

водил доктор медицинских наук Ю.П.Бородин, разрабатывавший актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения аллергических болезней (аллергический ринит, астматический бронхит и др.). Им опубликован ряд методических рекомендаций по этой проблеме. Многие научные исследования проводились совместно с кафедральными работниками.

Итак, все вышеприведенное свидетельствует о заметном вкладе сотрудников кафедры госпитальной терапии в развитие как практической, так и научной отечественной пульмонологии.

В настоящее время на кафедре продолжают проводиться научные исследования по актуальным проблемам

пульмонологии. Ведется работа над двумя кандидатскими диссертациями (А.Д.Пальман "Давление в легочной артерии у больных с синдромом апноэ во сне и его динамика в процессе лечения" и А.А.Белов "Гиперреактивность бронхов и система ПОЛ—антиоксидантная защита у больных бронхиальной астмой"). Активно изучаются новые лекарственные средства. Подготовлена к изданию брошюра И.Г.Даниляк "Бронхообструктивный синдром". Заявлено 6 докладов на 6-й Конгресс по болезням органов дыхания. Только за 1995 г. опубликовано 16 научных работ в отечественной печати и 8 в материалах зарубежных симпозиумов.

Поступила 27.02.96.

Оригинальные исследования

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996

УДК [616.2-036.12+616.24-006.6]-056.7

Е.И.Самильчук¹, А.В.Гаспарян², К.К.Лактионов², А.Г.Чучалин¹

TaqI ПОЛИМОРФИЗМ В 3'ФЛАНКИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ГЕНА PI ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ И РАКЕ ЛЕГКОГО

¹ Институт пульмонологии МЗ РФ, Москва; ² НИИ канцерогенеза ОНЦ РАМН, Москва

THE TaqI POLYMORPHISM IN THE 3'FLANKING REGION OF THE PI GENE IN THE CHRONIC PULMONARY DISEASES AND LUNG CANCER

Ye.I.Samilchuk¹, A.V.Gasparyan², K.K.Laktionov², A.G.Chuchalin¹

S u m m a r y

The TaqI polymorphism in the 3'flanking region of the PI gene has been analyzed in 147 patients with different lung diseases and 110 healthy individuals. The detection of the TaqI polymorphism was carried out by a single step or two-step nested polymerase chain reaction followed by the TaqI digestion of the fmplified product. The frequency of TaqI polymorphism was significantly higher among patients with chronic obstructive lung disease (15.15% versus 5.45%). Despite the difference between healthy controls and patients with lung cancer was nonsignificant, the χ^2 value for this comparison was quite close to the level of statistical significance. The group of patients with other lung diseases did not reveal any difference from the control in the frequency of TaqI polymorphism.

Р е з ю м е

Частота TaqI полиморфизма в 3'фланкирующей области гена PI была проанализирована у 147 пациентов с различными заболеваниями легких и 110 здоровых лиц. Идентификация полиморфизма проводилась с помощью одно- или двухстадийной цепной полимеразной реакции с последующим переваром амплифицированного фрагмента рестриктазой TaqI. Данный полиморфизм встречался достоверно чаще в группе больных с хроническими обструктивными заболеваниями легких по сравнению с контрольной группой (15,15 и 5,54% соответственно). В группе больных раком легкого повышение частоты TaqI полиморфизма было недостоверным, однако значение показателя χ^2 в этом случае было довольно близко к порогу статистической достоверности. В группе больных с другими заболеваниями легких отличий от контроля по частоте TaqI полиморфизма выявлено не было.

Хронические обструктивные заболевания легких (ХОЗЛ) относятся к числу наиболее распространенных форм патологии человека. Одним из генетических факторов, играющих роль в этиопатогенезе ХОЗЛ, является ген PI, кодирующий основной ингибитор протеаз — альфа-1-антитрипсин (ААТ). Среди многочисленных аллелей этого гена имеются варианты, которые характеризуются выраженным дефицитом или полным отсутствием ААТ в крови. Большинство таких “дефицитных” аллелей встречается крайне редко. Исключение составляют аллели PiZ и PiS, частоты которых достигают уровня полиморфности во многих популяциях. На долю наследственного дефицита ААТ приходится 1—5% ХОЗЛ. Патологический процесс в этом случае связан с нарушением баланса между ААТ и его мишенью — эластазой нейтрофилов, чрезмерная активность которой оказывается разрушительной для соединительной ткани легких. Наследственный дефицит ААТ и его клинические аспекты описаны в обзорах [1,3].

Помимо наследственного дефицита ААТ возможен и другой механизм ассоциации гена PI с ХОЗЛ, реализуемый при обычных (недефицитных) PI аллелях и, соответственно, нормальном базовом уровне ААТ. О наличии такого механизма свидетельствуют данные о повышенной частоте TaqI полиморфизма в 3'-фланкирующей области гена PI среди пациентов с ХОЗЛ в сравнении со здоровым контролем (17 и 5% соответственно) [4,6]. Клонирование геномной ДНК от пациентов с TaqI полиморфизмом и последующее сиквенирование клонов, содержащих данный сайт, позволили идентифицировать мутацию, ответственную за TaqI полиморфизм [7,9,10]. Ею оказалась замена гуанина на аденин (G → A), в результате которой сайт для TaqI (TCGA) оказывался разрушенным (TCAA).

До недавнего времени изучение TaqI полиморфизма было возможно лишь с помощью саузерн-блоттинга — довольно длительного и трудоемкого метода, требующего больших количеств высокомолекулярной геномной ДНК. Последнее в значительной степени ограничивало проведение таких исследований. Недавняя публикация нуклеотидной последовательности фрагмента, включающего TaqI-полиморфный сайт [9,10], позволила нам разработать более удобную методику анализа данного полиморфизма, основанную на цепной полимеразной реакции (ЦПР). Последняя была использована для детекции TaqI полиморфизма среди здоровых лиц и пациентов с различными формами заболеваний легких. Результаты этого исследования представлены в данной статье.

В работе были использованы образцы ДНК от 147 пациентов с заболеваниями легких (ХОЗЛ — 66, рак легкого — 49, другие заболевания органов дыхания — 32) и 110 здоровых лиц. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови или опухоли с помощью одного из следующих методов: экстракция фенолом-хлороформом, “высаливание”, “килекс”-экстракция [8,11,12].

Для анализа TaqI полиморфизма было разработано два варианта ЦПР: одностадийный, использующий одну пару праймеров и двухстадийный (“nested”), с использованием двух пар праймеров (наружных и внутренних) (рис.1). Выбор праймеров проводился на

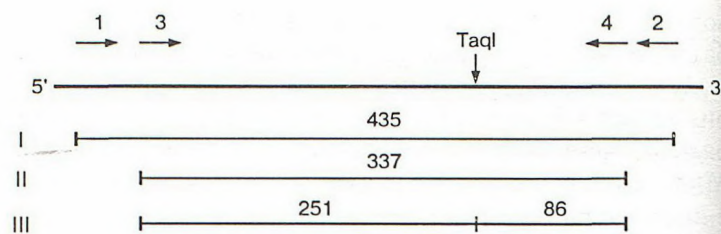


Рис.1. Схематическое изображение 3'-фланкирующей области гена PI, включающей TaqI полиморфный сайт.

I — фрагмент длиной 435 п.н., амплифицируемый на первой стадии двухстадийной ЦПР с помощью наружной пары праймеров (1 и 2);
II — фрагмент длиной 337 п.н., амплифицируемый при одностадийной ЦПР или на второй стадии двухстадийной ЦПР с использованием пары внутренних праймеров (3 и 4);
III — субфрагменты, образующиеся в результате перевара TaqI рестриктазой в случае аллеля “дикого типа” (TaqI сайт присутствует).

основе нуклеотидной последовательности 3'-фланкирующей области гена PI (Accession No X60765 EMBL/GenBank) с помощью программы OLIGO 5.0 (National Biosciences Inc.). Нуклеотидные последовательности отобранных праймеров приведены ниже: Наружный “сенс”: 5'-GCTGTCCCTGCAGTCTTAGA-3'; Наружный “антисенс”: 5'-GTGGAGAGTGAAAGGCTGTC-3'; Внутренний “сенс”: 5'-CTGAATAGCCCCTGTGGTAA-3'; Внутренний “антисенс”: 5'-CAGGAGACTTGTGTGGGAAA-3'.

Реакционная смесь (конечный объем 25 мкл) включала 10 mM Трис-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,001% желатины; 50 μM каждого дНТФ; 0,4 μM праймеров; 0,75 единиц Taq полимеразы (Perkin Elmer) и 200—1000 нг геномной ДНК. В случае двухстадийного ЦПР в качестве матрицы для второй стадии использовалось 0,5 мкл реакционной смеси после завершения первой стадии. Термоциклирование осуществляли в приборе System 9600 (Perkin Elmer) в условиях, идентичных для обоих вариантов ЦПР: начальная денатурация при 94°C в течение 3 мин, 35 двухстадийных циклов (94°C — 45 сек и 60°C — 30 сек) и конечная инкубация при 60°C в течение 7 мин.

Перевар ЦПР-продукта рестриктазой TaqI осуществляли в течение 3 часов при 65°C. Полученные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

На рис.1 представлены позиции праймеров для обоих вариантов ЦПР, а также размеры фрагментов, ожидаемые в случаях отсутствия или наличия TaqI



Рис.2. Детекция TaqI полиморфизма в агарозном геле.

М — маркер молекулярного веса (50, 100, 200, 300... 1000 п.н.); 2, 4—7 — гомозиготы по аллелю “дикого типа”; 1, 3 — гетерозиготы по полиморфному аллелю.

РОВАМИЦИН® 3,0 млн МЕ

СПИРАМИЦИН



R 3,0

Устраняет инфекцию дыхательных путей - быстро и полностью

**сильное продолжительное
действие в месте
инфекционного поражения**

**великолепные
клинические результаты**

безопасность пациента



RHÔNE-POULENC RORER

117049, Москва, ул. Покровка, д. 45

Тел: (095) 926-57-03, 926-57-11, 926-57-12, 926-57-13, 926-57-14

СОСТАВ: 1 таблетка содержит 3 млн МЕ спирамицина. **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА:** РОВАМИЦИН принадлежит к антибиотикам семейства макролидов. К РОВАМИЦИНУ чувствительны следующие микроорганизмы: Streptococcus, Meningococcus, Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Listeria monocytogenes, Clostridium, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Legionella pneumophila, Treponema, Leptospira, Campylobacter и Toxoplasma gondii. Умеренно чувствительны: Haemophilus influenzae, Bacteroides fragilis, V. cholerae, Staphylococcus aureus. Устойчивы к РОВАМИЦИНУ Enterobacteriaceae, Pseudomonas. Всасывание препарата происходит быстро (период полувсасывания составляет 20 минут). После приема внутрь 6 млн МЕ препарата пик его концентрации в крови наблюдается через 1,5-3 ч; период полувыведения составляет приблизительно 8 ч. РОВАМИЦИН не проникает в спинномозговую жидкость, однако хорошо диффундирует в слюну и ткани, а также в молоко матери, в связи с чем применение его кормящими женщинами не рекомендуется. Связывание с белками плазмы слабое и не превышает 10%. Препарат метаболизируется в печени и выводится через желчные протоки, кишечник и почки (10-14%). **ПОКАЗАНИЯ:** Применение РОВАМИЦИНА рекомендовано в оториноларингологии, бронхопульмонологии, стоматологии, гинекологии, при кожных и костных заболеваниях и для лечения простатита, а также для лечения токсоплазмоза, в том числе у беременных женщин. РОВАМИЦИН применяется для профилактики менингококкового менингита среди лиц, контактировавших с больным за 10 дней до его госпитализации, для химиопрофилактики острого суставного ревматизма. **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ:** Аллергия к спирамицину. **ПОБОЧНЫЕ ЯВЛЕНИЯ:** В отдельных случаях отмечается тошнота, диарея, рвота. В редких случаях возможны кожные аллергические реакции, парестезии конечностей, возникающие в процессе инфузии препарата и самопроизвольно исчезающие, редко - флебиты, в исключительных случаях - средней тяжести, требующие отмены терапии. **ОСОБЫЕ ОТМЕТКИ:** У больных с почечной недостаточностью можно не изменять дозировку, так как препарат практически не выводится через почки. Поскольку РОВАМИЦИН проникает в грудное молоко, необходимо прервать кормление грудью. РОВАМИЦИН можно без опасения применять беременным женщинам. **ПРИМЕНЕНИЕ И ДОЗИРОВКА:** Для взрослых дневная доза РОВАМИЦИНА внутрь составляет 6-9 млн МЕ в день за 2-3 приема. **ФОРМА ВЫПУСКА:** Таблетки 1,5 млн МЕ по 16 шт. в упаковке; таблетки 3 млн МЕ по 10 шт. в упаковке; флаконы с лиофилизированным порошком 1,5 млн МЕ для внутривенного введения.

Таблица 1

Частота TaqI полиморфизма среди пациентов с различными формами заболеваний легких и в контрольной группе

ХОЗЛ	Рак легкого	Другая патология	Здоровые
10/66 (15,15%)	7/49 (14,28%)	1/32 3,12%	6/110 5,45%

сайта. При двухстадийной ЦПР наружные праймеры позволяют амплифицировать фрагмент длиной 435 пар нуклеотидов (п.н.), который служит матрицей для второй стадии. Для второй стадии амплификации, также как и в одностадийном варианте ЦПР, использовалась пара внутренних праймеров, позволяющих амплифицировать фрагмент длиной 337 п.н. Двухстадийная ЦПР применялась для анализа тех образцов ДНК, которые при одностадийном варианте давали очень низкий выход ЦПР-продукта. ДНК последовательность “дикого-типа” содержит TaqI сайт и данная рестриктаза разрезает фрагмент длиной 337 п.н. на два субфрагмента, длины которых — 251 и 86 п.н. В случае TaqI полиморфизма данный сайт утрачивается, и фрагмент длиной 337 п.н. остается интактным. Гетерозиготы (один аллель — “дикого-типа”, другой — полиморфный TaqI вариант) характеризуются, соответственно, наличием всех трех фрагментов — 337, 251 и 86 п.н. Электрофоретические варианты, наблюдавшиеся у гетерозигот, а также гомозигот, по аллелю “дикого типа” показаны на рис.2.

Среди 257 обследованных лиц было выявлено 24 индивидуума, гетерозиготных по полиморфному TaqI аллелю. Гомозиготы по данному аллелю отсутствовали. Данные о частоте TaqI полиморфизма в контрольной группе и среди пациентов с различными формами заболеваний легких приведены в табл.1. Как видно из последней, частота TaqI полиморфизма повышена в сравнении с контролем в группах больных ХОЗЛ и раком легкого. Однако статистический анализ, проведенный с помощью метода χ^2 , показал, что статистически достоверное различие с контролем имеется только для группы больных ХОЗЛ. Повышение частоты полиморфизма в группе больных с раком легкого не является статистически достоверным. Однако следует отметить, что значение χ^2 в этом случае довольно близко к порогу статистической достоверности при $p < 0,05$. Данный порог составляет 3,841, тогда как значение χ^2 для групп “рак легкого—контроль” равно 3,54. Для сравнения, аналогичный показатель для групп “другие заболевания легких—контроль” равен лишь 0,31.

Возможность использования TaqI полиморфизма в качестве генетического маркера предрасположенности к ХОЗЛ, несомненно, заслуживает самого пристального внимания, если учесть, что генетические основы этой широко распространенной патологии мало изучены. Поскольку генные частоты могут отличаться в разных популяциях, представлялось целесообразным изучить насколько TaqI полиморфизм распространен в нашей

стране, в том числе среди отечественных больных ХОЗЛ.

В отличие от всех ранее опубликованных работ, в данном исследовании детекция TaqI полиморфизма впервые проводилась с помощью ЦПР, специально разработанной нами для этой цели. Преимущество данной методики состоит в ее относительной простоте в сравнении с саузерн-блоттингом и возможности получения результата в течение одного—двух дней; кроме того, с ее помощью возможно исследование образцов ДНК практически любого качества.

Полученные нами результаты в отношении больных ХОЗЛ в целом соответствовали ранее опубликованным данным. Мы также выявили повышенную частоту TaqI полиморфизма среди таких пациентов, что указывает на значимость данного генетического маркера и для этой популяции. Нам кажется, что результат в отношении пациентов с раком легкого, несмотря на отсутствие статистической достоверности, также заслуживает внимания — значение χ^2 в этом случае было весьма близко к пороговому. Возможно, исследование большего числа пациентов позволит точнее определиться в отношении ассоциации между раком легких и TaqI полиморфизмом. В то же время группа больных с другими заболеваниями легких (в основном атопической бронхиальной астмой) не выявила каких-либо отличий от контроля.

Частота TaqI полиморфного варианта в нашей контрольной группе была весьма близка к частотам, сообщенным для Великобритании и Канады (в последней среди потомков европейцев) [2, 4—6]. Следует, однако, иметь в виду, что частота данного полиморфизма может быть существенно отличной в других популяциях. Так, недавно мы обнаружили, что TaqI полиморфный аллель присутствует у кувейтских арабов почти в 10 раз чаще, чем у европейцев (*Самильчук Е.И. и др.*, готовится к печати). Последнее может быть следствием селективных преимуществ, предоставляемых этим аллелем, по отношению к какому-то неблагоприятному фактору в регионе проживания данной этнической группы. Многие страны, в том числе Россия, этнически весьма неоднородны, поэтому при проведении соответствующих исследований этот результат следует иметь в виду.

Наличие ассоциации между ХОЗЛ и TaqI полиморфизмом в 3'-фланкирующей области гена PI, естественно, поднимает вопрос о механизме, лежащем в основе данной ассоциации. TaqI полиморфный сайт, находясь за пределами кодирующей области гена PI, не влияет ни на структуру ААТ, ни на базовый уровень ААТ в крови. Однако данный полиморфизм может иметь значение в ситуациях, требующих резкого возрастания концентрации ААТ [7,9,10]. Действительно, анализ нуклеотидной последовательности фрагмента, содержащего данный полиморфный сайт, показал, что в нем содержится 4 потенциальных “мотива” для ДНК-связывающих белков, один из которых включает сайт мутации G → A. Кроме того, эксперименты по связыванию ядерных белков и изучение функциональной активности обычного и мутантного фраг-

ментов выявили, что речь идет о регуляторном элементе, который, в частности, может контролировать экспрессию расположенного в непосредственной близости гена PI. ААТ является одним из белков так называемой "острой фазы", концентрация которых значительно возрастает (для ААТ в 2—4 раза) при воспалении, стрессе и некоторых других состояниях. Если регуляторный элемент, контролирующей экспрессию гена PI, поврежден мутацией, то, несмотря на нормальный базовый уровень ААТ, его прирост, требуемый в "острой фазе", может оказаться недостаточным, приводя тем самым к дисбалансу между нейтрофильной эластазой и ее ингибитором. Данная гипотеза выглядит весьма привлекательно, однако требует дальнейшей разработки как на экспериментальном, так и на клиническом уровнях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самильчук Е.И., Лапин Б.А. Наследственный дефицит α_1 -антитрипсина: клинические проявления, методы диагностики, перспективы лечения // Тер. арх.— 1988.— № 7.— С.141—144.
2. Cox D.W., Billingsley G.D., Mansfield T. DNA restriction-site polymorphisms associated with the alpha-1-antitrypsin gene // Am. J. Hum. Genet.— 1987.— Vol.41.— P.891—906.
3. Crystal R.G. α_1 -antitrypsin deficiency, emphysema and liver disease // J. Clin. Invest.— 1990.— Vol.132.— P.417—433.
4. Hodgson I., Kalsheker N. DNA polymorphisms of the human α_1 -antitrypsin gene in normal subjects and in patients with pulmonary emphysema // J. Med. Genet.— 1987.— Vol.24.— P.47—51.
5. Kalsheker N., Hodgson I., Watkins G.L. et al. Deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphism of the α_1 -antitrypsin gene in chronic lung disease // Br. Med. J.— 1987.— Vol.294.— P.1511—1577.
6. Kalsheker N., Watkins G.L., Hill S.L. et al. Independent mutations in the flanking sequence of the α_1 -antitrypsin gene are associated with chronic obstructive airways disease // Dis. Markers.— 1990.— Vol.8.— P.151—157.
7. Kalsheker N., Morgan K. Redulation of the α_1 -antitrypsin gene and a disease-associated mutation in a related enhancer sequence // Am. J. Respir. Crit. Care Med.— 1994.— Vol.150.— P.S183—S189.
8. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucl. Acid Res.— 1988.— Vol.16.— P.1215.
9. Morgan K., Scobie G., Kalsheker N. The characterization of a mutation of the 3'flanking sequence of the α_1 -antitrypsin gene commonly associated with chronic obstructive airways disease // Eur. J. Clin. Invest.— 1992.— Vol.20.— P.1—7.
10. Morgan K., Scobie G., Kalsheker N. Point mutation in a 3'flanking sequence of the α_1 -antitrypsin gene associated with chronic respiratory disease occurs in a regulatory sequence // Hum. Mol. Genet.— 1993.— Vol.2.— P.253—257.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd Ed.— Cold Spring Harbor, 1989.
12. Walsh P.C., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // BioTechniques.— 1991.— Vol.10.— P.506—513.

Поступила 19.11.96.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996

УДК 616.248—085.357.45.032.23

О.А.Суточкинова, М.В.Самсонова, А.В.Черняк, А.Л.Черняев

ИНГАЛЯЦИОННАЯ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДНАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ ЛЕГКОГО ТЕЧЕНИЯ. ВЛИЯНИЕ НА ВОСПАЛЕНИЕ И ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

INHALED STEROIDS IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA. EFFECT OF INHALED STEROIDS ON AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS

О.А.Sutochnikova, М.В.Samsonova, А.В.Cherniak, А.Л.Chernjaev

Summary

The anti-inflammatory effect of Russian inhaled steroid budesonide (BENACORT) was studied in 10 patients with mild bronchial asthma. The moderate inflammatory activity in bronchoalveolar spaces proved by increased levels of neutrophils and eosinophils in bronchoalveolar lavage (BAL) was observed in all patients. The study had single-blind, crossover, placebo-controlled design.

The trustworthy improving in functional pulmonary indices, reduction of levels of eosinophils and neutrophils in BAL, decrease in bronchial inflammatory index, diminution of airway hyperresponsiveness were observed after 2-week treatment with benacort. The results of this study confirmed the significant anti-inflammatory effect of benacort.

Резюме

У 10 больных бронхиальной астмой легкого течения, у которых при исследовании бронхоальвеолярного смыва выявлена умеренная степень активности воспаления в бронхоальвеолярном