

Влияние полиморфизма гена индуцибельной NO-синтазы на достижение контроля бронхиальной астмы у детей на фоне терапии ингаляционными кортикостероидами*

Смирнова И.Ю., Петрова И.В., Деев И.А.

Influence of polymorphism of the gene of inducible NO-synthase on the achievement of control of bronchial asthma in children against the background of inhalation corticosteroid therapy

Smirnova I.Yu., Petrova I.V., Deyev I.A.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Смирнова И.Ю., Петрова И.В., Деев И.А.

Проведено исследование полиморфизма гена индуцибельной no-синтазы (*iNOS*) у 65 детей, страдающих бронхиальной астмой (БА). Цель исследования – установить вероятность достижения контроля БА у детей на фоне лечения ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) в зависимости от полиморфизма гена *iNOS*. Исследование генотипа полиморфизма гена *iNOS* осуществлялось методом полимеразной цепной реакции. Установлено, что достижение контроля болезни у детей на фоне лечения ИГКС ассоциировано с носительством гомозиготы «дикого» аллеля G полиморфизма G954C гена *iNOS*. Отсутствие контроля болезни сопряжено с наличием патологического аллеля C. Полученный результат может способствовать прогнозированию неконтролируемого течения БА у детей.

Ключевые слова: дети, бронхиальная астма, лечение, ингаляционные глюкокортикостероиды, полиморфизм, *iNOS*.

The polymorphism of the gene of inducible NO-synthase (*iNOS*) was studied in 65 children with bronchial asthma (BA). The goal was to determine the probability to achieve the BA control in children against the background of inhalation glucocorticosteroid (IGCS) therapy depending on the polymorphism of the *iNOS* gene. The genotype of polymorphism of the *iNOS* gene was studied by the method of polymerase chain reaction. It has been found that the achievement of BA control in children against the background of the IGCS treatment is associated with the carriage of homozygote of «wild» allele G of polymorphism G954C of the *iNOS* gene. The absence of BA control is related to the presence of pathological allele C. The result obtained can favor the prediction of the uncontrollable BA course in children.

Key words: children, bronchial asthma, treatment, inhalation corticosteroid, polymorphism, *iNOS*.

УДК 616.248-08:615.458:577.175.53:577.15:575.174.015.3

Введение

В настоящее время использование ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС) в лечении бронхиальной астмы (БА) у детей является наиболее эффективным, что связано с их выраженным противовоспалительным действием на различные звенья патогенеза болезни. Успех лечения БА зависит от множества факторов: используемого ИГКС, доза, регулярности лечения, способов доставки действующего вещества в бронхи [1, 5]. Но даже при регулярном использовании базисной терапии в аде-

кватной степени тяжести болезни дозе не всегда удается достичь полного контроля над болезнью, что может быть связано с внутренними

(генетическими) механизмами чувствительности к терапии. Так, например, установлено, что низкий уровень контроля БА у детей на фоне лечения ИГКС ассоциирован с полиморфизмом глюкокортикостероидного рецептора [3].

У больных БА отмечено увеличение экспрессии индуцибельной no-синтазы (*iNOS*) в макрофагах, эозинофилах, нейтрофилах, эпителии брон-

хов, влекущее за собой увеличение синтеза NO, что отражается повышением его концентрации в выдыхаемом воздухе [7, 8]. При этом происходит формирование реактивных форм азота, которые поддерживают аллергическое воспаление. Применение ИГКС приводит к снижению экспрессии iNOS, содержания NO в выдыхаемом воздухе как

вследствие прямого ингибирующего влияния кортикостероидов на ген iNOS, так и посредством уменьшения влияния провоспалительных факторов, увеличивающих экспрессию гена iNOS [1, 4, 9, 10].

Учитывая, что у детей, больных БА, iNOS вносит определенный вклад в формирование воспаления и патогенетических проявлений БА, целесообразным является изучение достижения контроля болезни на фоне лечения ИГКС в зависимости от полиморфизма гена iNOS.

Материал и методы

В рамках открытого проспективного клинико-фармакологического исследования в соответствии с критериями включения (исключения) обследовано 65 детей, в том числе 36 (56%) мальчиков, 29 (44%) девочек. Средний возраст пациентов составил $(10,36 \pm 4,16)$ года, продолжительность болезни $(4,21 \pm 0,73)$ года. В рамках протокола исследования для базисной терапии был использован ИГКС бекламетазона дипропионат (Беклазон Эко Легкое Дыхание) в дозе 200 мкг по 2 раза в день, для купирования симптомов болезни применялся короткодействующий β_2 -агонист сальбутамол (Саламол Эко Легкое Дыхание) в дозе 100–200 мкг по требованию в течение 24 нед. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом при Сибирском государственном медицинском университете (г. Томск) (№ 669 от 19.11.2007).

Больные среднетяжелой БА выбраны как наиболее показательные в плане оценки динамики клинических симптомов на фоне противовоспалительной терапии астмы.

Критерии включения больных в исследование:

- возраст пациентов от 5 до 17 лет;

- содержание иммуноглобулина (Ig) E в сыворотке крови не менее 100 МЕ/мл;

- пациенты, имеющие на момент включения в исследование один и более из признаков среднетяжелой БА: симптомы ежедневно, обострения могут нарушать активность и сон, ночные симптомы более 1 раза в неделю, ежедневный прием ингаляционных β_2 -агонистов короткого действия, объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁) или пиковая скорость выдоха (ПСВ) 60–80% от должных значений, вариабельность ПСВ или ОФВ₁ более 30% (GINA, 2006), и не получающие базисной противовоспалительной терапии, адекватной степени тяжести заболевания, в течение последних 4 нед до включения в исследование;

- умение правильно пользоваться ингалятором, пикфлоуметром;

- отсутствие острых респираторных заболеваний в течение 4 нед до скринингового визита в клинику.

Эффективность лечения оценивалась согласно критериям контроля БА, представленным в GINA (2006) [2]. С целью верификации диагноза и оценки суточной лабильности бронхов (СЛБ) проводилось мониторирование ПСВ в течение всего периода наблюдения пикфлоуметрами Mini-Wright. Перед назначением лечения, через 12 и 24 нед выполнялось спирометрическое исследование на аппарате MasterScope (Jaeger, Германия).

Выделение геномной ДНК из венозной крови обследуемых проводили методом фенолхлороформной экстракции. У всех больных изучали генотип следующих полиморфизмов: tandemные повторы промоторной области (ССТТТ)_n и (ТААА)_n и однонуклеотидная замена G954C промотора гена iNOS. Исследование генотипа осуществлялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров («Сибэнзим», г. Новосибирск):

iNOS (ССТТТ)_n (прямой 5'-ACC CCT GGA AGC CTA CAA CTGCAT-3');

iNOS (ССТТТ)_n (обратный 5'-GCC ACT GCA CCC TAGCCT GTC TCA-3');

iNOS (ТААА)_n (прямой 5'-ACC CCT GGA AGC CTA CAA CTGCAT-3');

iNOS (TAAA)_n (обратный 5'-GCC ACT GCA CCC TAGCCT GTC TCA-3');

iNOS G954C (прямой 5'-GTATGAGGTGGGGAG ACT CAGAAAGC-3');

iNOS G954C (обратный 5'-TTCTAAATGCCAAGA GCTTCAGC-3').

Статистическую обработку полученных результатов выполняли при помощи пакета программ Statistica for Windows 6.0. Данные представлены в виде $X \pm m$, где X — среднее арифметическое значение, m — ошибка среднего. Для оценки различия средних в попарно не связанных выборках применяли U -критерий Манна-Уитни, в связанных — критерий Вилкоксона. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$. Для сравнения частот качественных признаков использовался критерий χ^2 . Данные группировались в соответствии с задачами исследования. Для оценки вероятности развития события использован метод расчета отношения шансов (Odds ratio — OR) и относительного риска, который осуществлялся посредством программного продукта Statcalc.

Результаты и обсуждение

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 1. У всех больных на момент включения зарегистрированы частые дневные и ночные симптомы, высокая потребность в β_2 -агонистах короткого действия.

Таблица 1
Динамика клинико-функциональных показателей на фоне лечения ($X \pm m$)

Показатель	До лечения	На фоне лечения	
		Через 12 нед	Через 24 нед
Количество дневных симптомов в неделю	5,85 ± 0,55	1,00 ± 0,95*	0,76 ± 0,42*
Количество ночных симптомов в неделю	1,70 ± 0,26	0,20 ± 0,43	0,12 ± 0,08*
Количество эпизодов использования β_2 -агонистов короткого действия в неделю	6,40 ± 0,28	0,72 ± 0,67	0,22 ± 0,16*
ОФВ ₁ , %	89,33 ± 3,07	95,40 ± 4,21	100,08 ± 2,67*
ПСВ, %	90,94 ± 2,99	93,54 ± 2,17	104,16 ± 2,73*
СЛБ, %	24,45 ± 0,89	17,20 ± 0,82	12,34 ± 1,01*

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями до лечения.

Через 12 нед количество дневных и ночных симптомов, а также эпизодов использования сальбутамола значительно уменьшилось. Показатели ОФВ₁ и ПСВ увеличились и у 95% больных достигли уровня 80% и более от должного значения. Симптомы астмы у

40 (61,5%) пациентов через 12 нед лечения отсутствовали. Контроля над болезнью не достигли 6 больных: сохранялись дневные и ночные симптомы БА в среднем до 3 раз в неделю, требующие приема сальбутамола, регистрировалось ограничение в физической нагрузке, СЛБ в среднем у этих больных была (19,5 ± 0,78)%.

Через 24 нед базисной противовоспалительной терапии полный контроль над болезнью отмечен у 38 (58%) человек: отсутствовали клинические проявления БА и потребность в использовании β_2 -агонистов короткого действия, СЛБ составила (6,5 ± 0,5)%. Хороший контроль зарегистрирован у 21 (32%) пациента: отсутствовали ночные симптомы, но сохранялись дневные проявления астмы в течение недели ((2,00 ± 0,21) раза), ограничения в физической нагрузке (у 2 больных), СЛБ составила (13,7 ± 0,2)%. Показатели функции внешнего дыхания нормализовались у 62 (95,3%) больных. По-прежнему, как и на этапе 12 нед лечения, контроль астмы не был достигнут у 6 пациентов, у которых сохранялись симптомы (дневные до 4 раз в неделю, ночные — у 3 пациентов отсутствовали, у 4 больных — 3 эпизода пробуждения в неделю) и сохранялась частая потребность в использовании сальбутамола (более 3 раз в неделю). Показатели ПСВ и ОФВ₁ у пациентов, не достигших контроля над болезнью, составили (80,40 ± 1,35) и (79,9 ± 2,0)% соответственно, СЛБ — (17,3 ± 0,68)%.

В процессе анализа результатов исследования стратификация больных была проведена таким образом, чтобы ответить на вопрос: связана ли вероятность достижения контроля над болезнью с каким-либо из исследуемых полиморфизмов *iNOS*?

Для тандемных повторов (ССТТТ)_n и (ТААА)_n не обнаружено достоверной взаимо-

связи. Распределение генотипа полиморфизма G954C гена *iNOS* значимо различалось у больных с различным контролем БА (табл. 2). Наилучший эффект лечения достигнут у гомозигот по «дикому» аллелю G. Плохой контроль БА связан с патологическим аллелем C, наличие которого более чем в 4 раза увеличивает эту вероятность (OR = 3,39; CI 95%-й 1,31—8,94; *p* = 0,009).

Таблица 2
Распределение генотипов полиморфизма G954C гена *iNOS* у больных среднетяжелой БА и вероятность достижения полного контроля на фоне лечения ИГКС

Генотип	Контролируемая астма (38 человек)	Частично контролируемая и неконтролируемая астма (27 человек)	OR	CI 95%-й	<i>p</i>
GG	29	12	4,03	1,14—12,78	0,003
GC	8	12	0,36	0,1—1,24	0,11
CC	1	3	0,3	0,01—3,48	0,3

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: GG — гомозигота по аллелю G; GC — гетерозигота; CC — гомозигота по аллелю C; CI 95%-й — 95%-й доверительный интервал; *p* — достигнутый уровень значимости.

До назначения лечения количество дневных симптомов в неделю достоверно не различалось у больных с разными генотипами полиморфизма G954C (табл. 3), однако через 24 нед лечения у носителей генотипа GG дневных симптомов было значимо меньше по сравнению с больными — носителями генотипа CC.

Независимо от генотипа исследуемого полиморфизма по окончании периода наблюдения у всех больных произошло значимое уменьшение СЛБ, у больных — гомозигот по аллелю G суточные колебания ПСВ были достоверно ниже по сравнению с пациентами — носителями аллеля C (табл. 4).

Таблица 3
Количество дневных симптомов БА в зависимости от генотипа полиморфизма G954C гена *iNOS* до и после лечения

Генотип	Количество симптомов до лечения		Количество симптомов через 24 нед лечения	
	Абс.	<i>p</i>	Абс.	<i>p</i>
GG	5,78 ± 0,38	0,59 (CG)	0,14 ± 0,09*	0,01 (CC)
GC	6,12 ± 0,39	0,67 (CC)	0,66 ± 0,50*	0,32 (CC)
CC	5,66 ± 0,88	0,84 (GG)	1,50 ± 0,66*	0,34 (GC)

* *p* < 0,05 по сравнению с количеством симптомов до лечения.

Таблица 4
Динамика суточной лабильности бронхов на фоне лечения в зависимости от генотипа полиморфизма G954C гена *iNOS* до и после лечения

Генотип	СЛБ до лечения		СЛБ через 24 нед лечения	
	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>
GG	22,45 ± 0,85	0,22 (CG)	5,14 ± 0,97*	0,049 (CG)
GC	24,88 ± 0,95	0,33 (CC)	8,87 ± 1,01*	0,12 (CC)
CC	25,33 ± 0,87	0,07 (GG)	14,33 ± 1,33*	0,01 (GG)

* *p* < 0,05 по сравнению с СЛБ до лечения.

Заключение

Таким образом, установлено, что гомозигота по «дикому» аллелю G в положении 954 промоторной области гена *iNOS* ассоциирована с лучшим ответом на терапию БА у детей: низкое количество дневных симптомов, уменьшение суточной лабильности бронхов по сравнению с другим генотипом. Полученный результат, вероятно, обусловлен тем, что наличие «дикого» аллеля G связано с более низкой матричной активностью гена *iNOS* по сравнению с патологическим аллелем C, наличие которого повышает чувствительность к воздействию ИГКС [7].

Учитывая, что у больных БА изменена продукция NO [4], определение полиморфизма генов ферментов, синтезируемых NO, для которых установлена связь с эффективностью лечения ИГКС, является необходимым для прогнозирования неконтролируемого течения БА и поиска новых путей решения проблемы частичного или плохого контроля астмы.

Литература

1. Генне Н.А., Соодаева С.К., Белоусова Е.Г. и др. Оксид азота как маркер воспаления при бронхиальной астме // *Вопр. практ. педиатрии*. 2007. Т. 2, № 4. С. 27—31.
2. *Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы* / под ред. А.Г. Чучалина. М.: ИД «Атмосфера», 2007. 104 с.
3. Жданова М.В., Богданова М.А., Войтович А.Н. и др. Особенности течения бронхиальной астмы у детей с различными генотипами *rs1800947* полиморфизма гена глюкокортикоидного рецептора // *Педиатрия им. Г.Н. Сперанского*. 2007. Т. 86, № 4. С. 19—24.
4. Ляпунов А.А., Балаболкин И.И., Реутова В.С. и др. Клиническое значение исследования оксида азота в выдыхаемом воздухе у детей с бронхиальной

Результаты исследований молодых ученых и студентов

- астмой // Педиатрия. 2003. № 6. С. 1—4.
5. **Макарова И.В.** Сравнительная эффективность применения беклазона в двух системах доставки при бронхиальной астме у детей: ДАИ и ДАИ «Легкое дыхание» // Аллергология. 2002. № 4. С. 16—19.
 6. **Ahluwalia A.** Topical glucocorticoids and the skin — mechanisms of action: an update // Mediators of Inflammation. 1998. V. 7. P. 193—197.
 7. **Mulrennan S.A. Redington A.E.** Nitric oxide synthase inhibition: therapeutic potential in asthma // Treat Respir. Med. 2004. V. 3. P. 79—88.
 8. **Pitt B. R., Croix Cl.** Complex Regulation of iNOS in Lung // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2002. V. 26. P. 6—9.
 9. **Ricciardolo F.L.M., Sterk P.J., Gaston B. et al.** Nitric oxide in health and disease of the respiratory system // Physiol. Rev. 2004. V. 84. P. 731—765.
 10. **Xiong Y.** Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase // J. Immunol. 1999. V. 162. P. 445—452.

Поступила в редакцию 05.05.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

И.Ю. Смирнова — аспирант кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

И.В. Петрова — канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

И.А. Деев — канд. мед. наук, ассистент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Смирнова Ирина Юрьевна, тел. 8-906-967-1740, e-mail: she-irina-u@mail.ru