетический фактор. Проблема генетической детерминации ожирения пока не нашла конструктивного решения, имеется много дискуссионных аспектов. Например, широко обсуждается вопрос о генетической предрасположенности к продукции цитокинов адипоцитами [17].

Доказана роль генетического фактора в формировании ожирения уже в детском возрасте, а также у взрослых. Изучена взаимосвязь между -308 G/A, -238 G/A, -376 G/A, -163 G/A вариациями гена ФНОα с СД и ожирением. В проведенном исследовании у 263 женщин в возрасте от 60 до 90 лет определяли уровень липидов сыворотки крови, проводили глюкозный оральный тест. Генотип ФНОα изучали с помощью полимеразной цепной реакции. При сравнении частоты аллелей полиморфизма ФНОα у здоровых и больных ожирением/СД типа 2 достоверных различий не выявлено. Скорее всего, полиморфизм промоторной зоны гена ФНОα не имеет решающего значения в развитии ожирения и СД типа 2. Исследование проведено в популяции чилийских женщин, что позволяет говорить о национальных особенностях полученных данных.

Изменение метаболизма сигнальных молекул при ожирении. При развитии ожирения повышается содержание свободных жирных кислот, в патогенез вовлекаются β-клетки, в них возникают множественные интраклеточные сигналы, что ведет к апоптозу и снижению секреции инсулина. Развитие ожирения потенцируется путем активации адипоцитокинов, таких как ФНОα, ИЛ6, оментин, лептин, висфатин, адипсин, резистин, апелин и ретинолсвязывающий белок [20].

Показано, что ожирение у женщин в постменопаузальном периоде ассоциировано с повышением продукции андрогенов, более низкой концентрацией в сыворотке крови глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG). В то же время при проведении гастропластики с целью снижения массы тела отмечается достоверное уменьшение концентрации андрогенов, однако это не влияет на выраженность хронического воспаления, инсулинорезистентность, нарушения гомеостаза глюкозы и липидов.

Жировая ткань играет важную роль в регуляции метаболического гомеостаза, а также в патогенезе СД типа 2 и атеросклероза. Эти процессы медиируются адипоцитокинами (ФНОα, лептин, резистин, адипонектин или висфатин) [37]. При ожирении наблюдается блокада инсулининдуцированного фосфорилирования тирозина, субстрата рецепторов инсулина. Этот процесс опосредован ФНОα и ИЛ6 [46]. Метаболический синдром ассоциирован с провоспалительным статусом, и роль висцерального ожирения в этом значительна. Висцеральное ожирение приводит к нарушению физиологического баланса адипокинов, инсулинорезистентности, эндотелиальной функции и к проатерогенному статусу [34].

Хронический стресс. Медиаторной базой при этом являются стрессовые гормоны – норадреналин и адреналин, кортизол, а также компоненты ренин-ангиотензиновой системы, провоспалительные цитокины, свободные жирные кислоты. Патогенетическая цепочка начинается с активации NfκB макрофагов, висцеральной жировой ткани, эндотелиальных клеток адреналином/норадреналином, что приводит к продукции специфических рецепторов, которые активируют каскад провоспалительных иммунных реакций. Они охватывают в основном висцеральную жировую ткань, которая обладает высоким потенциалом в плане генерации провоспалительных цитокинов – ИЛ6, ФНОα, лептина, резистина, адипоцитокинов, белков острой фазы. Их продукция также активируется при симпатической стимуляции, которая возникает при хрониострессе. Тот факт, что висцеральная жировая ткань обильно васкуляризирована и обогащена нервными волокнами, создает предпосылки для быстрого распространения этих сигнальных молекул.

Кортизол, ИЛ6, ангиотензин II, 11-гидроксистероиддегидрогеназа-1 стимулируют аппетит, что в совокупности создает положительный энергетический баланс; соответственно, формируется избыточная жировая прослойка. Симпатическая сигнализация индуцирует продукцию ФНОα, который стимулирует синтез ИЛ6 и лептина адипоцитами, являющимися промоторами высвобождения свободных жирных

кислот. Кроме того, симпатические медиаторы ингибируют липопротеинлипазу – фермент, способствующий синтезу жиров. В ответ на стресс в головном мозге активируются субстанции, которые способствуют консолидации жира в организме, а в печени – хроническое вялотекущее воспаление [9].

Нейротрофическая теория. В формирование патологического каскада вовлечено много нейротропных механизмов: повышенная симпатическая активность, нарушения в системе гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников, воздействие хронических инфекций с субклиническим течением, провоспалительные цитокины, эффекты адипоцитокинов, психоэмоциональный стресс.

Увеличенная масса тела расценивается как результат воздействия нейротрофинов, участвующих в процессах воспаления и иммунной патологии, метаболизме липидов и карбогидрата. На ранних этапах метаболического синдрома выявлено статистически достоверное повышение уровня фактора роста нервов. В фазе развернутых клинических проявлений отмечается достоверно более низкое, чем в норме, содержание нейротрофинов.

Возможно, этот дефицит имеет патогенетическое значение в развитии антропометрических и сосудистых изменений в фазе развернутых клинических проявлений метаболического синдрома. Сформулирована концепция этиологии и патогенеза метаболического синдрома, основанная на нейроиммуноэндокринных взаимодействиях.

Последние базируются на:

- увеличении тканевой и плазменной концентрации цитокинов ИЛ1, 6, ФНОα, что является следствием воспалительных или эмоциональных влияний;
- росте плазменной концентрации нейротрофина – фактора роста нервов за счет индукции его продукции описанными провоспалительными цитокинами;
- высоких плазменных уровнях фактора роста нервов, что приводит к вегетативной дистонии (дисбаланс нейротрансмиттеров);
- гиперпродукции нейропептида Y, следствием чего становятся повышение аппетита, ожирение, увеличение содержания лептина;
- гипоталамо-гипофизарно-адреналовом дисбалансе – увеличение продукции кортикотропинрилизинг фактора и кортизола (гормональный дисбаланс);
- изменениях в колониях иммунных клеток – увеличение количества и дегрануляция мастоцитов (иммунный дисбаланс). Результатом всех этих изменений является формирование инсулинорезистентности, ожирения и СД типа 2 [27, 42].

Внешние факторы. Причиной ожирения могут быть не только эндогенные факторы, но и ряд внешних стимулов. Например, некоторые антипсихотические препараты обладают свойствами вызывать ожирение, характеризуются продиабетогенной активностью. После года лечения клозапином у 80% пациентов повышался индекс массы тела (ИМТ), у 35% развивались нарушение толерантности к глюкозе или СД [13].

ОЖИРЕНИЕ И ХРОНИЧЕСКОЕ ИММУННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ

Известно, что хроническое иммунное воспаление является патогенетической основой многих заболеваний кардиологического, ревматологического и других профилей. Значение хронического иммунного воспаления при ожирении также достаточно широко обсуждается в современной научной литературе.

Так, в проспективных исследованиях доказана роль хронического воспаления в патогенезе СД типа 2, когда в воспалительный процесс вовлечены ИЛ1β, 6, 8, 10, ФНОα, белки острой фазы. Доказана взаимозависимость между ожирением и воспалением при гиперлептинемии, когда стимулируется активация продукции ФНОα, что происходит под влиянием митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК) [50]. Выявлена также сильная положительная связь между воспалением, ожирением и инсулинорезистентностью [3].

Изучено влияние ожирения на развитие хронического вялотекущего воспаления при остром или хроническом вдыхании частиц органической пыли. У фермеров-свиноводов хроническое иммунное воспаление, которое индуцировано вдыханием пыли, не связано с ожирением, в то время как у здоровых волонтеров остро индуцированное воспаление потенцирует продукцию ассоциированных с ожирением маркеров воспаления [14].

В исследовании Health, Aging and Body Composition изучены взаимоотношения между воспалением, гипергликемией и СД в пожилом возрасте; в нем участвовали 3075 испытуемых от 70 до 79 лет в удовлетворительном состоянии и с высоким функциональным статусом. Выявлено, что гипергликемия ассоциирована с воспалительным статусом [16].

С провоспалительным статусом ассоциирован метаболический синдром, в этом значительна роль висцерального ожирения. Оно приводит к нарушению физиологического баланса адипокинов, инсулинорезистентности, эндотелиальной дисфункции и проатерогенному статусу.

Изучено содержание маркеров воспаления при артериальной гипертензии (АГ) с сопутствующими метаболическими нарушениями. Пациенты, вошедшие в исследование, были разделены на 2 группы: с АГ и полным метаболическим синдромом (1-я группа; n=44) и с АГ и одним из компонентов метаболического синдрома (2-я группа; n=26). Контрольную группу составили 12 здоровых добровольцев. У пациентов 1-й

и 2-й групп выявлен высокий уровень ФНОα и внутриклеточных молекул адгезии (ICAM), при этом при метаболическом синдроме содержание провоспалительных цитокинов было значительно более высоким. По мере присоединения компонентов метаболического синдрома выраженность воспалительной реакции увеличивалась, причем степень инсулинорезистентности была четко связана с содержанием ФНОα [4].

Гипергликемия представляется важным фактором поддержания воспалительного статуса. При метаболическом синдроме, важным элементом которого является ожирение, в значительной степени повышается содержание ФНОα, ICAM-1, ИЛ6 по сравнению с таковым у здоровых после проведения теста толерантности к глюкозе: ФНОα – на 71%, ICAM-1 – на 74%, ИЛ6 – на 175% (через 2 ч после нагрузки глюкозой). Считается, что при метаболическом синдроме периферическое воспаление может поддерживаться посредством сенситизации лейкоцитов, которые продуцируют провоспалительные факторы в ответ на повышение содержания глюкозы.

Изучена взаимосвязь уровня ИЛ6 и ФНОα с антропометрическими показателями у 108 женщин с повышенной массой тела и ожирением в период менопаузы. Исследовали также уровень глюкозы, инсулинорезистентность. Состояние жировой прослойки изучалось ультрасонографически. Выявлена положительная корреляция между содержанием ИЛ6 и ИМТ, окружностью живота, толщиной висцерального жирового слоя, уровнем инсулинорезистентности. Содержание ФНОα положительно коррелировало с ИМТ. Установлено, что содержание провоспалительных цитокинов достоверно ассоциировано с ИМТ [47].

Патогенетическая общность ожирения и других заболеваний основана на наличии хронического иммунного воспаления. Так, изучен вопрос о продукции провоспалительных цитокинов у детей с макросомией при гестационном СД у матери. У женщин отмечено снижение содержания адипонектина плазмы, в то время как уровни ИЛ6, ФНОα и других провоспалительных цитокинов были существенно повышены. При макросомии наблюдалась дисрегуляция Th-1-цитокинов с более высоким уровнем ИЛ6, ФНОα, лептина и адипонектина [6].

Повышенное содержание ИЛ6 и ФНОα является причиной сонливости в дневное время, усталости, инсулинорезистентности у женщин с синдромом поликистозных яичников. Уровень этих цитокинов повышается независимо от наличия ожирения или синдрома сонного апноэ [45].

Ожирение ассоциировано с псориазом, при этом отрицательно влияет на прогноз. Значение провоспалительных цитокинов велико в патогенезе как ожирения, так и псориаза. ФНОα при ожирении продуцируется макрофагами жировой ткани, при псориазе – активированными Т-клетками. При псориазе важно проводить лечение ожирения, снижать массу тела, что способствует уменьшению выраженности хронического вялотекущего воспаления, содержания ФНОα, ИЛ6, лептина, повышению чувствительности периферических тканей к инсулину [26].

Предположено, что при ожирении повреждение коронарных артерий обусловлено гиперпродукцией ФНОα, а также последующим синтезом свободнорадикальных форм кислорода. Это доказано на примере эндотелийзависимой (ацетилхолин) и эндотелийнезависимой (нитропруссид натрия) вазодилатации.

Интересен вопрос об ожирении и чувствительности кожи к ультрафиолетовому (УФ) излучению. В эксперименте установлено, что у мышей с повышенной массой тела увеличено фосфорилирование белков семейства p38, янус-киназ двойного действия (JAK), а также повышен уровень циркулирующих провоспалительных цитокинов, прежде всего ФНОα, ИЛ1β и ИЛ6. Полученные данные позволяют сделать вывод, что ожирение ассоциировано с большей напряженностью оксидативного стресса и может являться фактором риска заболеваний кожи, ассоциированных с повышенным УФ-излучением [31].

Чтобы выяснить зависимость между воспалительным фоном при ожирении и возрастом, была изучена продукция воспалительных медиаторов (ИЛ6, ФНОα, С-реактивного белка) у больных СД типа 2 в разных возрастных группах: 15–25, 20–40 лет, 40–60 и 60–80 лет. Наиболее высокая воспалительная активность выявлена в 2 последних возрастных группах.

В целом инсулинорезистентность/ожирение и кардиоваскулярная патология имеют общий патофизиологический механизм, который заключается в хронической активации иммунной системы. Эта система представляет собой 1-ю линию защиты и представлена различными барьерами – макрофагами, нейтрофилами, эпителием, жировой тканью. Подчеркивается роль повышения содержания ФНОα, ИЛ1β, 6 и 18, а также снижения уровня противовоспалительных сигнальных молекул (адипонектин, некоторые изоформы ФНОα, растворимые формы CD14 и пр.), что приводит к ожирению и развитию СД типа 2 [23].

У пациентов с хронической патологией почек часто встречаются инсулинорезистентность и(или) ожирение. В некоторых исследованиях получены данные, свидетельствующие о вкладе ангиотензина II в развитие инсулинорезистентности и стимулирование синтеза провоспалительных цитокинов. 54 пациентам с хронической почечной недостаточностью (ХПН) III и IV стадий без инсулинорезистентности был назначен ингибитор рецепторов к ангиотензину (ИРА) олмесартан в дозе 40 мг в течение 16 нед (основная группа). Контрольную группу составили 25 здоровых добровольцев. В основной группе выявлен достоверно более высокий уровень триглицеридов, холестерина, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), а также инсулинорезистентности. Одновременно зарегистрированы высокие уровни

С-реактивного белка, ФНОα, ИЛ6. У пациентов с ХПН уровень лептина достоверно коррелировал с абдоминальным ожирением, содержанием инсулина, ИЛ6, а уровень адипонектина находился в обратной зависимости от абдоминального ожирения и инсулинорезистентности. Лечение олмесартаном обеспечило снижение содержания глюкозы плазмы, экскреции белка с мочой, гликированного гемоглобина, степени инсулинорезистентности. В то же время отмечено значительное снижение уровня С-реактивного белка, фибриногена; достоверной динамики в содержании адипокина не было [10].

Воспаление является обязательным компонентом атеросклеротического процесса. Е-селектин, ICAM-1 вовлечены в процессы адгезии и экстравазации макрофагов и Т-лимфоцитов в атеросклеротическую бляшку. Доказано, что при сочетании ожирения и гипергликемии изменяется уровень Е-селектина [43].

РОЛЬ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОЖИРЕНИЯ

В развитии ожирения важную патогенетическую роль играет дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами. Например, свободные жирные кислоты продуцируются адипоцитами, в то время как синтез противовоспалительных молекул – адипокинов – понижен. Важную роль играют также такие провоспалительные агенты, как резистин, висфатин, ретинолсвязывающий протеин-4.

Нарушение баланса между противо- и провоспалительными молекулами является базой для формирования дисфункции эндотелия и развития в последующем сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения и СД типа 2. Воздействие на адипоцит, находящийся в состоянии дисфункции, – основа терапии инсулинорезистентности; главную роль в этом процессе играют немедикаментозные методы [5].

Провоспалительные цитокины. При носительстве 308А гена ФНОα риск развития ожирения повышен на 23% (по сравнению с контрольной группой), кроме того, в этом случае достоверно выше систолическое давление и уровень инсулина плазмы. Это подтверждает, что ген ФНОα вовлечен в патогенез метаболического синдрома.

Жировая ткань является главным резервуаром экспрессии ФНОα, который тесно связан с инсулинорезистентностью и ожирением. Норадреналин обладает трофическими эффектами в отношении бурой жировой ткани, характеризуется дозозависимым влиянием на ФНОα-индуцированный апоптоз бурых жировых клеток. При ожирении происходят рост продукции ФНОα и снижение катехоламинергической активности. В эксперименте содержание кроликов с ожирением в условиях низких температур на протяжении 7 дней увеличивает симпатическую активность бурой жировой ткани, в значительной степени снижает количество апоптозных бурых адипоцитов. Полагают, что ФНОα играет значительную роль в контроле гомеостаза бурого жира.

ФНОα занимает важное место в развитии синдрома инсулинорезистентности при ожирении, подавляет дифференцировку адипоцитов, является ключевой молекулой в метаболических расстройствах, связанных с ожирением [5].

Тем не менее механизмы формирования инсулинорезистентности под влиянием ФНОα окончательно не расшифрованы. ФНОα-сигнализация осуществляется посредством ФНОα-рецептора-1, что на этапе транскрипции вызывает нарушение регуляции активности фосфатазы 2С. Это в свою очередь подавляет окисление свободных жирных кислот, увеличивает внутримышечную диациглицерольную аккумуляцию, вызывает инсулинорезистентность скелетных мышц [10].

У взрослых, в отличие от детей, концентрация ФНОα в плазме ассоциирована с дисфункцией капилляров в период постишемической (постокклюзивной) гиперемии, что может объяснить взаимоотношения между уровнем ФНОα и инсулинорезистентностью. Эти взаимоотношения устанавливаются в подростковом возрасте.

Под влиянием ФНОα увеличивается содержание лептина. Локальное и системное увеличение продукции ФНОα при наличии кортикоидных гормонов может способствовать увеличению экспрессии лептина в ответ на стресс, в том числе на инфекцию и ожирение.

Гиперинсулинемия потенцирует аутоамплификацию ФНОα в жировой ткани и адипоцитах. В исследованиях, в которых ФНОα вводили мышам с нормальной массой тела с дефицитом рецепторов к ФНОα, показано, что аутоамплификация медиируется посредством p55-рецепторов к ФНОα, в то время как рецепторы p75 подавляют этот ответ. В результате аутоамплификация ФНОα в адипоцитах происходит через протеинкиназу С и транскрипцию фактора кВ.

Таким образом, ФНОα способен самостоятельно регулировать собственный биосинтез в жировой ткани, что отражается на повышении его уровня при ожирении [22].

У лиц с ожирением отсутствует «нормальная» супрессия гена ФНОα в мононуклеарных клетках после нагрузкой глюкозой, что может стать одной из причин развития инсулинорезистентности [26].

TWEAK – цитокин семейства ФНО, который экспрессируется при различных факторах, приводящих к хроническому иммунному воспалению. TWEAK экспрессируется жировой тканью вне зависимости от степени ожирения. Экспрессия ФНОα увеличивается при выраженном ожирении, когда происходит инфильтрация жировой ткани макрофагами [19].

В целом маркеры хронического воспаления (ИЛ6, С-реактивный белок, ФНОα) ассоциированы с инсулинорезистентностью и гипергликемией, маркеры

фибринолиза (ингибитор активатора плазминогена-1, тканевой активатор плазминогена) – с инсулинорезистентностью, цитокины ФНОα и ИЛ6 – с ожирением. При СД типа 2 инсулинорезистентность ассоциирована с васкулярной дисфункцией, нарушением процессов фибринолиза, вялотекущим хроническим воспалением вне зависимости от наличия ожирения и плохого контроля гликемии [36].

ФНОα оказывает влияние на гипоталамус. В опытах на мышах показано, что ФНОα экспрессирует не только продукцию провоспалительных цитокинов, но и нейротрансмиттеров, которые влияют на контроль питания и термогенез (энергетический гомеостаз).

При ожирении увеличивается продукция фактора роста гепатоцитов адипоцитами в связи со стимулирующим влиянием ФНОα [7]. Изучено влияние ФНОα на потребление глюкозы изолированными адипоцитами и эксплантатами жировой ткани (из сальника и подкожной), полученными от пациентов с нормальной, повышенной массой тела и ожирением. Экспрессия ФНОα ассоциирована с повышением продукции р ФНОα2, но не р ФНОα1, при этом экспрессия ФНОα и р ФНОα2 повышалась при ожирении.

Продукция р ФНОα1 была выше в сальнике, чем в подкожных отложениях. Уровень продукции ФНОα и рецепторов к нему не различались у пациентов с центральным или периферическим ожирением. ФНОα снижал потребление глюкозы инсулинстимулированной подкожной жировой тканью, причем только у обследованных с нормальной массой тела. Это свидетельствует о связи между продукцией ФНОα и ИМТ и отсутствием таковой между ФНОα и распределением жира. При ожирении жировая ткань обладает феноменом инсулинорезистентности, возможно, в связи с повышенным уровнем ФНОα.

При СД типа 2 отмечен повышенный уровень ФНОα, триглицеридов, метаболитов оксида азота, растворимых рецепторов к ИЛ2. Достоверной разницы между больными СД и здоровыми пациентами в отношении таких показателей, как С-реактивный белок, ЛПНП, общий холестерин, липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), не выявлено. При этом у женщин отмечено более высокое, чем у мужчин, содержание ФНОα, общего холестерина, ЛПНП. Показано, что при СД, даже если масса тела не повышена, отмечается хронический иммуновоспалительный статус [38].

ФНОα медиирует нарушение внутриклеточной инсулиновой сигнализации, что является важным патогенетическим механизмом развития ожирения и ассоциированного с ним СД типа 2. Эффект ФНОα зависит от концентрации и времени экспозиции на поверхности разных клеток [5, 27].

Биологически активная форма рецептора ФНОα (sTNFR2), вызывает угнетение активности ФНОα. Ожирение, СД и инсулинорезистентность связаны с повышением активности ФНОα. Выдвинута гипотеза, согласно которой выявление sTNFR2 свидетельствует о наличии защиты от развития ожирения.

Содержание sTNFR2 определяли у 269 здоровых добровольцев и пациентов с нарушением обмена глюкозы; использовался метод моноклональных антител. Было обнаружено, что содержание sTNFR2 значительно ниже у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе и СД, при высоком содержании ЛПНП, гликированного гемоглобина, мочевой кислоты. Сделан вывод о вероятном противовоспалительном значении sTNFR2 [24].

Источником ФНОα при ожирении являются адипоциты, его уровень может повышаться также при воспалении и инфекционном процессе. Исследовано 46 пациентов, страдающих СД типа 2 и периодонтитом, для определения взаимозависимости между содержанием ФНОα и клиническим течением периодонтита, величины продукции в области десны ИЛ1β, плазменного эндотоксина, глюкозы крови, гликированного гемоглобина.

Установлено, что уровень ФНОα имеет достоверную положительную корреляцию с содержанием плазменного эндотоксина, ИЛ1β, глюкозы, гликированного гемоглобина, ИМТ. Доказана взаимосвязь между степенью выраженности периодонтита и содержанием ФНОα. Авторы исследования приходят к выводу, что периодонтозная инфекция и воспаление вносят вклад в формирование инсулинорезистентности.

Плазменный уровень ИЛ18 ассоциирован с ожирением и СД типа 2. ФНОα – один из медиаторов инсулинорезистентности. У женщин с СД типа 2 сывороточная концентрация ФНОα была выше, чем у женщин с ожирением без других заболеваний [15]. При снижении экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) происходит одновременная редукция митохондриальной активности в клетках жировой ткани в эксперименте. ФНОα вызывает дисрегуляцию активности eNOS, снижает функциональную активность митохондрий как белой, так и бурой жировой ткани.

Таким образом, значимость ФНОα в развитии метаболического синдрома и ожирения чрезвычайно велика. Кроме него, при ожирении и метаболическом синдроме в воспалительный процесс вовлечены ИЛ1β, 6, 8, 10, ФНОα, белки острой фазы.

ИЛ6, являясь медиатором воспалительных реакций, повышает активность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, стимулирует термогенез, подавляет липогенез за счет снижения депонирования триглицеридов.

Лептин осуществляет регуляцию пищевого поведения, стимуляцию теплопродукции с активацией липолиза при достижении чувства сытости, регуляцию секреции соматотропного и кортикотропного, а также половых гормонов. При ожирении возрастает концентрация лептина, который обладает свойствами биологического агента, участвующего в процессах воспаления, ангиогенеза, заживления ран [2]. Изуче-

на экспрессия генов лептина и рецепторов к лептину в ткани сердца мыши в ответ на ишемию/реперфузию, которые были достигнуты путем лигирования коронарных сосудов. Выявлено, что продукция лептина и рецепторов к нему достоверно повышалась через 8 ч и более после реперфузии.

Более того, уровень лептина коррелировал со степенью инфильтрации сердечной мышцы воспалительными элементами, однако оставался неизменным только при ишемическом воздействии. Эти данные также подтверждают наличие взаимосвязи между уровнями лептина и рецепторов к нему и риском развития сердечно-сосудистой патологии.

Лептин стимулирует воспаление посредством активации продукции ФНОα под влиянием p38 MAPK [18]. Изучена взаимосвязь между лептином и системным воспалением при остром панкреатите. Высокая масса тела была ассоциирована с тяжестью панкреатита только у мужчин, а также при андроидном типе ожирения. Лептин не является сигнальной молекулой системного воспаления при остром панкреатите; его повышенный уровень отражает, скорее, наличие высокой массы тела [18].

Гиперпролактинемия, сопутствующая ожирению, ассоциирована с инсулинорезистентностью, обусловливает повышенный ИМТ, а также низкоинтенсивное воспаление вне зависимости от ИМТ.

При ожирении в жировой ткани высвобождается *трансформирующий фактор роста β1*, причем преимущественно нежировыми клетками [22].

В проспективных исследованиях доказана роль хронического воспаления в патогенезе СД типа 2. При этом снижается уровень *резистина*, плазменного адипонектина как при СД, так и при коронарной болезни сердца. Уровень резистина при этом не отличался от такового в группе контроля, однако жестко коррелировал с содержанием других воспалительных маркеров. Проведено сравнение плазменной концентрации резистина, ИЛ6, ФНОα, растворимых рецепторов к ФНОα1 и 2 у 26 женщин с ожирением и 15 здоровых женщин.

При ожирении (основная группа) отмечены более высокие градации инсулинорезистентности и уровня инсулина, повышенное содержание ФНОα, растворимых рецепторов к ФНОα, ИЛ6. Статистической разности показателей резистина в группах не выявлено, содержание резистина не коррелировало с ИМТ, инсулинорезистентностью, содержанием глюкозы и инсулина сыворотки. Отмечена корреляция уровня резистина с толщиной жировой прослойки, содержанием ЛПНП и ИЛ6 в группе с нарушением толерантности к глюкозе. Возможно, резистин связан с воспалительным процессом и ожирением, а также с инсулинорезистентностью [29].

Адипокины действуют как связующее звено между кумуляцией массы тела и нарушенной инсулинорезистентностью. Резистин и ФНОα участвуют в снижении чувствительности к инсулину; лептин и адипонектин увеличивают пониженную чувствительность к инсулину. Накопление липидов в скелетных мышцах приводит к развитию инсулинорезистентности. Адипонектин и лептин способны увеличивать степень окисления жирных кислот и снижать содержание липидов в мышцах. Начальным патогенетическим звеном инсулинорезистентности является нарушение чувствительности мышц к лептину; последняя может быть восстановлена применением диеты и физических упражнений [19].

Адипонектин – ключевой регулятор чувствительности тканей к инсулину и тканевого воспаления. Адипонектин оказывает протективное влияние на миокард при ишемически-реперфузионном повреждении по ЦОГ-2-зависимому механизму [41]. Гипоадипонектинемия развивается при ожирении и СД [35]. Пониженное содержание адипонектина и лептина в сочетании с высоким уровнем ФНОα относится к основным нарушениям в системе цитокинов при семейной парциальной липодистрофии. Возможно, данные изменения являются ключевыми в развитии инсулинорезистентности и кардиоваскулярной патологии при этом заболевании [49].

Адипонектин продуцируется как белой, так и серой жировой тканью и циркулирует в крови в высокой концентрации. Он оказывает прямое влияние на гепатоциты (улучшает потребление глюкозы), мышечную ткань (улучшает оксидацию), васкулярное русло (снижает уровень воспалительных реакций в сосудах). Адипонектин существует в сыворотке крови в нескольких формах с разной молекулярной массой, на гепатоциты оказывает влияние форма с наибольшей массой. Содержание адипонектина обратно пропорционально содержанию жира в организме, в последующем его уровень снижается при СД и коронарной болезни сердца.

Профилактика и таргетная терапия ожирения осуществляется по следующим направлениям: физические тренировки, диетические мероприятия и образовательные программы, применение лекарственных препаратов, использование хирургических методов.

Физические тренировки. Уменьшение массы тела путем регулярных физических упражнений может привести к снижению уровня ФНОα и ИЛ6, повысить концентрацию адипонектина. Цитокины – низкомолекулярные протеины с рядом эндокринных и метаболических функций. Во многом они продуцируются висцеральным и подкожным жиром. При увеличении массы тела происходит дисрегуляция продукции цитокинов, увеличивается синтез ФНОα, ИЛ6, ингибитора активатора плазминогена, одновременно снижается продукция адипонектина. Эти взаимоотношения можно восстановить при снижении массы тела посредством физических тренировок [12].

Физические тренировки в аэробном режиме на протяжении 3 мес обеспечивают улучшение профи-

ля глюкозы без изменения массы тела. На 21% понижался уровень лептина; содержание адипокинов и С-реактивного белка не изменялось [32].

Отмечено, что сокращающиеся мышечные волокна являются главным локусом продукции циркулирующих ИЛ6 в ответ на острую физическую нагрузку, но у тренированных людей их продукция меньше. Предположено, что поскольку продукция С-реактивного белка стимулируется ИЛ6, значит, их уровни зависят от базальной физической активности. У 84 здоровых добровольцев определяли содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови с одновременным выяснением уровня физической активности методом опроса. Было установлено, что при ожирении происходит повышение содержания инсулина, С-реактивного белка, ИЛ6, адипонектина. Важно, что отсутствие физической активности ассоциировано с повышенным уровнем С-пептида, ИЛ6 и С-реактивного белка вне зависимости от ожирения, возраста, пола или курения. Более того, показатели физической активности находились в обратной зависимости от уровня ИЛ6, С-реактивного белка. Результаты исследования показывают, что низкое содержание ИЛ6 и С-реактивного белка, в отличие от ИЛ18, ФНОα, адипонектина, отражает наличие регулярной физической активности [25].

Диета и образовательные программы. Хром и конъюгированная линолевая кислота (КЛК) являются главными компонентами диеты для похудения на модели экспериментальных животных. КЛК индуцирует инсулинорезистентность, хром улучшает чувствительность к инсулину. Это приводит к снижению массы тела за счет уменьшения содержания лептина и повышения потребления кислорода [8]. Изучены биологические эффекты линолевой кислоты (ЛК) при метаболическом синдроме. ЛК обеспечивает улучшение усвоения глюкозы скелетными мышцами посредством активизации транспортных процессов на уровне клеток.

Добавление в пищу ЛК мышам с СД вызывает снижение продукции ФНОα и его содержания в скелетных мышцах [28].

Известно, что абдоминальное ожирение ассоциировано с наличием воспалительного статуса; гораздо меньше известно об изменении цитокинового статуса после пищевой нагрузки (жирное питание). Показано, что у мужчин с ожирением и инсулинорезистентностью после приема пищи повышается содержание ИЛ6; спустя 4 ч отмечено снижение уровня ФНОα; содержание С-реактивного белка не изменялось.

Установлено, что образовательные программы, направленные на устранение вредных привычек, а также обучение правильному питанию, уровню физической активности (продолжительность таких программ – 3–4 мес), способствуют снижению массы тела, уменьшению инсулинорезистентности, концентрации циркулирующих С-реактивного белка и ИЛ6.

Хирургическое лечение. При большой потере массы тела (53% от исходной) значительно снижается содержание лептина, С-реактивного белка, повышается уровень адипонектина. При менее значимой потере массы тела (20% от исходной) происходит снижение содержания растворимых CD14-рецепторов и висфатина без достоверной динамики ФНОα. Таким образом, снижение массы тела оперативным путем (билиопанкреатическая диверсионная хирургия) снижает выраженность воспалительных реакций, по крайней мере, частично [22].

Лекарственная терапия. Адипонектин является антагонистом ФНОα, который, в свою очередь, ингибирует продукцию адипонектина. Выделяют 2 рецептора к этому агенту: AdipoR1 и AdipoR2. Первый экспрессируется в основном в скелетных мышцах, увеличивает окисление липидов, второй – в печени, где увеличивает потребление глюкозы и снижает степень стеатоза. Т-кадерин, который экспрессируется в эндотелии и гладкомышечных клетках, является адипонектинсвязывающим протеином. Выдвинута версия о возможной заместительной терапии адипонектином при метаболическом синдроме [48].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что в настоящее время жировая ткань рассматривается как мощный эндокринный и иммунный орган, регуляция деятельности которого осуществляется при активном участии нейропептидов и других сигнальных молекул в ходе локальных нейроиммуноэндокринных межклеточных взаимодействий.

При ожирении происходит дисбаланс в продукции про- и противовоспалительных агентов, что делает жировую ткань средой поддержания хронического иммунного воспаления, которое патогенетически связано с инсулинорезистентностью и метаболическим синдромом, а также сердечно-сосудистой и другой патологией.

В связи с этим важную роль приобретают мероприятия по снижению массы тела, при этом с позиций нейроиммуноэндокринологии патогенетически обоснованы диета и высокая физическая активность. По уровню сигнальных молекул можно следить за эффективностью подобранных методов лечебного воздействия.

Следует отметить также перспективность дальнейшего изучения нейроиммуноэндокринологии жировой ткани и ожирения при поиске новых методов медикаментозного лечения ожирения и сопутствующих заболеваний. Изучение уровня ряда сигнальных молекул у пациентов с ожирением и сопутствующими состояниями открывает новые возможности для подбора индивидуализированной таргетной терапии с целью восстановления локальных нарушений в сигнальном молекулярном взаимодействии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильницкий А.Н., Прощаев К.И. Метаболический синдром. – Мн.: «Инторгсервис». – 2004. – 24 с.
2. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии (2-е изд.). – М., ОАО «Издательство «Медицина». – 2008. – 512 с.
3. Ahmad J., Ahmed F., Siddiqui M. Inflammation, insulin resistance and carotid IMT in first degree relatives of north Indian type 2 diabetic subjects // Diabetes Res. Clin. Pract. – 2006; 73 (2): 205–10.
4. Alexandraki K., Piperi C., Kalofoutis C. Inflammatory process in type 2 diabetes: the role of cytokines // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006; 1084: 89–117.
5. Araki S., Dobashi K., Kubo K. N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha induced changes in secretion of interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 and adiponectin from 3T3-L1 adipocytes // Life Sci. – 2006; 17: 2405–12.
6. Ategbo J., Grissa O., Yessoufou A. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2006; 91 (10): 4137–43.
7. Bell L., Ward J., Degawa-Yamauchi M. Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2006; 291 (4): 843–8.
8. Bhattacharya A., Rahman M., McCarter R. Conjugated linoleic acid and chromium lower body weight and visceral fat mass in high-fat-diet-fed mice // Lipids. – 2006; 41 (5): 437–44.
9. Black P. The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II // Med. Hypotheses. – 2006; 67 (4): 879–91.
10. Bogdanski P., Pupek-Musialik D., Luczak M. et al. Assessment of selected markers of inflammation in patients with clinical symptoms of insulin resistance and normal renal function // Pol. Merkur. Lekarski. – 2006; 21 (122): 165–8.
11. Borst S., Conover C., Bagby G. Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance // Cytokine. – 2005; 32 (1): 39–44.
12. Carvalho M., Colaco A., Fortes Z. Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance // Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. – 2006; 50 (2): 304–12.
13. Chacon M., Richart C., Gomez J. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity // Cytokine. – 2006; 33 (3): 129–37.
14. Cormier Y., Israel-Assayag E. Adiposity affects human response to inhaled organic dust // Am. J. Ind. Med. – 2006; 49 (4): 281–5.
15. Creely S., McTernan P., Kusminski C. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2006; 4: 55–67.
16. De Rekeneire N., Peila R., Ding J. Diabetes, hyperglycemia, and inflammation in older individuals: the health, aging and body composition study // Diabetes Care. – 2006; 29 (8): 1902–8.
17. Do M., Jeong H., Choi B. Inflammatory gene expression patterns revealed by DNA microarray analysis in TNF-alpha-treated SGBS human adipocytes // Yonsei. Med. J. – 2006; 31: 729–36.
18. Duarte-Rojo A., Lezama-Barreda A., Ramirez-Iglesias M. Is leptin related to systemic inflammatory response in acute pancreatitis? // World J. Gastroenterol. – 2006; 12 (27): 4392–6.
19. Dyck D., Heigenhauser G., Bruce C. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity // Acta Physiol. – 2006; 186 (1): 5–16.
20. Eldor R., Raz I. Lipotoxicity versus adipotoxicity-The deleterious effects of adipose tissue on beta cells in the pathogenesis of type 2 diabetes // Diabetes. Res. Clin. Pract. – 2006; 30: 3–8.
21. Fain J. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells // Vitam. Horm. – 2006; 74: 443–77.
22. Fain J., Tichansky D., Madan A. Transforming growth factor beta1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity // Metabolism. – 2005; 54 (11): 1546–51.
23. Fernandez-Real J. Genetic predispositions to low-grade inflammation and type 2 diabetes // Diabetes Technol. Ther. – 2006; 8 (1): 55–66.
24. Fernandez-Real J., Botas-Cervero P., Lainez B. et al. An alternatively spliced soluble TNF-alpha receptor is associated with metabolic disorders: a replication study // Clin. Immunol. – 2006; 121 (2): 236–41.
25. Fischer C., Berntsen A., Perstrup L. et al. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity // Scand. J. Med. Sci. Sports. – 2007; 17: 580–7.
26. Hamminga E., van der Lely A., Neumann H. et al. Chronic inflammation in psoriasis and obesity: implications for therapy // Med. Hypotheses. – 2006; 67 (4): 768–73.
27. Hristova M., Aloe L. Metabolic syndrome-neurotrophic hypothesis // Med. Hypotheses. – 2006; 66 (3): 545–9.
28. Inoue N., Nagao K., Wang Y. Dietary conjugated linoleic acid lowered tumor necrosis factor-alpha content and altered expression of genes related to lipid metabolism and insulin sensitivity in the skeletal muscle of Zucker rats // J. Agric. Food Chem. – 2006; 54 (20): 7935–9.
29. Janowska J., Zahorska-Markiewicz B., Olszanecka-Glinianowicz M. Relationship between serum resistin concentration and proinflammatory cytokines in obese women with impaired and normal glucose tolerance // Metabolism. – 2006; 55 (11): 1495–9.
30. Kalofoutis C., Piperi C., Zisaki A. Differences in Expression of Cardiovascular Risk Factors among Type 2 Diabetes Mellitus Patients of Different Age // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006; 1084: 166–77.
31. Katiyar S., Meeran S. Obesity increases the risk of UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling // Free Radic. Biol. Med. – 2007; 15: 299–310.
32. Klimcakova E., Polak J., Moro C. Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2006; 91 (12): 5107–12.
33. Manco M., Fernandez-Real J., Equitani F. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2006; 44: 68–76.
34. Matsui H., Motooka M., Koike H. Ischemia/reperfusion in rat heart induces leptin and leptin receptor gene expression // Life Sci. – 2006; 23: 56–63.
35. Musso G, Gambino R., Durazzo M. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease // Hepatology. – 2005; 42 (5): 1175–83.
36. Natali A., Toschi E., Baldeweg S. Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes // Diabetes. – 2006; 55 (4): 1133–40.
37. Paquot N., Tappy L. Adipocytokines: link between obesity, type 2 diabetes and atherosclerosis // Rev. Med. Liege. – 2005; 60 (5–6): 369–73.
38. Pereira F., Frode T., Medeiros Y. Evaluation of tumour necrosis factor alpha, interleukin-2 soluble receptor, nitric oxide metabolites, and lipids as inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus // Mediators Inflamm. – 2006; 1: 39–62.
39. Samad F., Hester K., Yang G. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk // Diabetes. – 2006; 55 (9): 2579–87.
40. Santos M., Patino G., Martinez H. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms and type 2 diabetes and obesity in Chilean elderly women // Rev. Med. Chil. – 2006; 134 (9): 1099–106.
41. Shibata R., Sato K., Pimentel D. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms // Nat. Med. – 2005; 11 (10): 1096–103.
42. Traxler S., Deveney C., Jobe B. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity // Clin. Exp. Immunol. – 2006; 146 (1): 39–46.
43. Troseid M., Lappegard K., Mollnes T. Changes in serum levels of E-selectin correlate to improved glycaemic control and reduced obesity in subjects with the metabolic syndrome // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2005; 65 (4): 283–90.
44. Trotti R., Cestaro B., Cazzola R. Adipose tissue and cytokines // Minerva Gastroenterol. Dietol. – 2001; 47 (4): 205–7.
45. Vgontzas A., Trakada G., Bixler E. Plasma interleukin 6 levels are elevated in polycystic ovary syndrome independently of obesity or sleep apnea // Metabolism. – 2006; 55 (8): 1076–82.
46. Wang Z., Lv J., Zhang R. Co-culture with fat cells induces cellular insulin resistance in primary hepatocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006; 345 (3): 976–83.
47. Wassink A., Olijhoek J., Visseren F. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences // Eur. J. Clin. Invest. – 2007; 37 (1): 8–17.
48. Whitehead J., Richards A., Hickman I. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome // Diabetes Obes. Metab. – 2006; 8 (3): 264–80.
49. Wong S., Huda M., English P. Adipokines and the insulin resistance syndrome in familial partial lipodystrophy caused by a mutation in lamin A/C // Diabetologia. – 2005; 48 (12): 2641–9.
50. Zhao T., Hou M., Xia M. Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor-alpha expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways // Cell Immunol. – 2005; 238 (1): 19–30.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616-056-092:[612.6.05:577.21]-07

ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЕНОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К МНОГОФАКТОРНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

А.Н. Кучер, доктор биологических наук, профессор,
Н.П. Бабушкина, кандидат биологических наук,
С.В. Буйкин, кандидат медицинских наук, **В.П. Пузырев**, академик РАМН, профессор
ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения РАМН, Томск
E-mail: aksana.kucher@medgenetics.ru

Представлен краткий обзор эволюции взглядов на явление плейотропии; рассмотрены вопросы оценки значимости плейотропных эффектов в формировании патологических состояний человека, прежде всего многофакторных заболеваний (МФЗ). Плейотропные эффекты генов-кандидатов МФЗ проиллюстрированы на основании результатов собственных исследований авторов. Показана вовлеченность одних и тех же однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP) в детерминацию различных функциональных состояний организма, а также в формирование фенотипической вариабельности различных эндофенотипов при некоторых патологиях. Полученные результаты указывают на важность накопления знаний о функциональной роли генов и их полиморфных вариантов путем анализа ассоциаций с конечными фенотипами (болезнь), эндофенотипами, а также интегральными показателями оценки функционирования организма человека.
Ключевые слова: *плейотропия, генетические ассоциации, многофакторные заболевания*

PLEIOTROPIC EFFECTS OF MULTIFACTORIAL DISEASE SUSCEPTIBILITY GENES

A.N. Kucher, N.P. Babushkina, S.V. Buikin, V.P. Puzyrev
Research Institute of Medical Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation

The article provides a brief overview of the evolution of views on the phenomenon of pleiotropy. We discuss with assessment of pleiotropic effects significance in the formation of human pathological states, above all – multifactorial diseases (MFD). Pleiotropic effects of candidate genes of MFD are illustrated on the basis of own research. We show the involvement of the same SNP in determination of different functional states of the organism, as well as in the formation of the phenotypic variability of different endophenotypes in certain pathologies. These results point to the importance of knowledge of the functional role of genes and their polymorphic variants through the analysis of associations with phenotypes (disease), endophenotypes and integral indicators assessment of the human body function.
Key words: *pleiotropy, genetic associations, multifactorial diseases*

Понятие «плейотропия» предложено более 100 лет назад известным немецким исследователем в области генетики развития L. Plate, который в 1910 г. отмечал: «...Я называю единицу наследственности плейотропной, если от нее зависят несколько признаков; эти признаки будут, следовательно, проявляться совместно и могут, таким образом, проявлять взаимосвязь...» (цит. [18]). На протяжении последующих лет исследователи пытались ответить на вопросы: что есть плейотропия, насколько она универсальна, каковы механизмы плейотропии, каково эволюционное значение плейотропии? Значительный вклад в осмысление понятия плейотропии внесли отечественные ученые в 20–30-х годах XX века (Четвериков С.С., Рокицкий П.Ф., Астауров Б.Л., Серебровский А.С. и др.) (рис. 1).

На ранних этапах развития генетики высказывались диаметрально противоположные взгляды на «сферу компетенции генов» (от идеи, что каждый ген имеет свой специфический признак, до положения, что каждый ген определяет все признаки организма). Однако по мере накопления новых знаний происходило переосмысление феномена плейотропии (см. рис. 1, табл. 1). Так, выделение истинной (возникает, когда 2 различных продукта кодируются 1 локусом) и ложной (один и тот же продукт задействован в различных метаболических путях) (по H. Grunberg) плейотропии было опровергнуто после признания положения «1 ген – 1 фермент» и возрождалось по мере развития молекулярно-генетических исследований и установления механизмов функционирования генов (цит. [26]). Отметим, что, несмотря

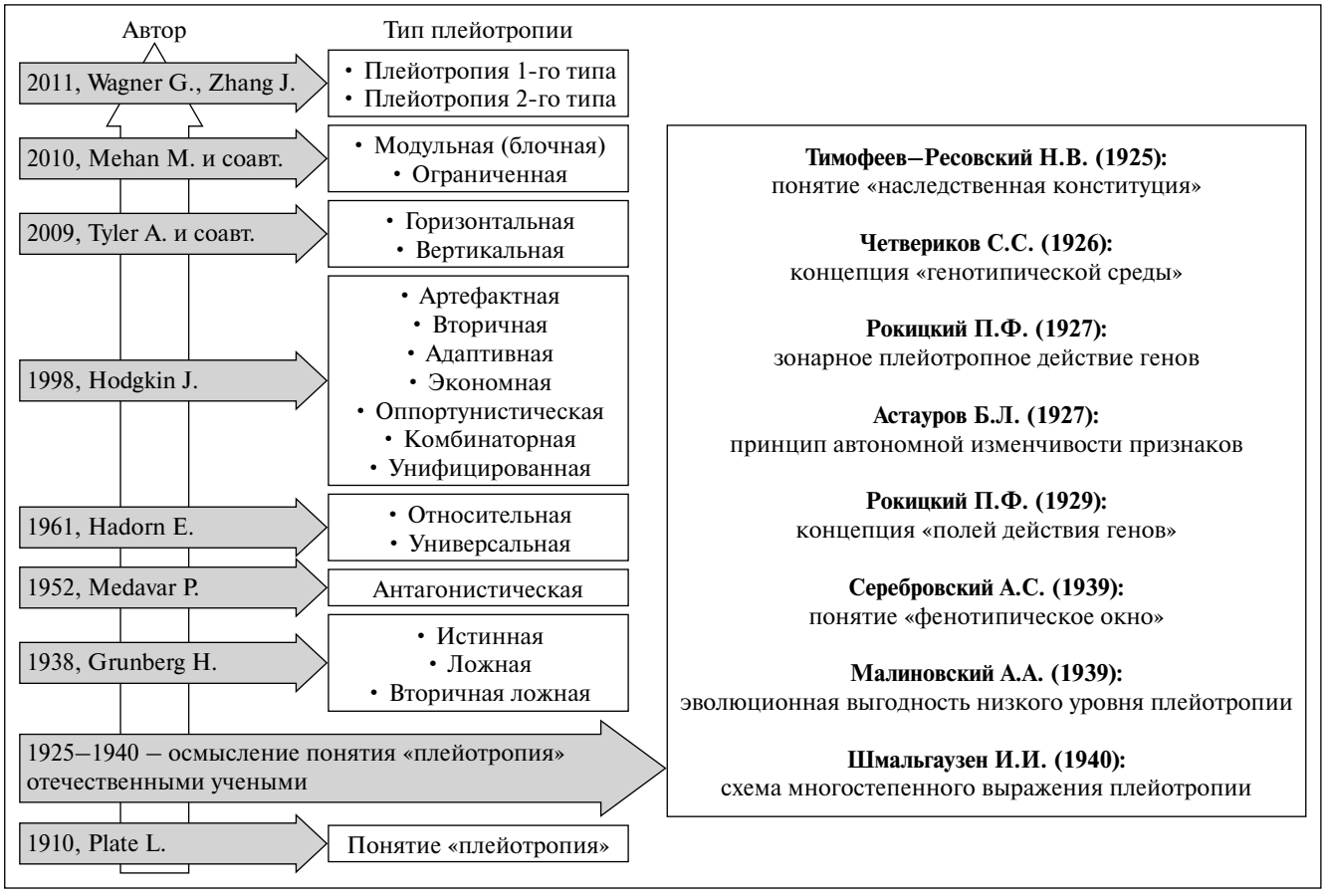


Рис. 1. *Развитие представлений о типах плейотропий в эволюционном контексте*

на некоторые различия в терминологии, выделялись практически идентичные в смысловом отношении типы плейотропий. В частности, некоторые современные исследователи [33], указав на неудачность обозначений «истинная» и «ложная» плейотропия в терминологии H. Grunberg (см. табл. 1), выделяют, по сути, эквивалентные формы – плейотропия 1-го и 2-го типа. Другие 2 типа плейотропии – горизонтальная (наблюдаются множественные эффекты одного гена) и вертикальная (один фенотип непосредственно приводит к другому), введенные A. Tyler и соавт. [30], полностью согласуются с понятиями «мозаичная» и «относительная» (родственная) плейотропия в терминологии E. Hadorn. Некоторые исследователи [15] предлагают более сложную классификацию типов плейотропий (см. табл. 1). В то же время, согласно современным данным, полученным на основании использования высокоразрешающих молекулярно-генетических технологий, плейотропные эффекты в значительной степени ограничены и в большей степени согласуются с модульным (блочным) типом, чем с универсальным (мутации по любому локусу оказывают прямое или непрямое влияние на все признаки) (см. табл. 1) [33]. Более подробно история вопроса рассмотрена F. Stearns [26].

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ПЛЕЙОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ ГЕНОВ

Типы плейотропии выделяли в соответствии с тем, оценивалась сфера компетенции единичной мутации, гена или блоков тесно сцепленных генов, а также с учетом того, на каком уровне рассматривались эффекты этих наследственных единиц – отдельные признаки (физиологические, морфометрические и т.д.), метаболические пути (модули, блоки), эндофенотипы (в том числе и скоррелированные признаки) и конечные фенотипы. В зависимости от анализируемых типов, а также от использованных критериев формирования выборок признаков и генетических маркеров, методов анализа полученные оценки степени плейотропии (т.е. число показателей, на которые оказывали влияние гены/полиморфные варианты) различались.

Установлено, что эффект отдельно взятой нуклеотидной замены более скромен, чем эффект целого гена [25, 27], особенно в случае различной функциональной значимости доменов белка при разных условиях и(или) их тканевой локализации [27]. Плейотропный эффект однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP) может также определяться его локализацией (более выражен для SNP, локализованных в экзонах) и функциональной значимостью (влияние

Таблица 1

ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О ПОНЯТИИ «ПЛЕЙОТРОПИЯ»

Тип плейотропии	Характеристика	Автор, год
Истинная	Один ген кодирует различные первичные продукты	H. Grunberg, 1938 (цит. [26])
Ложная	Один и тот же продукт гена используется в различных метаболических путях	
Вторичная ложная	Один первичный продукт запускает каскад событий с различными последствиями для фенотипа	
Антагонистическая	Гены оказывают антагонистический эффект на разных стадиях онтогенеза	P. Medawar, 1952; G. Williams, 1957 (цит. [26])
Мозаичная	Один локус прямо влияет на 2 фенотипических признака	E. Hadorn, 1961 (цит. [26])
Относительная	Один локус запускает каскад событий, которые значимы для множества независимых признаков	
Универсальная	Мутация по любому локусу прямо или косвенно может влиять почти на все признаки	E. Mayr, 1963 (цит. [26])
Артефактная	Одна и та же мутация влияет на близлежащие, но не родственные гены	J. Hodgkin, 1998 [15]
Вторичная	Простые первичные биохимические нарушения приводят к сложным конечным фенотипам	
Адаптивная	Характерна для многофункциональных белков: один продукт гена выполняет 2 и более функций, или по-разному функционирует в различных тканях (работа «по совместительству»)	
Экономная	Один и тот же продукт гена используется для идентичных химических процессов во множестве метаболических путей	
Оппортунистическая	Один продукт гена наряду с главной функцией выполняет некоторую дополнительную	
Комбинаторная	Один и тот же генный продукт используется в различных метаболических путях и обладает различными свойствами в зависимости от белковых партнеров	
Унифицированная	Один ген или кластер соседних генов кодируют множество химически активных веществ, которые поддерживают общие биологические функции	
Модульная (ограниченная, блочная)	Мутация оказывает влияние только на подмножество признаков	J. Welch, D. Waxman, 2003 (цит. [26])
Горизонтальная	Один ген имеет множество эффектов, различимых на одном и том же физиологическом уровне	A. Tyler et al., 2009 [30]
Вертикальная	Один фенотип непосредственно приводит к другому	
Модульная (блочная)	Плейотропные эффекты блоков генов зависят от включенности в различные сети (сети взаимодействия белков, метаболические сети, транскрипционно-регуляторные сети)	M. Mehan et al., 2010 [19]
Ограниченная	Каждый локус может влиять только на ограниченное число независимых линейных комбинаций фенотипических признаков	
Плейотропия 1-го типа	Продукт гена имеет много молекулярных функций	G. Wagner, J. Zhang, 2011 [33]
Плейотропия 2-го типа	Одна молекулярная функция гена определяет много морфологических и физиологических признаков	

на структуру и(или) функцию кодируемого продукта) и т.д. [25].

Согласно большинству экспериментальных данных, гены и локализованные в них полиморфные варианты в среднем оказывают влияние на небольшое число признаков. По данным Z. Su и соавт. [28], случайная мутация в гене (изучен 321 ген у представителей 7 видов позвоночных, в том числе человека) влияет в среднем на 6–7 молекулярных фенотипов, соответствующих компонентам приспособленности организма (по данным GO – The Gene Ontology Cjnsjrtium, 2002). Аналогичное значение получено для генов в отношении морфометрических признаков (на примере комплекса признаков, представляющих все основные подсистемы скелета мыши) [32]. В ряде исследований оценки плейотропных эффектов

генов характеризуются широким размахом – от 1,8 до 21,6 [33]. В то же время гены могут существенно различаться по эффектам: один ген может как вообще не влиять на вариабельность привлеченных к исследованию признаков, так и вовлекаться в детерминацию более 100 показателей (показано для морфологических признаков у дрожжей) [33].

Было предположено, что плейотропный эффект генов окажется более значимым, если генный продукт экспрессируется во многих тканях, тем самым мутации в них могут приводить к большему числу воздействий на фенотип [28]. Z. Su и соавт. [28] установлена значимая положительная корреляция между числом биологических процессов, в регуляцию которых вовлечены гены, и их плейотропным эффектом. В другом исследовании было показано, что высокой степенью плейотропии обладают гены, продукты которых характеризовались большим числом белков, с которыми они взаимодействуют, и были вовлечены в большое число биологических процессов; данный эффект не зависел от молекулярной функции белка или числа протеинов, кодируемых соответствующими генами [14].

Любой продукт гена реализует свой эффект через множество межгенных взаимодействий (отражающих взаимодействие между белками): эффект единичной мутации или варианта выражается, лишь проходя через тысячи ген-генных (белковых, метаболических) взаимодействий, проявляясь во множестве фенотипов, поэтому индивидуальный эффект гена наиболее корректно может быть оценен в контексте этих генных сетей (метаболических путей) [30]. При этом с точки зрения оценки плейотропных эффектов генов важными являются топология генной сети, местоположение гена в ней и число взаимодействий с другими элементами. В исследовании S. Chavali и соавт. [9] на основании анализа 5024 болезней, включенных в OMIM MorbidMap, были установлены различия в плейотропных эффектах генов в зависимости от их локализации в сетях, отражающих взаимодействие их белковых продуктов. Наблюдались следующие закономерности: во-первых, общие гены с плейотропным эффектом (ассоциированые со многими заболеваниями) в сетях белковых взаимодействий занимают место ближе к центру (по сравнению со специфическими генами, ассоциированными только с одной патологией). Во-вторых, ближе к центру сети также располагаются гены, для которых установлена ассоциация с фенотипически различными заболеваниями (phenodiv gene), в отличие от генов, ассоциированных с фенотипически сходными патологиями (phenosim gene).

Различия между 2 данными классами генов наблюдались и по другим параметрам. Так, общие гены имели большее число взаимодействий с другими генами болезней, чем это наблюдалось для специфических генов, и характеризовались относительно ограниченной тканевой коэкспрессией с взаимодействующими генами (в противоположность специфическим генам).

С использованием специально разработанного подхода, основанного на анализе различных сетей (белок-белковые взаимодействия, Gene Ontology annotations и авторская база данных генотип-фенотипических взаимодействий), была предпринята попытка идентифицировать коэкспрессирующиеся модули, специфически действующие при определенных фенотипах [19]. Авторы применили этот подход для анализа данных с 338 биочипов, охватывающих 178 фенотипических классов. В результате было выявлено 193 145 фенотип-специфических коэкспрессирующихся модулей и предсказано 6558 генотип-фенотипических ассоциаций. Применительно только к фенотипам болезней было установлено, что плейотропным эффектом (ассоциированы как минимум с 2 фенотипами) обладают 40,9% из 8504 генов, в том числе плейотропные эффекты впервые установлены для 607 генов, а для 725 генов, ранее охарактеризованных как плейотропные, предсказаны новые проявления плейотропии (фенотипы). Кроме того, на основании анализа информации по 69 транскрипционным факторам, имеющим более 16 000 мишеней при различных условиях, было показано, что динамическая регуляция транскрипции является важным источником формирования специфических генных модулей.

Можно также предположить, что чем сложнее метаболический путь и чем больше шагов в нем отделяют продукт гена от изучаемого признака, тем в большей степени эффект этого гена будет сглаживаться. Вместе с тем, если мутация (полиморфный вариант) в гене приводит к существенному нарушению работы его продукта, для оптимизации функционирования системы в целом на уровне метаболической цепочки требуется определенная корректировка многих биохимических процессов. Поэтому интегральные параметры, отражающие функционирование системы (например, полученные на основании анализа главных компонент), могут оказаться более чувствительными для выявления плейотропных эффектов генов.

Эффекты мутации и гена могут различаться в зависимости не только от генотипического фона (на что обратил внимание еще в 1926 г. С. Четвериков [6], обосновав понятие «генотипическая среда»: «Один и тот же ген будет проявлять себя различно, в зависимости от того комплекса генов, которыми он окружен» (с. 164)), но и от средовых эффектов (внутренних и внешних). То, что средовые факторы могут выявить «скрытые» плейотропные эффекты, убедительно доказано в объемном исследовании, выполненном на *Saccharomyces cerevisiae*: на этом модельном объекте изучены фенотипы 4710 мутантов при 21 условии среды [12]. Хорошо известно, что

внутренние средовые факторы (например, гормональный фон) могут выступать в качестве одной из причин гендерных различий эффектов генов (хромосомных регионов), как это было показано при изучении влияния QTL, вносящих вклад в фенотипическую вариабельность признаков, имеющих отношение к ожирению [10].

Однако, как справедливо подчеркивали G. Wagner и J. Zhang [33], плейотропию можно оценить только в отношении уже изученных признаков.

ПЛЕЙОТРОПНОСТЬ ГЕНОВ ПОЛИГЕННЫХ ПРИЗНАКОВ И МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В отношении многофакторных заболеваний (МФЗ) уместно заметить, что в эволюционной медицине болезнь рассматривается как результат конфликта между произошедшей в прошлом селекцией генов и требованиями сегодняшнего дня, неспособности наших генов «соответствовать» современному стилю жизни [4]. Главный источник подверженности хронической болезни сегодня – скрытая генетическая изменчивость, которая обнаруживается, высвобождается и нелинейно взаимодействует с резко изменившимися за последние 100 лет факторами среды (диета, табакокурение, поллютанты, стресс и многие другие). Изменение средовых условий функционирования генов в настоящее время, несомненно, в той или иной мере может сказаться на уровне выявляемых плейотропных эффектов генов.

Известно, что для МФЗ характерна существенная генетическая компонента. При этом, с одной стороны, как правило, вклад одного гена в детерминацию любого патологического состояния невелик [8], с другой – одни и те же гены (иногда – одни и те же полиморфные варианты) оказываются вовлечены в формирование предрасположенности к различным патологическим состояниям [34].

В качестве иллюстрации приведем информацию по ассоциациям, установленным для 13 генов-кандидатов широко распространенных заболеваний (рис. 2): в данном случае нет ни одного гена, который продемонстрировал бы строгую ассоциацию только с одним из изученных классов признаков

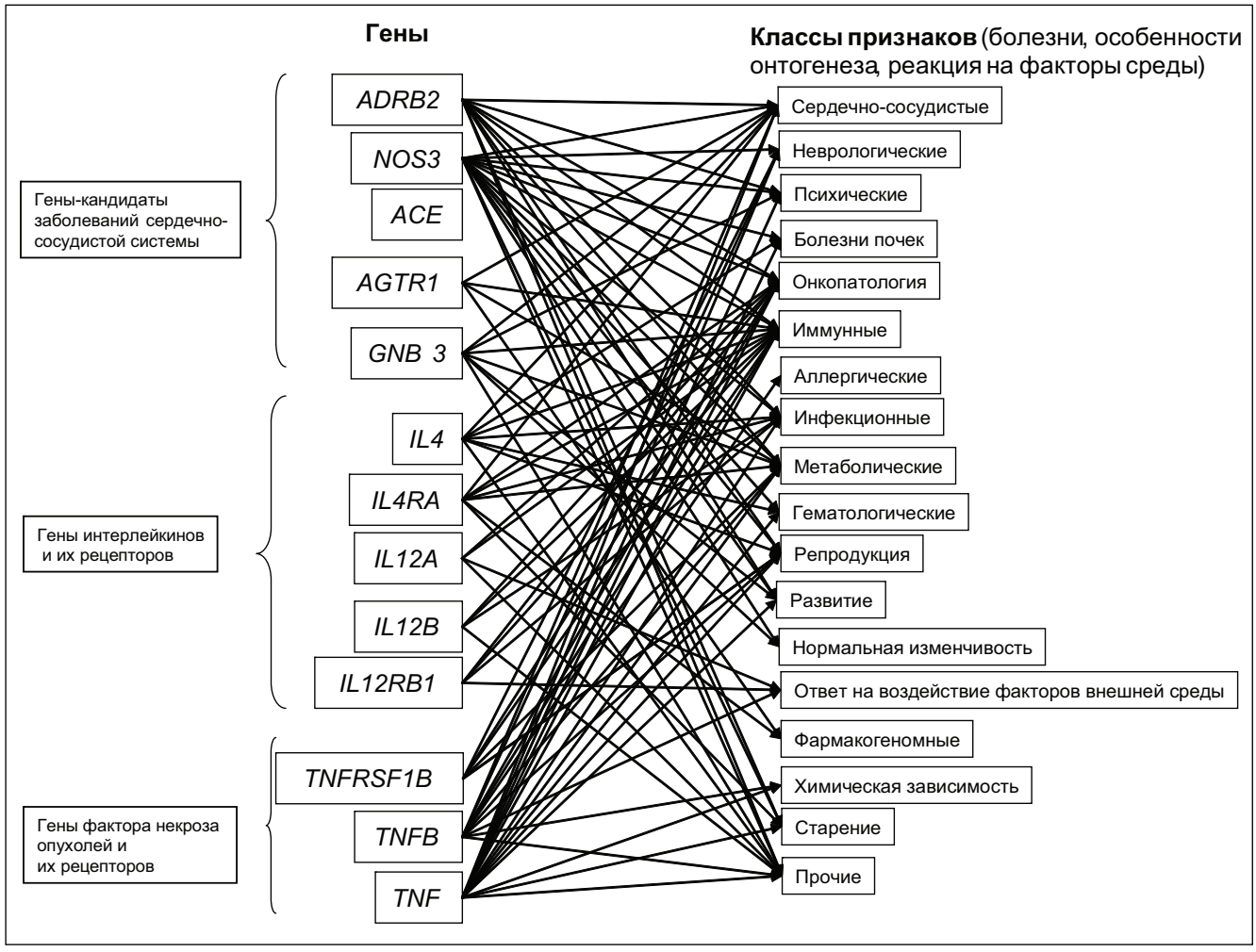


Рис. 2. *Схематическое изображение вовлеченности ряда генов в формирование признаков (эндофенотипов) у человека (по Genetic Association Database [34])*

(болезни различных систем органов, особенности онтогенеза, реакция на факторы внешней среды). Необходимо подчеркнуть, что приведенные данные иллюстрируют ассоциации генов не с конкретными заболеваниями (и признаками), а с группами функциональных состояний, в том числе и патологий. В действительности спектр патологических состояний, с которыми была показана ассоциация какого-либо полиморфного варианта данных генов-кандидатов, значительно шире. Более того, как отмечалось выше, можно ожидать расширения сферы компетенции данных генов по мере увеличения числа изученных болезней.

Среди всех привлеченных к рассмотрению генов для 5 (*NOS3, ACE, TNF, LTA* и *ADRB2*) было характерно наибольшее число классов болезней (состояний), с которыми установлена ассоциация локализованных в них полиморфных вариантов. Продукты этих генов характеризуются ярко выраженной функциональной «нагруженностью» – вовлечены во многочисленные метаболические пути (*TNF, NOS3*), взаимодействуют с большим числом белков (*TNF, ADRB2*), выполняют разнообразные функции (*ACE, NOS3, ADRB2*) и участвуют во многих биологических процессах (*TNF, NOS3, ADRB2, ACE*) (табл. 2). Очевидно, что функциональная характеристика продуктов генов (в том числе и привлеченных для анализа) и их участие в формировании предрасположенности к различным патологическим состояниям, в значительной степени определяются изученностью данных генов и состояний. Вместе с тем наблюдаемая закономерность согласуется с выводами о том, что плейотропные эффекты генов зависят от числа белков, с которыми взаимодействуют продукты генов, и от числа биологических процессов, в которых они участвуют [14].

То, что одни и те же гены продемонстрировали ассоциации с разными классами болезней, может объяснять неслучайность наличия различных болезней у одного и того же индивида. На этот факт указывалось еще в позапрошлом веке и было убедительно подтверждено широкомасштабными работами в начале XXI века [24]. На основании анализа более 5000 фенотипов, информация по которым включена в базу данных OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man database), было установлено, что сходство между различными фенотипами определяется биологическими модулями взаимодействующих функционально родственных генов, а патологические фенотипы человека лучше отражают нарушение функциональных модулей, чем индивидуальных генов [31]. При этом сходство между фенотипами оказывалось тем выше, чем больше функций было характерно для генов, входящих в данные модули, в том числе и проявляющихся посредством белок-белковых взаимодействий.

Заключения авторов цитируемых выше работ согласуются с результатами других исследователей. Так, известно, что астма и некоторые метаболические нарушения (например, ожирение) часто сочетаются, что подтверждается как экспериментальными исследованиями, так и клиническими наблюдениями [7, 11]. Среди 22 генов, для которых установлена

Таблица 2

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ПОДВЕРЖЕННОСТИ МФЗ (ПО ДАННЫМ NCBI [35])

Гены	Число метаболических путей (по BioSystems)				Число взаимодействующих белков	Количество функций	Количество биохимических процессов
	KEGG	WikiPathways	REACTOME	Pathway Interaction Database			
AGTR1	4	3	6	2	24	8	32
ACE	3	1	4	-	3	13	24
NOS3	4	2	10	6	13	13	69
ADRB2	4	4	7	1	32	13	31
GNB3	3	4	46	1	7	2	6
IL4	12	3	-	7	5	4	43
IL4RA	3	2	-	1	22	6	9
IL12A	14	1	-	2	5	6	21
IL12B	13	2	-	3	4	11	23
IL12RB1	2	-	-	3	5	6	12
TNF	34	12	6	15	27	5	83
LTA	2	1	-	2	10	4	15
TNFRSF1B	3	4	-	1	20	3	7

ассоциация с астмой, как минимум в 3 независимых репликативных исследованиях 6 оказались ассоциированы с такими эндокринными нарушениями, как резистентность к инсулину (*TNF, VDR*), ожирение (*TNF, VDR, IL4RA, CD14*), сахарный диабет (СД) типа 1 (*TNF, VDR, IL4RA, CD14, CCL5, ADAM33*) и СД типа 2 (*TNF*); наблюдалось существенное перекрывание между локусами, предрасполагающими к астме и эндокринным нарушениям, согласно данным GWAS [29]. Высокая положительная генетическая корреляция (около 0,31, p=0,024) установлена на основании анализа данных WTCCC (Wellcome Trust Case Control Consortium) GWAS между риском развития СД типа 2 и гипертонией [17]. В другом исследовании (информация получена для более чем 13 млн пожилых пациентов) на основании анализа структуры коморбидности и данных об ассоциациях между генами и патологиями, включенными в OMIM, было сделано заключение, что коморбидность выше для заболеваний: 1) у которых больше общих генов (ассоциированных с патологиями); 2) в случае, если имеются общие связи через белок-белковые взаимодействия (сети) между данными патологиями; 3) при высокой коэкспрессии генов, ассоциированных с заболеваниями [22].

Большинство ассоциативных исследований основываются на изучении влияния одного или нескольких маркеров на какой-либо отдельный (единичный) признак. Согласно мнению некоторых исследователей, такие подходы занижают возможность выявления плейотропных эффектов генов. Поэтому проводятся изыскания, направленные на обобщение накопленных данных, в том числе полученных при использовании GWAS. У японцев (14 792 обследованных) на основании GWAS было идентифицировано 12 SNP, статистически значимо ($p<5{,}0 \cdot 10^{-8}$) ассоциированных с 5 основными субтипами лейкоцитов (нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, базофилы и эозинофилы) [21]. В последующем на выборке, превышавшей 30 тыс. человек (японцы), была оценена вовлеченность этих локусов в определение уровня 13 показателей крови (помимо показателей, перечисленных выше, анализировали уровень гемоглобина, гематокрит и др.) [21]. Оказалось, что 9 из 12 привлеченных к анализу локусов продемонстрировали ассоциации с другими показателями крови; наибольшее число плейотропных ассоциаций наблюдалось для гена *HBS1-MγB* (установлены ассоциации со всеми проанализированными гематологическими признаками). S. Sivakumaran и соавт. [25] на основании данных GWAS показано, что 16,9% генов и 4,6% SNPs обладают плейотропным эффектом; при этом оценки уровня плейотропии варьируют в зависимости от привлеченных к анализу заболеваний и методов, использованных для оценки степени плейотропии. Например, для неиммунозависимых заболеваний при использовании разных методов оценки к категории плейотропных отнесены от 10 до 14% генов и от 4,6 до 7,8% SNP. В другом исследовании с использованием разработанного авторами метода PRIMe (Pleiotropic Region Identification Method) [16] на основании анализа данных GWAS Catalog были определены 57 регионов с высоким плейотропным индексом (расчетный показатель >5); top-регион включал гены *FTO* и *GCKR* (плейотропный индекс – 18), регион гена ABO (плейотропный индекс – 9).

Для оценки плейотропных эффектов генов путем анализа патологических состояний разрабатываются новые методы – например, такие как метод PCBMR (Principal-Component-Based Multivariate Regression), который, по сути, представляет собой комбинирование 2 методов – главных компонент и мультивариантной регрессии [20]; би-кластеризующий (biclasering) или блок-кластеризующий (block-clustering) алгоритм, основанный на Байесовской модели [13]. Оба подхода были апробированы на фактическом материале. Так, применение PCBMR-метода при изучении метаболического синдрома позволило выделить 11 ассоциированных с данным состоянием генов, некоторые из них ранее образовывали ассоциации с метаболическими признаками, другие были идентифицированы только в данном исследовании [20]. M. Gupta и соавт. [13] на основании GWAS-данных для 23 фенотипов, вовлеченных в риск развития переломов костей (минеральная плотность костей, количественные параметры кости по данным УЗИ, геометрия костей, мышечная масса), была выделена группа (кластер) из 10 признаков, имеющих общие гены (SNP), ассоциированные с признаками. Кластеризованные признаки характеризовались более высокими значениями генетической корреляции по сравнению с признаками, не попавшими в кластеры. Авторами также выделены плейотропные генные сети, вовлеченные в регуляцию этих кластеризованных признаков, которые были связаны с несколькими каноническими метаболическими путями (pathways), имеющими отношение к формированию костей, а также включали несколько новых потенциальных генов-кандидатов для ряда изученных признаков.

В отношении МФЗ следует указать на несколько важных моментов.

1. Чем больше индекс плейотропности генов, тем выше вероятность их вовлечения в индивидуальную коморбидность (синтропию).

2. Если разные аллели (генотипы) увеличивают риск развития тех или иных патологических состояний, то сочетание этих заболеваний у одного и того же индивида – менее вероятное событие (дистропные болезни). Однако в отношении и синтропных, и дистропных болезней необходимо иметь в виду, что любое МФЗ определяется комплексом как генетических, так и средовых факторов; именно их сочетание в конечном итоге определит риск развития патологии.

3. Риск развития патологии и характер течения заболевания – разные процессы. Это значит, что одни и те же аллельные варианты (генотипы) могут, с одной стороны, увеличивать риск развития патологии, но способствовать более легкому ее течению, другие – снижать вероятность развития заболевания, но если индивиды с благоприятной генетической конституцией заболеют, болезнь может протекать более тяжело. Именно поэтому важно учитывать не только влияние генетических маркеров на риск развития патологии (конечный фенотип), но и на характер его течения (эндофенотипы). Такой подход, с одной стороны, позволит уточнить возможные плейотропные эффекты генов, с другой – по мере познания биологии болезней будет способствовать более точной оценке характера течения болезни, что важно для разработки адекватных терапевтических мероприятий.

4. Наличие предрасполагающего аллеля и(или) генотипа не определяет однозначно развитие заболевания; в любом случае необходимо сочетание многих факторов риска – как генетических, так и средовых. Причем в случае инфекционных патологий средовые факторы превалируют, поскольку наличие патогена и степень активности штамма являются ведущими факторами. Если носители рисковых аллелей избежали развития патологии, то в более позднем возрасте эти же аллели могут способствовать долголетию (феномен антагонистической плейотропии).

Проиллюстрируем данные положения примерами.

Нами изучена вовлеченность 19 полиморфных вариантов, локализованных в 13 генах – *ADRB2* (rs1042713, rs1042714); *NOS3* (rs2070744, rs1799983, VNTR); *ACE* (rs4343, rs4291); *AGTR1* (rs5186); *GNB3* (rs5443); *IL4* (rs2243291); *IL4RA* (rs1801275, rs2074570);

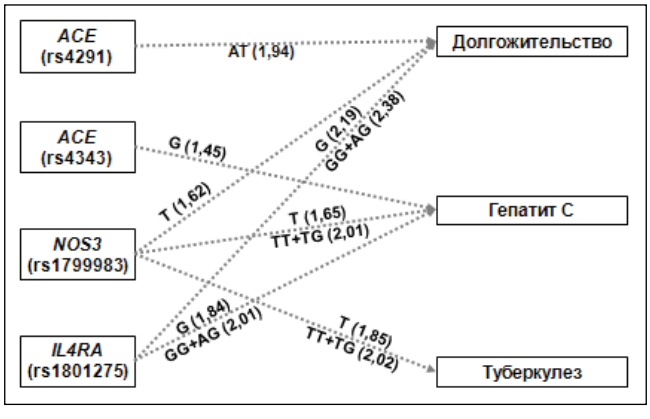


Рис. 3. *Ассоциации полиморфных вариантов генов с различными состояниями у русских жителей Томска. Над соединяющими стрелками приведены ассоциированные с состоянием аллели, под ними – генотипы; в скобках – значения OR*

IL12A (rs568408); *IL12B* (rs3212227, rs3212220); *IL12RB1* (rs3746190, rs11575926); *TNFRSF1B* (rs1061622); LTA (rs909253) и *TNF* (rs1800629) – в формирование риска развития некоторых конечных фенотипов (долгожительство и 2 патологических состояния – гепатит С и туберкулез легких) и комплекса количественных показателей (в том числе патогенетически значимых) при разных состояниях. Характеристика изученных генов и полиморфизмов, их популяционная изменчивость и методы анализа опубликованы ранее [1–3].

Из 20 изученных полиморфных вариантов 4 оказались ассоциированы с проанализированными конечными фенотипами (патологии, долгожительство). Причем 2 из них локализованы в 1 гене (*ACE*), но показали ассоциации с разными физиологическими состояниями организма (долгожительство и вирусный гепатит С) (рис. 3). Ранее [5] было показано, что гетерозиготный генотип по rs4291 гена *ACE* (ассоциированный в настоящем исследовании с долгожительством) предрасполагал к развитию гипертрофии левого желудочка при эссенциальной гипертензии (АГ).

Полиморфные варианты, локализованные еще в 2 генах (*IL4RA, NOS3*), также продемонстрировали плейотропные эффекты. По полиморфному варианту rs1801275 гена *IL4RA* аллель G, а также гомозиготы и гетерозиготы по данному аллелю предрасполагали к развитию гепатита С и долгожительству. Это значит, что при воздействии патогенных микроорганизмов у обладателей данных генотипов повышен риск развития патологии (неблагоприятное средовое воздействие), но эти же генотипы способствуют более высокой продолжительности жизни при благоприятных средовых условиях.

Наибольшее число ассоциаций показано для rs1799983 гена *NOS3*, причем во всех случаях как для патологических состояний (гепатит С, туберкулез легких), так и для долгожительства предрасполагающим являлся аллель Т (для патологий, кроме того, генотип ТТ). Ранее было показано [5], что этот же вариант (аллель Т, генотипы ТТ и GT) гена *NOS3* ассоциирован с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ) при АГ в сочетании с СД типа 2; хронической обструктивной болезнью легких у русских, а также у татар при воздействии профессиональных вредностей. В то же время риск развития СД типа 1 (инсулинозависимого) более высок у обладателей аллеля G (и генотипа GG) по данному полиморфизму [5]. При этом для другого SNP гена *NOS3* (rs1549758) также было установлено, что к СД типа 1 предрасполагает аллель С, тогда как аллель Т – к развитию ГЛЖ [5]. Возможно, СД типа 1, с одной стороны, и сочетание таких патологий, как ГЛЖ, АГ и СД типа 2, с другой – это дистропные состояния.

Из привлеченных к анализу полиморфных вариантов значения отношения шансов (OR) для изучен-

ных состояний организма хотя и были в ряде случаев статистически значимы, но не превышали 2,5 (см. рис. 3).

Для оценки влияния ассоциированных с патологическими состояниями аллельных вариантов генов на формирование эндофенотипов при соответству-

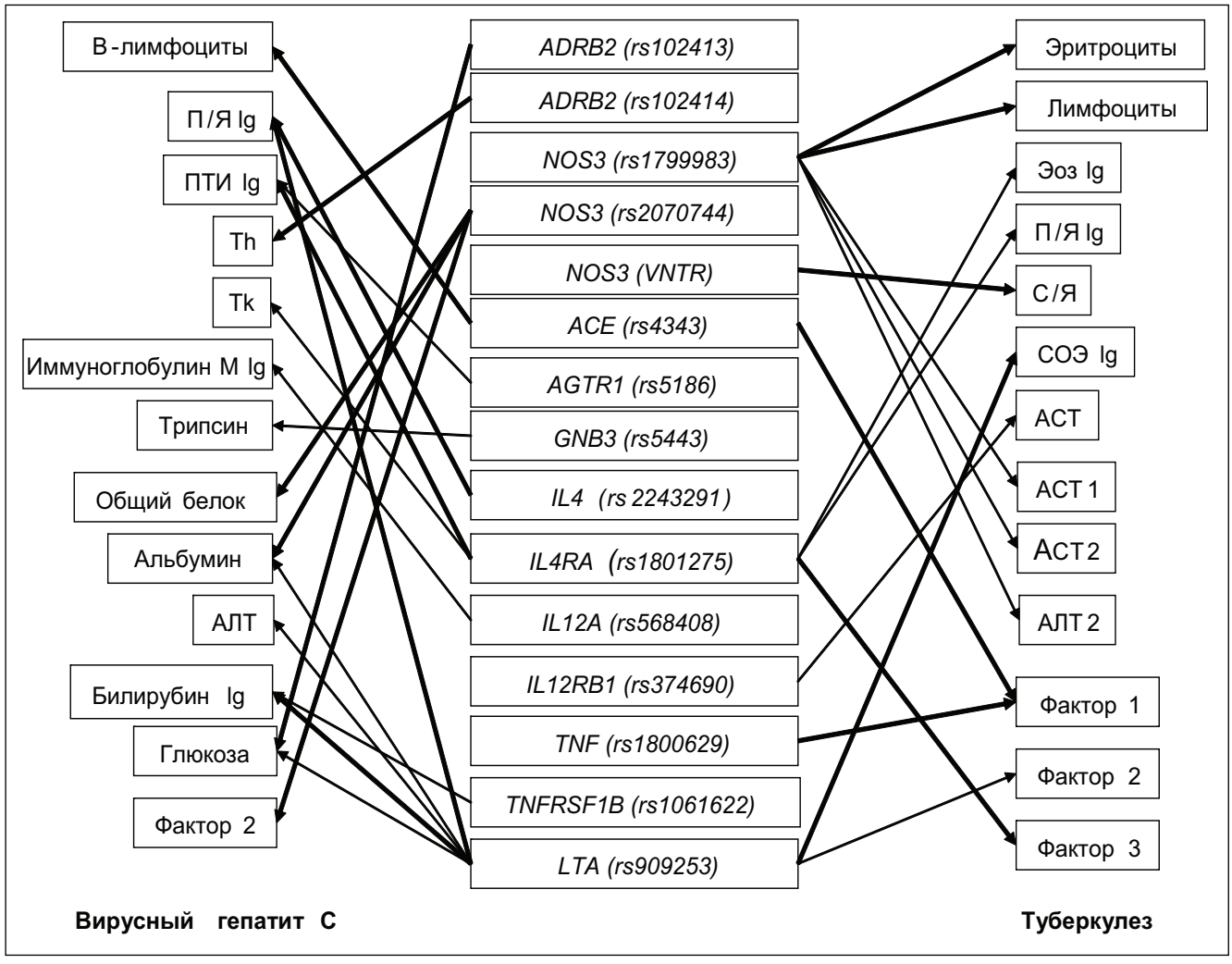


Рис. 4. *Ассоциации изученных полиморфных вариантов с некоторыми количественными показателями (lg – для расчета использовались логарифмированные данные) у больных вирусным гепатитом С и туберкулезом: П/Я – палочкоядерные нейтрофилы; ПТИ – протромбиновый индекс; Th – Т-хелперы; Tk – Т-киллеры; АЛТ – уровень аланинаминотрансферазы до лечения (АЛТ2 – через 4 нед с момента начала лечения); АСТ – уровень аспартатаминотрансферазы до лечения (АСТ1 и АСТ2 – соответственно через 2 и 4 нед с момента начала лечения); Эоз – эозинофилы; С/Я – сегментоядерные нейтрофилы; СОЭ – скорость оседания эритроцитов. Фактор 1, фактор 2 и фактор 3 – выделены на основании анализа главных компонент. В группе больных туберкулезом оценены ассоциации изученных полиморфных вариантов с собственными значениями главных компонент, выделенных на основании анализа ряда признаков (количество С/Я и П/Я (lg) нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов (lg), эритроцитов, моноцитов, уровень гемоглобина (Hb) и СОЭ (lg); 3 главные компоненты (факторы 1–3) объясняют 72% фенотипической изменчивости анализируемых признаков: в фактор 1 (фактор оксигенации) с максимальными нагрузками вошли показатели: количество эритроцитов и уровень Hb (объясняет около 35% вариации изученных признаков); фактор 2 (фактор агранулоцитов) представлен отрицательными значениями уровня моноцитов, СОЭ и уровнем лимфоцитов; фактор 3 (фактор гранулоцитов) включает значения концентрации эозинофилов, П/Я и С/Я нейтрофилов. У больных вирусным гепатитом С установлена ассоциация 1 полиморфного варианта гена NOS3 со 2-й главной компонентой (фактор 2 – фактор гуморального лимфоцитарного ответа), которая представлена показателями уровня эозинофилов (lg) и с отрицательными значениями Ig A, M (lg), G (объясняет 16,81% общей фенотипической изменчивости); при расчете факторных нагрузок, помимо включенных в фактор 2 признаков, учитывали количество П/Я (lg) и С/Я нейтрофилов, лимфоцитов (lg), В-лимфоцитов, моноцитов (lg), Т-хелперов и Т-киллеров*

ющих патологиях была проанализирована зависимость уровня ряда количественных параметров от генотипов по изученным маркерам у больных вирусным гепатитом С и туберкулезом легких. При гепатите С установлена зависимость ряда привлеченных к анализу количественных показателей от изученных полиморфных вариантов: всего установлено 18 ассоциаций (12 количественных признаков и 1 интегральный показатель – фактор 2; пояснения – см. подпись к рис. 4) с 11 SNP, локализованными в 10 генах. Причем из 3 SNP, ассоциированных с вирусным гепатитом С, для 2 замен показано статистически значимое влияние на изменчивость ряда эндофенотипов при данной патологии: rs4343 гена *ACE* ассоциирован с уровнем В-лимфоцитов, rs1801275 гена *IL4RA* – с количеством палочкоядерных нейтрофилов и Т-киллеров (см. рис. 4). В большинстве случаев вклад генов в вариабельность изученных признаков был небольшим, для 8 признаков он не превышал 1% (на рис. 4 – тонкие соединительные линии) и только для 2 (уровень альбумина и фактор 2; пояснения – см. подпись к рис. 3) был выше 5% (табл. 3).

Единственный ассоциированный с туберкулезом легких SNP (rs1799983 гена *NOS3*) определяет и уровень вариабельности ряда количественных показателей при данной патологии (см. рис. 4). Кроме того, установлены ассоциации и других 6 полиморфных вариантов генов с 9 количественными показателями, 3 из которых – собственные векторы главных компонент (факторы 1, 2, 3; пояснения – см. подпись к рис. 4). Как и в случае гепатита С, при туберкулезе вклад генов в фенотипическую вариабельность признаков в ряде случаев был невысок (<1%), однако, для большинства признаков установлено влияние, превышающее 5%. Это касалось как отдельных показателей (уровня эритроцитов, сегментоядерных нейтрофилов, скорости оседания эритроцитов – СОЭ; вклад SNP в изменчивость признаков варьировал от 5,94 до 9,11%), так и интегральных факторов – всех 3-х выделенных факторов при использовании метода главных компонент, которые суммарно объясняют более 72% фенотипической изменчивости, включенных в анализ признаков (см. примечание к рис. 4: вклад SNP в вариабельность показателей находился в границах 7,74–12,33%).

Таблица 3

ДОЛЯ ОБЩЕЙ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ДИСПЕРСИИ (G, %), ОБУСЛОВЛЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТЬЮ ЛОКУСОВ, ПРОДЕМОНСТРИРОВАВШИХ АССОЦИАЦИИ С КОЛИЧЕСТВЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ*

Ген/полиморфизм	Патология	Показатель	G, %
Гены интерлейкинов и их рецепторов			
IL4RA/rs1801275	Туберкулез	Фактор 3**	7,86
	Гепатит С	Протромбиновый индекс (lg)	2,2
IL4/rs2243291	Гепатит С	Палочкоядерные нейтрофилы (lg)	2,86
Гены-кандидаты заболеваний сердечно-сосудистой системы			
NOS3/rs1799983	Туберкулез	Лимфоциты	2,98
	Туберкулез	Эритроциты	6,55
NOS3/rs2070744	Гепатит С	Общий белок	1,3
		Альбумин	6,57
		Фактор 2**	12,33
NOS3/VNTR	Туберкулез	Сегментоядерные нейтрофилы	5,94
ACE/rs4343	Туберкулез	Фактор 1**	8,97
	Гепатит С	В-лимфоциты	6,64
ADRB2/rs1042713	Гепатит С	Уровень глюкозы	1,91
ADRB2/rs1042714		Т-хелперы	2,86
Гены фактора некроза опухоли и их рецепторов			
TNF/rs1800629	Туберкулез	Фактор 1**	7,74
LTA/rs909253	Туберкулез	Скорость оседания эритроцитов (lg)	9,11
	Гепатит С	Уровень глюкозы	1,92
		Палочкоядерные нейтрофилы (lg)	2,32

Примечание. * – Приведены только показатели, для которых вклад соответствующих маркеров в фенотипическую изменчивость признаков превышал 1%; lg – для расчета использовались логарифмированные данные. ** Интерпретация факторов – см. подпись к рис. 4.

Сказанное выше свидетельствует о том, что установление плейотропных эффектов генов представляет собой сложную и многогранную проблему. За более чем вековую историю изучения явления плейотропии накоплена обширная информация, осмысление которой имеет не только теоретическое значение (понимание особенностей функционирования генома в норме и при различных патологических состояниях), но важно и для практического здравоохранения – разработки новых стратегий диагностики и тактики лечения заболеваний. Так, в случае регистрации единичных ассоциаций «аллельный вариант – симптом» при разработке лекарственных препаратов всегда следует иметь в виду, что ген может обладать плейотропным эффектом, поэтому разработка терапевтических средств, направленных на корректировку одного специфического эффекта гена, может быть не просто неэффективна [33], но даже вредна. Именно поэтому исследования, направленные на установление плейотропных эффектов генов, по-прежнему являются приоритетными и реализуются в рамках различных проектов, в том числе и в рамках исследования PheWAS (phenome-wide association study) [23] – широко-феномного ассоциативного исследования, цель которого заключается в одновременном изучении фенотипической структуры и генотипической вариабельности в различных этнотерриториальных группах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов у представителей четырех этнических групп Сибирского региона // Мед. генетика. – 2009; 8 (10): 43–52.
2. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Маркова В.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы у представителей четырех этнических групп Сибирского региона // Мед. генетика. – 2010; 5: 24–34.
3. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Тарасенко Н.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов факторов некроза опухоли и их рецепторов у представителей четырех этнических групп Сибирского региона // Мед. генетика. – 2010; 6: 16–23.
4. Пузырев В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // Генетика. – 2011; 47 (12): 1573–83.
5. Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., Кучер А.Н. Генетическое разнообразие и болезни человека. Томск, Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. – 320 с.
6. Четвериков С.С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики / Классики советской генетики. 1920–1940. Ленинград: Из-во «Наука» Ленинградское отделение. 1968. С. 133–170.
7. Beuther D. Resent insight into obesity and asthma // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2010; 16: 64–70.
8. Bodmer W., Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases // Nature. Genet. – 2008; 40 (6): 695–701.
9. Chavali S., Barrenas F., Kanduri K. et al. Network properties of human disease genes with pleiotropic effects // BMC Systems Biology. 2010. 4: 78. http://biomedicentral.com/1752-0509/4/78
10. Chiu Y.-F., Chuang L.-M., Kao H.-Y. et al. Sex-specific genetic architectute of human fatness in Chinese: the SAPPHIRe Study // Hum. Genet. – 2010; 128: 501–13.
11. Delgado J., Barranco P., Quirce S. Obesity and asthma // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2008; 18: 420–5.
12. Dudley A., Jansw D., Tanay A. et al. A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast // Mol. Syst. Biol. – 2005. doi:10.1038/msb4100004.
13. Gupta M., Cheung C.-L., Hsu Y.-H. et al. Identification of homogeneous genetic architecture of multiple genetically correlated traits by block clustering of Genome-Wide Associations // J. Bone and Mineral Research. – 2011; 26 (6): 1261–71.
14. He X., Zhang J. Toward a molecular understanding of pleiotropy // Genetics. – 2006; 173: 1885–91.
15. Hodgkin J. Seven types of pleiotropy // Int. J. Dev. Biol. – 1998; 42: 501–5.
16. Huang J., Jonson A., O'Donnell C. PRIMe: a method for characterization and evaluation of pleiotropic regions from multiple genome-wide association studies // Bioinformtics. – 2011; 29 (9): 1201–6.
17. Lee S., Yang J., Goddard M. et al. Estimation of pleiotropy between complex diseases using SNP-derived genomic relationships and restricted maximum likelihood // Bioinformatics. – 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/bts474. First published online: July 26, 2012 http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2012/07/26/bioinformatics.bts474.full.pdf+html
18. McKusick V. Pleiotropism // Am. J. Hum. Genet. – 1976; 28: 301–2.
19. Mehan M., Nunez-Iglesias J., Dai C. et al. An integrative modular approach to systematically predict gene-phenotype associations // BMC Bioinformatics. – 2010; 11 (Suppl. 1): 62. http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/S1/s62
20. Mei H., Chen W., Dellinger A. et al. Privcipal-component-based multivariation regression for genetic association studies of metabolic syndrome components // BMC. Genetics. – 2010; 11: 100. http://www.biomedcentral.com/1471-2156/11/100
21. Okada Y., Hirota T., Kamatani Y. et al. Identification of nine novel loci associated with white blood cell subtypes in Japanese population // PLoS Genetics. – 2011; 7. Issue 6. e1002067.
22. Park J., Christakis N., Barbasi A. The impact of cellular networks on disease comorbidity // Mol. Syst. Biol. – 2009; 5: 262. doi:10.1038/msb.2009.16
23. Pendergrass S., Brown-Gentry K., Dudek S. et al. The use of Phenome-Wide Association Studies (PheWAS) for exploration of novel genotype-phenotype relationship and pleiotropy discovery // Genet. Epidemiol. – 2011; 35 (5): 410–22.
24. Rzhetsky A., Wajngurt D., Park N. et al. Probing genetic overlap among complex human phenotypes // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2007; 104 (5): 11694–9.
25. Sivakumaran S., Agakov F., Theodoratou E. et al. Abundant pleiotropy in human complex diseases and traits // Am. J. Hum. Genet. – 2011; 89: 607–18.
26. Stearns F. One hundred years of pleiotropy: a retrospective // Genetics. – 2010; 186 (11): 767–73.
27. Stern D. Evolutionary developmental biology and problem variation // Evolution. – 2000; 54: 1079–91.
28. Su Z., Zeng Y., Gu X. A preliminary analysis of gene pleiotropy estimated from protein sequences // J. Exp. Zool (Mol. Dev. Evol.). – 2010; 314B: 115–22.
29. Tesse R., Schieck M., Kabesch M. Asthma and endocrine disorders: Shared mechanism and genetic pleiotropy // Mol. and Cell. Endocrinol. – 2011; 333: 103–11.
30. Tyler A., Asselbergs F., Williams S. et al. Shadows of complexity: what biological networks reveal about epistasis and pleiotropy // BioEssays. – 2009; 31: 220–7.
31. van Driel M., Bruggeman J., Vriend G. et al. A text-mining analysis of the human phenome // Europ. J. Hum. Genet. – 2006; 14: 535–42.
32. Wagner G., Kenney J., Pavlicev M. et al. Pleiotpopic scaling of gene effects and the `cost of complexity' // Nature. – 2008; 452: 470–2.
33. Wagner G., Zhang J. The pleiotropic structure of the genotype – phenotype map: the evolvability of complex organisms // Nature. – 2011; 112: 204–13.
34. URL: http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/index.cgi
35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.248-036.17-092:[612.6.05:577.21

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Е.С. Куликов[1], кандидат медицинских наук, **Л.М. Огородова**[1], член-корреспондент РАМН, профессор, **М.Б. Фрейдин**[2], кандидат биологических наук, **И.А. Деев**[1], доктор медицинских наук, **П.А. Селиванова**[1], кандидат медицинских наук, **С.В. Федосенко**[1], кандидат медицинских наук, **Н.А. Кириллова**[1], кандидат медицинских наук

[1]Сибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Томск,

[2]Royal Brompton Hospital, London, UK

E-mail: evgeny.s.kulikov@gmail.com

В обзоре обобщены результаты исследований по определению доминирующих механизмов формирования и персистенции воспаления при тяжелой бронхиальной астме (БА). По данным современных исследований, наиболее вероятные причинные факторы и молекулы, лежащие в основе формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности, можно условно разделить на следующие группы: дисбаланс цитокинового профиля, феномен резистентности к глюкокортикоидам, ангиогенез и ремоделирование бронхов, детерминация иммунного ответа в направлении Th2-звена. Данные механизмы в перспективе могут быть использованы в диагностических целях, а также стать новыми таргетными мишенями терапии БА.

Ключевые слова: *бронхиальная астма, терапия, тяжелая бронхиальная астма, терапевтическая резистентность, молекулярные механизмы*

MOLECULAR MECHANISMS OF SEVERE ASTHMA

E.S. Kulikov[1], L.M. Ogorodova[1], M.B. Freidin[2], I.A. Deev[1], P.A. Selivanova[1], S.V. Fedosenko[1], N.A. Kirillova[1]

[1]Siberian State Medical University, Tomsk, Russia; [2]Royal Brompton Hospital, London, UK

Abstract: This review summarizes the results of studies devoted to identification the dominant mechanisms of formation and persistence of inflammation in severe asthma. According to the latest research, the most likely causal factors and molecules that underlie the formation of severe asthma and therapy resistance can be divided into the following groups: the imbalance of cytokine profile, the resistance to glucocorticoids, angiogenesis and remodeling of the bronchi, the shift of the immune response towards the Th2. These mechanisms could potentially be considered for diagnostic purposes, and become the new targets of asthma therapy.

Key words: *bronchial asthma, therapy, severe bronchial asthma, therapy resistance, molecular mechanisms*

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в мире отмечается тенденция к росту распространенности тяжелых форм бронхиальной астмы (БА) [30], составляющих 18% в общей структуре заболевания. При этом на лечение данной формы болезни необходимо выделять 80% расходов на БА, т.е. именно такую долю всех ресурсов потребляет 18% пациентов [2]. А если учесть, что тяжелая БА ассоциирована с частыми жизнеугрожающими состояниями и высоким риском смерти, это позволит отнести ее к одной из наиболее актуальных проблем современной медицины.

Согласно современным представлениям, тяжелая БА является гетерогенным заболеванием, в структуре которого выделяют несколько клинических вариантов течения (фенотипов), существенно различающихся по клинической характеристике [20]. Первую успешную попытку классифицировать тяжелую астму на фенотипы предпринял член экспертной группы Европейского респираторного общества по сложной астме S. Holgate в монографии «Difficult asthma» в 1999 г. [23]. Данная клиническая систематизация остается актуальной и сегодня; она предполагает следующее распределение фенотипов тяжелой БА: терапевтически резистентная астма без определенного фенотипа, фатальная астма, хаотичная нестабильная астма (brittle) и хроническая сложная астма с постоянной бронхиальной обструкцией [8].

По данным исследования НАБАТ (2004), терапевтически резистентная БА без определенного фенотипа и хроническая тяжелая астма с постоянной обструкцией – наиболее распространенные фенотипы в структуре тяжелой БА (по 23%), доля brittle-фенотипа составляет 15% [5]. Наименее распространенный фенотип – фатальная БА (2,1%). По-видимому, это связано с высокой частотой жизнеугрожающих состояний и высокой смертностью в данной группе больных.

В 2000 г. Американское торакальное общество (American Thoracic Society – ATS) впервые опубли-

ковало критерии терапевтически резистентной БА, согласно которым, для постановки диагноза терапевтически резистентной БА достаточно 1 большого критерия в сочетании с 2 малыми [6].

Несмотря на достаточно четко сформулированные клинические критерии отдельных фенотипов, данные знания не позволяют определить фенотип-специфичный подход к терапии болезни.

Традиционная классификация GINA2010 по степеням тяжести БА основана на том предположении, что у всех пациентов с определенной степенью тяжести процесса имеются схожие характеристики болезни и риск будущих обострений, а значит, они должны управляться схожими терапевтическими режимами. Однако данный классификационный подход не учитывает подтипов при той или иной степени тяжести патологии [47, 74]; особенно остро это несоответствие проявляется при ведении пациентов с тяжелыми формами БА. Ведь при использовании клинических критериев знание врача о наличии у пациента того или иного фенотипа определяет в некоторой степени лишь прогноз, риски будущих обострений и необходимость коррекции плана мониторинга течения болезни. Предложенные клинические группировки фенотипов БА не позволяют скорректировать фармакотерапевтический подход в связи с отсутствием знаний о патофизиологических механизмах, лежащих в основе формирования фенотипов тяжелой астмы [12].

Накоплено достаточно данных, чтобы утверждать, что в основе течения тяжелой БА лежат особенности формирования и персистенции воспаления, но доминирующие механизмы пока не определены [74].

Попытки группировать БА по клиническим признакам предпринимались многими исследователями как для астмы в целом, так и при тяжелой БА в частности. В 2006 г. в журнале Lancet было опубликовано обзорное исследование [73], в котором проанализированы все статьи по БА в рецензируемых журналах за последние 20 лет, содержащие ключевые слова, определяющие фенотипическую принадлежность; установлено 13 фенотипов астмы, которые объединены в 3 категории: клинико-физиологические фенотипы; фенотипы, связанные с воздействием триггеров, и воспалительные фенотипы. Однако анализ полученных данных показал, что у каждого конкретного пациента выявлялись паттерны фенотипических вариантов, принадлежащих сразу к нескольким категориям, что не позволяло четко разделить фенотипы и применить данную классификацию на практике.

В 2010 г. проведен неконтролируемый иерархический кластерный анализ данных, касающихся 726 пациентов, из базы Severe Asthma Research Program (Программа исследования тяжелой БА). У пациентов, участвующих в данной программе, имелась детализированная фенотипическая характеристика [48]. В результате было выявлено 5 групп (фенотипов). Однако и в данном исследовании, выполненном на высоком доказательном уровне, все кластеры включали пациентов, которые соответствовали определению терапевтически резистентной БА по критериям ATS, что доказывает клиническую гетерогенность тяжелой астмы и необходимость новых подходов к идентификации фенотипов тяжелой астмы с использованием молекулярных паттернов [18].

По данным современных исследований, наиболее вероятные причинные факторы и молекулы, лежащие в основе формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности, можно условно разделить на следующие группы: дисбаланс цитокинового профиля, феномен резистентности к глюкокортикоидам (ГК), ангиогенез и ремоделирование бронхов, детерминация иммунного ответа в направлении Th2-звена.

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ

У терапевтически резистентных пациентов, получающих высокие дозы системных кортикостероидов (СКС), в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) зарегистрирован высокий уровень нейтрофилов, в то время как у пациентов, не получающих СКС, преобладает эозинофилия [3, 66]. Наряду с повышенным содержанием эозинофилов в индуцированной мокроте регистрируется высокий уровень нейтрофилов и интерлейкинов (ИЛ)8 [54, 66]. Необходимо также отметить, что при тяжелой БА с частыми обострениями регистрируются достоверно более высокие уровни проэозинофильных цитокинов, чем у пациентов с фиксированной бронхиальной обструкцией [22]. В период тяжелых обострений, фатальных атак преобладает нейтрофильное воспаление [3].

В исследовании Л.М. Огородовой и соавт. [3] показано, что в БАЛ пациентов с brittle-фенотипом регистрируется более низкий общий цитоз за счет пониженного содержания лимфоцитов, эозинофилов и эпителиальных клеток, чем при среднетяжелой БА, а в БАЛ больных с фенотипом «астма с фиксированной обструкцией» зарегистрировано преобладание нейтрофилов. Таким образом, существуют различные паттерны воспаления при БА с фиксированной бронхиальной обструкцией и при хаотичной нестабильной астме (brittle-фенотип).

Повышенный уровень провоспалительных цитокинов потенциально способен активировать каскад воспалительных процессов, что может объяснить тяжесть клинического течения заболевания. Так, у пациентов с тяжелой БА регистрируются более высокие уровни ИЛ4, 5, 11, TGF-β, эотаксина [29, 49]. Наиболее выраженным провоспалительным эффектом характеризуются ИЛ4, 5, 10, 13. Адекватная противовоспалительная терапия ассоциирована со снижением уровня провоспалительных цитокинов, медиаторов и эффекторных клеток, что может под-

тверждать корреляцию повышенного уровня цитокинов с тяжестью заболевания. Механизм, объясняющий увеличенный синтез провоспалительных медиаторов, пока не установлен. С другой стороны, пониженная экспрессия противовоспалительных цитокинов также может играть роль в формировании тяжелой астмы.

Цитокины ИЛ13 и ИЛ4 опосредуют провоспалительный эффект посредством взаимодействия с ИЛ13Rα1 и ИЛ4Rα. Прямой эффект ИЛ13 в отношении эпителия бронхов приводит к повышению неспецифической бронхиальной гиперреактивности (БГР) и гиперпродукции слизи даже в случае отсутствия признаков воспаления [37]. Также экспрессируется ИЛ13Rα2, который функционально не способен к передаче сигнала, но при этом обладает высоким аффинитетом к ИЛ13. По последним данным, трансмембранная форма ИЛ13Rα2 может ослаблять действие ИЛ13 и ИЛ4 [7]. Таким образом, снижение экспрессии ИЛ13Rα2 может быть причиной персистенции воспаления у больных с тяжелой БА. ИЛ13 является также важным Th2-цитокином, участвующим в эозинофильном воспалении и способствующим переключению В-клеток на продукцию IgE.

В последнее время широко обсуждается роль механизмов регуляции продолжительности жизни эозинофилов в формировании персистирующего воспаления при БА. В норме эозинофилы элиминируются путем апоптоза, т.е. генетически детерминированной гибели клеток. При БА количество апоптотически измененных эозинофилов прогрессирующе уменьшается с утяжелением заболевания. Эти данные продемонстрированы в исследованиях биоптатов бронхов больных БА [69]. Супрессия апоптоза сочетается с преобладанием некротического пути гибели клеток и высвобождением значительного количества провоспалительных цитокинов и медиаторов (вторичная воспалительная реакция) [24]. В работах, выполненных в СибГМУ в 2005 г., подтверждаются данные о снижении апоптотической гибели эозинофилов, в наиболее выраженной степени – у пациентов с тяжелой БА; кроме того, выявлен ряд специфических механизмов нарушения апоптоза, особенно в группе больных с неконтролируемой БА, связанной с дисбалансом анти- и проапоптотических факторов, что может лежать в основе формирования терапевтической резистентности [4]. Доказаны также нарушения апоптотической гибели нейтрофилов при тяжелой БА [51, 67].

ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ГЛЮКОКОРТИКОИДАМ

В основе терапевтической эффективности ГК в лечении астмы лежит способность данной группы препаратов блокировать экспрессию провоспалительных цитокинов через подавление активности NF-κB [76]. Показано, что у пациентов, длительно получающих СКС, экспрессия NF-κB достоверно выше, чем у получающих терапию ингаляционными кортикостероидами (ИКС) ($p<0,001$), «наивных» пациентов ($p<0,04$) и группы контроля ($p<0,01$) [68].

Понятие терапевтической резистентности неразрывно связано с чувствительностью к глюкокортикостероидам. Кортикостероидная резистентность определяется как отсутствие прироста $ОФВ_1$ или ПСВ более чем на 15% по отношению к исходным значениям после применения 30–40 мг преднизолона в течение 2 нед.

В большинстве случаев резистентность к ГК у пациентов развивается в процессе заболевания. В ходе длительной иммуностимуляции, опосредованной цитокинами, появляется дефект связывания ГК-рецептора (ГКР) в Т-клетках [15]. Лишь у небольшой группы пациентов имеется первичная резистентность, которая характеризуется отсутствием побочных эффектов и изменений утреннего уровня кортизола при применении высоких доз кортикостероидов. Молекулярная основа данного типа заключается в снижении количества центров связывания внутри клетки [15, 40].

Среди молекулярных механизмов формирования резистентности к ГК рассматривают: дефект связывания с лигандом, нарушение ядерной транслокации, альтернативный сплайсинг рецепторов [40].

Установлено, что у резистентных к терапии пациентов нет нарушений в секреции эндогенного кортизола и в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе [39]. По опубликованным данным, пока не выявлено мутаций ГКР у резистентных пациентов [38]. Описано 2 типа дефектов связывания с лигандом [58]. Наиболее распространен дефект 1-го типа – снижение аффинитета ГКР; этот дефект специфичен для Т-клеток. Менее распространенный дефект – пониженная плотность ГКР при нормальной степени аффинитета; этот эффект специфичен для мононуклеаров [58].

Механизмы нарушения ядерной транслокации ГКР точно не установлены, но предполагается, что это может быть связано с нарушенным фосфорилированием ГКР системой МАРК и частичным взаимодействием с транспортным протеином – импортином [56]. При анализе связывающей способности не выявлено нарушений аффинитета в комплексе лиганд – рецептор, но установлено пониженное количество рецепторов, способных к связыванию с ДНК у резистентных пациентов. У части резистентных пациентов отмечена нормальная ядерная транслокация ГКР, но воздействие дексаметазона не приводит к достаточному стимулированию ацетиляции Н4-гистона [10]. Таким образом, кортикостероиды не способны активировать гены, отвечающие за противовоспалительный эффект, и не могут подавить экспрессию воспалительного каскада.

Причиной терапевтически резистентной БА может быть и альтернативный сплайсинг ГКР, приводящий к генерации ГКР-β, который не только не способен образовывать с молекулой кортикостероида комплекс лиганд – рецептор, но и препятствует активации нативного ГКР [28]. Так, у пациентов с резистентностью в БАЛ регистрируются более высокие уровни ГКР-β, чем при сохранении чувствительности к терапии и в группе контроля [28]. Более того, высокая экспрессия ГКР-β регистрируется и в Т-клетках дыхательных путей [28]. Однако изучение экспрессии ИЛ8 и GM-CST в периферической крови у пациентов с резистентной БА не показало ассоциации уровня данных цитокинов со снижением активности мРНК ГКР-β и увеличением экспрессии ГКР-β [28]. При анализе экспрессии ГКР на поверхности моноцитов периферической крови не отмечено снижения плотности и нарушений аффинитета у пациентов с тяжелой БА по сравнению с показателями при среднетяжелом течении заболевания и в группе контроля [15]. Поэтому биологическая значимость данной изоформы в формировании терапевтической резистентности продолжает обсуждаться, так как данный рецептор экспрессируется при низких уровнях [33]. Согласно последним исследованиям, NF-κB может увеличивать активность ГКР-β, который не только не связывается, но и является эндогенным ингибитором α-формы [71].

Таким образом, отсутствие дисбаланса ГКР-α и -β в периферических мононуклеарах может свидетельствовать о нарушении внутриклеточного транскрипционного комплекса – дисфункции транскрипционных факторов NF-κB и AP-1, что, в свою очередь, может приводить к неспособности ГКР повышать/подавлять активность кортикостероидзависимых генов. Увеличенная экспрессия и активация NF-κB в эпителии бронхов потенциально может подавлять противовоспалительный эффект ГК в условиях ограниченного количества ГКР. Данный феномен может быть отнесен к потенциальному механизму формирования резистентности.

ВЫРАЖЕННОЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ БРОНХОВ И АНГИОГЕНЕЗ

Важность ремоделирования бронхиальной стенки как компонента тяжелой БА доказана во многих исследованиях, показавших ассоциацию процессов ремоделирования с тяжестью заболевания и степенью бронхиальной обструкции [65].

Для тяжелой БА характерны некоторые особенности ремоделования стенки бронха по сравнению со среднетяжелой. Так, при тяжелом течении заболевания наблюдаются достоверно более выраженное утолщение базальной мембраны, гипертрофия эпителия и более интенсивный ангиогенез [17, 21, 52, 65, 75]. При этом паттерн ремоделирования, по данным некоторых авторов, носит фенотип-специфичный характер. Так, в слизистой оболочке бронхов пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА явления ремоделирования выражены в большей степени (снижение объемной плотности и высоты покровного эпителия, сокращение количества реснитчатых и бокаловидных эпителиоцитов, снижение относительного объема желез, значительное увеличение толщины базальной мембраны и относительного объема соединительной ткани), чем при средней тяжести БА [1]. В свою очередь, фенотип «астма с фиксированной обструкцией» отличается от brittle-фенотипа более выраженным утолщением базальной мембраны и снижением высоты эпителиального пласта [1].

Наблюдается и более выраженная гипертрофия гладкомышечных клеток, кроме того, при тяжелой БА регистрируется достоверно более развитый слой гладкомышечной ткани с характерным снижением расстояния между слоем эпителия и мышечным слоем [52, 65]. Гипертрофированные миоциты при тяжелой БА интенсивно экспрессируют ИЛ8 и эотаксин, обладающие провоспалительным эффектом. Гиперплазия гладкомышечной ткани, истончение базальной мембраны являются причиной комплексного взаимодействия между мезенхимальными факторами роста TGF-β, EGF, IGF и их рецепторами [19].

По последним данным, гипоксия приводит к активации синтеза сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и индуцированного гипоксией транскрипционного фактора-1-α (HIF-1α), которые активируют ангиогенез, что приводит к нарушению микроциркуляции и усилению интенсивности воздействия элементов воспалительного каскада [70].

Важную роль играет дисбаланс деградативных энзимов – металлопротеиназы-9 (MMP-9) и тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP-1. При тяжелой астме регистрируются повышение экспрессии MMP-9 и снижение экспрессии TIMP-1 [46]. Низкий коэффициент соотношения MMP-9/TIMP-1 наблюдается у больных с терапевтической резистентностью как следствие преобладания у них процессов бронхиального фиброгенеза над воспалением [16].

Таким образом, ремоделирование бронха при тяжелой БА можно рассматривать не только как статический компонент, формирующий бронхиальную обструкцию, но и как компонент, участвующий в воспалительном каскаде и способствующий персистенции воспаления.

МОДУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА В НАПРАВЛЕНИИ TH2

С позиции определения механизмов формирования терапевтической резистентности перспективным представляется изучение роли транскрипционных факторов (ТФ), регулирующих воспаление.

Согласно современным представлениям, ТФ играют ключевую роль в детерминировании направления дифференцировки лимфоцитов и формирования Th1/Th2-дисбаланса [41]. При этом во многих случаях экспрессия данных воспалительных белков индуцируется через ТФ. Ключевыми ТФ, определяющими направление дифференцировки Th0-клеток, являются факторы GATA-3 и T-bet.

Транскрипционный фактор GATA-3

Фактор GATA-3 – первый клонированный (в 1991 г.) Т- специфичный ТФ. Он является ключевым регулятором дифференцировки CD4 Т-клеток в Th2-клетки [44].

Влияние GATA-3 на направление дифференцировки Th0 клеток и уровень экспрессии Th2-цитокинов впервые описано в 1995 г. [59]. У пациентов, страдающих БА, регистрируется повышенная по сравнению с таковой в группе контроля экспрессия GATA-3 в крови [64]. Определение уровня ТФ возможно и в индуцированной мокроте у пациентов с БА, при этом регистрируемые показатели сопоставимы с уровнем данных факторов в ткани легких [64].

Для оценки влияния GATA-3 на дифференцировку Th-клеток в 2004 г. проведено исследование с участием здоровых добровольцев, имевших генетический дефект GATA-3-аллеля, но при этом без признаков иммунологической некомпетентности, которые не получали никакой сопутствующей терапии, потенциально способной повлиять на уровень иммунокомпетентных клеток [60]. Так, *in vivo* было установлено, что потеря одного функционального аллеля сопровождается не только достоверным снижением дифференцировки лимфоцитов в направлении Th2, но и снижением эффекторных функций Th2-клеток [60]. При проведении анализа *in vitro* получены схожие результаты. Подавление экспрессии GATA-3 специфичными ингибиторами также сопровождалось снижением дифференцировки Th2-клеток. Необходимо отметить, что интенсивная дифференцировка Th2-клеток приводит к увеличению экспрессии GATA-3, формируя тем самым замкнутый патогенетический каскад, видимо лежащий в основе персистенции атопического воспаления.

Согласно современным представлениям, возможно несколько механизмов влияния фактора GATA-3 на Th2-ответ: индукция продукции цитокинов Th2-ряда, селективная дифференцировка Th0-клеток в Th2 и подавление Th1 специфичных факторов [79].

Продукция Th2-цитокинов у человека, особенно ИЛ5 и ИЛ13, зависит от транскрипционной активности GATA-3. Повышение активности данного фактора сопровождается 10-кратным увеличением промоутерной активности указанных ИЛ, в то время как активность промоутера ИЛ4 возрастает лишь в 2 раза [50]. Увеличенная экспрессия GATA-3 также достоверно ассоциирована с повышением экспрессии ИЛ5 и БГР [50].

Точные механизмы регуляции генов Th2-цитокинов GATA-3 до сих пор не установлены, но, возможно, в регуляции экспрессии существует не только прямая трансактивация промоутера ИЛ5, но и ремоделирование хроматина, облегчающего транскрипцию ИЛ13 и ИЛ4 [57]. Некоторые цитокины, например ИЛ4, способны индуцировать экспрессию GATA-3 через механизм изменения конформации хроматина [57].

Присутствие GATA-3 необходимо для активации промотора ИЛ5, но не ИЛ4 [78]. Следует также отметить, что сайтов связывания GATA-3 с генами Th2-цитокинов, кроме гена ИЛ5, на данный момент не описано, хотя показано, что несколько регионов локусов ИЛ4/ИЛ13 потенциально способны к связыванию GATA-3. Базальная экспрессия фактора GATA-3 подавляет дифференцировку Th1-клеток [79]. Более того, результаты последних исследований свидетельствуют о том, что GATA-3 является ключевым фактором дифференцировки Th2-клеток не только благодаря возможности определять направление трансформации в сторону Th2, но и вследствие его способности блокировать продукцию Th1-цитокинов через снижение активности STAT4 и экспрессии ИЛ12Rβ2. В качестве ключевых продуктов экспрессии GATA-3 можно рассматривать ИЛ4, 5, 10, 13. Фактор GATA-3 также влияет на функциональную активность натуральных киллеров. Базальный уровень экспрессии данного транскрипционного фактора необходим для выживания, активации и эффекторных функций натуральных киллеров [34]. Дефицит экспрессии GATA-3 сопровождается нарушениями дифференцировки натуральных киллеров. Также GATA-3 участвует в регуляции экспрессии гена рецептора NKG2A, ответственного за распознавание антигена HLA-E на таргет-клетках [45].

Кроме прямого влияния на дифференцировку Th2-клеток и экспрессию провоспалительных Th2-цитокинов, GATA-3 оказывает влияние на такие компоненты клинического течения астмы, как БГР и ремоделирование стенки бронха.

Так, увеличенная экспрессия GATA-3 достоверно ассоциирована с повышением степени БГР у человека [50]. Исследования на трансгенных мышах показали положительную ассоциацию уровня экспрессии GATA-3 с БГР и инфильтрацией эозинофилами слизистой оболочки бронхов [77]. На модели астмы у мышей воздействие ингибитора экспрессии GATA-3 Imiquimod приводило к достоверному снижению гиперреактивности дыхательных путей [13]. Повышенная экспрессия GATA-3 ассоциирована со степенью субэпителиального фиброза и отека слизистой, что может свидетельствовать в пользу влияния данного

фактора на формирование и степень выраженности ремоделирования бронхов [35].

Транскрипционный фактор T-bet

Другим ключевым ТФ, определяющим дифференцировку Th0-клеток в Th1-клетки, является фактор T-bet, который относится к семейству T-box. Контакт специфичного антигена с наивным Т-лимфоцитом индуцирует синтез ИЛ12, что, в свою очередь, приводит к транслокации T-bet из цитоплазмы в ядро с последующим связыванием с промоторным регионом генов Th2-цитокинов и активаций экспрессии целевых цитокинов.

Экспрессия T-bet ограничена популяцией Th1-клеток, хотя показано [63], что трансдукция данного фактора в клетки Th2-ряда модулирует их дифференцировку в направлении Th1-фенотипа [63]. Фактор T-bet также экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках, включая дендритные, и служит необходимым ТФ для оптимальной продукции интерферона-γ (ИФНγ) дендритными клетками и антигенспецифичной активации Th1-клеток *in vivo* [43]. Наряду с активацией Th1-клеток T-bet оказывает супрессорный эффект на линию клеток Th-2 и экспрессию Th2-цитокинов. При тяжелой БА регистрируются значительно пониженная экспрессия фактора T-bet по сравнению с показателем в контроле [26].

Кроме прямого влияния на дифференцировку Th1-клеток и экспрессию провоспалительных Th1-цитокинов, T-bet действует на такие компоненты клинического течения астмы, как БГР и ремоделирование стенки бронха.

На модели трансгенных животных, лишенных гена T-bet, регистрируются развитие БГР к метахолину, признаки перибронхиального эозинофильного воспаления, повышение отложения коллагена III под базальной мембраной эпителия бронхов, трансформация миофибробластов. При этом степень снижения экспрессии T-bet ассоциирована со степенью субэпителиального фиброза и отека слизистой, что характеризует влияние данного фактора на формирование и степень выраженности ремоделирования бронха [35]. Нейтрализация ИЛ13 в данной модели приводила к снижению уровня БГР и уменьшению выраженности признаков воспаления. Таким образом, ИЛ13 является ключевым ИЛ, контролирующим ремоделирование бронхов [25]. Описано 24 варианта полиморфизма гена T-bet, при этом установлено, что наличие генотипа c._7947 ассоциировано с высокой степенью гиперреактивности к метахолину [55].

ИФНγ и ИЛ2, продуцируемые Th1-клетками, занимают центральное место в клеточном иммунном ответе, так как ИФНγ является мощным активатором фагоцитоза. Данные цитокины можно рассматривать в качестве ключевых продуктов экспрессии T-bet.

В последнее время в качестве потенциального фактора риска формирования тяжелой БА и триггера обострения у детей и взрослых активно обсуждается микоплазменная инфекция [14]. При этом установлено, что дефицит экспрессии T-bet способствует колонизации дыхательных путей инфекционными агентами (*Mycoplasma pulmonis*), что может стать предвестником неконтролируемого течения заболевания и формирования терапевтической резистентности [9]. Колонизация инфекционным агентом становится возможной в связи с неэффективным иммунным ответом вследствие снижения продукции ИФНγ и недостаточной активацией альвеолярных макрофагов. Дефицит T-bet у мышей, лишенных гена данного фактора, приводит также к большей подверженности инфицированию *Mycobacterium tuberculosis* [62].

Фактор NF-κB

Транскрипционным фактором, ассоциированным с активностью воспаления при БА, является NF-κB – один из главных ТФ, отвечающих за адаптивные реакции клеток.

Фактор NF-κB влияет на различные гены, задействованные в иммунном, острофазовом и воспалительном ответе. К ним относятся гены ИЛ1β, 2, 6, 8, 12, ФНОα и других хемокинов, индуцибельных ферментов (iNOS, Cox-2), молекул адгезивных контактов (ICAM-1, VCAM-1, E-селектин), главного комплекса гистосовместимости (MHC-I, MHC-II), белков комплемента (B, C3, C4), факторов, контролирующих клеточный цикл (p53, циклин D1 и др.), ингибиторов и активаторов апоптоза (c-IAP1, c-IAP2, FasL, Bcl-2, TRAF-1, TRAF-2 и др.).

Во многих исследованиях показано участие NF-B в патогенезе БА. Так, в бронхах пациентов, страдающих астмой, зарегистрирована повышенная активация NF-κB [27]. По данным L. Hart и соавт. [32], в эпителиальных клетках и макрофагах индуцированной мокроты пациентов с БА зарегистрировано повышение активности NF-κB в 2,5 раза по сравнению с контролем [32]. Так, иммуногистохимическое исследование показало, что в эпителиальных клетках больных астмой NF-κB находится в клетках в активированном состоянии вдвое чаще, чем в контрольной группе (соответственно 45,1±7,2 и 20,7±3,9%; $p<0,01$). Также необходимо отметить, что наряду с повышенной активностью данного ТФ для пациентов с БА характерно резкое увеличение связывающей активности NF-κB. Активация NF-κB при астме может быть причиной снижения противовирусного иммунитета и персистенции инфекции в дыхательных путях, что может рассматриваться как один из потенциальных независимых механизмов неконтролируемого течения астмы.

Так, на модели трансгенных животных, лишенных гена NF-κB, показано, что экспрессия нескольких

иммуномодуляторных и антивирусных генов запускалась под воздействием ИФН активнее [72]. Таким образом, экспрессия NF-κB подавляет антивирусную и иммуномодуляторную активность ИФН [72]. Фактор NF-κB участвует также в патогенезе БА посредством увеличения экспрессии NF-κB-зависимых провоспалительных цитокинов, к которым относятся RANTES и эотаксин [31].

До сих пор остается неоднозначной роль ядерного фактора в регуляции механизмов апоптоза. С одной стороны, снижение активности NF-κB ассоциировано с увеличением апоптотического индекса, с другой – активация NF-κB приводит к ингибированию p53-зависимого апоптоза через увеличение экспрессии онкогена AP12/MALT1. В частности, NF-B вовлечен в активацию антиапоптотических генов Bcl-2-семейства и ингибирование апоптотических белков c-FLIP и IAP1/2.24. Если NF-κB активируется через «апоптотический стимул» (агенты, повреждающие ДНК, радиация), это приводит к транскрипции проапоптотических генов DR5, Fas. Таким образом, NF-κB регулирует 2 гена с противоположными функциями. Механизмы данного явления пока неизвестны. Исследования на модели астмы у животных показали, что подавление активности NF-κB триоксидом мышьяка (As2O3) приводит к активации апоптоза эозинофилов в дыхательных путях и, как следствие, – снижению БГР к метахолину. Предполагается, что данные эффекты реализуются через модуляцию экспрессии IκBα и ингибиторного протеина NF-κB [42]. В других исследованиях на трансгенных животных не показано ассоциации NF-κB с БГР [53]. Вклад полиморфизма гена NF-κB в формирование тяжелой астмы продолжает изучаться.

TOLL-LIKE РЕЦЕПТОРЫ (TLR)

В последнее время в литературе появились данные о возможной роли TLR-протеинов в патогенезе БА [11]. Было показано, что TLR4 опосредуют свой эффект посредством модуляции иммунного ответа. Рецепторы TLR4 могут переключать иммунитет как на Th1-, так и на Th2-ответ [61]. При этом направление переключения зависит, как предполагается, от множества факторов (природы аллергена, дозы, времени экспозиции). На моделях животных показано, что низкие дозы липополисахаридов приводят к независимой активации TLR4 и переключению клеточного ответа по Th2-типу. Высокие дозы липополисахаридов поддерживают активацию Th1-звена и, следовательно, оказывают протективный эффект. Воздействие аллергена на дыхательные пути сопровождается секрецией ИЛ10 и ИЛ6 антигенпрезентирующими клетками. При этом ИЛ6 приводит к переключению ответа по Th2-пути, но при комплексном взаимодействии с TLR4 или TLR9 происходит более выраженная активация воспалительного каскада медиаторов. Данный эффект нейтрализуется посредством секреции ИЛ10, который предотвращает развитие реактивности дыхательных путей на воздействие аллергена. Таким образом, повышенный уровень экспрессии TLR на фоне дисбаланса цитокинов (ИЛ6 и ИЛ10) может быть одним из механизмов интенсивной персистенции воспаления при тяжелой БА.

Итак, ТФ являются ключевыми в формировании Th1/Th2-дисбаланса, лежащего в основе персистенции воспаления. Данные факторы оказывают влияние на степень ремоделирования бронха, выраженность БГР. Дисбаланс экспрессии данных факторов лежит в основе снижения иммунитета, способствующего колонизации дыхательных путей *Mycoplasma pulmonis*, что может быть патогенетической основой неконтролируемого течения БА и формирования терапевтической резистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ показал, что прогресс в изучении молекулярных механизмов тяжелой БА очевиден. Так, в доказательных исследованиях определены наиболее вероятные причинные факторы и молекулы, лежащие в основе формирования тяжелой БА и терапевтической резистентности, которые могли бы быть использованы в диагностических целях, а также стать новыми таргетными мишенями терапии БА [36].

В то же время пока рано утверждать, что сегодня существует полное понимание механизмов формирования тяжелой астмы и терапевтической резистентности.

Во-первых, проведенные исследования довольно разнородны по своим целям и задачам, выполнены на неоднородных выборках пациентов – с точки зрения степени тяжести и(или) уровня контроля болезни субъектов; это не позволяет объединить результаты исследований и сформировать полную теоретическую концепцию.

Во-вторых, опубликовано ограниченное количество исследований, в которых участвовали пациенты с тяжелой терапевтически резистентной БА или с фенотипами тяжелой астмы.

В-третьих, большинство исследований одномоментные, что не позволяет определить динамику изменения молекулярных и генетических профилей в ответ на фармакотерапию БА.

Поэтому особенно актуальным представляется планирование и выполнение комплексного молекулярно-генетического исследования тяжелой БА, которое позволит оценить динамику профилей молекулярных параметров и экспрессии генов в ответ на базисную терапию, а это поможет определить механизмы формирования терапевтической резистентности, сформулировать единую концепцию и в конечном счете идентифицировать таргетные мишени фенотип-специфичной (персонифицированной) терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геренг Е.А., Селиванова П.А. Морфофункциональная характеристика слизистой оболочки бронхов у больных различными формами тяжелой бронхиальной астмы // Сиб. консилиум. – 2007; №7 (62): 30–1.
2. Ленская Л.Г., Огородова Л.М. Фармакоэкономика бронхиальной астмы // Обществ. здоровье и организация медицинской помощи на рубеже веков. – Томск, 2000; 77–83.
3. Огородова Л.М., Селиванова П.А., Геренг Е.А. и соавт. Патоморфологическая характеристика нестабильной бронхиальной астмы (фенотип brittle) // Терапевт. арх. – 2008; 80 (3): 39–43.
4. Огородова Л.М., Деев И.А., Никитина Л.Ю. и соавт. Динамика антиапоптотических факторов эозинофилов периферической крови у больных тяжелой бронхиальной астмой на фоне различных фармакотерапевтических режимов // Рос. аллергол. журн. – 2005; 6: 22–31.
5. Чучалин А.Г., Огородова Л.М., Петровский Ф.И. и соавт. Мониторирование и лечение тяжелой бронхиальной астмы у взрослых: результаты национального многоцентрового исследования НАБАТ // Терапевт. арх. – 2005; 77 (3): 36–42.
6. American Thoracic Society. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000; 162: 2341–51.
7. Andrews A., Nasir T., Bucchieri F. IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006; 118 (4): 858–65.
8. Ayres J., Miles J., Barnes P. Brittle asthma // Thorax. – 1998; 53: 315–21.
9. Bakshi C., Malik M., Carrico P. T-bet Deficiency Facilitates Airway Colonization by Mycoplasma pulmonis in a Murine Model of Asthma // The Journal of Immunology. – 2006; 177: 1786–95.
10. Barnes P. Corticosteroid effects on cell signaling // Eur Respir J. – 2006; 27: 413–26.
11. Basu S., Fenton M. Toll-like receptors: function and roles in lung disease // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2004; 286: 887–92.
12. Bel E. Clinical phenotypes of asthma // Curr Opin Pulm Med. – 2004; 10: 44–50.
13. Bian T., Yin K., Jin S. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by imiquimod modulating transcription factors T-bet and GATA-3 // Chin. Med. J. (Engl). – 2006; 119 (8): 640–8.
14. Biscardi S., Lorrot M., Marc E. et al. Mycoplasma pneumoniae and asthma in children // Clin. Infect. Dis. – 2004; 38: 1341–6.
15. Bonnans C., Chanez P., Meziane H. Glucocorticoid receptor-binding characteristics in severe asthma // Eur. Respir. J. – 2003; 21: 985–8.
16. Bossé M., Chakir J., Rouabhia M. Serum matrix metalloproteinase-9: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1999; 159 (2): 596–602.
17. Bourdin A., Neveu D., Vachier I. Specificity of basement membrane thickening in severe asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 2007; 119 (6): 1367–74.
18. Bradding P., Green R. Subclinical phenotypes of asthma // Curr Opin Allergy Clin Immunol. – 2010; 10 (1): 54–9.
19. Chen G., Khalil N. TGF-beta1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases // Respir Res. – 2006; 3 (7): 2.
20. Chung K., Godard P., Adelroth E. Difficult/therapy-resistant asthma // Eur. Respir. J. – 1999; 13: 1198–208.
21. Cohen L., Tarsi J., Ramkumar T. Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2007; 176 (2): 138–45.
22. Dente F., Carnevali S., Bartoli M. Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients // Ann Allergy Asthma Immunol. – 2006; 97 (3): 312–20.
23. Difficult asthma / Ed. by S. Holgate. – Dunitz: Martin LTD. – 1999. – 567 p.
24. Fal A., Nowak A., Nowak M. Mechanisms regulating tissue eosinophilia in bronchial asthma: focus on apoptosis // Pneumonol Alergol Pol. – 2003; 71 (5–6): 281–7.
25. Finotto S., Hausding M., Doganci A. Asthmatic changes in mice lacking T-bet are mediated by IL-13 // International Immunology. – 2005; 17 (8): 993–1007.
26. Finotto S., Neurath M., Glickman J. et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet // Science. – 2002; 295: 336–8.
27. Gagliardo R., Chanez P., Mathieu M. Persistent Activation of Nuclear Factor-B Signaling Pathway in Severe Uncontrolled Asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2003; 168: 1190–8.
28. Gagliardo R., Chanez P., Vignola A. Glucocorticoid receptor alpha and beta in glucocorticoid dependent asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000; 162 (1): 7–13.
29. Gani F., Senna G., Piglia P. Cytokines and asthma // Recenti Prog Med. – 1998; 89 (10): 520–8.
30. Global Burden of Asthma Report (Электронный ресурс). – Электрон. дан. – 2012. – Режим доступа: http://www.ginasthma.org/reports-global-burden-of-asthma.html.
31. Graziano F., Cook E., Stahl J. Cytokines, chemokines, RANTES, and eotaxin // Allergy Asthma Proc. – 1999; 20: 141–6.
32. Hart L., Krishnan V., Adcock I. et al. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor k B, in asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1998; 158: 1585–92.
33. Hecht K., Carlstedt-Duke J., Stierna P. et al. Evidence that the isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor // J. Biol. Chem. – 1997; 272: 26659–64.
34. Kim P., Pai S., Brigl M. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells // J. Immunol. – 2006; 177 (10): 6650–9.
35. Kiwamoto T., Ishii Y., Morishima Y. Transcription Factors T-bet and GATA-3 Regulate Development of Airway Remodeling // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2006; 174: 142–51.
36. Kowalski M., Cieślak M., Pérez-Novo C. Clinical and immunological determinants of severe/refractory asthma (SRA): association with Staphylococcal superantigen-specific IgE antibodies // Allergy. – 2011; 66 (1): 32–8.
37. Kuperman D., Huang X., Koth L. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma // Nat Med. – 2002; 8 (8): 885–9.
38. Lane S., Arm J., Staynov D. et al. Chemical mutational analysis of the human glucocorticoid receptor cDNA in glucocorticoid-resistant bronchial asthma // Am. J. of Respiratory Cell. and Molecular Biology. – 1994; 11: 42–8.
39. Lane S., Lee T. Corticosteroid resistance in other disease states and tissues // Am. J. of Respiratory and Critical Care Medicine. – 1996; 154: 62–5.
40. Leung D., de Castro M., Szefler S. Mechanisms of glucocorticoid-resistant asthma // Ann. N Y Acad Sci. – 1998; 840: 735–46.
41. Levine S., Wenzel S. Narrative review: the role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes // Ann Intern Med. – 2010; 152 (4): 232–7.
42. Lin-Fu Zhou, Yi Zhu, Xue-Fan Cui. Arsenic trioxide, a potent inhibitor of NF-κB, abrogates allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation // Respiratory Research. – 2006; 7: 146.
43. Lugo-Villarino G., Maldonado-Lopez R., Possemato R. et al. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003; 100: 7749–54.
44. Maneechotesuwan K., Xin Y., Ito K. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3 // J. Immunol. – 2007; 178 (4): 2491–8.
45. Marusina A., Kim D., Lieto L. GATA-3 Is an Important Transcription Factor for Regulating Human NKG2A Gene Expression // The J. of Immunology. – 2005; 174: 2152–9.
46. Mattos W., Lim S., Russell R. Matrix metalloproteinase-9 expression in asthma: effect of asthma severity, allergen challenge, and inhaled corticosteroids // Chest. – 2002; 122 (5): 1543–52.
47. Miller M., Johnson C., Miller D. et al. Severity assessment in asthma: an evolving concept // J. Allergy Clin. Immunol. – 2005; 116: 990–5.
48. Moore W., Meyers D., Wenzel S. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2010; 181: 315–23.
49. Mukhopadhyay S., Hoidal J., Mukherjee T. Role of TNFα in pulmonary pathophysiology // Respir Res. – 2006; 7 (1): 125.
50. Nakamura Y. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 1999; 103: 215–22.
51. Parfrey H., Farahi N., Porter L. Live and let die: is neutrophil apoptosis defective in severe asthma? // Thorax. – 2010; 65 (8): 665–7.
52. Pepe C., Foley S., Shannon J. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 2005; 116 (3): 544–9.
53. Poynter M., Cloots R., Woerkom T. NF-B Activation in Airways Modulates Allergic Inflammation but Not Hyperresponsiveness // The J. of Immunology. – 2004; 173: 7003–9.
54. Puthothu B., Krueger M., Heinze J. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections // Clin. Mol. Allergy. – 2006; 17 (4): 2.
55. Raby B., Hwang E., Steen K. T-Bet Poly-

morphisms Are Associated with Asthma and Airway Hyperresponsiveness // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2006; 173: 64–70.
56. Rogatsky I., Logan S., Garabedian M. Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase // PNAS. – 1998; 95: 2050–5.
57. Seki N., Miyazaki M., Suzuki W. IL-4-Induced GATA-3 Expression Is a Time-Restricted Instruction Switch for Th2 Cell Differentiation // The J. of Immunology. – 2004; 172: 6158–66.
58. Sher E., Leung D., Surs W. et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy // J. of Clin. Investigation. – 1994; 93: 33–9.
59. Siegel M., Zhang D., Ray P. et al. Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements // J. Biol. Chem. – 1995; 270: 24548–55.
60. Skapenko A., Leipe J., Niesner U. GATA-3 in Human T Cell Helper Type 2 Development // J. Exp. Med. – 2004; 199 (3): 423–8.
61. Sukkar M., Xie S., Khorasani N. Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006; 118 (3): 641–8.
62. Sullivan B., Jobe O., Lazarevic V. Increased Susceptibility of Mice Lacking T-bet to Infection with Mycobacterium tuberculosis Correlates with Increased IL-10 and Decreased IFN-gamma Production // The J. of Immunology. – 2005; 175: 4593–602.
63. Szabo S., Kim S., Costa G. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment // Cell. – 2000; 100: 655–69.
64. Taha R., Hamid Q., Cameron L. T Helper Type 2 Cytokine Receptors and Associated Transcription Factors GATA-3, c-MAF, and Signal Transducer and Activator of Transcription Factor-6 in Induced Sputum of Atopic Asthmatic Patients // Chest. – 2003; 123: 2074–82.
65. Tillie-Leblond I., de Blic J., Jaubert F. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma // Allergy. – 2008; 63 (5): 533–41.
66. Turato G., Baraldo S., Zuin R. The laws of attraction: chemokines, neutrophils and eosinophils in severe exacerbations of asthma // Thorax. – 2007; 62 (6): 465–6.
67. Uddin M., Nong G., Ward J. Prosurvival activity for airway neutrophils in severe asthma // Thorax. – 2010; 65 (8): 684–9.
68. Vignola A., Chiappara G., Siena L. Proliferation and activation of bronchial epithelial cells in corticosteroid-dependent asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 2001; 108 (5): 738–46.
69. Vignola A., Lamb J. James A. et al. Reduced apoptosis of memory T-cells in the inner airway wall of mild and severe asthma // Eur Respir J. – 2005; 26 (2): 265–70.
70. Voelkel N., Spiegel S. Why is effective treatment of asthma so difficult? An integrated systems biology hypothesis of asthma // Immunol. Cell. Biol. – 2009; 87 (8): 601–5.
71. Webster J., Oakley R., Jewell C. et al. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative _ isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance // Proc Natl Acad Sci USA. – 2001; 98: 6865–70.
72. Wei L., Sandbulte M., Thomas P. NFkappaB negatively regulates interferon-induced gene expression and anti-influenza activity // J. Biol. Chem. – 2006; 281 (17): 11678–84.
73. Wenzel S. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes // Lancet. – 2006; 368: 804–13.
74. Wenzel S. Severe asthma in adults // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2005; 172: 149–60.
75. Wilson J., Hii S. The importance of the airway microvasculature in asthma // Curr. Opin. Allergy ClinImmunol. – 2006; 6: 51–5.
76. Wilson S., Wallin A., Della-Cioppa G. Effects of budesonide and formoterol on NF-kappaB, adhesion molecules, and cytokines in asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2001; 164 (6): 1047–52.
77. Yamashita N., Tashimo H., Ishida H. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2006; 290: 1045–51.
78. Zhang D., Yang L., Ray A. Differential responsiveness of the interleukin-5 (IL-5) and IL-4 genes to transcription factor GATA-3 // J. Immunol. – 1998; 161: 3817–21.
79. Zhu J., Yamane H., Cote-Sierra J. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors // Cell. Res. – 2006; 16 (1): 3–10.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 617.52/.53-006.6-037-078.33

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕОМА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМАХ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Г.В. Какурина[1], кандидат медицинских наук, **И.В. Кондакова**[1], доктор медицинских наук, профессор, **Е.Л. Чойнзонов**[1, 2], доктор медицинских наук, профессор

[1]Научно-исследовательский институт онкологии СО РАМН, Томск

[2]Сибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Томск

E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Плоскоклеточные карциномы головы и шеи – одна из агрессивных форм опухолей, с высокой степенью запущенности и низкой выживаемостью больных, что делает необходимым разработку новых маркеров прогноза течения заболевания. Протеомные технологии позволяют провести полномасштабное исследование изменений белкового спектра тканей и биологических жидкостей организма больного, что может открыть новые подходы в лабораторной диагностике. Идентифицированы белки, определение которых возможно в качестве маркеров для ранней диагностики заболевания и прогноза чувствительности опухолей к химиотерапевтическим воздействиям. Решение проблем, связанных с интерпретацией данных, различными методологическими подходами и незаконченностью многих работ позволит с уверенностью определить, какие из кандидатных белков можно предложить для использования в клинической практике.

Ключевые слова: *плоскоклеточная карцинома головы и шеи, протеомика, маркеры, прогнозирование*

PROTEOMIC PATTERNS OF BIOLOGICAL FLUIDS IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

G.V. Kakurina[1], I.V. Kondakova[1], E.L. Choinzonov[1, 2]

[1]Cancer Research Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation;
[2]Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Head and neck squamous cell carcinoma is one of the aggressive forms of cancer, which often presents at advanced stages, being associated with poor prognosis and low survival rates. Therefore, the delivery new biomarkers for early cancer detection and prediction of tumor response to target therapy seems to be necessary. The proteomic technologies allow to conduct the large-scale studies of changes in protein profile of tissues and biological fluids, thus discovering new approaches to the laboratory diagnosis. Identified proteins can be used as markers for early cancer detection and prediction of the chemotherapy response. Solution of the problems related to the interpretation of data, different methodological approaches and incompleteness of many studies, allow to determine with sufficient certainty what proteins can be suggested to use in clinical settings.

Key words: *squamous cell head and neck carcinoma, proteomics, markers, prognosis*

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важных задач современной онкологии – поиск характерных признаков и свойств опухолей, на основе которых можно прогнозировать течение заболевания и определять адекватную терапевтическую тактику. Известно, что типичные клетки плоскоклеточной карциномы (ПК) обладают способностью к персистирующей инвазии, которая приводит к местным рецидивам и лимфогенному метастазированию [4, 23]. Биологическое поведение ПК головы и шеи (ПКГШ), способность к метастазированию и рецидивированию, чувствительность к терапевтическим воздействиям могут варьировать в пределах как одной группы, так и одной локализации [17, 19].

Оценивая биологическую агрессивность первичной опухоли, чаще всего исследуют ее пролиферативную активность, апоптоз и такие ключевые показатели, как изменение адгезивных свойств опухолевых клеток, появление у них «локомоторного» фенотипа и способности к инвазии, сопровождающейся увеличением продукции протеаз [2, 3], что изменяет паренхиматозно-стромальные взаимоотношения, разрушая внеклеточный матрикс. Использование современных молекулярно-биологических методов (таких, как иммуногисто- и иммуноцитохимия, гибридизация *in situ*, полимеразная цепная реакция, лазерная микродиссекция, секвенирование, микрочиповые технологии и т.д.) позволяет достаточно полно оценить картину как белковых, так и генетических

изменений на уровне целостного организма, сопровождающих появление признаков прогрессирования опухолевого процесса.

С возникновением протеомных технологий появилась возможность провести исследование большой совокупности белков – ключевых игроков во всех биологических процессах, и сравнить протеомы тканей и биологических жидкостей организма в норме и при патологии для выявления потенциальных биомаркеров заболеваний, в том числе злокачественных новообразований [1]. В большинстве опубликованных исследований изучали молекулярные характеристики, отражающие ограниченное количество параметров, связанных с биологической агрессивностью опухоли. Работ, в которых рассматривался бы широкий спектр маркеров, описывающих различные стороны прогрессии опухолевого заболевания, немного. До сих пор не определена диагностическая панель белковых маркеров, способных достоверно предсказать биологическое поведение опухоли и ее ответ на терапевтические воздействия, которая была бы достаточной для проведения стандартного клинического исследования.

ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПКГШ

Биологические жидкости организма человека являются наиболее удобным объектом для исследования, поскольку содержат белки практически всех тканей организма, и в конечном итоге все патологические процессы отражаются на их составе. Поэтому поиск ключевых биологических меток патологических состояний чаще всего основан на использовании биологических жидкостей пациента, в частности сыворотки крови. Основной путь проведения исследовательских работ – сравнительный анализ белковых спектров сыворотки или плазмы крови практически здоровых доноров и пациентов со злокачественными новообразованиями. Причем такой подход является наиболее чувствительным и специфичным методом.

Сравнительный анализ протеома сыворотки крови показал его отличие у больных с ПКГШ и у здоровых людей при высокой степени чувствительности и специфичности [43]. Кроме того, анализ белковых спектров сыворотки крови (от 0 до 100 kDa) продемонстрировал определенные их различия у пациентов с опухолями полости рта (83%), ротоглотки (81%), гортани (88%) [21]. В образцах сыворотки крови с помощью SELDI-MS было определено 8 возможных биомаркеров с различной молекулярной массой (5320–9366 Da). При проверке точности предложенной модели для первичной диагностики ее чувствительность составила 90,9% (40/44), специфичность – 92,0% (23/25) [9].

Протеомный анализ низкомолекулярных фракций белков сыворотки крови здоровых (доноры) и больных раком различной локализации, в том числе ПКГШ, выявил 2 спектральных пика, соответствующих фрагментам сывороточного амилоида А. Авторы подчеркивают, что увеличение содержания сывороточного амилоида А отражает общий ответ организма на патологический процесс [34]. С помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии плазмы крови больных с ПК полости рта было выявлено 6 белков с различной молекулярной массой (2664–9240 Da). Белок с массой 2664 Da, идентифицированный как фрагмент α-цепи фибриногена, показал самую высокую чувствительность (100%) и специфичность (97%) в отношении определения метастазов [10]. Увеличение содержания фрагмента α-цепи фибриногена и(или) других его продуктов протеолиза может свидетельствовать об активации сериновых протеаз, которые участвуют в контроле физиологических процессов (активация каскада белков свертывания крови, фибринолиз) и могут, вероятно, служить маркером инвазии.

Для оценки возможности прогнозировать рецидив болезни Ch. Gourin и соавт. исследовали белковый спектр сыворотки крови больных ПКГШ после лечения с использованием комбинации таких методов, как SELDI-TOF-MS и 2-DIGE/MALDI-TOF-MS [22]. Было показано, что существует дифференциальная экспрессия 181 белка в сыворотке крови у больных ПКГШ до лечения и через 6 мес и более после него. Кроме этого, авторы показали, что рецидив заболевания был связан с недостаточной экспрессией нескольких ингибиторов сериновых протеаз (С1-ингибитор, SERPING1), кининогена и со сверхэкспрессией антиоксидантного тиолспецифичного белка нескольких форм аполипопротеина А1 и цитокератина 2. Показано, что кининоген ингибирует клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию, инвазию и ангиогенез. Он очень восприимчив к деградации тканевым *калликреином 14*, участвующим в опухолевом росте, инвазии и ангиогенезе через активацию матриксных протеаз. Известно, что высокий уровень экспрессии mRNA калликреина 14 связан с агрессивными формами рака молочной железы, предстательной железы и яичников [7, 13]. Как предполагают авторы, низкая экспрессия кининогена и его предшественников при рецидивирующей ПКГШ является результатом увеличенной деградации и может быть биомаркером агрессивного поведения опухоли. Отмеченная в работе сверхэкспрессия эпидермального цитокератина-2, как известно, является показателем активации пролиферации кератиноцитов, их дифференцировки и конечной стадии ороговения [12]. Протеомный профиль сыворотки крови больных ПКГШ до и после радиотерапии показал изменения в экспрессии серотрансферина и транстиретина, причем уровень идентифицированных белков в сыворотке крови больных после лечения возвращался к контрольно-

му. В связи с этим авторы предположили важность этих белков для диагностики и мониторинга больных с ПКГШ [40].

Таким образом, исследования пептидного состава сыворотки крови больных с ПКГШ в литературе представлены недостаточно, работы по поиску возможных маркеров заболевания являются незаконченными и разнородными по содержанию. Полученные авторами данные не могут отразить в полной мере ключевые точки прогрессирования патологического процесса и поэтому стать источником для разработки маркерной панели. Кроме того, различный методический подход может внести определенные трудности в интерпретацию результатов и дальнейшую разработку диагностической панели для клинических нужд.

Отметим, что на данный момент в крови идентифицировано 20 433 белка, внесенных в электронную базу данных [16]. Из них 1261 белок ассоциирован со злокачественными новообразованиями различных локализаций, около 22% являются плазменными белками крови и только 5% из предложенных кандидатных маркеров были использованы для дальнейших исследований и клинических разработок [35]. Поэтому данное направление остается перспективным для многих исследователей.

ПРОТЕОМНЫЙ СПЕКТР СЛЮНЫ БОЛЬНЫХ ПКГШ

Недавние исследования с применением протеомных технологий показали возможность использования слюны для поиска новых биомаркеров как неинвазивный метод диагностики [26]. Слюна – один из самых доступных образцов для получения биомаркеров, особенно для опухолей поверхностных локализаций (головы и шеи). Например, определенные успехи достигнуты при поиске маркеров рака поджелудочной железы – исследование транскриптомного профиля слюны выявило возможные маркеры с чувствительностью 90,0% и специфичностью 95,0% [45].

С помощью хромато-масс-спектрометрии LC-MS/MS, 2D-гель-электрофореза с последующим иммуноблоттингом были отобраны 12 кандидатных белков с высокой экспрессией в слюне у пациентов с ПК полости рта. Из них для 5 белков показаны существенные различия между больными (основная группа; n=48; p≤0,006) и здоровыми (контроль; n=48): Mac-2 BP, MRP14, CD59, каталаза, профилин [27]. Миелоидассоциированный белок MRP14 известен как S100-A9-белок или кальгранулин-B и связан с регуляцией каскада воспалительных реакций [42]. Кроме этого, показано, что комплекс MRP14-MRP8 (кальгранулин A/кальгранулин B) играет важную роль в подавлении иммунного ответа на опухоль, способствуя прогрессии опухолей разного происхождения [11, 18, 25, 38]. Также показана сверхэкспрессия белка S100A9, связанная с плохим прогнозом у пациентов с немелкоклеточным раком легкого [30]. Известно, что CD59 (протектин, MIRL, MACIF, P-18, H19) – один из мембранных белков, которые защищают клетки собственного организма от лизиса под воздействием лизирующего мембрану комплекса; его экспрессия связана с плохим прогнозом у больных раком ободочной и прямой кишки [44].

Изучение белкового профиля в образцах слюны пациентов с ПК полости рта с помощью протеомного анализа в комплексе с ELISA и вестерн-блоттингом выявили увеличение экспрессии трансферрина, достоверно коррелировавшее с размером и стадией опухоли [28], а также пептид 2918.57 Da, идентифицированный как олигомерный белок цинкового пальца ZNF510 (ZNP510) (25 и 60% соответственно у пациентов с T1+T2 и T3+T4), который, по мнению авторов, может быть полезен для ранней диагностики опухоли этой локализации [29]. Белки семейства ZNP (ZNP510, ZNP782) идентифицированы недавно, предположительно их функция заключается в регуляции транскрипции, они экспрессируются в остеобластах и хондроцитах и, видимо, связаны с процессами и особенностями этнического развития скелета индивидуума [31].

При сравнительном анализе протеомов слюны пациентов с ПКГШ и доброкачественными заболеваниями этой локализации установлено, что у больных раком повышена экспрессия β-фибрина, кальций-связывающего белка S100, трансферрина, тяжелая цепь γ-иммуноглобулина и кофилина-1 и понижена экспрессия транстеритина. Увеличенная экспрессия S100 подтверждена иммуноблоттингом [14]. Трансферрин и транстеритин относятся к транспортным белкам и могут быть вовлечены в стимуляцию пролиферации опухолевых клеток [36]. Белки семейства S100 насчитывают около 16 членов, которые участвуют в ответе генов раннего реагирования, в реализации генетических программ апоптоза и антиапоптозной защиты [37] и являются маркерами злокачественной меланомы. Белки S100 являются кальцийсвязывающими, регулирующими фундаментальные биологические процессы. 13 белков из S100 (S100A2, S100A3, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A12, S100A15, S100B, и S100P) экспрессируются в нормальном и(или) пораженном эпидермисе. Некоторые S100 белки сверхэкспрессируются в коже при раке, метастазах, псориазе, артрите, повреждении кожи и ее воспалении, при клеточных стрессах [15]. Один из белков семейства S100A4 (Mts1) предложен как маркер стволовых клеток ПКГШ [32]. Согласно одной из гипотез, появление агрессивного фенотипа ПКГШ зависит от наличия в пределах опухоли субпопуляции клеток (так называемые раковые стволовые клетки – CSCs или ракинициирующие клетки – CICs), ведущей к регенерации опухоли и метастазированию, развитию химио- и радиорезистентности [24, 39, 41].

Оценка протеомного профиля слюны больных ПКГШ показала увеличенную (по сравнению с таковой у здоровых) экспрессию белка PLUNC (белок, секретирующийся эпителиальными клетками верхних дыхательных путей) и Zn-α_2-гликопротеина. Авторы отметили, что обнаруженные ими белки в слюне могут быть потенциальными маркерами диагностики и мониторинга у пациентов с ПКГШ в комбинации с выявленными в той же работе белками в плазме крови [40].

Проведенные исследования показали присутствие достаточно информативных биомаркеров в слюне. Однако мало описаны проблемы специфичности/чувствительности в отношении патологических состояний возможных биомаркеров, содержащихся в слюне пациентов [5, 26]. Кроме того, состав белков в слюне может зависеть от различных факторов, в том числе и от этнического происхождения [8].

Ранее при картировании белков слюны здорового человека было идентифицировано около 100 белков, представляющих 20 различных модификаций. Основная часть белков, экспрессировавшихся в различных формах, состояла из α-амилазы, иммуноглобулина (Ig) A, пролактининдуцибельного белка, Zn-β_2-гликопротеина и цистатинов (S, SA, D и SN), антагониста рецептора интерлейкина (ИЛ)-1, липокалина-1 и кальгранулинов A и B (S100A8 и A9), аполипопротеина 1, α_2-микроглобулина, S-глутатионтрансферазы [20]. Дальнейшие исследования протеомного состава слюны человека пополнили белковый каталог до 2290 белков, причем исследователи отметили, что приблизительно 27% из них обнаружены в плазме крови. Кроме того, как утверждают авторы, почти 40% белков из предложенных в качестве кандидатных маркеров рака, сердечно-сосудистых и других заболеваний, могут находиться в цельной слюне [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы позволяет сделать вывод, что протеомная характеристика ПКГШ сегодня изучена не в полном объеме, результаты многих работ не проанализированы до конца или остаются на стадии идентификации белка по его массе.

На данном этапе можно выделить несколько встречающихся в разных работах белковых маркеров: белки семейства S100 (клеточные линии, слюна, опухолевый тканевый материал), митохондриальная супероксиддисмутаза, белки теплового шока и виментин (клеточные линии, тканевый материал), цитокератины (кровь, тканевый материал), транспортные белки (слюна, кровь).

Итак, описанные в литературе кандидатные маркеры включают белки, являющиеся продуктами внутриклеточных реакций или вовлеченные в различные клеточные и внеклеточные процессы и структуры – такие, как межклеточные контакты, ангиогенез, клеточная дифференцировка, пролиферация, апоптоз, иммунный ответ, передача клеточных сигналов, гидролиз, клеточный хоуминг, ответ острой фазы и пр. Гипотетически все эти белки в той или иной концентрации должны содержаться в биологических жидкостях организма (кровь, слюна), где их можно обнаружить с помощью высокотехнологичных протеомных методов, которые позволяют отследить концентрацию белка на фемтомолярном уровне. Следует отметить, что анализ биологических жидкостей организма достаточно доступен для клинического применения.

Несмотря на высокий методологический подход в исследованиях белкового профиля карцином головы и шеи, картина происходящих в организме физиологических и патологических процессов при прогрессировании ПКГШ недостаточно ясная. Результаты исследований описаны довольно мозаично, чаще противоречивы и разнородны по содержанию. Учитывая, что прогрессирование заболевания сопровождается большим количеством реакций (усиление клеточной адгезии, появление способности опухолевых клеток к миграции и инвазии, усиленная пролиферация, активация неоангиогенеза, толерантность к апоптотическим сигналам и уход от иммунного надзора), в сыворотке крови больных может появиться большое количество конечных продуктов этих процессов. Возможно, на ранних стадиях появляются также сигнальные белки и(или) продукты клеточных реакций, которые могут говорить о начале процесса перехода новообразования на более агрессивный уровень. Для разработки диагностической панели необходимо выделить особенно важные ключевые белки, которые с высокой степенью чувствительности и достоверности будут предсказывать исход заболевания.

Первоначально применение новых технологий для поиска биомаркеров в клинически доступных образцах (ткань, кровь и слюна) в качестве предвестников ПКГШ, дало многообещающие результаты. Однако проблемы, связанные с оценкой воспроизводимости результатов и недостаточной освещенностью большого количества данных, пока не разрешены. Нельзя с полной уверенностью сказать, какой из предложенных в экспериментальных исследованиях белков может быть включен в дальнейшие клинические исследования. Нужно учитывать также, что идентифицированная масс-спектрометрически молекулярная масса белка в эксперименте может отличаться от теоретических значений в базе данных протеомного атласа. Вероятно, это связано с посттрансляционными модификациями.

Таким образом, несмотря на большое количество работ с использованием клинического материала, до сих пор неизвестно, какие из кандидатных белков в полной мере могут служить маркерами, предупреждающими о возможной прогрессии опухолевого заболевания и ответе на терапевтические вмешательства. На

данном этапе поиска из 1261 предложенных кандидатных белка только единицы одобрены и разрешены к применению для диагностических целей в качестве маркеров опухолевого процесса [35]. Решение проблем, связанных с интерпретацией экспериментальных данных, различными методологическими подходами и незаконченностью многих работ позволит с уверенностью определить, какие из кандидатных белков-маркеров можно предложить для использования в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Постгеномные технологии в прогнозе метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи // Росс. биотерапев. журн. – 2011; 3: 31–6.
2. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи // Вопр. онкологии. – 2012; 1 (58): 26–32.
3. Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В. и др. Патогенетическая значимость системы матриксных металлопротеиназ при плоскоклеточном раке головы и шеи // Сиб. онкол. журн. – 2011; 1: 29–33.
4. Чойнзонов Е.Л., Чижевская С.Ю., Мусабаева Л.И., и др. Результаты комбинированного лечения больных раком гортани и гортаноглотки // Сиб. онкол. журн. – 2012; 1 (49): 5–9
5. Al-Tarawneh S., Border M., Dibble C. et al. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review // OMICS. – 2011; 15(6): 353–61.
6. Anderson N., Polanski M., Pieper R., et al. The Human Plasma Proteome: A Non-Redundant List Developed by Combination of Four Separate Sources // Mol. Cell. Proteomics. – 2004; 3: 311–26.
7. Borgono C., Michael I., Shaw J. et al. Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14 // J Biol Chem. – 2007; 282: 2405–2422
8. Brinkmann O., Kastratovic D., Milovan V. et al. Oral Squamous Cell Carcinoma Detection By Salivary Biomarkers in a Serbian Population // Oral Oncol. – 2011; 47(1): 51–5.
9. Cao S., Yu J., Chen Q. et al. Detection of nasopharyngeal carcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry profiles of the serum proteome // Chin. J. Cancer. – 2010; 29 (8): 721–8.
10. Cheng A., Chen L., Chien K. et al. Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology // Clin. Chem. – 2005; 51 (12): 2236–44.
11. Cheng P., Corzo C., Luetteke N. et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein // J. Exp. Med. – 2008; 205(10): 2235–49.
12. Collin C., Moll R., Kubicka S. et al. Characterization of human cytokeratin 2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation // Exp. Cell. Res. – 1992; 202 (1): 132–41.
13. Coticchia Ch., Yang J., Moses M. Ovarian Cancer Biomarkers: Current Options and Future Promise // J. Natl. Compr. Canc. Netw. – 2008; 6: 795–802.
14. Dowling P., Wormald R., Meleady P. et al. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis // J. Proteomics. – 2008; 71 (2): 168–75.
15. Eckert R., Broome A., Ruse M. et al. S100 proteins in the epidermis // J. Invest. Dermatol. – 2004; 123 (1): 23–33.
16. Farrah T., Deutsch E., Omenn G. et al. A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas // Mol. Cell. Proteomics. – 2011; 10 (9): M110.006353.
17. Garavello W., Ciardo A., Spreafico R. et al. Risk Factors for Distant Metastases in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. – 2006; 132: 762–6.
18. Gebhardt C., Németh J., Angel P. et al. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer // Biochem. Pharmacol. – 2006; 72 (11): 1622–31.
19. Gendena E., Ferlito A., Bradleyc P. et al. Neck disease and distant metastases // Oral. Oncology. – 2003; 39: 207–12.
20. Ghafouri B., Tagesson C., Lindahl M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting // Proteomics. – 2003; 3 (6): 1003–15.
21. Gourin C., Xia Z., Han Y. et al. Serum protein profile analysis in patients with head and neck squamous cell carcinoma // Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. – 2006; 132 (4): 390–7.
22. Gourin C., Zhi W., Adam B. Proteomic identification of serum biomarkers for head and neck cancer surveillance // Laryngoscope. – 2009; 119 (7): 1291–302.
23. Grandis J., Pietenpol J., Greenberger J. et al. Head and Neck Cancer. Meeting Summary and Research Opportunities // Cancer Res. – 2004; 64: 8126–9.
24. Graziano A., d'Aquino R., Tirino V. et al. The stem cell hypothesis in head and neck cancer // J. Cell. Biochem. – 2008; 103(2): 408-12.
25. Hermani A., De Servi B., Medunjanin S. et al. S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells // Exp. Cell. Res. – 2006; 312 (2): 184–97.
26. Hu S., Loo J., Wong D. Human saliva proteome analysis // Ann. N. Y Acad. Sci. – 2007; 1098: 323–9.
27. Hu Sh., Arellano M., Boontheung P. et al. Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery // Clin. Cancer. Res. – 2008; 14: 6246–52.
28. Jou Y., Lin C., Lai C. et al. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer // Anal. Chim. Acta. – 2010; 681 (1–2): 41–8.
29. Jou Y., Lin C., Lai C. et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages // Clin. Chim. Acta. – 2011; 412 (15–16): 1357–65.
30. Kawai H., Minamiya Y., Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer // Tumor. Biology. – 2011; 32 (4): 641–6.
31. Lei Sh., Yang T., Tan L. et al. Genome-wide association scan for stature in Chinese: evidence for ethnic specific loci // Hum. Genet. – 2009; 125 (1): 1–9.
32. Lo J., Yu C., Chiou S. et al. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers // Cancer Res. – 2011; 71 (5): 1912–23.
33. Loo J., Yan W., Ramachandran P. et al. Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes // J. Dent. Res. – 2010; 89 (10): 1016–23.
34. Pietrowska M., Polańska J., Suwiński R. et al. Comparison of peptide cancer signatures identified by mass spectrometry in serum of patients with head and neck, lung and colorectal cancers: association with tumor progression // Int. J. Oncol. – 2012; 40 (1): 148–56.
35. Polanski M. and Anderson N. A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics // Biomark Insights. – 2006; 1: 1–48.
36. Rossi M. and Zetter B. Selective stimulation of prostatic carcinoma cell proliferation by transferring // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1992; 89 (13): 6197–201.
37. Scotto Ch., Deloulme J., Rousseau D. et al. Calcium and S100B Regulation of p53-Dependent Cell Growth Arrest and Apoptosis // Mol. Cell. Biol. – 1998; 18 (7): 4272–81.
38. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: New Insights into Their Roles in Malignancy // J. Innate Immun. – 2012; 4 (1): 31–40.
39. Stanley Shostak. Cancer Stem Cells – The Cutting Edge. – Croatia: InTech. – 2011. – 606 p.
40. Vidotto A., Henrique T., Raposo L. et al. Salivary and serum proteomics in head and neck carcinomas: before and after surgery and radiotherapy // Cancer Biomark. – 2010–2011; 8 (2): 95–107.
41. Visvader J., Lindeman G. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions // Nat. Rev. Cancer. – 2008; 8 (10): 755–68.
42. Vogl T., Tenbrock K., Ludwig S. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock // Nat. Med. – 2007; 13 (9): 1042–9.
43. Wadsworth J., Somers K., Cazares L. Serum Protein Profiles to Identify Head and Neck Cancer // Clin. Cancer Research. – 2004; 10: 1625–32.
44. Watson N., Durrant L., Madjd Z. et al. Expression of the membrane complement regulatory protein CD59 (protectin) is associated with reduced survival in colorectal cancer patients // Cancer Immunol. Immunother. – 2006; 55 (8): 973–80.
45. Zhang L., Farrell J., Zhou H. et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer // Gastroenterology. – 2010; 138 (3): 949–57. e1-7.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.61-089.843-089.168.1-06-092:[612.017.1:577.21]-078.33

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ДОНОР-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В РАННЕМ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

М.Ш. Хубутия, член-корреспондент РАМН, профессор, **Н.В. Боровкова**, доктор медицинских наук, **Н.В. Доронина**, **Н.В. Шмарина**, кандидат медицинских наук, **Р.В. Сторожев**, **Л.В. Чудакова**

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения Москвы

E-mail: Borovkovanv@yandex.ru

Для оценки выявляемости и прогностической значимости донор-специфических антител к HLA изучены образцы сыворотки крови 66 реципиентов. Донор-специфические антитела (DSA) выявлены в сыворотке 15 (22,7%) пациентов. Для оценки влияния DSA на течение раннего посттрансплантационного периода проанализированы результаты лечения 38 реципиентов почки. Выявлено, что образование антител к HLA донора сопровождалось развитием реакции отторжения у 5 реципиентов из 8, что в 2 случаях привело к утрате трансплантата. Из 30 реципиентов, у которых образования DSA не выявлено, реакция отторжения трансплантата диагностирована в 4 случаях. У 3 больных отмечен криз острого клеточного отторжения. Таким образом, образование de novo DSA к HLA является прогностически неблагоприятным фактором в плане развития реакции отторжения и гибели трансплантата.

Ключевые слова. *HLA-антитела, донор-специфические антитела (DSA), криз отторжения, трансплантация органов*

DETERMINATION OF DONOR SPECIFIC HLA ANTIBODIES IN THE EARLY POST-TRANSPLANT PERIOD

M.Sh. Khubutia, N.V. Borovkova, N.V. Doronina, N.V. Shmarina, R.V. Storozhev, L.V. Chudakova

N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow, Russian Federation

To assess the detection and prognostic significance of donor-specific HLA antibodies serum samples from 66 recipients were examined. Donor-specific antibodies (DSA) have been identified in the sera of 15 patients (22,7%). To assess the effect on DSA during the early post-transplant period, the results of treatment of 38 renal transplant recipients have been analyzed. that donor-specific HLA antibodies were found to be accompanied by the development of rejection in 5 out of 8 recipients, that in two cases led to the loss of the graft. Among the 30 patients in whom no DSA were found, the graft rejection was diagnosed in 4 cases. The acute cellular rejection was recorded in three patients. Thus, de novo generation of donor-specific HLA antibodies is a poor prognostic factor in terms of rejection and graft loss.

Key words: *HLA-antibodies, donor-specific antibodies (DSA), rejection crises, organ transplantation*

ВВЕДЕНИЕ

Одной из главных причин потери трансплантата является реакция отторжения донорского органа. Она происходит в разные сроки после операции и обусловлена реакцией на антигены главного комплекса гистосовместимости клеток пересаженного органа, против которых вырабатываются антитела [1, 7]. Различают сверхострую, острую и хроническую реакции отторжения. Сверхострая реакция отторжения (HAR-реакция) протекает бурно с первых минут или часов после пересадки органа. Острая реакция отторжения (ACR-реакция; AHR-реакция) чаще развивается со 2-х по 90-е сутки после операции. Хроническая реакция отторжения (CAR-реакция) диагностируется через несколько недель, месяцев и лет после операции, может несколько раз рецидивировать после подавления ее иммуносупрессивной терапией [5, 6]. Реакция отторжения трансплантата обусловлена клеточными и(или) гуморальными иммунными механизмами. В ответ на чужеродные человеческие лейкоцитарные антигены (HLA) в организме реципиента вырабатываются донор-специфические антитела (DSA).

В настоящее время DSA определяют разными способами. В основе серологического метода лежит комплементзависимый лимфоцитотоксический тест – cross-match (кросс-матч) реакция. Выявление у реципиента антител к HLA донора (кросс-матч-реакция) является обязательной процедурой перед трансплантацией органа [8].

В последние годы широкое распространение получили методы мультиплексного анализа с детекцией результатов на платформе Luminex (x-MAP технология). X-MAP-технология основана на использовании панели микросфер, имеющих различные спектральные характеристики. Это позволяет с максимальной точностью выявить антитела к известным кросс-реактивным группам антигенов I и II классов системы HLA (в отличие от лимфоцитотоксического теста), что помогает определиться с тактикой лечения.

Большой интерес представляет определение DSA в посттрансплантационном периоде, так как образованные *de novo* DSA являются решающим фактором развития отторжения трансплантата [2–4]. Вновь образующиеся антитела против антигенов трансплантата не вызывают немедленного прекращения его деятельности (в отличие от предсуществующих антител), тем не менее эти посттрансплантационные антитела в итоге могут стать причиной хронического отторжения трансплантата. Они могут образовываться как через 3–21 сут, так и через несколько лет после пересадки органа, даже при отрицательной перекрестной пробе cross-match на момент трансплантации. DSA в посттрансплантационном периоде можно определять как классическим серологическим методом (лимфоцитотоксический тест), так и с помощью x-MAP-технологии, позволяющей проводить детекцию IgG-антител к I и II классу HLA.

Цель настоящей работы – оценить выявляемость и прогностическое значение DSA к HLA в раннем посттрансплантационном периоде.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С целью определения наличия DSA к HLA исследованы образцы сыворотки крови у 66 реципиентов (38 мужчин и 28 женщин в возрасте от 26 до 53 лет), которым в период с июня 2011 г. по июль 2012 г. в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского выполнена трансплантация органа. Из числа обследованных 38 были реципиенты почки, 6 – поджелудочной железы и почки, 12 – печени, 5 – легких и 5 – сердца. DSA определяли в сыворотке крови реципиентов с 5-х по 28-е сутки посттрансплантационного периода. У ряда пациентов оценку DSA проводили также в более поздние сроки.

В качестве диагностикума для определения DSA служили лимфоциты, выделенные из селезенки органного донора. Вместе с трансплантируемыми органами у донора брали фрагмент селезенки. Небольшие фрагменты селезенки гомогенизировали, получали суспензию лимфоцитов, затем (после добавления криопротекторов) клетки селезенки помещали на хранение в жидкий азот при температуре -196°С. Это позволило сохранить жизнеспособность лимфоцитов длительное время (1 год и более) и контролировать наличие DSA у реципиента после аллотрансплантации.

Определение DSA проводили с помощью набора LIFECODES Donor Specific Antibody (DSA) производства Gen-Probe (США). Набор содержит смесь Luminex-частиц; одни из них в смеси конъюгированы с моноклональными АТ к I классу HLA, другие – ко II классу HLA. При смешивании с лизатом клеток донора эти 2 категории частиц связываются с растворенными донорскими молекулами HLA. Принцип метода состоит в реакции антиген – антитело. Если образец пациента положительный, то комплекс микросферы – лизат – HLA АТ даст положительную реакцию; если образец пациента отрицательный, этот комплекс даст фоновый сигнал. Чтобы исключить ошибку подготовительной стадии (связывания лизата с микросферами), в систему вводят специальный контроль. Этот реагент вносят в дополнительную лунку планшета вместо образца. Наряду с исследуемыми образцами и контролем в тесте предусмотрены лунки под положительную и отрицательную контрольные сыворотки (соответственно ПК и ОК), содержащие и не содержащие антитела к HLA-антигенам I и II классов. Таким образом, в наборе предусмотрены контроль частиц и контрольные сыворотки, обеспечивающие точность определения антител к антигенам донора.

DSA определяли также серологическим методом с помощью лимфоцитотоксического теста (кроссматч-реакция). Для этого к сыворотке крови реципиента добавляли лимфоциты селезенки доноров. Лимфоцитотоксический тест (ЛЦТ) проводили в плашках Терасаки. В плашку с сывороткой реципиента добавляли 1 мкл суспензии лимфоцитов доноров. После 30-минутной инкубации в лунку вносили 5 мкл кроличьего комплемента и инкубировали еще 60 мин. Затем окрашивали лимфоциты эозином и фиксировали клетки 20% формалином. Через 30 мин подсчитывали относительное число погибших лимфоцитов (табл. 1) [8].

Скрининг антител к 1 и 2 классам HLA (донор-неспецифические антитела) проводили на платформе Luminex с помощью наборов LABScreen ONE LAMBDA (США) и LIFECODES Lifescreen Gen-Probe (США). Тестируемые сыворотки инкубировали с микросферами, покрытыми очищенными HLA-антигенами. HLA-антитела, присутствующие в тестируемых сыворотках, связывались с антигенами на поверхности микросфер. Не связавшиеся компоненты удаляли путем 3-кратной промывки буфером. Реактивность каждой сыворотки оценивали по флюоресцентному сигналу от каждой микросфе-

Таблица 1

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЦТ*

Количество погибших клеток, %	Баллы	Результат
0–10	1	Отрицательный
11–20	2	Сомнительный
21–50	4	Слабоположительный
51–80	6	Положительный
81–100	8	Резко положительный

*A. Zachary, G. Teresi (eds.). ASHI Laboratory Manual (2nd ed.). Lenexa, KS: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1990.

ры после коррекции неспецифического связывания по микросфере с негативным контролем. В норме интенсивность флюоресценции MFI не превышала 500 ед.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В раннем посттрансплантационном периоде (с 5-х по 20-е сутки) DSA выявлены в сыворотках крови 15 (22,7%) пациентов из 66 обследованных. У 5 пациентов DSA были обнаружены уже в момент трансплантации, при отрицательной кросс-матч-реакции. Выявляемость DSA у пациентов при трансплантации органов представлена в табл. 2.

Таким образом, гуморальный иммунный ответ с выработкой специфических антител к лейкоцитарным антигенам донора у 22,7% реципиентов развивается уже в раннем посттрансплантационном периоде. Обращает на себя внимание также тот факт, что в ряде случаев у реципиентов имеются предсуществующие DSA к HLA, которые не детектируются общепринятым серологическим методом. Поэтому было решено проанализировать эффективность выявления DSA в посттрансплантационном периоде в ЛЦТ и с помощью набора LIFECODES Donor Specific Antibody (DSA) на платформе Luminex.

В табл. 3 представлены результаты определения антител у реципиентов с использованием диагностикумов. С помощью метода на платформе Luminex DSA выявлены у 5 реципиентов, течение посттрансплантационного периода у которых осложнилось развитием реакции отторжения. Серологическим методом антитела выявлены только у 1 реципиента. Таким образом, для определения DSA в посттрансплантационном периоде мы рекомендуем использовать методы, основанные на использовании x-MAP технологии.

Таблица 2

НАЛИЧИЕ DSA ПРИ ПЕРЕСАДКЕ ОРГАНОВ И В РАННЕМ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Реципиенты органов	Число обследованных	Выявлены DSA	
		в момент трансплантации	в раннем посттрансплантационном периоде
Почки	38	2	7
Поджелудочной железы	6	0	1
Сердца	5	1	2
Легких	5	1	2
Печени	12	1	3
ВСЕГО	66	5 (7,5%)	15 (22,7%)

Таблица 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ DSA У РЕЦИПИЕНТОВ ОРГАНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИАГНОСТИКУМОВ

Метод исследования	Число образцов клеток	Отсутствие донор-специфических антител	Наличие донор-специфических антител
Серологический (ЛЦТ)	18	17	1
Метод по технологии x-MAP на платформе Luminex		13	5

Таблица 4

ОСОБЕННОСТИ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ПЕРИОДА У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ С ВЫЯВЛЕННЫМИ DSA

Параметр	Реципиенты	
	с DSA (n=8)	без DSA (n=30)
Отсроченная функция трансплантата	4 (50)	5 (16,6)
Реакция отторжения	5 (62,5)	4 (13,3)
Утрата трансплантата	2 (25)	1 (3)

Примечание. В скобках – %.

С целью выявления влияния DSA на течение раннего посттрансплантационного периода проанализированы результаты лечения 38 реципиентов почки. Оценивали: длительность восстановления функции трансплантата, наличие дисфункции трансплантата, развитие реакции отторжения.

Результаты проведенного анализа представлены в табл. 4, из которой видно, что у 4 пациентов из 8 с выявленными DSA отмечалась отсроченная функция почечного трансплантата. Образование *de novo* антител к лейкоцитарным антигенам донора в раннем посттрансплантационном периоде сопровождалось развитием реакции отторжения у 5 реципиентов из 8, что в 2 случаях привело к утрате трансплантата. Среди реципиентов, у которых образования DSA в раннем посттрансплантационном периоде не выявлено, реакция отторжения трансплантата диагностирована у 4. У 3 пациентов отмечен криз острого клеточного отторжения. У 1 реципиента на 2-е сутки отмечена гибель трансплантата, обусловленная острым гуморальным отторжением. Ни в момент

трансплантации, ни в период потери трансплантата (2-е сутки послеоперационного периода) антитела к лейкоцитарным антигенам донора в сыворотке крови реципиента не определялись. Можно предположить, что реакция отторжения у него вызвана не HLA-антителами или что DSA в достаточном для их детекции количестве могли образоваться в более позднем периоде.

Таким образом, образование *de novo* DSA к HLA является прогностически неблагоприятным фактором в плане развития реакции отторжения и гибели трансплантата.

Чтобы проанализировать выявляемость DSA и донор-неспецифических антител к HLA после пересадки органов и оценить их прогностическое значение, обследованы сыворотки у 34 пациентов в разные сроки посттрансплантационного периода. У 22 пациентов антител к HLA не выявлено, посттрансплантационный период протекал без особенностей.

У 4 пациентов (2 реципиента сердца и 2 – печени) скрининг не выявил антитела к HLA, но обнаружены DSA. Криз отторжения, подтвержденный морфологически, диагностирован у 2 реципиентов сердца. При этом в 1 случае реакция отторжения трансплантата подтверждена при биопсии и после коррекции иммуносупрессивной терапии купирована. Другой пациент погиб; на аутопсии отмечены признаки реакции отторжения. У 1 реципиента печени в посттрансплантационном периоде выявлены клинические признаки реакции отторжения трансплантата, что потребовало назначения пульс-терапии; при повторном исследовании после проведенного лечения DSA не выявлены. Еще у 1 реципиента печени, несмотря на наличие DSA к HLA, посттрансплантационный период протекал без особенностей, клинических или морфологических признаков отторжения не зарегистрировано.

Выраженное содержание донор-неспецифических антител к HLA (интенсивность флюоресценции – MFI – от 4000 до 24 919) и отсутствие DSA зарегистрированы в посттрансплантационном периоде у 4 пациентов (1 реципиент сердца и 3 – почки). У реципиента сердца течение посттрансплантационного периода осложнилось развитием тяжелой вирусной инфекции, ставшей причиной смерти больного. У реципиентов почки клинических или гистологических признаков отторжения не диагностировано, однако отмечались отсроченная функция трансплантата и медленное восстановление уровня сывороточных мочевины и креатинина.

Одновременно DSA и донор-неспецифические антитела к HLA выявлены у 4 реципиентов почки, из которых у 3 диагностирован криз отторжения.

Таким образом, выработка донор-неспецифических антител к HLA в посттрансплантационном периоде не только отражается на течении посттрансплантационного периода, но не увеличивает риск развития реакции отторжения трансплантата. В то же время образование *de novo* антител к лейкоцитарным антигенам донора в 62% случаев сопровождало острое гуморальное отторжение, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [2, 3]. Отметим, что при трансплантации печени наличие DSA в момент пересадки и образование антител в посттрансплантационном периоде не оказывали существенного влияния на частоту отторжения трансплантата.

ВЫВОДЫ:

1. В посттрансплантационном периоде на фоне иммуносупрессивной терапии у 22,7% реципиентов образуются DSA к HLA.

2. Вновь образованные DSA к HLA влияют на течение посттрансплантационного периода, являются предвестником реакции отторжения трансплантата.

3. С целью прогнозирования и ранней диагностики криза отторжения в посттрансплантационном периоде рекомендуется осуществлять мониторинг DSA к HLA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cornell L., Smith R., Colvin R. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance // AnnuRev Pathol. – 2008; 3: 189–220.
2. Zeevi A., Spichty K., Joseph P. et al. Increased risk for bronchiolitis obliterans in lung transplant recipients who develop post transplant donor specific HLA antibodies // Tissue antigens. – 2011; 77 (5): 386.
3. Bardi R., Boujemaa S., Kallala Ch. et al. Monitoring of donor specific anti-HLA antibodies (DSA) in kidney transplantation patients // Tissue antigens. – 2012; 79 (6): 497.
4. Nils Lachmann, Paul I. Terasaki, Constanze Schönemann. Donor-Specific HLA Antibodies in Chronic Renal Allograft Rejection: A Prospective Trial with a Four-Year Follow-Up // Clin. Transplants. – 2006; 13: 171–99.
5. Solez K., Colvin R., Racusen L. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (`CAN') // Am. J. Transplant. – 2007; 7 (3): 518–26.
6. Solez K., Colvin R., Racusen L. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions // Am. J. Transplant. – 2008; 8 (4): 753–60.
7. Tomasoni S., Remuzzi G., Benigni A. Allograft rejection: acute and chronic studies // Contrib Nephrol. – 2008; 159: 122–34.
8. Zachary A. ASHI Laboratory Manual // American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. – 2 nd. – NY – 1990; 307–20.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 615.849.2.03:616.7-092.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРИГОДНОСТИ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ^{188}RE-ЗОЛЕДРОНОВАЯ КИСЛОТА

Л.В. Волознев[1], **О.Е. Клементьева**[2], кандидат биологических наук,
В.Н. Корсунский[2], доктор медицинских наук, профессор,
Н.П. Лысенко[1], доктор биологических наук, профессор

[1]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,
[2]Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России

E-mail: adrenoblocator@gmail.com

Представлены результаты распределения радиофармацевтического препарата (РФП) ^{188}Re-золедроновая кислота в организме крыс с моделью костной патологии при внутривенном введении. Распределение РФП ^{188}Re-золедроновая кислота характеризуется интенсивным накоплением в скелете (до 31,8% от введенной активности) и высокой скоростью выведения из организма в целом (до 60,4% через 3 ч после введения препарата). При этом накопление препарата в создаваемой у животных области костной патологии в среднем в 3,0 раза выше, чем в здоровой костной ткани, а эффективный период полувыведения равен 7,86 ч. Полученные результаты дают основание говорить о перспективности применения РФП ^{188}Re-золедроновая кислота для терапии патологии, сопровождающейся ремоделированием костной ткани, в том числе метастатических поражений скелета.

Ключевые слова: *радиофармацевтический препарат, золедроновая кислота, рений-188, скелет, терапия*

EXPERIMENTAL EVALUATION OF FUNCTIONALITY OF RADIOPHARMACEUTICAL ^{188}RE-ZOLEDRONIC ACID

L.V. Voloznev[1], O.E. Klementyeva[2], V.N. Korsunsky[2], N.P. Lysenko[1]
[1]Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation
[2]A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russian Federation

The results of biodistribution of intravenously administrated ^{188}Re-zoledronic acid in rats' body on the model of bone lesions (callus) are presented. Experiments showed that the complex of ^{188}Re-zoledronic acid has the bone-seeking distribution (up to 31,8% ID/skeleton) and high rate of excretion (after 3 hours 60,4% ID is excreted). In this case, the rate of accumulation of the drug in the created field of bone pathology in the animal is 3,0 times more if compared with the rate of its accumulation in the healthy bone, and the effective half-life (Teff.) is equal to 7,86 h. The results give the reason to talk about the prospects of ^{188}Re-zoledronic acid for treatment of bone disease, accompanied by remodeling of the bone tissue, including skeletal metastases.

Key words: *radiopharmaceutical, zoledronic acid, rhenium-188, a skeleton, therapy*

ВВЕДЕНИЕ

Одним из серьезных осложнений онкологических заболеваний различной локализации, несмотря на современную противоопухолевую терапию, является развитие костных метастазов. Метастатическое поражение скелета сопровождается ремоделированием пораженных участков кости вследствие стимуляции опухолевыми клетками костного обмена [7, 9]. При этом основным клиническим проявлением поражения костей является болевой синдром, нарастающий по мере прогрессирования процесса, резко снижающий качество жизни, способствующий развитию тревоги, депрессии и приводящий к стойкой инвалидизации [2, 4, 5].

Наиболее перспективный метод паллиативной терапии при метастатическом поражении скелета – радионуклидная терапия. При ее применении возможно формирование высоких поглощенных доз непосредственно в патологических очагах, при этом облучение здоровых органов и тканей минимальное. Радионуклидная терапия позволяет получить выраженный паллиативный эффект при метастазах рака молочной железы, предстательной железы, легких и др. [1, 8]. Преимуществом радионуклидной терапии является также то, что активность накапливается во всех метастазах одновременно. Это свойство позволяет применять радиофармацевтические препараты (РФП) для успешного ле-

чения диссеминированных метастазов (в том числе бессимптомных) [3, 6]. Поэтому основной задачей радиофармацевтики является разработка новых и совершенствование существующих препаратов для таргетной доставки радионуклида к патологическому очагу.

Бисфосфонаты, в том числе золедроновая кислота, как таргетные носители для эмиттеров обладают оптимальными характеристиками для выполнения данных задач, характеризуясь высокоселективной тропностью к костной ткани. Радионуклид ^{188}Re по ядерно-физическим характеристикам соответствует требованиям, предъявляемым к радионуклиду терапевтического назначения: высокая энергия β^--излучения (E_{max}=2,120 МэВ) и короткий период полураспада ($t_{1/2}$=17,0 ч). Способность ^{188}Re связываться с бисфосфонатами позволяет образованным комплексным соединениям избирательно накапливаться в патологически измененных участках кости, сопровождающихся ее ремоделированием, при меньшем накоплении в интактной костной ткани и окружающих мягких тканях. Кроме того, ^{188}Re является как β-, так и γ-излучателем, благодаря чему меченные ^{188}Re бисфосфонаты можно применять как для терапии опухолевых заболеваний костной ткани, так и для визуализации распределения препарата *in vivo* [6].

Целью данной работы являлось изучение распределения РФП ^{188}Re-золедроновая кислота в организме крыс с моделью костной патологии (ремоделирования кости) для оценки возможности использования в клинической практике для терапии метастатических поражений скелета.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучение функциональной пригодности препарата ^{188}Re-золедроновая кислота основывалось на определении динамики распределения РФП в органах и тканях крыс. В эксперименте было использовано 15 крыс с моделью костной патологии, массой 180–230 г.

На каждую временную точку использовали 3 животных. Всем животным препарат ^{188}Re-золедроновая кислота вводили в хвостовую вену (А=1,2 мКи/кг, золедроновая кислота – 0,3 мг/кг). Через 1, 3, 5, 24 и 48 ч проводили эвтаназию декапитацией, после чего в органах и тканях определяли содержание РФП методом прямой радиометрии с помощью автоматического гамма-счетчика «Wizard» версии 2480 фирмы PerkinElmer/Wallac (Финляндия). Полученные результаты рассчитывали в % от введенного количества на орган и на 1 г ткани.

Коэффициент дифференциального накопления (КДН) определяли на основании данных прямой радиометрии и рассчитывали как частное от деления величин концентраций ^{188}Re-золедроновая кислота в исследуемых органах (большеберцовая кость с переломом/интактная кость, большеберцовая кость с переломом/мышечная ткань, большеберцовая кость с переломом/кровь).

Данные о периодах эффективного полувыведения определялись на основании экспоненциальной математической модели динамики распределения препарата ^{188}Re-золедроновая кислота в органах и тканях и рассчитывались в программе OLINDA 1.0 согласно:

$$\text{Тэф} = \frac{T_{физ} \times T_{биол}}{T_{физ} + T_{биол}},$$

где $T_{физ}$ – период полураспада ^{188}Re, $T_{биол}$ – период биологического полувыведения препарата ^{188}Re-золедроновая кислота.

Костная патология имитировалась переломом большеберцовой кости. Манипуляции с животными проводили под хлоралгидратным наркозом. Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения раствора хлоралгидрата в физиологическом растворе из расчета 400 мг на 1 кг массы тела. В течение последующих 14 дней после создания закрытого перелома формировалась костная мозоль, которая и служила моделью костной патологии.

Все полученные данные обработаны методами математической статистики с применением пакетов прикладных программ «OriginLab Pro 7.5» и «Microsoft Excel». Для каждого исследуемого признака определяли среднюю арифметическую величину (M) и стандартную ошибку средней (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как показали результаты изучения распределения препарата в организме крыс с моделью костной патологии, он обладает ярко выраженной остеотропностью и высокой скоростью выведения (табл. 1). Уже через 1 ч после введения РФП в скелете накапливается 25,7% от введенной активности. На протяжении последующих 4 ч содержание препарата в костной ткани остается достаточно высоким, составляя 29,5%, и к 5-му часу становится максимальным – 31,8%. Через 24 ч содержание препарата в костной ткани начинает незначительно снижаться и к 24 ч составляет 22,7%.

Препарат быстро выводится из крови. Через 1 ч после введения его концентрация не превышает 0,5%/мл, через 5 ч – 0,1%/мл, через 24 ч после введения эта величина может считаться следовой.

Выведение препарата происходит через мочевыделительную систему и отличается высокой скоростью. Через 1 ч после внутривенного введения в среднем 38,7% препарата выводится из организма с мочой, к 3-му часу выводится 51,4% от введенной активности. В целом за 3 ч из организма экскретируется до 60,4% от введенной активности.

Таблица 1

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА ^{188}RE-ЗОЛЕДРОНОВАЯ КИСЛОТА В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КРЫС-САМОК С МОДЕЛЬЮ КОСТНОЙ ПАТОЛОГИИ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ (% ОТ ВВЕДЕННОЙ ДОЗЫ НА 1 г ТКАНИ; M±m)

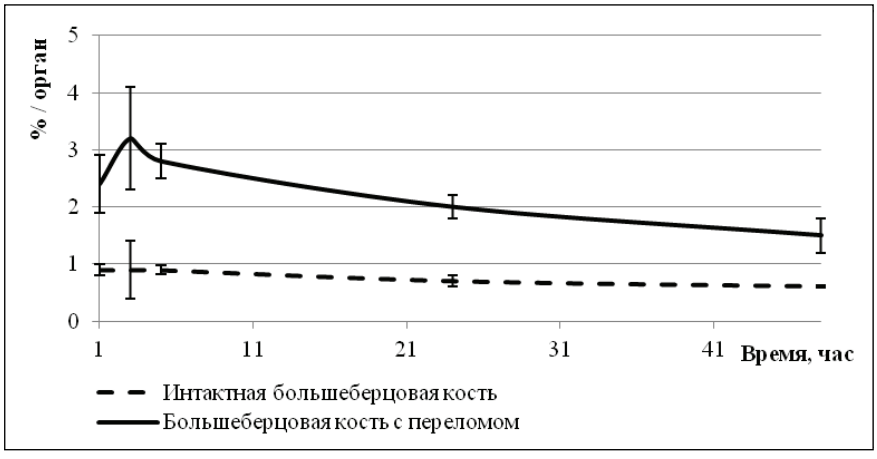
Органы/ткани	1 ч	3 ч	5 ч	24 ч	48 ч
Кровь, 1 мл	0,5±0,03	0,2±0,05	0,1±0,02	**	**
Желудок	0,3±0,07	0,4±0,04	0,4±0,04	0,03±0,01	**
Печень	0,2±0,02	0,1±0,05	0,09±0,01	0,02±0,01	**
Почки	2,4±0,7	2,3±0,8	2,4±0,2	1,0±0,02	0,7±0,02
Мочевой пузырь (наполненный)	38,7±3,4*	51,4±5,8*	–	–	–
Мышца	0,06±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	**	**
Скелет	25,7±2,43*	29,5±2,7*	31,8±5,4*	22,7±1,4*	20,1±0,81*
Выведение из организма в целом	57,0	60,4	59,0	74,1	77,7

* – % от введенной активности на орган, ** – фоновое значение.

Накопление препарата в области костной патологии в среднем в 3 раза выше, чем в здоровой костной ткани (см. рисунок).

Полученные значения КДН подтверждают выраженную остеотропность препарата с гиперфиксацией в области ремоделирования кости. Значения коэффициентов дифференциального накопления (КДН) интактная кость/костная патология в пределах 2,5–3,6 свидетельствуют о специфическом накоплении РФП ^{188}Re-золедроновая кислота в очагах ремоделирования кости и дают основание предполагать возможность достижения высокой терапевтической дозы β-излучения в патологическом очаге (табл. 2).

Эффективный период полувыведения из организма в целом ($T_{эф}$) составляет 7,86 ч. При определении $T_{эф}$ для интактной кости и кости с переломом получены сравнимые значения: соответственно 13,87 и 13,40 ч. Однако следует принимать во внимание, что при сравнимом периоде эффективного полувыведения уровень накопления препарата в костной мозоли в 2,5–3,6 раза больше, чем в интактной костной ткани. Поэтому ожидается, что подведенная доза β-излучения в области костной патологии будет в несколько раз больше, чем в интактной костной ткани, при равной скорости выведения, что также позволит снизить излишнюю миелотоксичность.



Динамика накопления (% от введеной активности на кость) ^{188}Re-золедроновая кислота в очаге ремоделирования кости и в интактной области

Таблица 2

ЗНАЧЕНИЯ КДН ПРЕПАРАТА ^{188}RE-ЗОЛЕДРОНОВАЯ КИСЛОТА У ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ КОСТНОЙ ПАТОЛОГИИ

КДН	1 ч	3 ч	5 ч	24 ч	48 ч
Кость с переломом / кровь	4,0	11,5	18,0	*	*
Кость с переломом / мышечная ткань	33,3	115,0	60,0	*	*
Кость с переломом / интактная кость	2,7	3,6	3,1	2,9	2,5

* – Не определено, так как значение в знаменателе равно фоновому.

ВЫВОДЫ

Экспериментальные данные по изучению РФП ^{188}Re-золедроновая кислота показали остеотропное распределение препарата, специфическое его накопление в области ремоделирования кости и высокую скорость выведения из организма. Величина накопления в очаге ремоделирования кости дает основание предполагать туморотропность в очагах метастатического поражения скелета. Динамика накопления в области костной патологии предполагает достижение терапевтической дозы β-излучения в патологическом очаге.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения препарата ^{188}Re-золедроновая кислота в клинической практике для терапии костной патологии, сопровождающейся ремоделированием костной ткани, в том числе при метастатическом поражении скелета.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность в неоценимой помощи при проведении работ сотрудникам Отдела радиационных технологий медицинского назначения ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России к.х.н. Кодиной Г.Е., Малышевой А.О.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гулидов И.А., Краснов Е.В., Лукьянова Е.В. и др. Паллиативная лучевая терапия костных метастазов рака молочной железы // Мед. физика. – 2010; 3: 5–10.
2. Иванов В.Г., Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. и др. Бифосфонаты в клинической онкологии: использование у больных солидными опухолями // Фарматека – 2007; 18 (152): 23–8.
3. Петриев В.М., Афанасьева Е.Л., Скворцов В.Г. Остеотропные радиофармпрепараты на основе фосфоновых кислот для лечения костных метастазов человека (обзор) // Хим.-фарм. журн. – 2008; 5 (42): 82–90.
4. Рыжков А.Д. Современная тактика системной радиотерапии хлоридом стронция-89 в комплексном лечении больных с метастатическим поражением костей. Дис. … докт. медицинских наук. – М., 2008. – 245 с.
5. Цыб А.Ф., Крылов В.В., Дроздовский Б.Я. и др. Радионуклидная терапия самарием-оксабифором, Sm-153 при раке молочной и предстательной железы с метастазами в кости // Сиб. онкол. журн. – 2006; 3: 8–17.
6. Liepe K., Kotzerke J. A comparative study of 188Re–HEDR, 186Re–HEDR, 153Sm–EDTMP and 89Sr in the treatment of painful skeletal metastases // Nucl. Med. Communication. – 2007; 18 (28): 623–30.
7. Roodman David G. Mechanisms of Bone Metastasis // The New Engl. J. of Med. – 2004; 350: 1655–64.
8. Russell R. et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy // Osteoporos Int – 2008; 19: 733–59.
9. Wolf K., Mazo I., Leung H. et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis // J. Cell. Biol. – 2003; 160: 267–77.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.831-005.1/.4-037-092:[612.6.05:577.21

ПОЛИМОРФИЗМ Val66Met *BDNF* У БОЛЬНЫХ С ВЫСОКИМ РИСКОМ ЛЕТАЛЬНОСТИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ИНСУЛЬТА И ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

В.М. Шкловский[1, 2], академик РАО, доктор психологических наук, профессор, **В.Б. Вильянов**[1], доктор медицинских наук, профессор, **Ю.А. Фукалов**[2], **А.Ю. Ременник**[2], кандидат медицинских наук, **Л.А. Скипетрова**[2], **Г.Н. Кобозев**[1], кандидат медицинских наук, **И.Ю. Орлов**[2], **А.Г. Петрушевский**[2], **А.В. Кудряшов**[2], **М.Е. Кокорева**[2]

[1]Московский НИИ психиатрии МЗ РФ,

[2]Центр патологии речи и нейрореабилитации, Москва

E-mail: vilianov1@mail.ru

Исследован полиморфизм Val66Met гена BDNF у больных с высоким риском летальности в результате инсульта или тяжелой черепно-мозговой травмы. Частота генотипа ValVal превышала аналогичный показатель в контрольной группе в общей выборке испытуемых (75,5 и 63,6%; χ^2=4,63; df=1; p=0,03). Частота аллеля Val у пациентов с последствиями тяжелой черепно-мозговой травмы составляла 90,0%, у перенесших геморрагический инсульт – 87,1%, ишемический – 85,4%; при объединении 2 последних групп больных различия по сравнению с контролем были близки к значимым (χ^2=3,67; df=1; p=0,055). В этой объединенной группе обнаружены различия частоты встречаемости генотипов по сравнению с контрольной группой (χ^2=3,88; df=1; p=0,049). При генотипе Met$^-$ средний размер очага поражения головного мозга в результате ишемического инсульта составлял 79,01 см^3, при Met$^+$ – 108,85 (p=0,13). Возможно, аллель Val полиморфизма Val66Met BDNF является фактором выживаемости больных при ишемическом и геморрагическом инсультах и тяжелой черепно-мозговой травме.

Ключевые слова: *инсульт, черепно-мозговая травма, гены, мозговой нейротрофический фактор*

Val66Met BDNF POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH A HIGH RISK OF MORTALITY DUE TO STROKE AND SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY

V.M. Shklovsky[1, 2], V.B. Vilyanov[1], Yu.A. Fukalov[2], A.Yu. Remennik[2], L.A. Skipetrova[2], G.N. Kobozev[1, 2], I.Yu. Orlov[2], A.G. Petruschevsky[2], A.V. Kudryashov[2], M.E. Kokoreva[2]

[1]Research Institute of Psychiatry, Moscow, Russian Federation;

[2]Speech Pathology and Neurorehabilitation Center, Moscow, Russian Federation

We have studied BDNF gene Val66Met polymorphism in patients with a high risk of mortality due to stroke or severe head injury. Genotype ValVal rate was higher than that of in the control group in the total sample of subjects (75,5% and 63,6%; χ^2=4,63; df=1; p=0,03). In patients with consequences of severe head injury Val allele frequency was 90,0%, in patients with hemorrhagic stroke – 87,1%, in cases with ischemic stroke – 85,4%, in the united group of stroke patients, compared with controls, the differences were close to be significant (χ^2=3,67; df=1; p=0,055). In this united group detected differences in frequency of genotypes were similar to controls (χ^2=3,88; df=1; p=0,049). In genotype Met$^-$ cases the average size of the lesion of the brain as a result of ischemic stroke was 79,01cm^3, Met$^+$ – 108,85 (p=0,13). Val allele of Val66met BDNF polymorphism may be a factor of survival in patients with ischemic and hemorrhagic stroke and severe traumatic brain injury.

Key words: *stroke, traumatic brain injury, genes, brain-derived neurotrophic factor*

Мозговой нейротрофический фактор (brain – derived neurotrophic factor – BDNF), один из наиболее изучаемых нейротрофинов, участвующий в регуляции выживаемости, дифференцировке и поддержании функций нейронов, а также вовлеченный в возникновение долговременной потенциации, лежащей в основе клеточных механизмов памяти и обучения [10]. BDNF поддерживает рост мотонейронов, сенсорных, ганглионарных, дофаминергических, холинергических и ГАМК-ергических нейронов [7]. Ген BDNF считается геном раннего ответа, т.е. в ответ на стимул происходит быстрая инициация транскрипции этого гена [9]. Увеличение экспрессии гена BDNF регулируется глутаматом (через глутаматные рецепторы), а снижение – в основном через систему ГАМК [16].

В исследованиях по имитации ишемического инсульта на крысах показано защитное влияние BDNF на нейроны через снижение факторов локального воспаления [11, 14]. Отмечено уменьшение размера зоны ишемии мозговой ткани после предварительного введения BDNF в желудочки мозга [13]. Эти данные дают основание полагать, что BDNF противостоит механизму глутаматной эксайтотоксичности. Ген BDNF находится на хромосоме 11q13 и состоит из 5 или более экзонов. Исследования гена выявили полиморфный сайт rs 6265, обусловленный заменой гуанина на аденин, которая приводит к замещению валина (Val) на метионин (Met) в 66-м кодоне и влияет на регуляцию секреции белка BDNF [6]. С аллелем Met связывают более низкий уровень сывороточного BDNF [12], а также снижение объема кратковременной памяти, уменьшение объема гиппокампа и дорсолатеральной префронтальной коры [6, 13]. Соотношение аллелей Val/Met у психически здоровых людей оказалось очень вариабельным. Так, среди жителей Москвы и Подмосковья соотношение аллелей Val/Met составляло 0,78/0,22 [2], в японской популяции – 0,59/0,41, в итальянской – 0,7/0,3, североамериканской – 0,82/0,18 [15].

В этой связи изучение полиморфизма Val66Met BDNF у больных с последствиями ишемического, геморрагического инсультов и тяжелой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) имеет научное и практическое значение. Объединение в одном исследовании 3 указанных категорий больных обусловлено большой распространенностью этих вариантов патологии, а также схожестью патогенетических механизмов развития повреждения ЦНС. Показано, что в зоне травматической пенумбры развиваются ишемические каскады, аналогичные возникающим при ишемическом инсульте, при этом патохимические различия в особенностях развития обоих процессов крайне незначительны [8].

Целью настоящего исследования было изучение аллельного полиморфизма rs 6265 BDNF (Val66Met) у больных с последствиями тяжелой ЧМТ, ишемическим или геморрагическим инсультом. Задачи исследования включали:

1. Определение соотношения генотипов VAlVal, ValMet и MetMet в общей группе исследуемых больных.

2. Сравнительный анализ соотношения указанных параметров в группах больных с последствиями ЧМТ, ишемического или геморрагического инсульта.

3. Изучение влияния гендерного фактора на соотношение генотипов.

4. Исследование связи указанного варианта аллельного полиморфизма с размерами очагов повреждения в результате ишемического инсульта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 163 больных с последствиями инсульта или тяжелой ЧМТ, получавших лечение в Центре патологии речи и нейрореабилитации (табл. 1). Критерием включения в группу исследования было наличие тяжелого ишемического или геморрагического инсульта в бассейне левой средней мозговой артерии с повреждением лобно-височной-теменной зоны коры больших полушарий, сопровождавшегося расстройствами сознания в диапазоне «сопор – кома» и повлекшее госпитализацию в течение первых 24–48 ч с момента заболевания. Уровень утраты дееспособности по модифицированной шкале Рэнкина у больных на момент обследования соответствовал II–III степени. Оценка тяжести ЧМТ, у включенных в исследование пациентов соответствовала общепринятым критериям: травматическое повреждение мозга, обусловливающее нарушение уровня сознания в пределах 3–8 баллов по шкале комы Глазго [3, 16].

У всех испытуемых были констатированы умеренные или тяжелые речевые расстройства (сенсорная и моторная афазия, смешанные формы), а также характерные для последствий органического поражения головного мозга соматоневрологические осложнения.

Материалом для генетического исследования являлась кровь пациентов, взятая из кубитальной вены. Аллельный полиморфизм определяли с помощью полимеразной цепной реакции. Для определения полиморфизма Val66Met гена BDNF были использованы олигонуклетидные

Таблица 1

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ

Группа больных	Мужчины		Женщины		Средний возраст*, годы	Общее количество больных	
	абс.	%	абс.	%		абс.	%
Ишемический инсульт	67	75,3	22	24,7	59,2±1,7	89	54,6
Геморрагический инсульт	38	70,4	16	29,6	46,9±2,2	54	33,1
Последствия ЧМТ	15	75,0	5	25,0	32,2±4,5	20	12,3
Всего	120	73,6	43	26,4	55,1±2,9	163	100,0

* – При начале заболевания.

праймеры: 5'-GAGGCTTGACATCATTGGCT-3' и 5'-CGTGTACAAGTCTGCGTCCT-3', соответственно, выделены аллели Val и Met, генотипы ValVal, ValMet и MetMet. В группе контроля были представлены результаты генотипирования 121 психически здорового испытуемого (48 женщин и 73 мужчины; средний возраст – 29,2 года).

Магнитно-резонансную томографию проводили на томографе MAGNETOM AVANTO 1,5 T (SIEMENS). Объемы очагов поражения паренхимы головного мозга (кистозная трансформация с перифокальным глиозом) вычисляли путем суммации площадей поражения на каждом срезе (в $см^2$) с умножением полученного результата на коэффициент 0,65. Данный коэффициент является суммой толщины среза (5 мм) и межсрезового интервала (gap=1,5 мм). Объем очага поражения определяли только у пациентов с последствиями ишемического инсульта, поскольку у больных с ишемическим инсультом и тяжелой ЧМТ на размеры повреждения мозга зачастую оказывали влияние последующие оперативные вмешательства на головном мозге.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью критерия χ^2 для оценки ассоциированности вариантов генотипа с рассматриваемыми заболеваниями. Достоверность различий средних значений объемов очагов поражения у больных с последствиями ишемического инсульта определяли по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение распределения генотипов Val66Met BDNF в контрольной группе показало, что оно не отличалось от ожидаемого распределения Харди–Вайнберга (χ^2=0,015; p>0,05). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Частота аллелей Val и Met в общей выборке больных значимо различалась с таковой в контрольной группе (χ^2=4,63; df=1; p=0,03).

Не обнаружено статистически значимых различий в частоте аллелей между группами больных с ишемическим и геморрагическим инсультом и при сравнении каждой из них с контролем. В объединенной группе больных с ишемическим и геморрагическим инсультом различия в частоте аллелей по сравнению с контрольными данными были близки к значимым (χ^2=3,67; df=1; p=0,055).

При расчете частоты генотипов с учетом малочисленности больных с генотипом MetMet их объединили с носителями генотипов ValMet, и таким образом, расчет производился в 2 группах Met^- (ValVal) и Met^+ (ValMet + MetMet). Статистически значимые различия частоты генотипов по сравнению с контролем получены только в объединенной группе больных с ишемическим и геморрагическим инсультом (χ^2=3,88; df=1; p=0,049). Достоверность различий частоты аллелей и генотипов в группе больных с последствиями ЧМТ по сравнению с другими группами больных и с контролем ввиду их малочисленности не определяли.

Следует отметить, что все носители гомозиготного генотипа MetMet в основной группе относились к пациентам с последствиями ишемического инсульта. Носителей указанного генотипа было не много и в контрольной группе, но все же больше, чем среди больных. По частоте встречаемости аллеля Val лидировали больные с последствиями ЧМТ, затем – перенесшие геморрагический и ишемический инсульт.

Поскольку в нашей выборке распределение показателей объема очагов поражения у пациентов с ишемическим инсультом не соответствовало критериям нормального распределения, достоверность различия данных показателей в группах с генотипом Met^- и Met^+ определяли по критерию Манна–Уитни. Результаты расчета представлены в табл. 3 и на рис. 1.

Результаты исследования указывают на отчетливую тенденцию к снижению размеров очагов поражения головного мозга у носителей генотипа Met^- (ValVal). При исследовании гендерных различий в характере распределения проявлений ал-

Таблица 2

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА Val66Met *BDNF* В ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

Группа больных	Аллели				Генотипы						Всего генотипов
	Val		Met		ValVal		ValMet		MetMet		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Все больные	282	86,5±1,9	44	13,5±1,9	123	75,5±3,4	36	22,1±3,2	4	2,4±1,2	163
Ишемический инсульт	152	85,4±2,6	26	14,6±2,6	67	75,3±4,6	18	20,2±4,2	4	4,5±2,2	89
Геморрагический инсульт	94	87,1±3,2	14	12,9±3,2	40	74,1±5,9	14	25,9±5,9	0	0	54
ЧМТ	36	90,0	4	10,0	16	80,0	4	20,0	0	0	20
Контроль	193	79,7±2,6	49	20,3±2,6	77	63,6±4,5	39	32,2±4,4	5	4,1±1,5	121

Таблица 3

СРЕДНИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАЗМЕРОВ ОЧАГОВ ПОРАЖЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С ПОСЛЕДСТВИЯМИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ПРИ ВАРИАНТАХ ГЕНОТИПА Met^- И Met^+

Генотип	Средний размер очага поражения, $см^3$	Медиана	Доверительный интервал	p
Met^- (n=67)	79,01	64,0	67,51 – 90,52	0,13
Met^+ (n=22)	108,85	90,5	76,93 – 140,76	

лельного полиморфизма значимых различий не выявлено. У пациентов мужского и женского пола частота встречаемости выделенных аллелей совпадала (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Общая летальность у больных с инсультом составила в 2001 г. 40,37% (36,6% – у мужчин и 43,4% – у женщин), причем значительно преобладала при кровоизлияниях в мозг по сравнению с его инфарктами (соответственно 61,4 и 21,8%) [1]. В настоящее время летальность при тяжелой ЧМТ составляет от 35–40% [16] до 80 % [3]. Следовательно, все включенные в настоящее исследование пациенты с последствиями инсульта и тяжелой ЧМТ относятся к категории лиц, переживших состояние высокого риска летальности (обусловленного среди прочих факторов, и генетической предиспозицией), что позволило объединить их по данному признаку в одну группу.

Тот факт, что у исследуемых нами больных наблюдалась более частая встречаемость аллеля Val, чем в контрольной группе, дает основание полагать, что накопление частоты в этой группе связано с большей летальностью от инсульта и тяжелой ЧМТ носителей аллеля Met. В пользу этого предположения свидетельствуют и меньшие размеры средних показателей объема очага поражения при генотипе ValVal, а также эпидемиологические данные о более высокой летальности при геморрагическом инсульте (в нашей выборке у больных с последствиями данного варианта сосудистой патологии отмечена более высокая встречаемость аллеля Val). Наиболее значимые различия соотношения аллелей Val/Met получены у испытуемых с последствиями перенесенной тяжелой, на грани пределов выживаемости, ЧМТ. Допустимо предположить, что здесь фактор генетической предиспозиции сыграл еще более значимую роль, чем у пациентов с инсультом. Следовательно, выявленное в исследуемых группах соотношение аллелей Val/Met полиморфизма rs 6265 BDNF отражает степень угрозы летальности при данных вариантах повреждения ЦНС. Генотип ValVal в точке полиморфизма rs 6265 гена мозгового нейротрофического фактора обеспечивает лучшую защиту от повреждения в результате ишемии, более эффективно способствует выживаемости нейронов, препятствует развитию глутаматной эксайтотоксичности. Наше исследование согласуется с представлением о том, что ген BDNF является геном раннего ответа на повреждение нейронов.

Полученные данные позволяют по-новому оценить некоторые результаты проведенного ранее исследования аллельного полиморфизма rs 6265 BDNF у больных шизофренией с ранним началом [4, 5], в котором соотношение аллелей Val/Met было соответственно 86,2 и 13,8% (в контроле – 77,5 и 22,5%). Это дало основание расценить генотип ValVal как маркер раннего начала шизофрении. Подчеркнем, что это – данные генотипирования детей, у которых заболевание началось в возрасте до 15 лет (средний возраст начала заболевания 10,5±3,7 года), сюда были включены и пациенты с ранней детской шизофренией, с дебютом процесса в возрасте до 5 лет.

В свете полученных нами данных допустимо предположить, что увеличение частоты аллеля Val при детской шизофрении может быть обусловлено его «накоплением» среди данного контингента за счет увеличения пре- и перинатальной летальности, а также летальности в первые годы жизни детей с аллелем Met и этиологически неясной пока неблагоприятной генетической предиспозицией, которая может проявляться как в форме шизофрении, так и другими вариантами патологии ЦНС. У выживших носителей аллеля Met в последующем заболевание могло быть квалифицировано и как другие формы психической

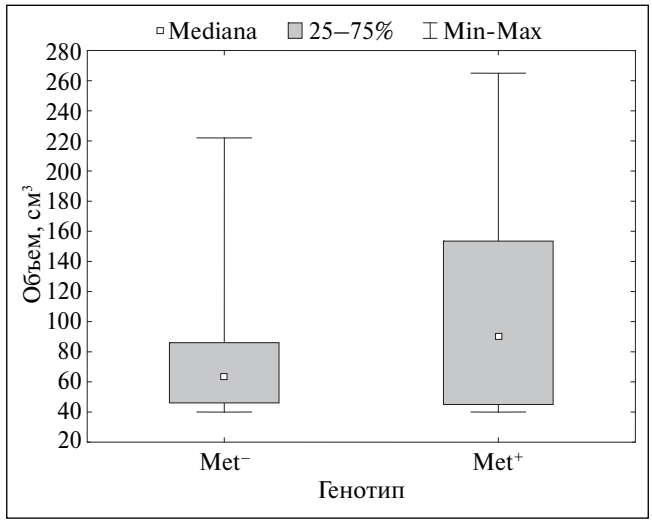


Рис. 1. *Объемы очагов поражения у больных ишемическим инсультом с различными вариантами генотипа*

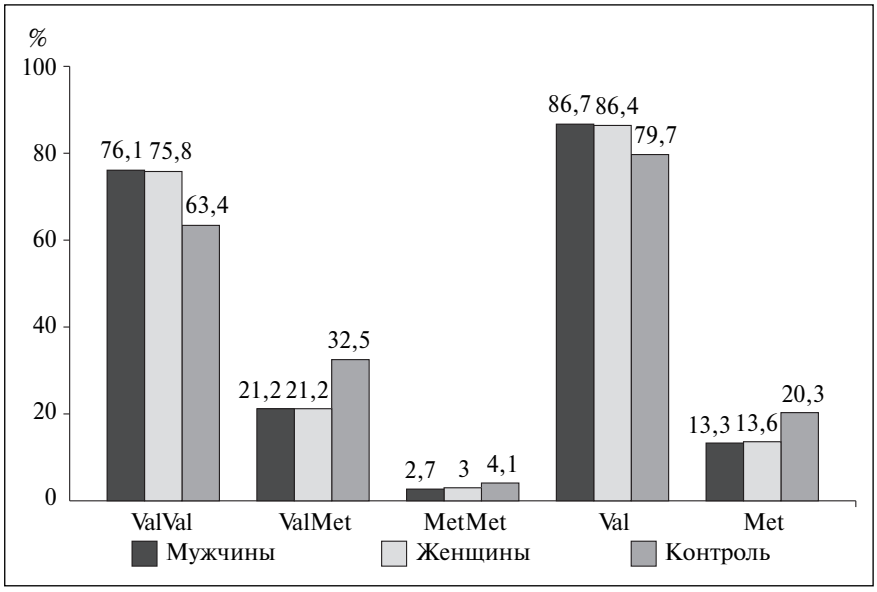


Рис. 2. *Частота встречаемости генотипов и аллелей Val и Met (%) у больных с последствиями ишемического и геморрагического инсульта с учетом гендерного фактора*

патологии, в том числе с более выраженными и ранними проявлениями когнитивного дефицита (например, олигофрения или детский церебральный паралич). В пользу этого предположения свидетельствуют более высокие показатели риска невынашивания беременности и осложнений в родах у этой группы испытуемых [4].

Проведенное исследование позволяет предположить, что аллель Val rs 6265 BDNF является фактором, обеспечивающим выживаемость больных с тяжелым органическим поражением головного мозга, а соотношение числа аллелей Val/Met в популяционном исследовании может служить сравнительным показателем силы влияния фактора летальности от различных заболеваний ЦНС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. Эпидемиология инсульта в России // Журн. неврол. и психиатр. – (приложение «Инсульт») – 2003; 8: 4–9.
2. Голимбет В.Е. Коровайцева Г.И., Абрамова Л.И. и др. Связь полиморфного маркера Val66Met гена нейротрофического фактора головного мозга с шизофренией в русской популяции // Молекул. биол. – 2008; 42 (4): 1–6.
3. Качков И.А. В.Г., Амчеславский В.Г., Филимонов Б.А. Алгоритмы лечения тяжелой черепно-мозговой травмы в остром периоде // Consilium medicum. – 1999; 1 (2).
4. Пахомова С.А., Вильянов В.Б., Голимбет В.Е. Аллельный полиморфизм генов и клинико-анамнестические показатели больных шизофренией детского и подросткового возрастов // Сиб. вестн. психиатрии и наркологии. – 2009; 6: 52–7.
5. Пахомова С.А., Коровайцева Г.И.,. Вильянов В.Б. и др. Молекулярно-генетическое исследование шизофрении с ранним началом // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2010; 110 (2): 66–9.
6. Egan M., Kojima N., Callicott J. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity – dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function // Cell. – 2003; 112: 257–69.
7. Henderson C. Role of neurotrophic factors in neuronal development // Curr. Opin. Neurobiol. – 1996; 6 (1): 64–70.
8. Kendell E., Swartz J., Jessel T. Principles of Neuronal Sciences. Appleton and Lange. – 2000; 1134.
9. Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J. et al. Neurotrophins and brain insults // Trends Neurosci. – 1994; 17 (11): 490–6.
10. Lomo T. The discovery of long-term potentiation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2003; 358 (1432): 617–20.
11. Jiang Y. Intranasalbrain-derived neurotrophic factor protect brainfrom ischemic insult via modulating local inflammation in rats // Neurescience. –2011; Jan. 13; 172: 398–405.
12. Ozan E., The effect of depression, BDNF gene val66met polymorphism and gender on serum BDNF levels // Brain Res. Bull. – 2010; Jan. 15; 81 (1): 61–5.
13. Rybakowcki J., Borkovska A., Czerski P. et al. Polimorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and performance on a cognitive test in bipolar patients // Bipolar. Disord. – 2003; 5: 468–77.
14. Schabitz W., Schwab S., Spranger M. et al. Intraventricular brain – derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. – 1997; 17 (5): 500–6.
15. Simizu E., Hashimoto K., Masaomi I. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: The possibility to explain ethnic mental traits American Journal of Medical Genetics Part B // Neuropsychiatric Genetics. – 2003; 126B (1): 122–3.
16. Zafra F., Castren E., Thoenen H. et al. Interplay between glutamate and gamma aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1991; 88 (22): 10037–41.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616-092:612.017.3 -02:615.33

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *IL-4Rα* С РАЗВИТИЕМ РЕАКЦИЙ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА НА β-ЛАКТАМНЫЕ АНТИБИОТИКИ

И.Е. Грознова, **А.О. Чикало**, **Н.Г. Бердникова**, кандидат медицинских наук,
Д.А. Сычев, доктор медицинских наук, профессор,
В.Г. Кукес, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН
Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава РФ
E-mail: groznova_ira@mail.ru

Развитие аллергических реакций при применении β-лактамных антибиотиков в значительной степени определяется генетическими факторами. В данной работе для изучения ассоциации полиморфизма гена IL-4Rα (rs1801275) с развитием реакций гиперчувствительности немедленного типа (РГНТ) на β-лактамные антибиотики в российской популяции пациентов исследовали частоту генотипов полиморфного маркера rs1801275 данного гена. В результате проведенного исследования получены статистически значимые различия между контрольной группой и группой пациентов с РГНТ на β-лактамные антибиотики по полиморфизму гена IL-4Rα (rs1801275). Показана ассоциация генотипа A/A с развитием РГНТ на β-лактамные антибиотики у российских пациентов (OR=3,50; $CI_{95\%}$ [1,82–6,72]; p=0,0001).

Ключевые слова: *β-лактамные антибиотики, реакции гиперчувствительности немедленного типа, полиморфизм гена IL-4Rα*

ASSOCIATION OF IL-4Rα POLYMORPHISM WITH THE DEVELOPMENT OF IMMEDIATE HYPERSENSITIVITY REACTIONS TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS

I.E. Groznova, A.O. Chikalo, N.G. Berdnikova, D.A. Sychev, V.G. Kukes
Scientific Centre of Medical Products, Moscow, Russian Federation

The development of allergic reactions to beta-lactam antibiotics is largely determined by genetic factors. In this work, to study the association of gene polymorphisms IL-4Rα (rs1801275) with the development of immediate hypersensitivity reactions (RGNT) to beta-lactam antibiotics in the russian population of patients genotypic frequencies of rs1801275 polymorphism of this gene were investigated. The study showed a statistically significant difference in the gene polymorphism IL-4Rα (rs1801275) between the control group and the group of patients with RGNT to beta-lactam antibiotics. The association between the development of IRR to beta-lactam antibiotics and genotype AARGNT in russian patients was demonstrated (OR=3,50; $CI_{95\%}$ [1,82–6,72]; p=0,0001).

Key words: *beta-lactam antibiotics, immediate hypersensitivity reactions, gene polymorphism IL-4Rα*

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

В современной клинической практике существенно растет использование антибактериальных препаратов для лечения больных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями [6]. β-Лактамные антибиотики являются основой современной химиотерапии, так как занимают важное или ведущее место в лечении большинства инфекционных болезней [4]. Сферу применения антибиотиков несмотря на высокую эффективность при многих инфекционных заболеваниях значительно ограничивают побочные реакции, возникающие на фоне лечения этими препаратами (в основном – токсичность и аллергические реакции) [1].

Аллергические реакции гиперчувствительности немедленного типа (РГНТ) – это опосредованные IgE иммунные реакции [2]. Генетические факторы, влияющие на IgE-опосредованные механизмы, изучены в основном при применении β-лактамных антибиотиков [7]. Результаты подобных исследований позволяют предположить, что полиморфизмы гена, кодирующего α-цепь рецептора к интерлейкину-4 (IL-4Rα), могут существенно влиять на риск развития РГНТ при применении β-лактамных антибиотиков у российской популяции пациентов. IL-4Rα-локус кодирует α-цепь рецептора IL-4 и одновременно является функциональным геном-кандидатом, ответственным за развитие атопии и аллергических заболеваний [5].

Таким образом, изучение ассоциации полиморфизма гена, кодирующего IL-4Rα, с развитием аллергических реакций при применении β-лактамных

антибиотиков позволяет определить роль генетического аппарата человека в развитии аллергических реакций, а также выработать рекомендации по ограничению использования β-лактамных антибиотиков для пациентов с определенным генотипом по полиморфизму гена *IL-4Rα*.

Целью исследования было изучить наличие ассоциации полиморфизма гена *IL-4Rα* (rs1801275) с развитием РГНТ на β-лактамные антибиотики у российских пациентов.

Задачи исследования:

1. Определить частоту генотипов по полиморфизму гена *IL-4Rα* (rs1801275) в группе пациентов с кожными проявлениями РГНТ на β-лактамные антибиотики и группе контроля.
2. Изучить наличие ассоциации между носительством генотипов по полиморфизму гена *IL-4Rα* (rs1801275) и развитием РГНТ при применении β-лактамных антибиотиков в российской популяции пациентов, имеющих в анамнезе подобного рода неблагоприятные побочные реакции. Провести статистический анализ распределения генотипов изученного полиморфного маркера в указанных группах, рассмотреть статистическую достоверность выявленных различий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основную группу были включены 59 пациентов с кожными проявлениями РГНТ (крапивница, ангионевротический отек, анафилактический шок и др.) при применении β-лактамных антибиотиков. Группа контроля включала 137 обследованных представителей российской популяции, у которых в анамнезе не было РГНТ на β-лактамные антибиотики.

Все участники исследования были прогенотипированы по полиморфизму гена *IL-4Rα* (rs1801275) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) после предварительного выделения ДНК из лейкоцитов крови. ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с помощью коммерческого набора реактивов Genomic DNA purificationkit №K0512 производства фирмы Fermentas (Литва). Метод аллель-специфической ПЦР основан на неспособности Taq-ДНК-полимеразы инициировать синтез ДНК на праймерах, 3'-концевой нуклеотид которых не комплементарен матричной ДНК [3]. Праймеры для амплификации исследованного локуса были подобраны с помощью программы Vector NTI advance 10 (Invitrogen, США) в соответствии с требованиями метода. Их специфичность проверяли с помощью находящейся в свободном доступе программы primer BLAST (NCBI). Частоту генотипов в основной и контрольной группах сопоставляли с помощью критерия χ^2.

Таблица 1

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАКОНА ХАРДИ–ВАЙНБЕРГА В ОСНОВНОЙ ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ ДЛЯ ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА *IL-4Rα* (rs1801275)

Аллель/генотип	Наблюдаемая частота	Ожидаемая частота	p
A	0,83		
G	0,17		
A/A	41	41	
A/G	16	16	1
G/G	2	2	

Таблица 2

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАКОНА ХАРДИ–ВАЙНБЕРГА В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ ДЛЯ ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА *IL-4Rα* (rs1801275)

Аллель/генотип	Наблюдаемая частота	Ожидаемая частота	χ^2; [p]
A	0, 67		
G	0,33		
A/A	54	60	
A/G	75	62	3,680; [0,1588]
G/G	8	15	

Таблица 3

ЧАСТОТА ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА *IL-4Rα* (rs1801275) В ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ

Генотип	Основная группа (n=59)	Контрольная группа (n=137)	χ^2	p
A/A	41	54		
A/G	16	75	14,960	0,0006
G/G	2	8		

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мы определили, насколько наши выборки близки к тому, чтобы адекватно отражать частоту генотипов в реальных популяциях. Учитывая, что рассматриваемые нами популяции довольно многочисленны и являются более или менее панмиксными, можно ожидать выполнения в них закона Харди–

Таблица 4

РЕЦЕССИВНАЯ МОДЕЛЬ НАСЛЕДОВАНИЯ (ТЕСТ χ^2; df=1)

Генотип	Основная группа (n=59)	Контрольная группа (n=137)	χ^2	p	OR	
					значение	95% CI
Генотип *A/A*	0,695	0,394	14,94	0,0001	3,50	1,82–6,72
Генотип *A/G+G/G*	0,305	0,606			0,29	0,15–0,55

Вайнберга; т.е. если изучаемые выборки реально отражают свойства целых популяций, тогда наблюдаемая в них частота генотипов не должна статистически значимо отличаться от ожидаемой частоты, рассчитанной по соотношению Харди–Вайнберга.

В табл. 1 и 2 представлены данные, полученные при сравнении наблюдаемой частоты генотипов с ожидаемой, рассчитанной исходя из частоты аллелей. Проверка выполнена с помощью критерия χ^2; при уровне значимости p>0,05 различия считали статистически недостоверными. Как видно из приведенных данных, уровень значимости p во всех случаях был >0,05. А значит, изученные выборки адекватно отражали частоту генотипов в реальных популяциях и могут служить для их сравнения.

Как видно из табл. 3 в результате исследования получено следующее распределение генотипов: *A/A* – 41 (69,5%) пациент, *A/G* – 16 (27,1%), *G/G* – 2 (3,4%); в контрольной группе: *A/A* – 54 (39,4%) обследованных, *A/G* – 75 (54,8%), *G/G* – 8 (5,8%). При анализе частоты генотипов выявлены достоверные различия между группами пациентов с кожными проявлениями РГНТ на β-лактамные антибиотики и без указаний в анамнезе на подобные побочные реакции.

Мы изучили возможность определения генотипов *A/A, A/G* и *G/G* для прогнозирования развития РГНТ на β-лактамные антибиотики. Чувствительность выявления генотипа *A/A* для прогнозирования развития РГНТ на β-лактамы составила 43%, специфичность – 82%. Прогностическая ценность положительного результата (ppV – positive redictive value) в случае выявления генотипа *A/A* составила 69%, отрицательного результата (negative predictive value – NPV) – 61%.

Отношение шансов (OR) для развития РГНТ при применении β-лактамов у носителей генотипа *A/A* было 3,50 ($CI_{95\%}$ – в интервале от 1,82 до 6,72) (табл. 4).

Полученные результаты помогут в дальнейшем в поиске предвестников РГНТ, возникающих при применении β-лактамных антибиотиков, а также создании алгоритма прогнозирования указанных РГНТ.

ВЫВОДЫ

1. Определена частота генотипов по полиморфизму гена *IL-4Rα* (rs1801275) в группе пациентов с кожными проявлениями РГНТ на β-лактамные антибиотики и в контрольной группе.
2. Отмечены статистически значимые различия между контрольной группой и группой пациентов с РГНТ на β-лактамные антибиотики по полиморфизму гена *IL-4Rα* (rs1801275).

Показано, что генотип *A/A* является генетическим фактором риска (OR=3,50 при доверительном интервале 1,82–6,72; p=0,0001), предрасполагающим к развитию РГНТ на β-лактамные антибиотики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллин И.М., Баширова Д.К., Визель А.А. и др. Антибиотики в клинической практике. – Казань, ВЭО «Саламат», 1997. – 304 с.
2. Новик Г.А. Механизмы аллергических реакций и методы аллергообследования в клинической практике. – СПб., СПГПМА 2004. – 76 с.
3. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. Генная и белковая инженерия. – М., Наука, 2004. – 530 с.
4. Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Инфекции в интенсивной терапии. – М., Бионика, 2003. – 208 с.
5. Bottini N., Borgiani P., Otsu A. et al. IL-4 receptor alpha chain genetic polymorphism and total IgE levels in the English population: two-locus haplotypes are more informative than individual SNPs // Clin Genet. – 2002; 61 (4): 288–92.
6. Evans et al. Risk Factors for Adverse Drug Events: A 10-Year Analysis // Ann. Pharmacother. – 2005; 39: 1161–8.
7. Guйant J., Guйant-Rodriguez R., Gastin I. et al. Pharmacogenetic determinants of immediate and delayed reactions of drug hypersensitivity // Curr Pharm. Des. – 2008; 14 (27): 2770–7.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 617.723/.735/.747-007.17-092:[612.6.05:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЭНДОТЕЛИНА-1 (*Lys198Asn*) У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ВИТРЕОХОРИОРЕТИНАЛЬНОЙ ДИСТРОФИЕЙ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

С.В. Серебренникова, **А.А. Петров**, **Ю.А. Витковский**, доктор медицинских наук, профессор
Читинская государственная медицинская академия
E-mail: ssv1903@mail.ru

Представлены результаты исследования полиморфизма гена эндотелина-1 (Lys198Asn) у больных с периферической витреохориоретинальной дистрофией (ПВХРД) русской и бурятской национальности в Забайкальском крае. Выявлено, что в представленных этнических группах частота аллели Asn выше среди пациентов с ПВХРД, чем у здоровых ($p<0,05$). Аллель Asn гена EDN1Lys198Asn чаще выявляли у пациентов с разрывами и отслойками сетчатки, чем с другими типами ПВХРД ($p<0,05$). Распределение частоты аллельных вариантов Lys и Asn в русской и бурятской этнических группах не различалось.
Ключевые слова: *полиморфизм, аллель, эндотелин-1 (Lys198Asn), периферическая витреохориоретинальная дистрофия*

ENDOTHELIN-1 (LYS198ASN) GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH PERIPHERAL VITREORETINAL DEGENERATION IN TRANSBAIKALIA

S.V. Serebrennikova, A.A. Petrov, Yu.A. Vitkovsky
State medical academy, Chita, Russian Federation

The results of the study of endothelin-1(Lys198Asn) polymorphism in Transbaikalia region in patients of russian and buryat nationality with peripheral vitreoretinal degeneration are presented. In patients the frequency of Asn-allele is higher than in healthy cases ($p<0,05$). In patients with peripheral breaks of retinal and retinal detachment the rate of Asn-allele is higher than in cases with other type of peripheral vitreoretinal degeneration ($p<0,05$). Prevalence of Lys-allele and Asn-allele in russian and buryat population did not differ.
Key words: *polymorphism, allele, endothelin-1 (Lys198Asn), peripheral vitreochoreoretinal degeneration*

ВВЕДЕНИЕ

Периферическая витреохориоретинальная дистрофия (ПВХРД) – группа заболеваний, которая характеризуется различными дегенеративными изменениями сетчатки крайних отделов глазного дна и встречается у пациентов с различными видами рефракции. Наличие опасных видов ПВХРД является основной причиной развития отслойки сетчатки, частота которой в общей популяции достигает 10–15 случаев на 100 тыс. населения [3, 9]. Отслойка сетчатки остается значимой медико-социальной проблемой, поскольку большинство пациентов с данной патологией – люди трудоспособного возраста [3].

Основными патогенетическими факторами формирования и прогрессирования ПВХРД являются ретинальная гипоксия и снижение метаболизма сетчатки вследствие ухудшения гемодинамики и микроциркуляции в глазу, а также растяжения ее склеральной капсулы [3, 9]. Большое значение в указанных процессах играют факторы, регулирующие тонус сосудов: эндотелин, оказывающий вазоконстрикторное действие на сосуды, и вазодилататор – оксид азота. Возможно, нарушение баланса эндогенных регуляторов ангиогенеза и вазотоников способно привести к нарушению микроциркуляции в глазу.

Эндотелин-1 (ЭТ-1) – самый мощный вазоконстрикторный фактор, основными активаторами синтеза которого является гипоксия и локальная ишемия. ЭТ-1 усиливает продукцию цитокинов и тем самым инициирует локальный воспалительный процесс [2, 5, 6, 8, 12]. Поскольку ЭТ-1 действует преимущественно местно, логично предположить, что повышение его образования и поступления в кровь и слезную жидкость может быть причиной возникновения и усугубления тяжести течения глазных заболеваний.

Достоверные маркеры для оценки предрасположенности человека к развитию ПВХРД, а также для определения прогноза заболевания сегодня отсутствуют, что объясняет повышенный интерес к изучению генетических факторов риска развития данной патологии. Количество и типы генов, изменяющих течение болезни, могут быть не одинаковыми в различных этнических группах [1, 4, 13], поэтому важно выявить генетические критерии для прогнозирова-

ния течения и прогрессирования ПВХРД среди населения в этническом аспекте.

Целью данной работы было изучение частоты встречаемости аллельных вариантов гена ЭТ-1 (*EDN1Lys198Asn*) у здоровых и пациентов с ПВХРД среди представителей русской и бурятской национальности в Забайкальском крае.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методом сплошной выборки обследован 71 пациент с ПВХРД (55 женщин и 16 мужчин), проживающих на территории Забайкальского края. Средний возраст больных составил 29±4,6 года. Все пациенты с ПВХРД были разделены на 2 этнические группы: 1-я – 40 пациентов (31 женщины и 9 мужчин) русской национальности, 2-я – 31 пациент (24 женщины и 7 мужчин) бурятской национальности. Данные об этнической принадлежности выясняли путем опроса, включая указания на национальную принадлежность предков до III поколения.

У пациентов русской национальности выявлены следующие типы ПВХРД: ретинальные разрывы (у 16), «классическая решетка» (у 10), дистрофия типа «след улитки» (у 6), снежковидная дистрофия (у 2), отслойка сетчатки (у 6). При обследовании пациентов бурятской национальности обнаружены: ретинальные разрывы (у 12), отслойка сетчатки (у 4), дистрофия «след улитки» (у 8), снежковидная дистрофия (у 4) и патологическая пигментация (у 3).

Контрольную группу составили обследованные (n=71; 46 женщин и 25 мужчин) без ПВХРД, в возрасте 27±5,8 года. Они также были разделены на 2 этнические группы: 1-я – 40 обследованных русской национальности (24 женщины и 16 мужчин), 2-я – 31 бурят (22 женщины и 9 мужчин).

Всем испытуемым проводилось офтальмологическое обследование, включавшее визометрию (без коррекции или с коррекцией), биомикроскопию переднего отдела глаза, биомикроофтальмоскопию (в условиях мидриаза) с помощью контактной 3-зеркальной линзы Гольдмана. Для молекулярно-генетического исследования выбрана точка мутации ЕТ-1 в позиции 198 (Lys>Asn). ДНК выделяли из цельной крови и буккального эпителия. Амплификацию проводили в термоцикле модели 110 (ООО «Биоком», Москва). В работе использованы стандартные наборы праймеров НПФ «Литех» – «SNP-экспресс». Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромида этидия.

Полученные данные подвергали статистической обработке и анализу с помощью программы Statistika for Windows Version 6,0 и электронных таблиц Microsoft Excel, версия XP. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p<0,05$. Для сравнения частоты и групп по качественному бинарному признаку применяли критерий χ^2 (Пирсона). Генотипы обследованных проверяли на соответствие закону Харди–Вайнберга. Вычисляли относительный риск (ОР) заболеваемости и отношение шансов (ОШ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования частоты полиморфизма *EDN1Lys198Asn* в этнических группах представлены в таблице. Распределение генотипов этой мутации во всех группах соответствовало соотношению Харди–Вайнберга.

У обследованных русской национальности отсутствовала значимая разница в частоте генотипов между больными и здоровыми. Относительный риск развития ПВХРД в группе русских носителей аллели Asn оказался в 3,7 раза выше, чем у носителей аллели Lys (ОШ=7,2).

Следует отметить, что из 31 пациента бурятской национальности с ПВХРД 25 (80,6%) были носителями мутантного варианта гена *EDN1Lys198Asn*, из них 10 (32,3%) – в гомозиготном состоянии. В бурятской этнической группе относительный риск развития ПВХРД среди носителей Asn-аллели гена *EDN1Lys198Asn* оказался в 4,9 раз выше, чем среди носителей Lys-аллели (ОШ=8,6).

Частота встречаемости аллели Lys и мутантной аллели Asn у пациентов с ПВХРД по сравнению со здоровыми обследованными в русской и бурятской этнических группах представлены на рисунке.

Установлено, что из 12 бурят с разрывом сетчатки 10 являлись носителями мутантной аллели Asn. В русской этнической группе из 16 пациентов с ретинальными разрывами аллель Asn обнаружена у 12.

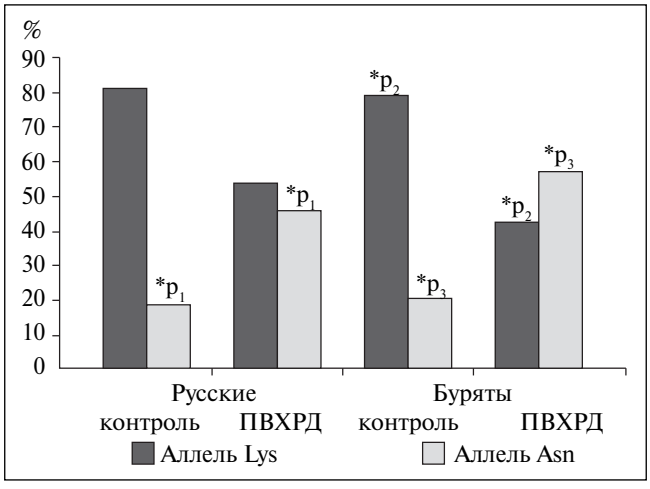
У всех 10 пациентов с отслойкой сетчатки русской и бурятской национальности выявлена мутантная аллель Asn, при этом у 4 пациентов – в гомозиготном состоянии. Аллель Asn гена *EDN1Lys198Asn* в представленных этнических группах встречалась чаще у пациентов с разрывами и отслойкой сетчатки, чем с другими типами ПВХРД ($p<0,05$).

При сравнении распространенности аллельных вариантов гена *EDN1Lys198Asn* между контрольными

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ *EDN1Lys198Asn* У ОБСЛЕДОВАННЫХ РУССКОЙ И БУРЯТСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОСТИ

Генотип	Буряты		Русские	
	ПВХРД (n=31)	контроль (n=31)	ПВХРД (n=40)	контроль (n=40)
Lys/Lys	6 (19,4) $p_1<0,001$	21 (67,7)	14 (35)	27 (67,5)
Lys/Asn	15 (48,4)	7 (22,6)	15 (37,5)	11 (24)
Asn/Asn	10 (32,2) $p_2<0,01$	3 (9,7)	11 (27,5)	2 (8)

Примечание. p_1 – достоверность различий носительства генотипа Lys/Lys у бурят с ПВХРД и в контроле, p_2 – генотипа Asn/Asn в тех же группах. В скобках – %.



*Частота аллельных вариантов гена EDN1Lys198sn среди больных с ПВХРД и здоровых русской и бурятской этнических групп, %. Примечание. *p_1<0,05 между носительством аллели Asn при ПВХРД и в контрольной группе у представителей русской национальности; *p_2<0,05 между носительством аллели Lys у бурят с ПВХРД и в контрольной группе; *p_3<0,05 – между носительством аллели Asn у бурят с ПВХРД и в контрольной группе.*

группами бурят и русских, а также между пациентами с ПВХРД исследуемых этнических групп значимая разница отсутствовала.

Таким образом, в русской и бурятской этнических группах обладатели мутантного варианта гена *EDN1Lys198Asn* в большей степени предрасположены к развитию ПВХРД.

Накоплены многочисленные подтверждения того, что носительство генетического полиморфизма ЭТ-1 ассоциировано с риском артериальной гипертензии [7, 11]. Получены сведения о том, что аллельный вариант AsnAsn связан со стенокардией напряжения [10]. Эти взаимосвязи обусловлены тем, что гомозиготное носительство аллели Asn данного полиморфного маркера сопряжено с высоким уровнем ЭТ-1 [7]. Как известно, повышенный уровень этого вазоактивного пептида приводит к усилению сосудистого тонуса и негативно отражается на течении сердечно-сосудистой патологии [2]. В патогенезе отслойки сетчатки значимое место занимает состояние микроциркуляторного русла глаза.

У пациентов с ПВХРД обнаружено повышение концентрации ЭТ-1 в слезной жидкости [5], что, возможно, связано с метаболическими нарушениями, приводящими к гипоксии, которые возникают вследствие уменьшения кровотока в тканях глаза. Это, в свою очередь, приводит к образованию ЭТ-1, который оказывает непосредственное констриктивное влияние на стенку артерий, а также активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию и пролиферацию средней оболочки мелких сосудов. Вероятно, указанные процессы носят более выраженный характер на фоне гомозиготного носительства Asn-аллели мутации *EDN1Lys198Asn*. Этим, по нашему мнению, объясняется тот факт, что среди больных с отслойкой и разрывами сетчатки превалируют носители мутантного варианта гена этого полиморфного маркера.

ВЫВОДЫ

1. Частота мутантной аллели (Asn) гена *EDN1Lys198Asn* выше среди пациентов с ПВХРД, чем среди здоровых у обследованных русской и бурятской этнических групп.

2. Аллель (Asn) гена *EDN1Lys198Asn* встречается чаще у пациентов разрывами и отслойкой сетчатки, чем с другими типами ПВХРД в рассматриваемых этнических группах.

3. Распределение частоты аллельных вариантов гена *EDN1Lys198Asn* среди представителей русской и бурятской национальности не различается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова А.И., Витковский Ю.А., Логунов Н.А. Полиморфизм гена p21 как фактора риска первичной открытоугольной глаукомы среди населения Забайкальского края // Забайкальский мед. вестн. – 2009; 2: 19–21. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
2. Гомазков О.А. Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты // Кардиология. – 2001; 41 (2): 50–8.
3. Поздеева О.Г., Тарасова Л.Н. Гипоксия тканей и состояние клеточных мембран при разных типах течения периферических витреохориоретинальных дистрофий // Офтальмохирургия. – 2005; 4 (8): 43–7.
4. Серебренникова С.В., Витковский Ю.А. Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы (C786T) у больных с периферическими витреохориоретинальными дистрофиями сетчатки в Забайкальском крае // Забайкальский мед. вестн. – 2012; 1: 17–21. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
5. Серебренникова С.В., Голубина Л.А., Витковский Ю.А. Содержание эндотелина-1 в плазме крови и слезной жидкости у больных с периферической витреохориоретинальной дистрофией в Забайкальском крае // Забайкальский мед. вестн. – 2012; 2: 17–9. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
6. Цыбиков Н.Н., Шовдра О.Л., Пруткина Е.В. Уровень эндотелина-1, нейронспецифической енолазы и аутоантител к ним при диабетической ретинопатии // Забайкальский мед. вестн. – 2010; 1: 17–9. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
7. Barden A., Herbison C., Beilin L. Association between the endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy // J. Hypertens. – 2001; 19 (10): 1775–82.
8. Chakravarthy U., Archer D. Endothelin: a new vasoactive ocular peptid // Br. J. Ophthalmol. – 1998; 76 (2): 107–8.
9. Karazhaeva M., Saxonova E., Klebanov G. Flavonoid antioxidants in complex treatment of patients with dystrophic retinal detachment // Ophthalmology. – 1999; 237: 27–33.
10. Lee J., Cheong S., Kim J. Association of endothelin-1 gene polymorphisms with variant angina in Korean patients // Clin. Chem. Lab. Med. – 2008; 46 (11): 1575–80.
11. Porov A., Schulz E., Hinz J. Impact of endothelin-1 Lys198Asn polymorphism on coronary artery disease and endorgan damage in hypertensives // Coron. Artery Dis. – 2008; 19 (7): 429–34.
12. Salvatore S., Vingolo E. Endothelin-1 role in human eye: a review // J. Ophthalmol. – 2010; 2: 34–5.
13. Stow L., Jacobs M. Endotelin-1 gene regulation // FASEB J. – 2010; 25 (1): 16–28.

значительно возрастает стоимость медицинского обслуживания больных ВМД. Так, в США затраты на оказание помощи больным НВ ВМД в 1994 г. составили 1504$ на пациента в год, в 2006 г. – 3263$, т.е. стоимость лечения выросла почти в 2 раза [5].

В настоящее время существуют возможности первичной профилактики ВМД для лиц из группы риска, а также возможность предотвратить переход неэкссудативной ВМД в экссудативную. В структуре как первичной профилактики ВМД, так и профилактики НВ ВМД большое значение имеют модифицируемые факторы риска ВМД – курение, ожирение, солнечное излучение, а также нутрицептивная поддержка – витамины, антиоксиданты, полиненасыщенные жирные кислоты и каротиноиды [15].

Особый интерес представляет возможность превентивного медикаментозного лечения пациентов с высоким риском конверсии неэкссудативной ВМД в экссудативную. На этом этапе патогенеза терапия должна быть направлена на связывание свободных проангиогенных факторов в сетчатке, прежде всего VEGF (Vascular endothelial growth factor), или использование естественных антиангиогенных молекул, например PEDF (Pigment epithelium-derived factor). Проводятся клинические испытания по применению PEDF у больных ВМД с использованием аденовирусного вектора для доставки препарата в задний участок глаза [16]. Восполнение дефицита этого фактора поможет восстановить баланс про- и антиангиогенных факторов в сетчатке и предотвратить развитие НВ.

Выявление предрасположенных лиц позволит модифицировать тактику диспансерного наблюдения: увеличение частоты регулярных осмотров и выполнения ангиографии позволит выявлять НВ на самых ранних стадиях. Ранняя диагностика и раннее начало лечения гарантируют гораздо более высокую эффективность терапии и благоприятный прогноз в отношении сохранения зрительных функций [8].

Генетическое тестирование – это возможность ранней скрининговой диагностики и профилактики, возможность прогнозировать течение болезни и определить вероятность перехода неэкссудативной формы в экссудативную, выбрать оптимальную тактику ведения больного. Это первый шаг к генной терапии, уже доказавшей свою эффективность.

Продолжаются исследования генетических факторов риска развития неоваскуляризации [2, 3]. Во многих исследованиях на различных популяциях выявлена связь однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphisms – SNPs) в локусе 10q26 [12] с высоким риском ВМД. В этом регионе расположены гены *LOC387715/ARMS2* и *HTRA1*, полиморфизмы которых, вероятно, играют определенную роль в патогенезе заболевания. В нашем исследовании изучены полиморфизм rs10490924 (риск-аллель Т), расположенный в кодирующей области гена *LOC387715/ARMS2* (age-related maculopathy susceptibility 2), и rs11200638 (риск-аллель А), полиморфизм промоторной области гена *HTRA1* (high-temperature requirement factor A1). Ген HTRA1 кодирует один из белков теплового шока, который относится к семейству сериновых протеаз. *HTRA1* синтезируется во многих органах и тканях, в том числе в сетчатке. Возможно, *HTRA1* регулирует сигнальный путь трансформирующего ростового фактора β (TGFβ) [17]. Полиморфизм rs11200638 расположен в промоторной области гена и поэтому может изменять уровень его экспрессии.

Ген *LOC387715/ARMS2* кодирует белок наружной митохондриальной мембраны с предполагаемой массой 12 кДа, который синтезируется в сетчатке [14]. Т-аллель rs10490924 приводит к замене аминокислот в белке: аланин 69>серин (A69S-вариант) и увеличению скорости деградации *LOC387715/ARMS2* мРНК в клетке.

Ген *CFH* кодирует фактор Н системы комплемента, являющийся естественным ингибитором и классического, и альтернативного пути системы комплемента. Полиморфизм rs1061170 встречается более чем у половины больных ВМД и признан важным генетическим фактором риска развития болезни [4].

Целью настоящего исследования была разработка способа оценки риска НВ-формы ВМД с учетом генетических и клинических факторов риска.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 255 пациентов с НВ ВМД (основная группа) и 119 испытуемых контрольной группы. Диагноз ВМД и стадию заболевания устанавливали согласно рекомендациям AREDS (Age-RelatedEyeDiseaseStudy) [1].

В контрольную группу были включены пациенты, не страдающие ВМД, проходившие профилактическое обследование в Медицинском центре Хадассах. Критерии включения в группу контроля: возраст старше 60 лет; прозрачные среды, не препятствующие офтальмоскопии; отсутствие множественных мелких или средних друз или перераспределения пигмента на глазном дне, характерных для ВМД (1-я категория по классификации AREDS). Исследование одобрено этическим комитетом университета, каждый испытуемый подписал бланк информированного согласия.

Средний возраст в контрольной группе был меньше, чем в основной (соответственно (70,8 ±8,2 и 78,1±7,6 года; $p<0,05$; непарный двусторонний t-тест). Группы были сопоставимы по половой структуре.

Все исследуемые генотипированы по следующим однонуклеотидным полиморфизмам (SNPs):

1) rs11200638 в гене *HTRA1*, расположенный в промоторной области данного гена;

2) rs10490924 в гене *LOC387715/ARMS2*, локализован в кодирующем регионе гена;

3) rs1061170 в гене *CFH*.

© **Т.П. Гальбинур**, 2013
УДК 617.736-053.9-092:[612.6.05:577.21

ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ ХОРИОИДАЛЬНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Т.П. Гальбинур, кандидат медицинских наук
Университет Иврит, Медицинский центр Хадассах, Иерусалим, Израиль
E-mail: tgalbinur@gmail.com

Сообщение посвящено разработанному способу оценки риска неоваскулярной (НВ) формы возрастной макулярной дегенерации (ВМД) с учетом генетических и клинических факторов риска. В исследовании участвовали 255 пациентов с НВ ВМД (основная группа) и 119 испытуемых контрольной группы. Диагноз и стадию ВМД устанавливали согласно рекомендациям AREDS. Средний возраст в контрольной группе (70,8±8,2 года) был ниже, чем в группе НВ ВМД (78,1±7,6 года). Все исследуемые были генотипированы по rs11200638 в гене HTRA1, rs10490924 в гене LOC387715/ARMS2, rs1061170 в гене CFH. Определение полиморфизмов выполнялось путем секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР), содержащих данные SNPs.

В основной группе полиморфизмы rs11200638 и rs10490924 имеют почти полное сцепление, D'=0,96–1,00. Различия в распределении частоты аллелей и генотипов данных SNPs в основной и контрольной группах были статистически значимыми. Подтверждена связь курения и НВ ВМД (OR=3,95% ДИ 1,7–5,3; p<0,001). Выявлена статистически значимая ассоциация генотипа CFH rs1061170 и типа хориоидальной НВ (ХНВ) (p=0,027). Индивидуальный риск развития НВ ВМД для пациента может быть выражен как вероятность наступления данного события (%) или в виде одной из категорий: среднепопуляционный риск (1-я категория; медиана 0,92%), высокий риск (2-я категория; медиана 8,4%), очень высокий риск (3-я категория; медиана 47,6%).

Определение индивидуального риска развития НВ, внимательное динамическое наблюдение за пациентами из группы риска, превентивное или возможно более раннее начало лечения гарантируют успех в предотвращении НВ-осложнений ВМД.

Ключевые слова: *хориоидальная неоваскуляризация, неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация, однонуклеотидный полиморфизм*

THE RISK ASSESSMENT OF DEVELOPMENT OF CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

T.P. Galbinur
The Hebrew University-Hadassah Schools of Medicine and Dental Medicine, Jerusalem, Israel

Aim. *To study a method of risk assessment neovascular age-related macular degeneration (AMD) with the genetic and clinical risk factors.*

Methods. *The study included 255 patients with neovascular AMD (NVAMD) and 119 subjects in control group. Diagnosis and stages of AMD were set as recommended by AREDS. The mean age of patients in the control group (70,8±8,2 years) was lower than in the NVAMD group (78,1±7,6 years). All studied cases were genotyped for rs11200638 in the gene HTRA1, rs10490924 in the gene LOC387715/ARMS2, rs1061170 in the gene CFH. Determination of polymorphisms was performed by sequencing PCR products containing data SNPs.*

Results. *In the NVAMD group polymorphisms rs11200638 and rs10490924 have almost complete adhesion, D'=0,96–1,00. The differences in the distribution of alleles and genotypes of these SNPs in AMD patients and control groups were statistically significant. The relationship of smoking and NVAMD development(OR=3,95% CI 1,7–5,3, p<0,001) has been confirmed. A statistically significant association of CFH rs1061170 genotype and type of CNV (p=0,027) has been revealed. Individual risk for NVAMD development can be expressed as a probability of occurrence of the event (%) or one of the categories: middle population risk (category 1, median 0,92%), high risk (category 2, median 8,4%) and very high risk (category 3, median 47,6%).*

Conclusion. *Determination the individual risk of development of neovascularization, careful dynamic monitoring of patients at risk, preventive or as much as possible early treatment ensures success in preventing complications of NVAMD.*

Key words: *choroidal neovacularization, neovascular AMD, singlenucleotide polymorphism*

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение заболеваемости и стоимости лечения больных возрастной макулярной дегенерацией (ВМД) требует эффективного и доступного метода скрининговой диагностики, способного снизить затраты на медицинское обслуживание пациентов. К 2050 г. население мира увеличится приблизительно в 1,4 раза, в том числе людей старше 60 лет станет больше почти в 4 раза, соответственно увеличится и количество больных ВМД [9]. Прогнозируется беспрецедентное увеличение числа больных неоваскулярной (НВ) ВМД к 2050 г. с 23,47 до 80,44 млн [11]. С другой стороны,

Определение полиморфизмов выполнялось путем секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР), содержащих данные SNPs, с использованием методики iPLEX™ на времяпролетном масс-спектрометре (MALDI-TOF), работающем на принципе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (Sequenom Inc., San Diego, CA).

Другие факторы, учитываемые в исследовании: пол, возраст при выявлении НВ, стаж курения, тип хориодальной НВ (ХНВ), острота зрения на момент выявления ХНВ. Испытуемые, курившие во время исследования или раньше, считались курящими, испытуемые, не курившие никогда – некурящими.

Клиническое обследование включало визометрию, биомикроскопию, тонометрию, оптическую когерентную томографию и выполнение флюоресцеиновой ангиографии. Тип ХНВ определяли в соответствии с критериями Macular Photocoagulation Study Group (классические ХНВ, преимущественно классические, минимальные классические и скрытые ХНВ).

Статистическая обработка результатов осуществлена с помощью пакета прикладных программ STATISTICA® 10,0 (Statsoft Inc). Для сравнения групп использован непарный двусторонний t-тест. Для расчета отношения шансов (OR – odds ratio), доверительных интервалов (95% ДИ) и уровня значимости использовали логистический регрессионный анализ и критерий χ^2. Для составления статистической модели оценки риска применялась бинарная логистическая регрессия с функцией последовательного включения и исключения признаков. Для всех методов статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение частоты аллелей данных SNPs соответствовало распределению Харди–Вайнберга. Выявлено, что в основной группе полиморфизмы rs11200638 и rs10490924 имеют почти полное сцепление; D'=0,96–1,00. Различия в распределении частоты аллелей и генотипов данных SNPs в группах ВМД и контрольной статистически значимые (табл. 1).

Курение признано важным фактором риска ВМД, в том числе и НВ-формы. В исследуемой популяции подтверждена связь курения и НВ ВМД (OR=3,95% ДИ 1,7–5,3; $p<0,001$). Логистический регрессионный анализ не выявил ассоциации курения с какими-либо генотипами; в настоящей модели курение рассматривается как независимый фактор риска.

Выявлена статистически значимая ассоциация генотипа *CFH* rs1061170 и типа ХНВ ($p=0,027$). Классический тип ХНВ, к которому отнесены классические и преимущественно классические варианты, был более характерен для гомозигот по риск-аллели полиморфизма, а среди нормальных гомозигот чаще встречалась скрытая ХНВ. Распространенность скрытой ХНВ была в 2,5 раза выше среди гетерозигот (к скрытой ХНВ отнесены минимальные классические и собственно скрытые типы).

Методом логистического регрессионного анализа не выявлено статистически значимых ассоциаций данных SNPs с другими клиническими и демографическими параметрами.

Построение статистической модели для прогнозирования вероятности заболевания проводили с применением логистического регрессионного анализа. Составлена модель, описывающая вероятность НВ ВМД в зависимости от наличия или отсутствия предвестников.

Таблица 1

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ rs11200638, rs10490924 И rs1061170 В ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ

Ген	SNPs	Частота аллелей N/R; %				Частота генотипов NN/NR/RR; %					
		НВ ВМД	контроль	p	OR (95%CI)	НВ ВМД	контроль	NR		RR	
								p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
LOC387715/ ARMS2	rs10490924 N=G R=T	56/44	80/ 20	<0,0001	3,1 (2,2–4,5)	36,5/ 39/ 24,5	64,2/ 30,3/ 5	0,0012	2,3 (1,4–3,7)	<0,0001	8,6 (3,5–2,8)
HTRA1	rs1200638 N=G R=A	63,7/ 73,6	82,8/ 17,2	<0,0001	2,7 (1,9–4)	45,5/ 36,5/ 18	68,1/ 29,4/ 2,5	0,013	1,8 (1,1–3,0)	<0,0001	10,7 (3,2–35,7)
CFH	rs1061170 N=T R=C	49,4/ 5,6	64,4/ 35,6	0,0002	1,9 (1,3–2,6)	22,9/ 52,9/ 24,2	41,5/ 45,8/ 12,7	0,0004	2,1 (1,3–3,4)	<0,0001	3,4 (1,7–6,8)

Примечание. N – нормальная аллель, R – риск-аллель; NN – нормальная гомозигота, NR – гетерозигота, RR – гомозигота по риск-аллели.

Вероятность НВ ВМД (probability – P) описывается уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + a^{-y}},$$

где y – значение уравнения логистической регрессии;

$$y = const + \sum_{i=1}^{n} \beta i \times xi$$

коэффициенты и переменные указаны в табл. 2.

Таблица 2

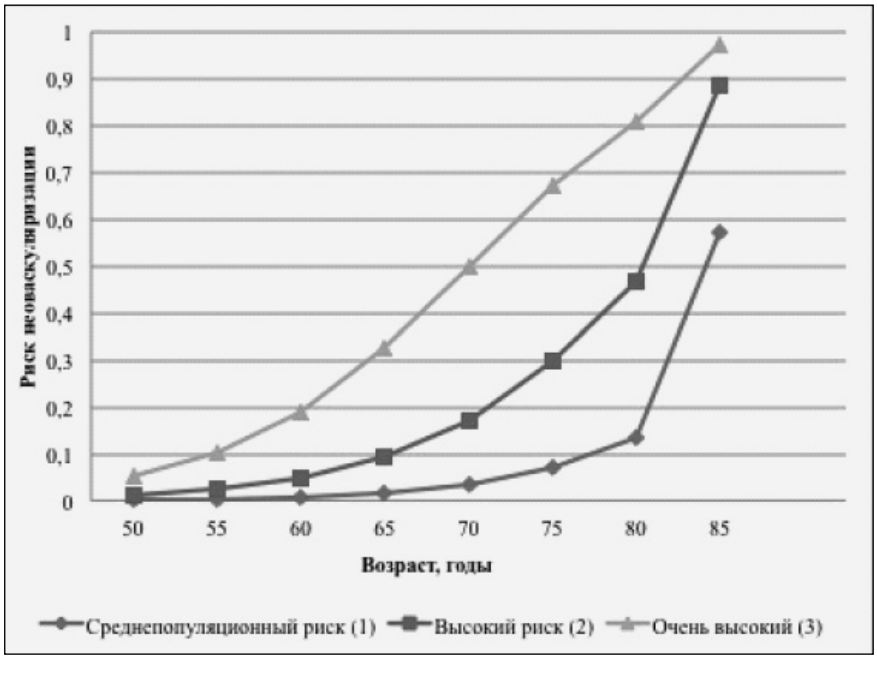
КОЭФФИЦИЕНТЫ РЕГРЕССИОННОГО УРАВНЕНИЯ И ЗНАЧЕНИЯ ПЕРЕМЕННЫХ

Параметр	Регрессионный коэффициент (β)	p	X
Const	-7,82	0,045	1
ARMS2	1,13	<0,001	GG =0, GT =1, TT =2
HTRA1	0,99	=0,002	GG=0, GA=1, AA=2
CFH	0,64	=0,002	TT=0, TC=1, CC=2
Курение	1,1	=0,030	Нет=0, да=1
Возраст, годы	1,44	<0,001	50-60=0, 60-70=1, 70-80=2, >80=3

Таблица 3

СТРАТИФИКАЦИЯ РИСКА НВ-ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ВМД

Категории риска	Медиана, %	Интервал, %
1-я (среднепопуляционный)	0,92	0,04-3,0
2-я (высокий)	8,4	3,1-20,0
3-я (очень высокий)	47,6	20,1-95,7



Зависимость риска НВ ВМД от возраста пациентов: 1 – среднепопуляционный риск; 2 – высокий; 3 – очень высокий

Таким образом, найдя значение переменных X для каждого испытуемого (количество риск-аллелей каждого полиморфизма, возраст), с помощью составленной модели можно определить индивидуальный риск развития ХНВ.

По данным мета-анализа 2012 г., распространенность НВ ВМД логарифмически увеличивается с возрастом – приблизительно в 4 раза за каждое десятилетие после 50 лет (OR=4,2 за десятилетие; 95% ДИ (Байесовский)=3,8–4,6). Ввиду исключительной значимости возраста пациента в оценке риска НВ ВМД в настоящую модель включена переменная «возраст», расчеты основаны на данных мета-анализа эпидемиологических исследований повозрастной заболеваемости ВМД в европейской популяции [10].

Все возможные значения уравнения регрессии сгруппированы в 3 категории для стратификации риска НВ-осложнений при ВМД. Индивидуальный риск развития НВ ВМД для пациента может быть выражен как вероятность наступления данного события (%) или в виде одной из категорий: среднепопуляционный риск (1-я категория), высокий риск (2-я категория) и очень высокий риск (3-я категория). Категории, медиана и интервал вероятности для каждой группы представлены в табл. 3.

Помимо общего определения индивидуального риска, разработана более детализированная система оценки риска НВ по категориям в разных возрастных группах (см. рисунок).

Развитие ХНВ – наиболее прогностически неблагоприятное осложнение ВМД, приводящее при естественном течении заболевания к тяжелой потере центрального зрения.

Разработка способа оценки риска НВ-формы ВМД и внедрение доступного клинико-генетического тестирования позволит выявить группу риска и своевременно принять превентивные меры. Определение категории риска и выдача соответствующих рекомендаций по модификации образа жизни, объяснение пациенту первых симптомов НВ ВМД и

важности регулярного наблюдения, составление индивидуального графика обследования и выполнения инструментальных исследований обеспечит высокий уровень ранней диагностики ХНВ. Существуют также возможности превентивного лечения пациентов из группы риска (анти-VEGF, PEDF) [16]. Генотипирование пациентов с неэкссудативной формой ВМД может предоставить ценную клиническую информацию о предполагаемой скорости прогрессирования (полиморфизм гена *ARMS2* – фактор быстрого прогрессирования, тяжести течения ВМД) и вероятности перехода неэкссудативной ВМД в экссудативную (полиморфизмы генов *ARMS2, HTRA1, CFH*).

Кроме того, определение риск-вариантов исследуемых полиморфизмов позволит прогнозировать эффективность лечения и определить оптимальную терапевтическую стратегию. Так, риск-аллель *CFH* rs1061170 снижает эффективность анти-VEGF-терапии и лечения антиоксидантами [7]. Пациенты с риск-вариантом *ARMS2/HTRA1*, наоборот, быстрее отвечают на лечение ранибизумабом и методом фотодинамической терапии, у них лучше результат восстановления остроты зрения [6, 13]. С другой стороны, данные гены или их продукты привлекательны как мишень для разработки новой, патогенетически ориентированной или генной терапии [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no 8 // Arch Ophthalmol. – 2001; 119: 1417–36.
2. Budzinskaia M., Pogoda T., Generozov É. et al. Influence of genetic mutations on clinical presentation of subretinal neovascularization. Report 1: The impact of CFH and IL-8 genes polymorphism // Vestn. Oftalmol. – 2011; 127: 3–8.
3. Budzinskaia M., Pogoda T., Strelkova I. et al. (Influence of genetic mutations on clinical presentation of subretinal neovascularization. Report 2: The impact of HTRA and VEGF genes polymorphism) // Vestn. Oftalmol. – 2011; 127: 9–16.
4. Conley Y., Jakobsdottir J., Mah T. et al. CFH, ELOVL4, PLEKHA1 and LOC387715 genes and susceptibility to age-related maculopathy: AREDS and CHS cohorts and meta-analyses // Hum. Mol. Genet. – 2006; 15: 3206–18.
5. Cruess A., Zlateva G., Xu X. et al. Economic burden of bilateral neovascular age-related macular degeneration: multi-country observational study // Pharmacoeconomics. – 2008; 26: 57–73.
6. Kibbin M., Ali M., Bansal S. et al. VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitrealranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration // Br. J. Ophthalmol. – 2012; 96: 208–12.
7. Orlin A., Hadley D., Chang W. et al. Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration // Retina. – 2012; 32: 4–9.
8. Rauch R., Weingessel B., Maca S., et al. Time to first treatment: The significance of early treatment of exudative age-related macular degeneration // Retina. – 2012; 32: 1260–4.
9. Rein D., Wittenborn J., Zhang X. et al. Vision Health Cost-Effectiveness Study Group. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments // Arch. Ophthalmol. – 2009; 127: 533–40.
10. Rudnicka A., Jarrar Z., Wormald R. et al. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalencein populations of European ancestry: a meta-analysis. Ophthalmology. – 2012;119: 571–80.
11. Skaat A., Chetrit A., Belkin M. et al. Time trends in the incidence and causes of blindness in Israel // Am. J. Ophthalmol. – 2012; 153: 214–221.
12. Stanton C., Chalmers K., Wright A. The chromosome 10q26 susceptibility locus in age-related macular degeneration // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012; 723: 365–70.
13. Tsuchihashi T., Mori K., Horie-Inoue K. et al. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration // Ophthalmology. – 2011; 118: 93–100.
14. Wang G., Scott W., Whitehead P. et al. A novel ARMS2 splice variant is identified in human retina // Exp. Eye Res. – 2012; 94: 187–91.
15. Wong I., Koo S., Chan C. Prevention of age-related macular degeneration // Int. Ophthalmol. – 2011; 31: 73–82.
16. Zarbin M., Rosenfeld P. Pathway-based therapies for age-related macular degeneration: an integrated survey of emerging treatment alternatives // Retina. – 2010; 30: 1350–67.
17. Zhang L., Lim S., Du H. et al. High temperature requirement factor A1 (HTRA1) gene regulates angiogenesis through transforming growth factor-β family member growth differentiation factor 6 // J. Biol. Chem. – 2012; 287: 1520–6.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ МОЖЕТ БЫТЬ ПРЕОДОЛЕНА?

Меланома, как известно, представляет собой агрессивно развивающуюся опухоль, при химиотерапии которой в значительном проценте случаев отмечается развитие лекарственной устойчивости, что ставит дополнительные проблемы в терапии этого типа рака. Более чем в 50% случаев меланомы человека обнаружена мутационная активация экспрессии гена *BRAF*. Активирующую мутацию в протоонкогене B-Raf, повышение активности B-Raf-киназы первыми описали в 2002 г. Davies и соавт. Эта мутация приводит к накоплению онкопротеина *BRAF*(V600E). Однако лечение вемурафенибом больных с меланомой поздней стадии, содержащей *BRAF*-мутировавшие клетки, привело к выраженной регрессии опухоли и повышению выживаемости. Ученым из Калифорнийского университета биомедицинских исследований группы Новартис, Meghna Das Thakur и соавт., удалось показать на модели клеток меланомы, что лекарственная устойчивость зависит от передачи сигнала в системе BRAF(V600E)→MEK→ERK. Блокирование этого каскада может помочь преодолеть лекарственную резистентность опухоли. Установлено также, что меланомы, обладающие лекарственной устойчивостью к действию вемурафениба, могут стать чувствительными к препарату через определенное время после прекращения его применения, при измененном режиме воздействия, в результате продолжающегося деления клеток опухоли без мутантного гена *BRAF*.

(Nature, 2013, Jan 9. doi: 10.1038/nature11814. [Epub ahead of print]).

ИММУНОГЕННОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МОЖНО НЕ ОПАСАТЬСЯ

Требования биоэтической медицины, а также вероятность иммунологического отторжения эмбриональных стволовых клеток (ES-клеток) обусловливают преимущества использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) вместо ES в регенеративной медицине. Однако существует также вероятность иммуногенности терминально дифференцированных до специфических типов клеток, полученных индуцированием плюрипотентных клеток, и, как результат, – их отторжения при трансплантации. Недавние исследования, проведенные R. Araki и соавт. (Национальный институт радиологических исследований, Япония), продемонстрировали иммуногенность кожных трансплантатов, как и ткани костного мозга, полученных путем индуцирования мышиных iPSCs. Для сравнения использовались аналогичные линии клеток, полученные из ES. Путем определения экспрессии генов *Zg16* и *Hormad1*, отвечающих за отторжение трансплантатов, была показана низкая иммуногенность клеток, полученных как из iPSCs, так и из ES. Таким образом, можно с большей уверенностью развивать направление iPSCs в регенеративной медицине.

(Nature, 2013, Vol. 493, P.145).

ИСКУССТВЕННЫЙ КОМПЛЕКС МИКРОБОВ ПРОТИВ КЛОСТРИДИИ

Общеизвестна проблема дисбиоза, возникающая при употреблении антибиотиков, токсическом поражении кишечника, химиотерапии или инфекционном заболевании желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Часто одной из причин упорного дисбиоза, не поддающегося коррекции общеупотребительными пробиотиками, является активизация рекурентной бактериальной инфекции, рост которой обычно сдерживается компонентами нормальной микрофлоры. Было несколько успешных попыток применить «аутотрансплантат» – препарат, приготовленный из фекалий пациента, которого затем подвергали воздействию антибиотиков. Такой подход вызвал ряд нареканий в связи с невозможностью контролировать и стандартизовать многокомпонентную систему микроорганизмов, содержащуюся в фекалиях. В связи с этим FDA не допустила широкого применения такого подхода, особенно когда было предложено использовать «ксенотрансплантат», т.е. фекалии здорового донора для восстановления микрофлоры и борьбы с клостридиальной инфекцией. Разработал данный подход M. Ramesh (Университет инфекционных заболеваний Генри Форда) в 2011 г., успешно осуществивший лечение разведенными в теплой воде фекалиями здоровых доноров 43 из 49 (90%) больных с клостридиальной диареей. В связи с этим ученые из Канадского университета г. Гвельф создали искусственную смесь, получившую название «rePOOPulating the gut» (игра слов: англ. «poop» точнее всего переводится словом «какашки»). Для этого несколько десятков бактерий, выделенных из фекалий здорового донора, преимущественно анаэробных, прошли все необходимые стадии секвенирования, исследования на токсинообразование, адгезивность и другие свойства, а затем были вновь соединены в примерно тех же пропорциях, что в исходном материале. Авторы (Elaine O. Petrof и соавт.) в статье, опубликованной в журнале «Microbiome», утверждают, что применение «искусственных фекалий» с успехом излечивает сложные формы диареи, вызванной *Clostridium difficile*.

(Microbiome, 2013, Vol.1 (1), 3, P. 2049–2618).

ФИЗИЧЕСКИЕ УПРАЖНЕНИЯ ЭФФЕКТИВНО СНИЖАЮТ АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ

Известно, что в пожилом возрасте артериальная гипертензия (АГ) рассматривается почти как неизбежный процесс, связанный со склерозированием сосудов и снижением сердечной функции. Однако

система, основанная на одновременном напряжении мышц сгибателей и разгибателей (resistance exercise training – RET, упражнения с самосопротивлением), улучшает гемодинамические показатели у больных пожилого возраста. Kevin S. Heffernan и соавт. предложили 21 участнику в возрасте 60 лет с исходным АД 138/84 мм рт. ст. в течение 12 нед выполнять несложные RET-упражнения. 11 из 21 участника согласились на тренировки. У всех исследуемых оценивали разнообразные показатели гемодинамики, в том числе распространение пульсовой волны, аортальный индекс аугментации и т.д. Было показано, что тренировки снизили АД у пожилых людей в начальной стадии артериальной гипертензии.

(Nature Reviews Cardiology, 2013, Vol. 10, P. 12–14).

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА

Оценка уровня С-реактивного белка (СРБ) и связь его повышения с развитием воспаления открыла в свое время эпоху поиска специфических биомаркеров разнообразных заболеваний. Однако попытки повысить специфичность детекции СРБ не прекращаются до настоящего времени. A. Sanne и соавт. исследовали СРБ как фактор индивидуальной предрасположенности к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Стандартные клинические исследования оценки таких факторов, как возраст, пол, курение, измерение АД, уровень холестерина, работают достаточно хорошо на популяционном уровне, однако недостаточны для оценки индивидуального риска. Детекция повышенного уровня СРБ является прогностическим фактором развития заболеваний сердечно-сосудистой системы.

(Nature Reviews Drug Discovery, 2013, Vol. 12, P. 21).

АУТИЗМ: МИШЕНЬ – ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ БЕЛКИ?

Ментальные расстройства аутистического спектра (ASDs) представляют собой сложные нарушения развития психики, которые характеризуются дефицитом социализации, сложностью в формировании коммуникативных навыков, раздражительностью, повторяющимися движениями (раскачивание и т.д.) и ограничением интересов. Этиология ASDs неизвестна. В последние годы разработана аутоиммунная гипотеза, предполагающая дефицит сигнальных белков, связывающих иммунную и нервную систему, однако S. Crunkhorn показала, что возможной причиной развития аутизма является гиперпроводимость нейрональных цепей, вызывающая повышенный синтез синаптических белков. Блокирование трансляции этих белков может быть подходом в разработке препаратов направленного действия для лечения больных аутизмом.

(Nat Rev Drug Discov, 2012, Vol. 14; 12 (1), P. 21–25).

МЕХАНИЗМ АУТОИММУННОГО ДИАБЕТА РАСКРЫТ?

Сахарный диабет типа 1 (СД1) развивается в течение нескольких лет и характеризуется резким снижением количества инсулинпродуцирующих клеток поджелудочной железы за счет действия аутореактивных Т-клеток. Французские исследователи из группы INSERM (J. Diana и соавт.) на модели диабетических мышей показали, что гибель β-клеток индуцируется активацией и поступлением в поджелудочную железу B_{1a}-клеток, нейтрофилов и плазмацитоидных дендритных клеток. Активированные B_{1a}-лейкоциты секретируют IgG, специфически 2-цепочечную ДНК. IgG активируют нейтрофилы с высвобождением ДНК-связывающего антимикробного кателицидин-связанного пептида (CRAMP), который связывает собственную ДНК. Затем этот комплекс активирует плазмацитоидные дендритные клетки и миелоидный фактор дифференцировки-88 через toll-подобный рецептор TLR-9. Эта цепь событий приводит к продукции интерферона-α в островках Лангерганса поджелудочной железы и последующей их гибели. Несмотря на то, что эта цепь событий развивается на модели «диабетических» NOD-мышей, подобный механизм развития СД1 возможен и у человека.

(Nature Medicine, 2013, Vol. 19, P. 65–73).

НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Украинские исследователи из 3 институтов Львова совместно с канадским ученым V. Titorenko (Монреаль) опубликовали результаты деятельности в области промышленной биотехнологии, которые могут быть применены и в других медико-биологических сферах. Авторы статьи, опубликованной в журнале BioTechniques, утверждают, что применение наночастиц для доставки ДНК наиболее многообещающий подход для генетической трансформации дрожжевых клеток, а также предлагают новый метод для доставки ДНК на основе олигоэлектролитного полимера, в котором комбинированы анионный скелет с диметламиноэтилметакрилатными боковыми цепями, обеспечивающими эффективную доставку ДНК в дрожжевые клетки. По сравнению с применяемыми методами электропорации и LiAc-доставки разработанный метод более дешев, прост и воспроизводим.

(BioTechniques, 2013, Jan., Vol. 54 (1), P. 35–43).

ХЛОПЧАТНИК ГОДИТСЯ НЕ ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СИТЦА

Хлопчатник *Gossypium hirsutum* – наиболее экономически значимое растение, с незапамятных времен культивировавшееся во всем мире. Однако F. Bedon и соавт., исследователи из Института растениеводства (Канберра, Австралия), показали, что это растение может быть очень ценным для исследований клеточной элонгации и изучения механизмов форми-

рования волокон и биогенеза клеточной стенки растительной клетки. Разработан быстрый и дешевый метод разделения различных типов тканей из семяпочки и молодых семян хлопчатника для получения РНК, геномной ДНК и белков, который могут быть использованы в различных молекулярных исследованиях.

(BioTechniques, 2013, Vol. 54 (1), P. 44–46).

УЧЕНЫЙ ПРИНЕС ИЗВИНЕНИЯ ЗА ФАЛЬСИФИКАЦИЮ ДАННЫХ

Научные фальсификации – это заведомо ложные знания и выводы, а также искажения результатов исследований, целью которых является получение грантов и другого вида финансирования исследования (частного). Научные фальсификации следует искать в направлениях науки, которые хорошо финансируются, а это либо передовые технологии, либо нерешенные задачи, либо экономически выгодные проекты. Одна из самых крупных и типичных из известных научных фальсификаций нашего времени – «холодный ядерный синтез».

Бывший старший научный сотрудник Глэдстоунского университета неврологических исследований (Калифорния, США) Paul J. Muchowski в декабре 2012 г. принес извинения за фальсификацию данных в своем отчете по 3 научным грантам. Он касался данных экспериментов, которые не были проведены на тот момент, когда подавался отчет. Paul J. Muchowski считался крупным специалистом в области исследований болезни Хантингтона, он – автор нескольких статей, которые цитировались более 100 раз. В последней статье, опубликованной в 2011 г. в журнале Cell, он сообщил о новом препарате JM6, который позволяет уменьшить проявления нейродегенеративных изменений у мышей на модели болезней Альцгеймера и Хантингтона. Опубликованные данные никогда не подвергались сомнениям и критике со стороны других ученых. Для проверки истинности научных данных, публиковавшихся в печати в течение многих лет, в Глэдстоунском университете была создана специальная комиссия.

В отношении фальсификатора приняты строгие меры. Помимо того, что он исключен из университета, он будет проходить постоянные проверки и контроль качества исследований на любом месте, где будет работать дальше. Кроме того, он никогда не будет включен в список консультантов системы общественного здравоохранения, что в значительной мере ограничивает возможность участия в исследованиях по грантам.

(BioTechniques, 2013, Vol. 54 (1), P. 35–37).

ПОТЕРЯННЫЙ СЛУХ МОЖНО ВОССТАНОВИТЬ?

Получен препарат, который позволяет вернуть слух взрослым мышам с моделированной его потерей в результате действия звука высокой интенсивности. По сообщениям исследователей из Гарвардского университета (США) и Медицинского университета Кейо (Иокогама, Япония), ингибирование сигнального пути Notch вызывает регенерацию волосковых клеток внутреннего уха, пораженных в результате шума высокой интенсивности (модель акустической травмы). Препарат, действие которого основано на активации фактора транскрипции, приводит к развитию новых волосковых клеток. Возможность регенерации волосковых клеток у птиц и рыб была показана ранее, но для млекопитающих такая возможность установлена впервые.

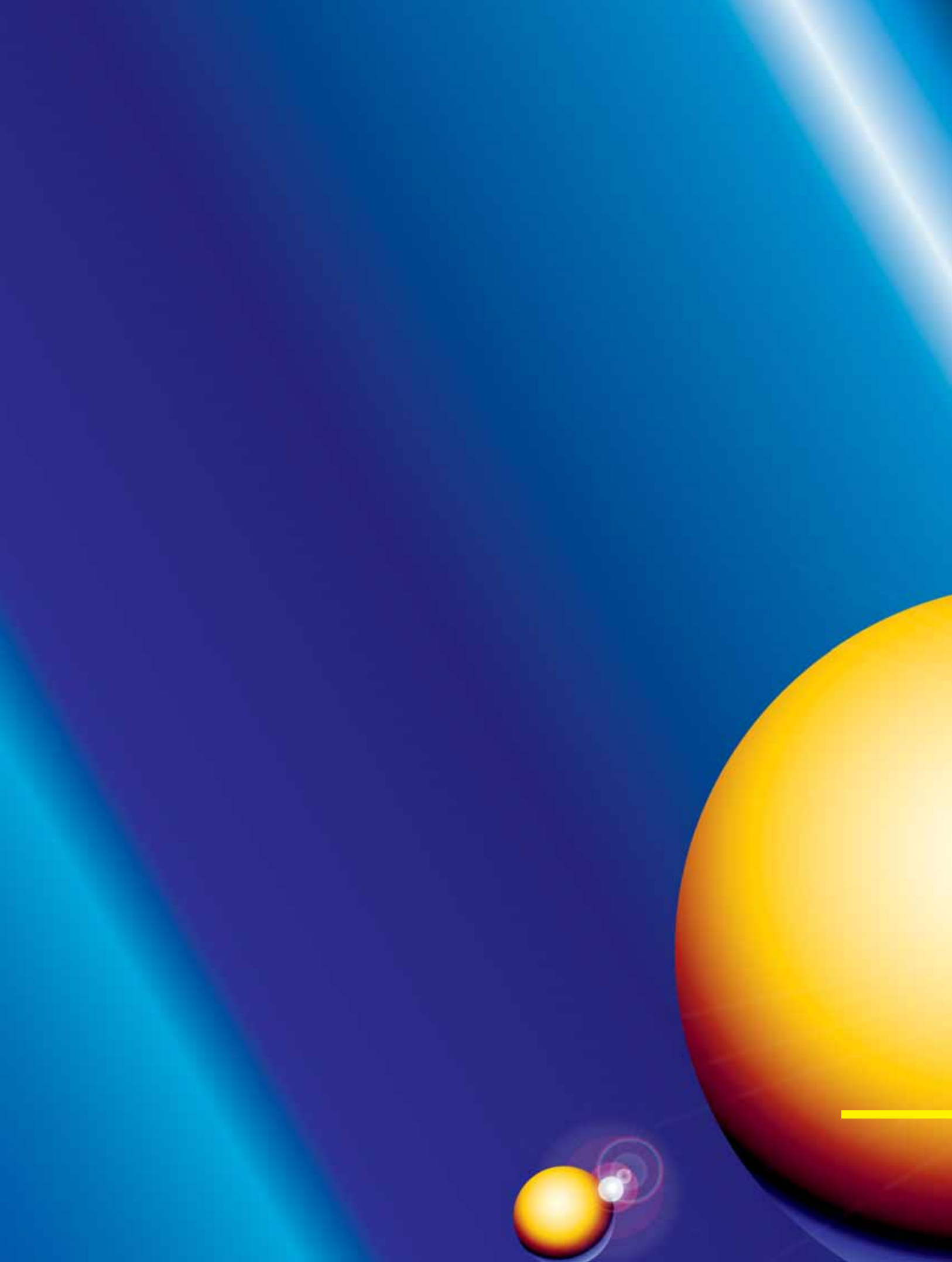
(Neuron, 2013, Vol. 77, P. 58–69).

КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ПЦР-АНАЛИЗУ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА 30 ЛЕТ

Своеобразный юбилей отмечают молекулярные исследователи. В 1983 г. в журнале *BioTechniques* опубликованы статьи о новом методе, разработанном K. Mullis. За прошедшие 30 лет метод получил широкое применение, разрабатываются разные его формы и технологии. Можно сказать, что этот метод совершил революцию в молекулярной биологии и медицине.

(BioTechniques, 2013, Vol. 44 (5), P. 619–626).

ИСКУССТВЕННЫЙ ХРОМОСОМНЫЙ КОМПЛЕКС – НОВЫЙ ПОДХОД К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМ

Исследователи генома после сиквенса часто стоят перед проблемой: каким образом должны быть «упакованы» хромосомы? Пространственная конфигурация хромосом значительным образом влияет на экспрессию генов. Искусственно создаваемые хромосомные комплексы могут позволить получить информацию о возможной геномной организации и структурных вариациях, в той или иной степени позволяя говорить о мутационной изменчивости. Алгоритм создания таких комплексов создан исследователями из Иллинойского университета. Этот алгоритм обеспечивает сборку хромосом, основанную на исходных данных (reference-assisted chromosome assembly – RACA). Он строится на сравнительном анализе известной геномной информации и возможности соединения связей между различными участками хромосом

(Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, Jan. 10, DOI:10.1073/pnas.1220349110).