

## Генетические маркеры эффективности бронхоспазмолитической терапии детей, страдающих атопической бронхиальной астмой

И.И. Балаболкин, О.Н. Брянцева, Е.Е. Тихомиров, В.Г. Пинелис, Н.В. Журкова, Е.Е. Тюменцева, Г.М. Баязутдинова, Н.С. Аверьянова

Научный центр здоровья детей, Российская Академия Медицинских Наук, Москва, Россия

## Efficacy genetic markers of broncholytic therapy in children with atopic bronchial asthma

I.I. Balabolkin, O.N. Briantseva, E.E. Tihomirov, V.G. Pinelis, N.V. Jurkova, E.S. Tiumentseva, G.M. Bayazutdinova, N.S. Averianova

Scientific Centre of Children Health, Russian Academy of Medical Scientist, Moscow, Russia

### Аннотация

Рассматриваются возможные причины снижения эффективности бронхоспазмолитической терапии у детей с атопической бронхиальной астмой различной степени тяжести в свете полиморфизмов гена  $\beta_2$ -адренергического рецептора ( $ADR\beta_2$ ) и длительности лечения ингаляционными глюкокортикостероидами.

### Ключевые слова

Бронхиальная астма, полиморфизмы  $\beta_2$ -адренергического рецептора,  $\beta_2$ -агонисты короткого и пролонгированного действия, ингаляционные глюкокортикостероиды.

В настоящее время в лечении больных бронхиальной астмой применяют широкий спектр лекарственных препаратов. Исходя из клинических проявлений и патогенетических основ этого заболевания, все лечебные средства условно могут быть разделены на две основные группы: противовоспалительные препараты и симптоматические средства. Препараты первой группы называют препаратами базисной терапии и используют для устранения аллергического воспаления слизистой оболочки бронхов и уменьшения их гиперреактивности. Симптоматические средства применяют для купирования бронхиальной обструкции - ведущего клинического проявления бронхиальной астмы [1,2].

### Summary

The subject of discussion includes possible reasons for efficacy decrease in case of broncholytic therapy in children with atopic bronchial asthma of different severity in view of  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $ADR\beta_2$ ) gene polymorphisms and duration of inhaled corticosteroid treatment.

### Key words

Bronchial asthma,  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphisms, short and long-acting  $\beta_2$ -agonists, inhaled glucocorticosteroid.

Препараты  $\beta_2$ -агонистов успешно применяются в практике уже более 40 лет и на сегодняшний день они занимают центральное место среди средств неотложной терапии при обострении бронхиальной астмы. Широкое использование  $\beta_2$ -агонистов обусловлено их фармакологическими особенностями: быстрое начало действия (в течение первых 5 мин); выраженная и довольно длительная (до 12 часов) у дюранных  $\beta_2$ -агонистов бронхоспазмолитическая активность; умеренное бронхопротективное действие и минимальное число побочных явлений при правильном использовании [3,4].

Свои эффекты  $\beta_2$ -агонисты реализуют через  $\beta_2$ -адренергические рецепторы ( $ADR\beta_2$ ), кото-

рые в большом количестве представлены в воздухоносных путях на гладкомышечных, эпителиальных, железистых клетках, а также макрофагах, лимфоцитах и ряде других клеток. Структура и функции  $ADR\beta_2$  детально изучены. Его функциональная значимость не ограничивается только способностью к бронходилатации, помимо этого, активация  $\beta_2$ -адренергического рецептора приводит к угнетению высвобождения медиаторов из клеток воспаления, уменьшению проницаемости капилляров, стимуляции мукоцилиарного клиренса.

Одним из свойств рецептора является подверженность десенситизации. Десенситизация (тахифилаксия) – это снижение чувствительности рецептора (после достижения начального высокого уровня ответа) на повторную стимуляцию агонистом. Уменьшение количества действующих рецепторов на поверхности клетки приводит к состоянию «down-regulation», которое влечет за собой развитие длительной толерантности к препарату. Причины и молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, в настоящее время до конца не ясны и широко изучаются [5,6,7].

Немаловажное значение в развитие процесса тахифилаксии придает полиморфизму структуры гена  $ADR\beta_2$ , изменениям в его аминокислотной последовательности. Ген  $\beta_2$ -адренорецепторов локализуется на длинном плече 5q31-32 хромосомы вблизи кластера генов, кодирующих цитокины, а также глюкокортикоидный рецептор. В настоящее время идентифицировано девятнадцать однонуклеотидных (точковых) замен в кодирующей и промоторной областях гена, из которых четыре замены в аминокислотной последовательности в кодирующей части гена играют важную роль в функционировании рецептора. Особое внимание в литературе уделяется замене в 46 нуклеотиде азотистого основания аденина на гуанин, которая приводит к замене аминокислоты аргинина на глицин в 16 позиции (Arg16Gly) [8,9,10]. Эта замена находится на участке гена, который кодирует три первых трансмембранных домена рецептора, один из которых лигандсвязывающий. Причиной пристального изучения полиморфизма Arg16Gly является его связь с повышенной десенситизацией рецептора. Опубликованные на сегодняшний день данные очень противоречивы. Ряд исследователей на основании работ проводимых *in vitro*, пришли к выводу, что рецептор, имеющий в структуре гена Gly/Gly16, более подвержен десенситизации эндо-

генными катехоламинами по сравнению с рецептором, имеющим в своей структуре Arg/Arg16 или Arg/Gly16 [11, 12]. Martinez F.D. с соавторами подтвердил эти находки и показал сниженный прирост ОФВ1 у детей как с нормальным фенотипом так и больных бронхиальной астмой при однократном назначении альбутерола с генотипом Gly/Gly16, по сравнению с гомозиготным аллелем аргинина [12]. Аналогичные результаты были получены в группе взрослых больных, получающих в течение 4-х недель пролонгированный  $\beta_2$ -агонист формотерол [13]. Обратная взаимосвязь между генотипами и эффективностью проводимой терапии была получена в других работах [14,15,16].

Вариабельность фармакологического ответа на  $\beta_2$ -агонисты и разноречивость полученных ранее результатов [17,18,19,20,21,22,23,24] определяет актуальность проводимых фармакогенетических исследований.

*Цель нашего исследования:* установить значимость полиморфизма гена  $\beta_2$ -адренергического рецептора в 16 аминокислотной позиции в оценке эффективности проводимой бронхолитической терапии  $\beta_2$ -агонистами у детей с бронхиальной астмой.

## Материалы и методы

Нами было обследовано 208 детей в возрасте от 2 до 17 лет с атопической бронхиальной астмой различной степени тяжести, находившихся на стационарном лечении в аллергологическом отделении НЦЗД РАМН. Диагноз заболевания устанавливался на основании данных клинического и лабораторного обследования, спирографии, R-графии, кожных проб с аллергенами. Все больные получали  $\beta_2$ -агонисты короткого действия (сальбутамол, вентолин) в период обострения бронхиальной астмы, из них 171 пациенту проводилась базисная терапия ингаляционными глюкокортикостероидами (беклозона дипропионат, будесонид, фликсотид) в различной дозировке, включая комбинированные препараты (серетид, симбикорт). Распределение больных на две группы проведено в зависимости от эффективности терапии  $\beta_2$ -агонистами короткого действия. В первую группу (147 детей) были включены пациенты, которые отмечали положительный эффект от применения  $\beta_2$ -адреномиметиков короткого действия, т.е. приступ бронхиальной обструкции купировали в течение первых суток, используя от 1 до 4 ингаляций ими в сутки. Из них у 75 человек была диагностирована бронхиальная астма тя-

желого течения, у 40 – средней тяжести и у 33 детей установлена бронхиальная астма легкого течения. Вторую группу (61 ребенок) составили больные, у которых проводимая та же медикаментозная терапия была неэффективна или малоэффективна: количество ингаляций  $\beta_2$ -адреномиметика превышала 4-6 ингаляций в сутки, более того у некоторых детей в связи с отсутствием улучшения в состоянии возникала необходимость применять другие группы препаратов (метилксантины, системные глюкокортикостероиды). В этой группе у 5 пациентов отмечалась бронхиальная астма легкого течения, у 14 – средней тяжести и у 41 человека диагностирована бронхиальная астма тяжелого течения. Внутри каждой группы мы распределили пациентов на две подгруппы в зависимости от эффективности проводимой терапии ингаляционными глюкокортикостероидами, и с учетом доз получаемых препаратов. В подгруппу детей, у которых мы считали терапию ингаляционными глюкокортикостероидами эффективной, включали детей, у которых был достигнут полный контроль над симптомами астмы или у них было отмечено значительное улучшение состояния (урежение частоты обострений астмы и уменьшение тяжести приступа). Отсутствие положительной динамики в течении бронхиальной астмы (сохранение или незначительное уменьшение частоты обострений, наличие ночных эпизодов обструкции, вариабельность показателей спирометрии при контрольных обследованиях) являлось основным критерием формирования подгрупп детей с малоэффективной или неэффективной терапией ингаляционными глюкокортикостероидами.

В отдельное исследование мы отобрали группу детей (54 ребенка), получавших терапию пролонгированными  $\beta_2$ -агонистами (Серевент, Оксис, Форадил) в течение 1-3-х месяцев. Распределение на две подгруппы проводилось так же с учетом эффективности проводимой терапии. Первую группу составили 36 пациентов, которые отмечали положительный эффект на фоне проводимого лечения (обострения бронхиальной астмы реже 1 раза в неделю, снижение потребности в использовании  $\beta_2$ -агонистов короткого действия; отсутствие ночных эпизодов бронхообструкции). В этой группе у 28 человек отмечалось тяжелое течение бронхиальной астмы и у 14 пациентов – средней тяжести. Во вторую группу вошли дети (18 человек), у которых сохранялись симптомы болезни, несмотря на лечение пролонгированными  $\beta_2$ -адреномиметиками.

15 человек из этой группы имели тяжелое течение бронхиальной астмы, 3 пациента – средней тяжести.

Образцы ДНК выделяли из клеток крови с использованием коммерческого набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» фирмы «Promega» согласно инструкции прилагаемой к набору. Полиморфизм Arg16Gly определяли с помощью аллельспецифической ПЦР, используя праймеры и условия реакции описанные ранее.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы MS Excel. Достоверность различий в сравниваемых группах проводилась по критерию  $\chi^2$ , различия в группах считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В процессе проведенного исследования были установлены достоверные различия в генотипах больных двух групп. (Рис. 1, 2). Гомозиготный аллель Gly/Gly16 во второй группе встречается в два раза чаще, чем в первой группе (в 66% против 38%,  $p < 0,001$ ), тогда как в распределении гетерозиготного аллеля выявлена обратная закономерность (в первой группе – 55%, во второй – 28%,  $p < 0,001$ ). В распределении генотипа Arg/Arg16 в обеих группах существенных различий не выявлено (по 6% в каждой группе). Рас-

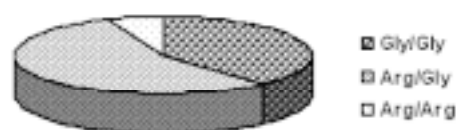


Рис. 1. Распределение генотипов Arg16Gly гена  $ADR\beta_2$  у детей с хорошим ответом на  $\beta_2$ -агонисты короткого действия



Рис. 2. Распределение частоты генотипов Arg16Gly  $ADR\beta_2$  у детей с недостаточным эффектом на  $\beta_2$ -агонисты короткого действия

пределение по тяжести течения происходило следующим образом: в I группе у 51% детей отмечалось тяжелое течение, у 27,2% - средней тяжести, у 22,8% - легкое течение; во II группе у 67% диагностирована астма тяжелого течения, у 23% - средней тяжести, у 8% - легкая.

Для исключения предположения о том, что недостаточная эффективность  $\beta_2$ -агонистов связана с неадекватной терапией бронхиальной астмы, мы проанализировали распределение Arg16Gly генотипов в подгруппах детей, получающих ингаляционные глюкокортикостероиды (табл. 1).

Из представленной таблицы 1 видно, что среди, находившихся на терапии ингаляционными глюкокортикостероидами больных большая часть детей получала лечение в среднетерапевтических дозах – 68 больных (60%) в I группе и 39 больных (68,5%) во II группе.

Низкими дозами проводилось лечение 26 больным (в 22,8%) в первой группе и 6 (в 10,5%) – во второй, высокими – 20 пациентам (17,2%) и 12 (21%) соответственно. При анализе полученных результатов сохраняется вышеуказанная тенденция в распределении генотипов между группами детей с хорошим ответом на  $\beta_2$ -агонист и недостаточным ответом в подгруппах детей, получающих низкие и среднетерапевтические дозы ингаляционных глюкокортикостероидов. При статистической обработке данных различия между двумя группами в подгруппах больных, получающих среднетерапевтические дозы ингаляционных глюкокортикостероидов достоверны. При анализе полученных данных во второй группе детей только в 36,7% случаев отмечается хороший эффект от терапии ингаляционными глюкокортикостероидами, тог-

**Таблица 1**  
**Распределение генотипов Arg 16Gly гена ADR $\beta_2$  у детей получающих различные дозы ингаляционных глюкокортикостероидов**

Генотип	I. Хороший ответ на $\beta_2$ -агонист терапия и ГКС										
	Эффективна			Малоэффективна/неэффективна							
	НД (абс.)%	СрД (абс.)%	ВД (абс.)%	НД (абс.)%	СрД (абс.)%	ВД (абс.)%					
Gly/Gly	5	25	11	27,5	9	64,3	2	11	39,3	3	
Arg/Gly	13	65	29	72,5	5	35,7	3	16	59,1	3	
Arg/Arg	2	10	-	-	-	1	1	1	1,6	-	
Всего в подгруппе	20	40	14	6	28	6					
Общее кол-во пациентов (абс.)	74						40				
Генотип	II. Недостаточный эффект на $\beta_2$ -агонист терапия и ГКС										
	Эффективна			Малоэффективна/неэффективна							
	НД %	СрД %	ВД %	НД %	СрД %	ВД %					
Gly/Gly	1	14	87,5	2	16	69,6	7				
Arg/Gly		2	12,5	1	1	5	21,7	1			
Arg/Arg	1	-	-	1	2	8,7	1				
Всего в подгруппе	2	16	3	4	23	9					
Общее кол-во пациентов (абс.)	21						36				
	$\chi^2 16,6$ , $p < 0,001$						$\chi^2 6,03$ , $p < 0,05$				

Обозначения: НД – низкие дозы (менее 400мкг по бекламетазону дипропионат \*); СрД – среднетерапевтические дозы (от 400 до 800 мкг по бекламетазону дипропионат \*); ВД – высокие дозы (более 800 мкг по бекламетазону дипропионат \*).

\* - или эквивалентная доза другого препарата

да как незначительных эффект отмечают 63,2% детей. Также необходимо отметить, что в подгруппах детей, получающих высокие дозы ингаляционных глюкокортикостероидов, регистрируется небольшое превалирование генотипа Gly/Gly16 над гетерозиготным аллелем: 9 человек против 6 - в первой группе с хорошим ответом на ингаляционные глюкокортикостероиды и 7 против 1 - во второй группе с малоэффективной или неэффективной терапией ингаляционными глюкокортикостероидами. Достоверность различий нам доказать не удалось, в связи с малой выборкой больных.

При оценке эффективности терапии пролонгированными  $\beta_2$ -агонистами нам также не удалось обнаружить статистически достоверных различий ( $p > 0,1$ ) в распределении генотипов, в то же время процентное соотношение указывает на те же закономерности, которые были выявлены у больных, получающих препараты короткого действия. В I группе Gly/Gly16 генотип встречается в 38% против 61% во II, тогда как Arg/Gly16 в первой группе зафиксирован в 62% случаев против 39% во второй.

Клинические наблюдения за больными бронхиальной астмой в период обострения показали, что доза и продолжительность применения  $\beta_2$ -агониста для купирования симптомов обструкции различны у разных индивидуумов. Результаты проведенных нами исследований позволяют заключить, что вариабельность ответа пациента на терапию  $\beta_2$ -агонистами ассоциирована с полиморфизмом Arg16Gly гена ADR $\beta_2$ . Повышенная десенситизация  $\beta_2$ -адренорецептора, рассматриваемая как одна из причин недостаточной эффективности терапии, может являться следствием определенной структуры гена. По нашим данным к такой структуре гена относится Gly/Gly16. Расхождения наших результатов с данными некоторых зарубежных авторов, возможно, связаны с разными условиями исследований, к которым относятся степень тяжести бронхиальной астмы, сопутствующая терапия (использование ингаляционных глюкокортикостероидов), возрастная категория пациентов, включенных в работу (взрослые или дети), способы применения  $\beta_2$ -агонистов и популяционные различия.

В настоящее время хорошо известно, что больные с тяжелым течением бронхиальной астмы хуже отвечают на бронхолитическую терапию  $\beta_2$ -агонистами. Наши результаты согласу-

ются с данным утверждением. В группе детей с недостаточным ответом на адреномиметик в 67% случаев отмечается тяжелое течение бронхиальной астмы, тогда как в группе детей с адекватным ответом тяжелое течение заболевания регистрируется в 51% случаев. Вместе с этим, анализируя когорту детей, получающих высокие дозы ингаляционных глюкокортикостероидов, мы отметили некоторое превалирование генотипа Gly/Gly16 в этих группах. На этом основании можно предположить, что данный аллель принимает участие в формировании фенотипа с тяжелым течением бронхиальной астмы и толерантным к терапии.

Важно заметить, что большинство детей из группы с недостаточным ответом на  $\beta_2$ -агонисты (57 человек из 61) получали ингаляционные глюкокортикостероиды и последние не препятствовали снижению чувствительности к терапии  $\beta_2$ -агонистами. Полученные данные наводят на мысль о том, что развитие тахифилаксии не связано с пониженной экспрессией гена ADR $\beta_2$ .

Распределение полиморфизма Arg16Gly гена ADR $\beta_2$  носит популяционные и расовые различия, что обуславливает противоречивость мнений об его участии в развитии тахифилаксии.

Недостоверность различий в группах детей, получающих пролонгированные  $\beta_2$ -агонисты, вероятно, связана с малой выборкой больных. Хотя также необходимо учитывать особенности механизма действия этих препаратов. Благодаря своим липофильным свойствам они длительно могут стимулировать  $\beta_2$ -адренергический рецептор, тем самым, с одной стороны, провоцировать его десенситизацию, что не происходит на практике, с другой стороны, усиливать терапевтический эффект.

Возрастные различия могут быть связаны с разной техникой ингаляций, у детей часто используются спейсеры, небулайзеры для улучшения доставки препарата. В нашем исследовании учитывалась правильность техники ингаляций лекарственных препаратов, принимая во внимание тот факт, что большинство детей находилось на госпитализации повторно, и с правилами ингаляций были ознакомлены ранее.

Проведенная работа доказывает, что фармакогенетические исследования имеют большие возможности и открывают перспективы поиска других генетических маркеров эффективности лечения.



## Выводы

- Полиморфизм Arg16Gly  $\beta_2$ -адренергического рецептора взаимосвязан с вариабильностью фармакологического ответа на  $\beta_2$ -агонисты.
- Выявлена ассоциация генотипа Gly/Gly16 гена  $\beta_2$ -адренергического рецептора с недостаточным эффектом проводимой бронхолитической терапии  $\beta_2$ -агонистами короткого действия.

- Подобная зависимость отмечается также при оценке эффективности терапии пролонгированными  $\beta_2$ -агонистами.
- Отмечается участие аллеля Gly16 в формировании фенотипа с тяжелым течением бронхиальной астмы и толерантной к терапии как  $\beta_2$ -агонистами, так и ингаляционными глюкокортикостероидами

## Литература

1. Балаболкин И.И. Бронхиальная астма у детей. М.: Медицина, 2003, 319 с.
2. Катцунг Б.Г. Базисная и клиническая фармакология. М., СПб.: Бином – Невский диалект; 1998 в 2-х т.
3. Синопальников А.И., Клячкина И.Л.  $\beta_2$ -агонисты – роль и место в лечении бронхиальной астмы. Русский медицинский журнал 2002; Т.10; №5: 236-242.
4. Lefkowitz R.J. G protein-coupled receptors. The journal of biological chemistry 1998; V.24: 18677–18680.
5. Kohout T.A., Lefkowitz R.J. Regulation of G protein-coupled receptor kinesis and arresting during receptor desensitization. Mol. Pharmacol 2003; V.63: 9–18.
6. Penn R.B., Panettieri R.A., Benovic Jr. and J.L. Mechanisms of acute desensitization of the  $\beta_2$  AR-adenylyl cyclase pathway in human airway smooth muscle. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998; V.19: 338–348.
7. Hall I.P. Genetics of Asthma and Atopy. Monogr Allergy. Basel. – Karger. 1996; V. 33: 153-168
8. Hall I.P.  $\beta_2$ -adrenoreceptor polymorphisms: are they clinically important? Thorax 1996; V.51: 351-353
9. Васильковский Н.В., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Серебров В.Ю., Петровский Ф.И., Деев И.А. Роль полиморфизма гена  $\beta_2$ -адренергического рецептора в развитии бронхиальной астмы. Медицинская генетика 2006; №1: 10-14.
10. Green S.A., Turki J., Innis M. and Liggett S.B. Amino-terminal polymorphisms of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. Biochemistry 1994; V.33: 9414–9419.
11. Martinez F.D., Graves P.E., Baldini M. et al. Association between genetic polymorphisms of the  $\beta_2$ -adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. J. Clin. Invest 1997; V.100: 3184-3192.
12. Hancox R.J., Sears M.R., Taylor D.R. Polymorphism of the  $\beta_2$ -adrenoreceptor and the response to long-term  $\beta_2$ -agonist therapy in asthma. Eur. Respir. J. 1998; V.11: 589-593.
13. Lee D.K.C., Currie G.P., Hall I.P., Lima J.L., Lipworth B.J. The arginine-16  $\beta_2$ -adrenoceptor polymorphism predisposes to bronchoprotective subsensitivity in patients treated with formoterol and salmeterol. Br. J. Clin. Pharmacol. 2004; V.57: 68–75.
14. Israel E., Drazen J.M., Liggett S.B., Boushey H.A., Cherniack R.M., Chinchilli V.M., et al. The effect of polymorphisms of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; V.162: 75–80.
15. Israel E., Chinchilli V.M., Boushey H.A., et al. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomized, placebo-controlled cross-over trial Lancet 2004; V.364: 1505–1512.
16. Holloway J.W., Dunbar P.R., Riley G.A. et al. Association of  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphism with severe asthma. Clin. Exp. Allergy 2000; V.30; №8: 1097-1200.
17. Tan S., Hall I.P., Dewar J., Dow E., Lipworth B. Association between  $\beta_2$ -adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. Lancet 1997; V. 350: 995–999.
18. Taylor D.R., Hancox R.J., McRae W., Cowan J.O., Flannery E.M., McLachlan C.R., Herbison G.P. The influence of polymorphism at position 16 of the  $\beta_2$ -adrenoceptor on the development of tolerance to  $\beta_2$ -agonist. J. Asthma 2000; V. 37: 691–700.
19. Telleria J.J., Blanco-Quirys A., Muntiyon S., Garrote J.A., Arranz E., Armentia A., Dñez I. and Jesús Castro. Tachyphylaxis to  $\beta_2$ -agonists in Spanish asthmatic patients could be modulated by  $\beta_2$ -adrenoceptor gene polymorphisms. Respiratore medicin 2006; V.100; №6: 1072-1078.
20. Turki J., Pak J., Green S.A., Martin R.J., Liggett S.B. Genetic polymorphisms of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma: evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. J. Clin. Invest. 1995; V. 95: 1635-1641.
21. Turner S.W., Khoo S.K., Laing I.A., Palmer L.J., Gibson N.A. and al.  $\beta_2$  adrenoceptor Arg16Gly polymorphism, airway responsiveness, lung function and asthma in infants and children. Clin. Exp. Allergy 2004; V.34: 1043-1048.