

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.09

ЭКСПРЕССИЯ ИЗОФОРМ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА АЛЬФА И БЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БРОНХООБСТРУКТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ

© А. С. Улитина,^{1,4,*} Е. И. Всеволодская,² Ж. А. Миронова,² С. Д. Горбунков,³
А. Л. Акопов,³ С. Н. Пчелина,^{1,4} В. И. Трофимов²

¹ Отдел молекулярно-генетических и нанобиологических технологий
Первого С.-Петербургского государственного медицинского
университета им. акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ,
Санкт-Петербург, 197022,

² Кафедра госпитальной терапии Первого С.-Петербургского государственного медицинского
университета им. акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022,

³ Отдел торакальной хирургии Первого С.-Петербургского государственного медицинского
университета им. акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022, и

⁴ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300;

* электронный адрес: anna.s.ulitina@yandex.ru

При хронической бронхообструктивной патологии широко применяются глюкокортикостероиды, действующие через глюкокортикоидный рецептор (ГР). ГР α является основной функциональной изоформой, а ГР β — ее антагонистом. Для поиска корреляций между экспрессией данных изоформ в периферической крови и индивидуальной вариабельностью ответа на глюкокортикостероиды мы определили уровни мРНК ГР α и ГР β у лиц с хронической бронхообструктивной патологией (бронхиальная астма (БА), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), сочетание БА + ХОБЛ), соотнесли уровни мРНК с результатами клинического обследования пациентов ($n = 72$); также мы сравнили уровни мРНК данных изоформ в периферической крови и биоптатах легких. Мы выявили сниженную экспрессию ГР α и ГР β у пациентов с БА по сравнению как с БА + ХОБЛ, так и с контрольной группой ($n = 32$). У пациентов с БА + ХОБЛ уровень мРНК ГР α обратно коррелировал с количеством обострений, более высокая экспрессия ГР β была ассоциирована с легочной гипертензией и профессиональными вредностями в анамнезе, а соотношение ГР α/β прямо коррелировало с количеством эозинофилов в крови и было снижено при выраженном бронхоспазме. У пациентов с ХОБЛ мы обнаружили прямую корреляцию экспрессии ГР α и ГР β в периферической крови и тканях легких. Таким образом, изменение экспрессии изоформ ГР α и ГР β при БА выражено сильнее, чем при БА + ХОБЛ. При БА + ХОБЛ снижение экспрессии ГР α и повышение экспрессии ГР β ассоциированы с более тяжелым течением заболевания и сниженной стероидочувствительностью. Уровень экспрессии ГР α и ГР β в периферической крови отражает их тканеспецифическую экспрессию в легких у пациентов с ХОБЛ тяжелого течения.

Ключевые слова: бронхообструктивная патология, глюкокортикостероиды, глюкокортикоидный рецептор, ген *NR3C1*, экспрессия

Принятые сокращения: БА — бронхиальная астма, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, ГКС — глюкокортикостероиды, ГР — глюкокортикоидный рецептор.

Хроническая бронхообструктивная патология, в первую очередь бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), является актуальной медицинской и социальной проблемой. Многие пациенты с указанными заболеваниями нуждаются в терапии глюкокортикостероидами (ГКС) (Barnes, 2006). ГКС действуют преимущественно через глюкокортикоидный рецептор (ГР), кодируемый геном *NR3C1*. На индивидуальную вариабельность ответа на ГКС-терапию (стероидочувст-

вительность) при интерстициальных заболеваниях легких влияет экспрессия изоформ ГР α и ГР β (Pujols et al., 2004), однако роль этих генетических детерминант при бронхообструктивной патологии изучена недостаточно, особенно с учетом возможных межпопуляционных различий. Также нуждается в выяснении важный практический вопрос: можно ли по экспрессии ГР α и ГР β в периферической крови судить об их тканеспецифической экспрессии в легких? В настоящем исследовании нами были постав-

лены задачи определить уровни мРНК ГР α , ГР β у лиц с хронической бронхообструктивной патологией (БА, ХОБЛ и сочетание БА+ХОБЛ) и в контрольной группе, сравнить уровни мРНК в периферической крови и в биоптатах легких, а также соотнести уровни мРНК с результатами клинического обследования пациентов.

Материал и методика

Исследование проводили на базе Первого С.-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова. Образцы периферической крови собирали у 104 жителей Северо-Западного региона России с диагнозами БА легкой степени тяжести ($n = 29$, средний возраст 31.5 ± 13.0 лет, 16 мужчин и 13 женщин), ХОБЛ тяжелой или крайне тяжелой степени тяжести ($n = 12$, средний возраст 51.7 ± 9.3 года, 12 мужчин), сочетание БА + ХОБЛ ($n = 31$, средний возраст 63.7 ± 9.7 года, 18 мужчин и 13 женщин). В контрольную группу включили лиц без бронхолегочной патологии ($n = 32$, средний возраст 64.1 ± 16.6 года, 13 мужчин и 19 женщин). Всем пациентам проводили стандартное лабораторно-инструментальное обследование. Кроме того, у пациентов с ХОБЛ тяжелой или крайне тяжелой степени тяжести ($n = 8$) в ходе хирургического лечения были получены биоптаты легких.

Определение экспрессии ГР α и ГР β выполняли у всех обследованных в образцах периферической крови, а у пациентов после хирургического вмешательства — также в биоптатах легких методом триплексной ПЦР в реальном времени (TaqMan). После выделения общей РНК и проведения обратной транскрипции относительная нормализованная экспрессия ГР α и ГР β определена в приборе CFX96 (Bio-Rad, США) с эндогенным контролем — генами *GNB2L1* и *GAPDH*. Праймеры (3'—5') и зонды: ГР α -F-ctc-ctt-aac-tat-tgc-ttc-caa-aca-ttt, ГР α -R-gtattct-gat-tgg-tga-tga-ttt-cag-c, ГР α -FAM-tgg-ata-aga-cca-tgagta-ttg-aat-tcc-ccg-a-BHQ-1, ГР β -F-cat-taa-tct-gat-ttt-catccc-aac-aat-c, ГР β -R-ttg-aca-acg-aag-tgc-aca-taa-tc, ГР β -FAM-tgg-cgc-tca-aaa-aat-aga-act-caa-tga-gaa-aa-BHQ-1, *GNB2L1*-F-atc-aag-cta-tgg-aat-acc-ctg-g, *GNB2L1*-R-ggagac-gat-gat-agg-gtt-gc, *GNB2L1*-R6G-ctc-aga-gtg-ggt-gctt-ttg-tgt-ccg-c-BHQ-1, *GAPDH*-F-cca-ctc-ctc-cac-ctt-tga-c, *GAPDH*-R-gtg-gtc-cag-ggg-tct-tac-tc и *GAPDH*-Cy5-ttg-ccc-tca-acg-acc-act-ttg-tca-BHQ-2. Протокол ПЦР: 95 °C — 5 мин, далее 47 циклов амплификации (95 °C — 15 с, 60 °C — 50 с).

Использованные реактивы: Среда-РНК (АмплиСенс®, Россия), RNAlater™ (Ambion, США), РИБО-золь-В (АмплиСенс®, Россия), RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Германия), РЕВЕРТА-L (АмплиСенс®, Россия), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой (Синтол, Россия).

Статистическую обработку выполняли в программе SPSS 22.0. Различия считали значимыми при $P < 0.05$. Коэффициент корреляции рассчитывали по методу Спирмена. В выборке БА + ХОБЛ с логнормальным распределением уровней мРНК использовали логарифмическое преобразование. Нормально распределенные данные представлены как среднее арифметическое и среднеквадратичное отклонения, в прочих случаях — как медиана и квартили.

Результаты и обсуждение

Уровни мРНК в группах обследованных нами лиц различались (см. таблицу). Экспрессия ГР α и ГР β снижена в группе БА по сравнению как с группой БА + ХОБЛ, так и с контрольной группой. Мы полагаем, что на уровни мРНК изоформ ГР влияют патогенетические особенности указанных болезней органов дыхания. Сочетание БА + ХОБЛ, до недавнего времени именовавшееся «перекрестным синдромом», характеризуется патофизиологическими и терапевтическими особенностями по сравнению с изолированными БА и ХОБЛ, поэтому выделение таких пациентов в особую группу обосновано и целесообразно в соответствии с новейшими клиническими рекомендациями (GINA-GOLD, 2017). У пациентов с БА + ХОБЛ мы выявили ассоциации уровней мРНК с клиническими данными. Так, экспрессия ГР α обратно коррелировала с количеством обострений ($r = -0.440$; $P = 0.013$), что отражает снижение защитного действия данной изоформы, описанного ранее (Lu, Cidlowski, 2004) и снижение стероидочувствительности, поскольку количество обострений прямо коррелировало с дозой внутривенных ГКС ($r = 0.409$; $P = 0.003$) и продолжительностью терапии ГКС ($r = 0.745$; $P = 0.008$). Уровень мРНК ГР β был выше у пациентов с профессиональными вредностями в анамнезе ($n = 14$), чем без таковых (1.19 ± 0.65 против 0.78 ± 0.36 соответственно; $P = 0.030$), а также у пациентов с осложнением в виде легочной гипертензии ($n = 9$), чем без такового (1.26 ± 0.58 против 0.71 ± 0.22

Уровни мРНК изоформ глюкокортикоидного рецептора альфа и бета в периферической крови в группах обследованных лиц

| Ген | Уровень мРНК, отн. ед. | | | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| | Группы обследованных лиц | | | |
| | пациенты с бронхообструктивными патологиями | | | контроль (n = 32) |
| БА + ХОБЛ (n = 31) | БА (n = 29) | ХОБЛ (n = 12) | | |
| ГР α | 0.886 (0.665; 1.045) | 0.534 ^{a, 6} (0.381; 0.546) | 0.848 (0.344; 2.041) | 0.808 (0.690; 1.063) |
| ГР β | 0.790 (0.579; 1.241) | 0.436 ^a (0.239; 0.856) | 0.697 (0.209; 1.485) | 0.957 (0.643; 1.346) |

Примечание. Данные представлены в виде медианы и квартилей; ^aотличия показателей от других групп пациентов ($P < 0.005$); ⁶отличия показателей от контрольной группы ($P = 0.01$); n — количество обследованных.

соответственно; $P = 0.038$). Соотношение уровней экспрессии $GR\alpha/\beta$ снижено у пациентов с выраженным бронхоспазмом ($n = 10$) по сравнению с лицами с умеренным бронхоспазмом (0.82 ± 0.28 против 1.38 ± 0.62 ; $P < 0.001$).

У лиц с нейтрофильным воспалением в мокроте отмечена тенденция к повышению экспрессии $GR\beta$ по сравнению с пациентами с нейтрофилами мокроты менее 40 % (0.03 ± 0.20 против 0.12 ± 0.17 соответственно; $P = 0.056$). Соотношение экспрессии $GR\alpha/\beta$ прямо коррелировало с количеством эозинофилов в крови ($r = 0.367$; $P = 0.042$). Мы полагаем, что повышение экспрессии $GR\alpha$ и снижение $GR\beta$ способствует большей стероидочувствительности за счет преобладания эозинофильного воспаления в крови и снижения нейтрофильного воспаления в мокроте. Наши результаты согласуются с данными как российских (Федосеев и др., 2015), так и зарубежных (Jiang, Zhu, 2016; Leung, Sin, 2017) авторов.

Мы выявили прямую корреляцию уровней мРНК в периферической крови и в биоптатах легких для $GR\alpha$ ($r = 0.765$; $P = 0.027$) и $GR\beta$ ($r = 0.708$; $P = 0.050$). Эти результаты свидетельствуют о связи регуляторных механизмов на системном и локальном (органном) уровнях, и такой подход имеет перспективы практического применения, поскольку позволяет судить об органоспецифических процессах без сложной и травматичной процедуры забора образцов легочной ткани.

Таким образом, изменение уровней экспрессии изоформ $GR\alpha$ и $GR\beta$ при БА выражено сильнее, чем при сочетании БА + ХОБЛ. При сочетании БА + ХОБЛ снижение экспрессии $GR\alpha$ и повышение экспрессии $GR\beta$ ассоциировано с более тяжелым течением заболевания и сниженной стероидочувствительностью. Кроме того, уровни экспрессии $GR\alpha$ и $GR\beta$ в периферической крови отражают их тканеспецифическую экспрессию в легких.

Список литературы

- Федосеев Г. Б., Трофимов В. И., Негруца К. В., Тимчик В. Г., Зуева Е. Е., Горовнева Е. В., Рогачевская Н. Н., Разумовская Т. С., Александрин В. А., Голубева В. И., Бируля И. В., Филиппова Н. А., Крякунов К. Н. 2015. Характеристика мокроты для оценки наличия и характера воспаления бронхолегочного аппарата у больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких. Рос. аллергол. журн. 1 : 15—26. (Fedoseev G. B., Trofimov V. I., Negrutsa K. V., Timchik V. G., Zueva E. E., Gorovneva E. V., Rogachevskaya N. N., Razumovskaya T. S., Alexandrin V. A., Golubeva V. I., Birulya I. V., Filippova N. A., Kryakunov K. N. 2015. Sputum characteristics and evaluation of airways inflammation peculiarities in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Rus. Allergol. J. 1 : 15—26.)
- Barnes P. J. 2006. Corticosteroids: the drugs to beat. Eur. J. Pharmacol. 533 : 2—14.
- GINA-GOLD-2017. Diagnosis and initial treatment of asthma, COPD and asthma-COPD overlap (Официальный электронный ресурс). Режим доступа: <http://ginasthma.org/>
- Jiang Z., Zhu L. 2016. Update on molecular mechanisms of corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. Pulm. Pharmacol. Ther. 37 : 1—8.
- Leung J. M., Sin D. D. 2017. Asthma-COPD overlap syndrome: pathogenesis, clinical features, and therapeutic targets. BMJ. 358 : j3772.
- Lu N. Z., Cidlowski J. A. 2004. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. Ann. N. Y Acad. Sci. 1024 : 102—123.
- Pujols L., Xaubet A., Ramirez J., Mullol J., Roca-Ferrer J., Torrego A., Cidlowski J. A., Picado C. 2004. Expression of glucocorticoid receptors alpha and beta in steroid sensitive and steroid insensitive interstitial lung diseases. Thorax. 59 : 687—693.

Поступила 7 III 2018

EXPRESSION OF THE GLUCOCORTICOID RECEPTOR ALPHA AND BETA ISOFORMS IN OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE

A. S. Ulitina,^{1,4,*} E. I. Vsevolodskaya,² Zh. A. Mironova,² S. D. Gorbunkov,³
A. L. Akopov,³ S. N. Pchelina,^{1,4} V. I. Trofimov²

¹ Department of Molecular, Genetic and Nanobiological Technologies, I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, 197022,

² Department of Hospital Therapy, I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, 197022,

³ Department of Thoracic Surgery, I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, 197022, and

⁴ B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Leningrad Region, 188300;

* e-mail: anna.s.ulitina@yandex.ru

Glucocorticosteroids are widely used in chronic obstructive lung pathology, and they act *via* glucocorticoid receptor (GR). $GR\alpha$ and $GR\beta$ are antagonists, and $GR\alpha$ is a main functional isoform. The purposes of our study were to assess mRNA levels of $GR\alpha$ and $GR\beta$ in subjects with chronic obstructive lung pathology (asthma (BA), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and BA+COPD overlap). We have also compared mRNA levels in the peripheral blood and the lung biopsies and searched for relationship between mRNA levels and the clinical examination data. 72 patients and control group ($n = 32$) were included in the study. We showed the decrease of $GR\alpha$ and $GR\beta$ expression in patients with BA compared to both BA+COPD overlap and control group. In BA+COPD overlap, $GR\alpha$ mRNA level was negatively correlated with the exacerbation rate, and the expression of $GR\beta$ was associated with the lung hypertension and industrial pollutants in anamnesis; $GR\alpha/\beta$ ratio was correlated with blood eosinophils count, and it was decreased in subjects with severe bronchospasm. In COPD patients, we showed a positive correlation between isoforms expression in the peripheral

blood and the lung tissue for both GR α and GR β . We may conclude that the change in the GR α and GR β expression in BA group is greater than in BA+COPD group. In BA+COPD group the decrease in the GR α expression, as well as the increase in the GR β expression, are associated with the more severe disease course. GR α and GR β expression in the peripheral blood reflects their organ-specific expression in the lung tissue.

Key words: obstructive lung pathology, glucocorticosteroids, glucocorticoid receptor, *NR3C1* gene, expression
