

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобошко М. Ю., Мальцева Н. В., Бердникова И. П. и др. Эффективность слухопротезирования при использовании разных формул настройки слухового аппарата // Росс. оторинолар. — 2014. — № 3. — С. 137–144.
2. Фонлантен А., Арндт Х. Слуховые аппараты. — Ростов/н Д: Феникс, 2009. — 304 с.
3. Cox R. M., G. C. Alexander G. C., Gray G. A. Audiometric correlates of the unaided APHAB // J. Am. Acad. Audiol. — 2003. — Vol. 14. — № 7. — P. 361–371.
4. Dillon H., Birtles G., Lovegrove R. Measuring the outcome of a national rehabilitation program: Normative data for the Client Oriented Scale of Improvement (COSI) and the Hearing Aid User's Questionnaire (HAUQ) // J. Am. Acad. Audiol. — 1999. — Vol. 10. — № 2. — P. 67–79.
5. Gatehouse S. Glasgow Hearing Aid Benefit Profile: Derivation and Validation of a Client-centered Outcome Measure for Hearing Aid Services // J. Am. Acad. Audiol. — 1999. — Vol. 10. — P. 80–103.
6. Gatehouse S. The Glasgow Hearing Aid Benefit Profile: What it measures and how to use it // Hear. J. — 2000. — Vol. 53. — № 3. — P. 10–18.
7. Kemker B. E., Holmes A. E. Analysis of Prefitting versus Postfitting Hearing Aid Orientation Using the Glasgow Hearing Aid Benefit Profile (GHABP) // J. Am. Acad. Audiol. — 2004. — Vol. 15. — P. 311–323.
8. Stephens D., Hetu R. Impairment, disability and handicap in audiology: towards a consensus // Audiology. — 1991. — Vol. 30. — P. 185–200.

9. Whitmer W. M., Howell P., Akeroyd M. A. Proposed norms for the Glasgow hearing aid benefit profile (GHABP) questionnaire // Int. J. Audiol. — 2014. — Vol. 53. — № 5. — P. 345–351.

РЕЗЮМЕ

Л. Е. Голованова, Е. В. Жилинская, М. Ю. Бобошко

Анализ результатов слухопротезирования с помощью анкеты «Глазговский профиль эффективности слухового аппарата»

Анкета «Глазговский профиль эффективности слухового аппарата» апробирована на 164 пациентах со 2–4-й степенью хронической двусторонней сенсоневральной тугоухости. Показана целесообразность ее использования в сложных для слухопротезирования случаях.

Ключевые слова: хроническая двусторонняя тугоухость, «Глазговский профиль эффективности слухового аппарата».

SUMMARY

L. E. Golovanova, E. V. Zhilinskaya, M. Yu. Boboshko

Analysis of the results of hearing aids fitting using the questionnaire «Glasgow Hearing Aid Benefit Profile»

164 patients with moderate to severe chronic bilateral sensorineural hearing loss were asked to fill in the Glasgow hearing aid benefit profile. Its usefulness was showed in cases of difficult hearing aid fitting.

Key words: chronic bilateral hearing loss, «Glasgow Hearing Aid Benefit Profile».

© Коллектив авторов, 2015 г.
УДК [616.24-036.12-036.65:616.155.3]:575.17

**Н. Д. Елшин, А. Б. Чухловин,
Н. А. Кузубова, И. А. Шаханова,
О. Н. Титова**

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *GR*, *COX2* И *ММР1* В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ В ПРОЦЕССЕ ТЕРАПИИ ОБОСТРЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Кафедра клинической лабораторной диагностики, НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой, НИИ пульмонологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова

ВВЕДЕНИЕ

Патогенез хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) связан с локальными хроническими воспалительными процессами, в частности, с повышением уровней ТНФ, ИЛ-6, матриксных металлопротеиназ в мокроте и бронхиальных смывах [6]. Так, исследование *ex vivo* легочной ткани больных ХОБЛ показало, что в ранние сроки после

стимуляции бактериальным эндотоксином происходит секреция TNF-альфа, а в дальнейшем происходит выработка ИЛ-6, CXCL8 и ИЛ-10 [7]. Матриксные металлопротеиназы (ММР-1, -2, -9, -12) и другие коллагенолитические ферменты непосредственно участвуют в ремоделировании и фибротизации легочной ткани при ХОБЛ [5]. Наиболее важными продуцентами вышеперечисленных факторов являются макрофаги и пневмоциты. Известно также, что клетки легочной паренхимы у больных ХОБЛ имеют повышенную экспрессию циклооксигеназ-1 и -2 [13].

Кроме того, у многих больных ХОБЛ наблюдаются признаки системного воспаления. Так, в работе [2] изучалась относительная прогностическая значимость ряда сывороточных биомаркеров системного воспаления (С-реактивного белка, ИЛ-6, ТНФ и др.). Среди пациентов с признаками системного воспаления отмечалась более высокая частота обострений и смертность. Выявлены взаимосвязи между рядом основных диагностических компонентов, в частности, с числом нейтрофилов в мокроте, уровнями ИЛ-8 и ТНФ-альфа в плазме крови, а также показателями ОФВ1 и уровнями С-реактивного белка в сыворотке крови [12]. В недавнем исследовании [3] было обнаружено повышение хемотаксиса нейтрофилов под влиянием CXCL8 у курильщиков, в том числе у пациентов

с ХОБЛ, а также связь между индуцированной миграцией нейтрофилов и уровнями TNF-альфа в сыворотке крови, что может отражать его роль в активации лейкоцитов при ХОБЛ.

Лечение больных ХОБЛ в период обострения включает в себя комбинированные схемы лечения с применением ингаляций М-холинолитиков, бета-агонистов адренорецепторов, глюкокортикостероидов (ГКС) и антибактериальной терапии, с целью достижения бронхолитического и противовоспалительного эффекта. Популяции лейкоцитов крови могут быть объектом этих медикаментозных воздействий.

В связи с этим нас интересовал вопрос об изменениях уровней экспрессии генов рецепторов глюкокортикостероидов (*GR*), циклооксигеназы-2 (*COX-2*), матриксной металлопротеиназы-1 (*MMP-1*) в периферических лейкоцитах у больных ХОБЛ при лечении клинических обострений данного заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе выполнения пилотного проекта нами был обследован 41 пациент с ХОБЛ, поступивший в городской Пульмонологический центр (Введенская городская клиническая больница) для лечения по поводу обострения заболевания, из них 80 % – мужского пола. Возраст пациентов составлял от 59 до 85 лет (медиана – 66,5 года). В соответствии с классификацией GOLD (2014), на момент исследования больные относились к группе D.

Базовая терапия включала спириву (тиотропиум бромид) – 18 мкг 1 раз в сутки, а также форадил комби (формотерол + будесонид) – 400 мкг/12 мг 2 раза в сутки. В период обострения заболевания дополнительно назначались антибактериальные препараты и усиливалась бронхолитическая терапия, а именно – ингаляции беродуала – 1 мл (через небулайзер) 2 раза в сутки. При поступлении и по завершении лечения проводилось спирометрическое исследование на аппарате «Мастер-Скрин» (*E. Jaeger*, Германия). Отклонение спирометрических параметров оценивалось по градации [1]. Содержание лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, а также сывороточные маркеры системного воспаления (С-реактивный белок и др.) определяли по стандартным методикам в лаборатории Введенской городской клинической больницы.

Кроме того, нами проводилась количественная оценка экспрессии ряда генов, имеющих отношение к уровням воспалительной реакции и ее динамике после лечения: гена рецептора глюкокортикостероидов (*GR*), циклооксигеназы-2 (*COX2*) и матриксной металлопротеиназы-1 (*MMP-1*) в лейкоцитах крови. Тотальную мРНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом селективной сорбции с помощью набора GeneJET RNA

Purification Kit (*Thermo Scientific*). Затем получали суммарные кДНК путем обратной транскрипции. Для синтеза кДНК использовался набор RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (*Thermo Scientific*). Геноспецифическую амплификацию кДНК (*GR*, *COX2*, *MMP1* и *GAPDH*) осуществляли в количественном варианте (real-time PCR) на приборе ICycler IQ5 (Bio-Rad) с применением флуоресцентных Taqman-зондов и специфических праймеров, описанных ранее [4, 8, 9, 14]. Для постановки ПЦР использовалась ПЦР-смесь со стандартным набором реагентов «ПЦР-комплект» фирмы «Синтол» (Москва), в которую добавляли соответствующие кДНК, праймеры и флуоресцентные зонды. ПЦР проводили по стандартной программе с двухшаговым циклом (40 повторов), с денатурацией при 95° в течение 15 секунд и отжигом праймеров и элонгацией при 60° в течение 40 секунд.

Уровни экспрессии генов оценивали как соотношение значений порогового цикла (Ct) для целевых генов (*MMP1*, *GR*, *COX2*) и референс-гена *GAPDH*. Основным показателем при оценке результатов исследования было соотношение активности целевых генов (Ag), определявшееся по формуле: $Ag = 1/Ct \text{ целевого гена} / Ct \text{ референс-гена}$. Этот показатель использовался далее для реальной оценки повышения или понижения уровней специфического гена в индивидуальных образцах мРНК из лейкоцитов крови. Полученные ряды экспериментальных значений обрабатывали с применением корреляционного анализа (критерий Спирмена) и параметрической статистики (критерий Стьюдента) с помощью пакета программ «STATISTICA 6.0».

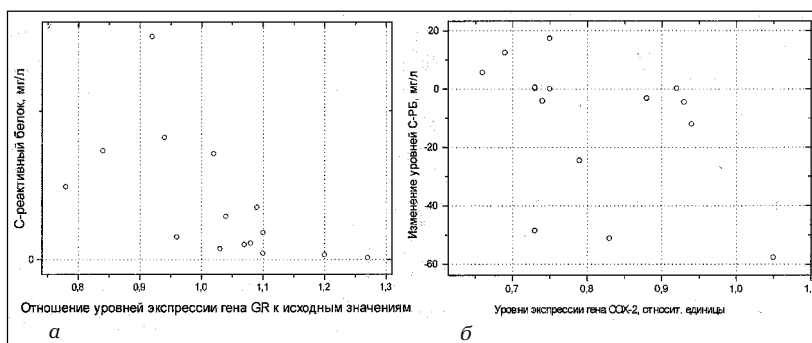
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные об относительных уровнях экспрессии изученных генов до и после курса проведенной терапии приведены на таблице. Видно, что в целом по выборке не имеется достоверных различий в экспрессии данных генов между исходными и пост-

Сравнительные уровни мРНК ряда фармакогенов в лейкоцитах больных ХОБЛ до и после курса бронхолитического лечения

Ген	Период исследования	Средние значения (M±m)	Медиана и пределы выборки	Уровень достоверности P
<i>GR</i>	До лечения	0,81±0,01	0,69–1,14 (0,79)	0,29
	После лечения	0,84±0,02	0,69–1,24 (0,81)	
<i>COX2</i>	До лечения	0,84±0,02	0,68–1,16 (0,82)	0,86
	После лечения	0,83±0,02	0,66–1,05 (0,83)	
<i>MMP-1</i>	До лечения	0,74±0,02	0,58–1,05 (0,69)	0,62
	После лечения	0,76±0,02	0,59–0,97 (0,73)	

Примечание: приводятся данные по 41 пациенту до лечения и 31 – после курса терапии. Различия между подгруппами достоверны при $P \geq 0,05$.



Обратная корреляционная зависимость между изменениями концентрации С-реактивного белка после курса комплексной бронхолитической и антибактериальной терапии и относительными уровнями экспрессии генов *GR* (а), *COX-2* (б)

терапевтическими показателями. Однако отмечается значительный разброс по индивидуальным показателям генной экспрессии, что дает основания провести анализ корреляций с клиническими и лабораторными показателями пациентов.

При статистическом анализе мы выявили достоверное повышение экспрессии мРНК глюкокортикоидного рецептора (*GR*) в лейкоцитах у леченных больных с III – IV стадией по сравнению с пациентами во II стадии ХОБЛ ($0,85 \pm 0,02$ против $0,79 \pm 0,01$ соответственно, $P = 0,02$).

На рисунке показаны корреляционные отношения между экспрессией мРНК генов, кодирующих глюкокортикоидные рецепторы (*GR*), циклооксигеназу-2 (*COX-2*), и динамикой сыровоточного С-реактивного белка (по данным от 16 пациентов, имеющих результаты до и после лечения). Из рисунка, а видно, что концентрации С-РБ после лечения тем ниже, чем более повышена экспрессия гена *GR* ($r = -0,79$; $P < 0,0001$ по критерию Спирмена), что согласуется с известным противовоспалительным действием ГКС. Достоверная корреляция показана также между изменением уровней С-РБ в сыворотке в ходе лечения и повышением экспрессии гена *COX2* ($r = -0,55$; $P = 0,01$).

Наряду со снижением уровней С-реактивного белка, важным показателем лечебного эффекта является уменьшение значений СОЭ у больных в процессе лечения. Анализ данных показал, что имеется четкая зависимость между снижением СОЭ и повышением экспрессии гена *GR* ($r = -0,48$; $P = 0,001$), а также *MMP-1* в лейкоцитах ($r = -0,49$, $P = 0,01$).

При анализе наших данных об экспрессии фармакогенов в лейкоцитах следует подчеркнуть, что активность исследованных генов при лечении может определяться совместным действием глюкокортикоидов и бронхолитических препаратов на отдельные клеточные популяции. Так, экспрессия рецепторов глюкокортикостероидов (ГКС) наблю-

дается, в частности, в макрофагах и лимфоцитах [10]. Интересно, что рецепторы ГКС определяются в 100 % нейтрофилов периферической крови, что коррелирует с их чувствительностью к ГКС (по ингибированию выработки TNF α). В нашем исследовании выявлены обратные корреляции между экспрессией мРНК-рецепторов ГКС и показателями воспаления (С-реактивный белок, СОЭ). Таким образом, уровни экспрессии гена *GR* на лейкоцитах могут отражать степень их чувствительности к противовоспалительной терапии ГКС.

Как известно, активность циклооксигеназы-2 в иммунных клетках (в частности, моноцитах/макрофагах) является важным звеном в развитии воспаления. Роль повышенной активности ЦОГ-2 в генезе хронической легочной патологии показана в экспериментах на крысах с эмфиземой легких [11]. В нашем исследовании активность гена *COX2* была тем выше, чем более снижались концентрации С-реактивного белка после терапии. Таким образом, повышенная активность гена циклооксигеназы-2 коррелировала с выраженным противовоспалительным эффектом.

ВЫВОДЫ

Количественная оценка экспрессии генов *GR*, *COX2* и *MMP1*, контролирующая важные этапы системного воспаления при ХОБЛ, позволяет выявить существенные связи между изменением активности генов и эффектами комплексного лекарственного лечения по общепринятым лабораторным показателям (С-реактивный белок, СОЭ). Дальнейшие исследования должны касаться активации данных генов в различных популяциях лейкоцитов крови у пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клемент П. Ф. Инструкции по применению формул и таблиц должных величин основных спирометрических показателей / П. Ф. Клемент, А. А. Лаврушин, Ю. Н. Котелов, П. А. Тер-Погосян. — Л., 1986.
2. Agusti A., Edwards L. D., Rennard S. I. et al. Evaluation of COPD longitudinally to identify predictive surrogate endpoints (ECLIPSE) investigators. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype // PLoS One. — 2012. — № 7(5). — P. e37483. doi: 10.1371/journal.pone.0037483.
3. Blidberg K., Palmberg L., Dahlen B. et al. Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease // Respirology. — 2012. — Vol. 17 (5). — P. 854 – 860.
4. Cavalcante L. O., Melo M. R., Dinis V. G. et al. Quantitation of glucocorticoid receptor alpha and NF- κ B pathway mRNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis

patients // *Genet. Mol. Res.* — 2010. — Vol. 9 (4). — P. 2300–2310.

5. *Churg A., Zhou S., Wright J. L.* Series «matrix metalloproteinases in lung health and disease»: Matrix metalloproteinases in COPD // *Eur. Respir. J.* — 2012. — Vol. 39 (1). — P. 197–209.

6. *Gao P., Zhang J., He X. et al.* Sputum inflammatory cell-based classification of patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease // *PLoS One.* — 2013. — № 8(5). — P. e57678. doi: 10.1371/journal.pone.0057678.

7. *Hackett T. L.* Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an *ex vivo* study / *T. L. Hackett, R. Holloway, S. T. Holgate, J. A. Warner* // *Respir. Res.* — 2008. — № 9. — P. 47. doi: 10.1186/1465-9921-9-47.

8. *Jordan R. C. K., Macabeo-Ong M., Shiboski C. H. et al.* Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA // *Clin. Cancer Res.* — 2004. — Vol. 10. — P. 6460–6465.

9. *Patel N., Itakura T., Gonzalez J. M. Jr. et al.* GPR158, an Orphan Member of G Protein-Coupled Receptor Family C: Glucocorticoid-stimulated expression and novel nuclear role // *PLoS ONE.* — 2013. — № 8 (2). e57843. doi:10.1371/journal.pone.0057843

10. *Plumb J., Gaffey K., Kane B. et al.* Reduced glucocorticoid receptor expression and function in airway neutrophils // *Int. Immunopharmacol.* — 2012. — Vol. 12(1). — P. 26–33.

11. *Roh G. S., Yi C. O., Cho Y. J. et al.* Anti-inflammatory effects of celecoxib in rat lungs with smoke-induced emphysema // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 2010. — Vol. 299 (2). — P. L184–L191.

12. *Roy K., Smith J., Kolsum U. et al.* COPD phenotype description using principal components analysis. // *Respir. Res.* — 2009. — № 10. — P. 41. doi: 10.1186/1465-9921-10-41.

13. *Xaubet A., Roca-Ferrer J., Pujols L. et al.* Cyclooxygenase-2 is up-regulated in lung parenchyma of chronic obstructive pulmonary disease and down-regulated in idiopathic pulmonary fibrosis // *Sarcoidosis. Vasc. Diffuse Lung Dis.* — 2004. — Vol. 21(1). — P. 35–42.

14. *Xi H., Baldus S. E., Warnecke-Eberz U. et al.* High cyclooxygenase-2 expression following neoadjuvant radiochemotherapy is associated with minor histopathologic response and poor prognosis in esophageal cancer. // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11. — P. 8341–8347.

РЕЗЮМЕ

Н. Д. Елшин, А. Б. Чухловин, Н. А. Кузубова, И. А. Шаханова, О. Н. Титова

Экспрессия генов *GR, COX2* и *MMP1* в лейкоцитах крови больных в процессе терапии обострения хронической обструктивной болезни легких

Цель работы — анализ экспрессии генов, контролируемых отдельные этапы воспалительного процесса при комплексной терапии хронической обструктивной болезни

легких (ХОБЛ). Оценка активности генов *GR, COX-2* и *MMP-1* в лейкоцитах крови проводилась у 41 пациента с обострениями ХОБЛ (II–III стадия, группа D по GOLD), проходившего 2-недельный курс лечения с применением ингаляций тиотропия бромидом, формотерола, глюкокортикостероидов (ГКС) и антибактериальной терапии. До и после лечения определяли содержание мРНК генов циклооксигеназы-2, рецепторов ГКС и матричной металлопротеиназы-1 (*COX2, GR, MMP-1*) в лейкоцитах крови больных с применением ПЦР в реальном времени. Средние уровни экспрессии изученных генов не различались достоверно в сроки до и после лечения. Выявлены высокодостоверные корреляции между изменениями экспрессии генов *COX2, MMP1* и *GR*, обратная корреляция между экспрессией генов *COX2, GR* и позитивной динамикой уровней сывороточного С-реактивного белка в процессе лечения. Результаты работы подтверждают наличие взаимосвязей между изменениями экспрессии данных генов, модулирующих процесс воспаления, и улучшением клинических показателей при комплексной лекарственной терапии ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, комплексная терапия, лейкоциты, экспрессия генов, *COX2, MMP1, GR*.

SUMMARY

N. D. Yelshin, A. B. Chukhlovin, N. A. Kuzubova, O. N. Titova

Expression of *GR, COX2* and *MMP1* genes in peripheral blood leukocytes after intensive therapy of the patients with chronic obstructive lung disease

Our study was aimed at analysis of expression of genes controlling individual stages of an inflammatory process in combined therapy of chronic obstructive lung disease (COPD). Evaluation of activity of *GR, COX-2*, and *MMP1* genes in blood leukocytes was determined in forty one patients with COPD exacerbations (GOLD stage II to III, Group D) who underwent a two-week combined treatment including Tiotropium Bromide, Formoterol, and glucocorticoid inhalations, as well as parenteral antibacterial treatment. Before and after treatment, relative content of specific mRNAs for *GR, GC* receptors, and matrix metalloproteinase-1 (*COX-2, GR*, and *MMP1*) genes were determined with real-time PCR. Mean values of the gene expression did not significantly differ between the pre- and post-treatment time points. We have found, however, a highly significant correlation between individual changes of the *COX2, MMP1* and *GR* gene expression, as well as reverse correlation between *COX2, GR* expression and positive changes in C-reactive protein levels following treatment course. The results of study confirm some interrelations between changes in expression of the inflammation-modulating genes and improvement of clinical parameters after combined drug therapy of the COPD.

Key words: chronic obstructive lung disease, combined therapy, leukocytes, gene expression, *COX2, MMP1, GR*.