

Также были продемонстрированы определенные черты реагирования параметров ВНС у лиц с ТИА с сопутствующей фибрилляцией предсердия в ответ на стрессовую ситуацию, состоящие в отрицательной зависимости активности парасимпатического отдела ВНС от гуморального компонента деятельности ВНС. Подобные изменения в группе ПНМК с синусовым ритмом трактовались нами как саногенетический компонент [24] и обуславливали, по нашему мнению, смещение индекса вегетативного равновесия в сторону преобладания симпатикотонии. Несмотря на преобладающий парасимпатикотонический тонус в статусе ВНС в группе ПНМК, возникшего на фоне мерцательной аритмии, сохранность отрицательной зависимости автономного контура ВНС от гуморального влияния была сохранена в этой группе и определяла отсутствие очага некроза в головном мозге.

Полученные данные подтверждались результатами нелинейного регрессионного анализа, согласно которому повышение тонуса парасимпатического отдела ВНС влияло на более благоприятный исход острой ишемии головного мозга сосудистого генеза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Stroke incidence and mortality trends in US communities, 1987 to 2011 // S. Koton [et al.] // JAMA. — 2014. — Vol. 312, № 3. — P. 259–268.
2. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / E. C. Jauch [et al.] // Stroke. — 2013. — Vol. 44, Iss. 3. — P. 870–947.
3. Guidelines for the early management of stroke patients / C. Edward [et al.] // Stroke. — 2013. — Vol. 44, № 3. — P. 870–947.
4. Heart and Stroke Foundation of Canada Canadian Stroke Best Practices Advisory Committee. Canadian Stroke Best Practice Recommendations: Acute inpatient stroke care guidelines, update 2015 / L. K. Casaubon [et al.] // Int J Stroke. — 2016. — Vol. 11, Iss. 2. — P. 239–252.
5. Стаховская, Л. В. Транзиторные ишемические атаки / Л. В. Стаховская; под ред. Л. В. Стаховской. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. — 224 с.
6. Лихачёв, С. А. Транзиторные ишемические атаки: этиология, патогенез, классификация, клиника, диагностика / С. А. Лихачев, А. В. Астапенко, Н. Н. Белявский // Мед. новости. — 2003. — № 10. — С. 31–37.
7. Зависимость вегетативного статуса от тяжести ишемического поражения головного мозга / Н. В. Галиновская [и др.] // Пробл. здоровья и экологии. — 2012. — № 1 (31). — С. 92–97.
8. Thyroid hormone status in stroke and transient ischemic attack patients / N. V. Halinowskaya [et al.] // Neurologijos seminarai. — 2015. — Vol. 19, № 65. — P. 207–209.
9. Parameters of systemic inflammatory response in patients with passing infringements of brain blood circulation / N. V. Halinowskaya [et al.] // British J. Med. and Med. Research. — 2016. — Vol. 15, № 1. — P. 1–10.
10. Пути взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем в регуляции функций организма / Н. В. Казаков [и др.] // Арх. клин. и эксперим. медицины. — 2004. — Т. 13, № 1/2. — С. 3–10.
11. Галиновская, Н. В. Психовегетативный статус при ишемических повреждениях головного мозга / Н. В. Галиновская, Н. Н. Усова, Л. А. Лемешков; Гомел. гос. мед. ун-т. — Гомель: Изд-во ГомГМУ, 2015. — 228 с.
12. Самохвалова, Е. В. Вариабельность ритма сердца в динамике острого периода ишемического инсульта и характер церебрального поражения / Е. В. Самохвалова, А. В. Фоякин, Л. А. Гераскина // Кардиоваск. терапия и профилактика. — 2004. — № 4 (4). — С. 338.
13. Вейн, А. М. Вегето-сосудистая дистония / А. М. Вейн. — М.: Мед-на, 2005. — 580 с.
14. Bolis, L. Handbook of the Autonomic Nervous System in Health and Disease / L. Bolis, J. Licinio, S. Govoni. — New York: Dekker, 2003. — 667 с.
15. Заремба-Федчишин, О. В. Вариабельність серцевого ритму та окисно-відновний метаболізм у хворих на стабільну стенокардію, поздану з гормональним дисбалансом, і методи їх корекції: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.11 / О. В. Заремба-Федчишин; Івано-Франк. держ. мед. ун-т. — Івано-Франк., 2006. — 19 с.
16. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association / T. A. Pearson [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 107, № 3. — P. 499–511.
17. Kurata, C. Improvement of cardiac sympathetic innervation by renal transplantation / C. Kurata, A. Uehara, A. Ishikawa // J. of Nuclear Med. — 2004. — Vol. 45, № 7. — P. 1114–1120.
18. Autonomic dysfunction assessed by EZSCAN and subclinical atherosclerosis / J. Sun [et al.] // J. Diabetes. — 2014. — Vol. 6, № 5. — P. 409–416.
19. Взаимосвязь вариабельности артериального давления, синусового ритма сердца и структурно-функциональных характеристик миокарда левого желудочка у больных артериальной гипертензией пожилого и старческого возраста / В. П. Носов [и др.] // Клин. медицина. — 2004. — № 9. — С. 20–24.
20. Баевский Р. М. Анализ вариабельности сердечного ритма в космической медицине / Р. М. Баевский // Физиология человека. — 2002. — Т. 28, № 2. — С. 70–82.
21. Энтропия сердечного ритма — предиктор функционального исхода парциального инфаркта мозга в бассейне сонных артерий у пациентов с фибрилляцией предсердий / И. А. Гончар [и др.] // Мед. новости. — 2015. — № 1. — С. 41–46.
22. Клинические протоколы диагностики и лечения больных с патологией нервной системы // Здравоохранение. — 2009. — № 4. — С. 62–74.
23. Жемайтите, Д. И. Анализ сердечного ритма / Д. И. Жемайтите, Л. Телькнис. — Вильнюс, 1992. — 130 с.
24. Галиновская, Н. В. Преходящие нарушения мозгового кровообращения: клинко-патогенетические особенности: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.01.11 / Н. В. Галиновская. — УО «Гомельск. гос. мед. ун-т». — Минск, 2017. — 49 с.

Поступила 21.02.2018

УДК 616.23-002.193:575.113

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ MDR1, ADRB2 И IL-13 С РАЗВИТИЕМ РЕЗИСТЕНТНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Е. В. Воронаев¹, Д. Ю. Рузанов¹, О. В. Осипкина¹,
В. А. Штанзе¹, Т. В. Переволоцкая², А. Н. Переволоцкий², А. С. Шафорост¹

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,
г. Гомель, Республика Беларусь

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»,
г. Обнинск, Российская Федерация

Цель: оценка вклада генетических детерминант в формирование патогенетических и клинических фенотипов бронхиальной астмы, а также их ассоциация с ответом на терапию.

Материалы и методы. Полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, электрофоретическая детекция, анализ анамнеза и клинических данных, статистический метод.

Результаты. Выявлены статистически значимые ($p < 0,05$) различия между контрольной группой и группой пациентов с резистентной астмой по частоте встречаемости генотипа CC и TT (ген MDR1 rs1045642). Не выявлены значимые различия по частотам встречаемости всех генотипов генов ADRB2 (rs1042713) и IL-13 (rs20541) между контрольной группой и группой пациентов с контролируемой астмой, а также между группами пациентов с резистентной и контролируемой астмой.

Заключение. Показана ассоциация генотипа CC rs1045642 гена MDR1 с потребностью в высоких дозах только ингаляционных глюкокортикостероидов или в их сочетании с системными глюкокортикостероидами.

Ключевые слова: бронхиальная астма, генетические маркеры, полиморфизм гена.

ASSOCIATION OF POLYMORPHISM OF MDR1, ADRB2 AND IL-13 GENES WITH DEVELOPMENT OF THERAPY-RESISTANT BRONCHIAL ASTHMA

*E. V. Voropaev¹, D. Yu. Ruzanov¹, O. V. Osipkina¹,
V. A. Shtanze¹, T. V. Perevolotskaya², A. N. Perevolotskiy², A. S. Shafarost¹*

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

²All-Russia Research Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk,
Russian Federation

Objective: assessment of the contribution of genetic determinants to the formation of pathogenetic and clinical phenotypes of bronchial asthma as well as their association with the response to the therapy.

Material and methods. Polymerase chain reaction, restriction analysis, electrophoretic detection, analysis of anamnesis and clinical data, statistical method.

Results. Statistically significant ($p < 0.05$) differences have been found between the control group and the group of patients with therapy-resistant asthma in the incidence rate of genotype CC and TT (MDR1 gene rs1045642). No significant differences have been revealed in the incidence of all the genotypes of the genes ADRB2 (rs1042713) and IL-13 (rs20541) between the control group and the group of patients with controlled asthma, and between the groups of patients with therapy-resistant and controlled asthma.

Conclusion. The association of the genotype CC rs1045642 of the MDR1 gene has been shown with the necessity for higher doses of inhaled glucocorticosteroids alone or in combination with systemic glucocorticosteroids.

Key words: bronchial asthma, genetic markers, gene polymorphism.

Введение

Бронхиальная астма (БА, J45 МКБ10) — одно из наиболее распространенных хронических воспалительных заболеваний бронхолегочной системы, ущерб от которого связан с затратами на лечение и с потерей трудоспособности. Около 300 миллионов человек в разных странах страдают от астмы и около 250 000 человек умирают ежегодно [1, 2]. При выборе терапии необходимо учитывать ожидаемую эффективность (хороший уровень контроля над симптомами и снижение риска обострений) и безопасность. Более дешевая, но недостаточная терапия приводит к повышению расходов за счет увеличения числа обострений и госпитализаций больных.

«Глобальная инициатива по бронхиальной астме» (Global Initiative for Asthma, GINA) создана для взаимодействия врачей, лечебных учреждений с целью распространения информации о подходах к лечению пациентов с БА. Доклад GINA «Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы» обновляется ежегодно, начиная с 2002 г. Тем не менее уровень контроля БА является недостаточным во многих странах. Понятие «уровень контроля БА» впервые начало обсуждаться около 15 лет назад в Американском и Европей-

ском респираторных обществах, оно характеризует выраженность симптомов, а также определяет риск неблагоприятных исходов в будущем [3]. Стратегия терапии БА — именно достижение контроля, а не просто гипотетическое улучшение состояния. За последние десять лет доля пациентов с контролируемой астмой в странах Западной Европы увеличилась с 4–9 до 42–55 % [4]. В Республике Беларусь стандартизированные исследования, изучающие уровень контроля над БА, не были проведены, а имеющиеся немногочисленные работы свидетельствуют, что доля пациентов с полным контролем остается невысокой [5]. Поиск причин отсутствия контроля над астмой является актуальной задачей. Наиболее перспективными являются генетические исследования, которые направлены на выявление генов, связанных с развитием болезни и ответом на терапию. Разнообразие ответов на медикаментозное воздействие может быть обусловлено тяжестью и типом астмы, сочетанием фармакологических препаратов, условиями среды, возрастом пациента и др.

За прошедшее время были выявлены гены, ассоциированные с астмой и/или атопией, однако, согласно многочисленным исследованиям, ни один из них в отдельности не отвечает

за развитие определенного фенотипа, а значит, каждый из множества генов вносит определенный вклад в общую предрасположенность к заболеванию. Гены, ассоциированные с астмой, можно классифицировать по выполняемой ими функции: связанные с воспалением, первичным иммунным ответом, ответом Th-2 лимфоцитов, чувствительностью к факторам внешней среды, ремоделированием дыхательных путей, бронхоконстрикцией, дисфункцией эпителиального барьера [6].

Для лечения бронхиальной астмы используются воздействующие на механизм заболевания препараты базисной терапии (например, ингаляционные глюкокортикостероиды (ИГКС) и влияющие на гладкую мускулатуру бронхиального дерева, снимающие приступ симптоматические препараты (бронходилататоры — β_2 -агонисты, М-холиноблокаторы). β_2 -агонисты — вещества, вызывающие стимуляцию β -адренергических рецепторов и оказывающие значительное влияние на основные функции организма, часто используются в фармакологии для лечения БА, их применение позволяет снизить дозу ИГКС, а также помогает эффективно купировать симптомы бронхиальной обструкции.

В гене β_2 -адренорецептора ADRB2 выявлены мутации, ассоциированные с ответом на β_2 -агонисты [8]. β_2 -адренорецептор — ионный белковый канал, встроенный в цитоплазматическую мембрану клетки, имеющий высокую степень родства к адреналину и обеспечивающий повышение или понижение активности иннервируемой ткани или органа. В результате единичной замены (SNP — Single nucleotide polymorphism) G46A (rs1042713 по классификации NCBI — National Center for Biotechnology Information) в аминокислотной последовательности белка ADRB2 в позиции 16 аргинин заменяется на глицин (Arg16Gly). В ряде исследований было показано, что генотип AA ассоциирован с риском развития ночной формы БА [9].

Ген ABCB1 (ATP-binding cassette subfamily B member1) кодирует белок множественной лекарственной резистентности MDR1 (multidrug resistance protein или гликопротеин P1), функция которого — перенос лекарственных средств и других соединений из клетки в межклеточное пространство. Замена 3435CT (rs1045642) ассоциирована с экспрессией гена MDR1 и функционированием Р-гликопротеина [10]. Выявлена ассоциация генотипа 3435CC с потребностью в больших дозах системных глюкокортикостероидов у пациентов с БА, однако в целом результаты изучения влияния полиморфизма гена MDR1 на фармакокинетику противоречивы.

При анализе причин терапевтической резистентности необходимо определить вклад аллельных вариантов генов цитокинов Th2,

ассоциированных с иммунным ответом: интерлейкина 4 (IL-4) и интерлейкина 13 (IL-13). Противовоспалительный цитокин IL-13 продуцируется активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками, стимулирует секрецию IgE и IgG4. Показано, что замена гуанина на аденин G2044A, Arg130Gln (rs20541), приводящая к замене аргинина на глутамин в белке, увеличивает риск развития атопий, показана его взаимосвязь с риском развития БА [11].

Результаты многочисленных генетических исследований противоречивы: трудновоспроизводимы в последующих работах, характеризуются выраженными межэтническими различиями. Необходимо дальнейшее изучение генов, ассоциированных с БА, с учетом этнической принадлежности, так как подобные исследования в белорусской популяции отсутствуют. Новые знания в области генетики БА позволят выявить молекулярные предикторы астмы, определить группы риска для осуществления профилактических мероприятий, обосновать выбор терапии.

Цель работы

Оценка вклада генетических маркеров в формирование патогенетических и клинических фенотипов БА, а также их ассоциация с ответом на терапию.

Материалы и методы

Для проведения исследований были сформированы следующие группы пациентов: «Резистентная астма» (с неконтролируемым течением БА); «Контролируемая астма» (с контролируемым течением БА); «Группа-контроль» (здоровые добровольцы).

Все участники исследования были информированы о его целях и предстоящих процедурах, у всех было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании. Участники исследования являются жителями Гомеля или Гомельской области.

Группа пациентов «Резистентная астма»

В эту группу были включены 37 пациентов учреждения «Гомельская областная туберкулезная клиническая больница»: 18 мужчин (48,6 %) и 19 женщин (51,4 %) в возрасте от 37 до 81 года. Средний возраст составил $60,1 \pm 10,5$ года. У большинства пациентов — 27 (73 %) — выявлена неаллергическая форма БА (смешанная — у 9 (24,3 %), аллергическая — у 1 (2,7 %)). Количество пациентов, имевших тяжелое и крайне тяжелое течение заболевания — 33 (89,2 %) и 4 (10,8 %) соответственно. Треть пациентов имела группу инвалидности: 10 (27 %) — по общему заболеванию и 4 (5,4 %) — по БА.

Большинство пациентов в течение последних 3 месяцев использовали бронхолитики короткого действия очень часто: 1–2 раза в сутки и реже — 7 человек (18,9 %), 3–5 раз в сутки —

15 человек (40,5 %), 6–10 раз в сутки — 10 человек (27 %), больше 10 раз в сутки — 5 человек (13,5 %). В качестве базисной терапии в течение последних 3 месяцев подавляющее большинство пациентов использовали комбинированные препараты (бронхолитики длительного действия и высокие дозы ИГКС) — 30 человек (81,1 %), лишь некоторые из них получали другие схемы лечения: комбинированные препараты (бронхолитик длительного действия и средние дозы ИГКС) — 2 человека (5,4 %), ИГКС в высоких дозах — 1 человек (2,7 %). Однако часть пациентов вообще не использовали регулярно базисную терапию — 4 человека (10,8 %). Дополнительные препараты для лечения заболеваний органов дыхания принимали 24 пациента (64,9 %), в том числе в сочетаниях: муколитики — 5, инъекционные ГКС — 6, интраназальные ГКС — 1, пероральные ГКС — 3, метилксантины — 18, бронхолитики через небулайзер — 16, формотерол — 1, монтелукаст — 1. Не использовали другие лекарственные средства 13 пациентов (35,1 %).

Вариабельность показателя ОФВ₁ (объем форсированного выдоха за первую секунду маневра форсированного выдоха) составила от 15 до 75 %. Умеренная обструкция (ОФВ₁ от 60 до 80 %) отмечалась у 10 пациентов (27 %), выраженная (ОФВ₁ от 40 до 59 %) — у 12 пациентов (32,4 %), резкая (ОФВ₁ от 20 до 39 %) — у 14 пациентов (37,8 %). Наиболее низкий показатель ОФВ₁ (< 20 %) был зарегистрирован у 1 пациента (2,7 %). У большинства пациентов отмечался отрицательный бронходилатационный тест — 23 человека (62,2 %). Лишь у 14 пациентов (37,8 %) была положительная проба с салбутамолом.

Количество амбулаторных обращений за последние 3 месяца варьировало от 1 до 8, в среднем — 3,3. Не обращались по месту жительства за медицинской помощью по поводу БА 5 человек (13,5 %). Отмечалось большое число вызовов бригады скорой медицинской помощи за последние 3 месяца: 1–3 вызова — 19 пациентов (51,5 %), 4–5 раз — 2 пациента (5,4 %), 10–12 раз — 3 пациента (8,1 %). Не вызывали бригаду скорой медицинской помощи 13 пациентов (35,1 %). Длительность госпитализаций за последние 3 месяца варьировала от 7 до 48 дней и составила в среднем $20 \pm 10,4$ дня. В течение 3 последних месяцев не были госпитализированы 10 пациентов (27 %). Общий срок временной нетрудоспособности за год составил от 8 до 160 дней, в среднем — $45,3 \pm 31,1$ дня. Не было госпитализаций в течение года лишь у 1 пациента. Аллергоанамнез отягощен у большинства пациентов — 20 человек (54,1 %). БА, аллергический ринит у

кровных родственников отмечали около половины пациентов — 16 (43,2 %).

Группа пациентов «Контролируемая астма»

В эту группу были включены 20 пациентов учреждения «Гомельская областная клиническая поликлиника»: 14 женщин (70 %), 6 мужчин (30 %). Средний возраст составил $48,2 \pm 16$ лет.

Преимущественно пациенты страдали смешанной формой БА — 17 человек (85 %). Реже регистрировались неаллергическая и аллергическая формы — у 2 (10 %) и у 1 (5 %) пациента соответственно. Лишь 2 (10 %) имели группу инвалидности: 2-ю и 3-ю по общему заболеванию.

В качестве базисной терапии в течение последних 3 месяцев 3 пациента (15 %) использовали комбинированные препараты (бронхолитик длительного действия и высокие дозы ИГКС), 3 (15 %) — ИГКС в средних дозах, 1 (5 %) — ИГКС в низких дозах. Однако большинство пациентов (13 человек — 65 %) вообще не использовали регулярно базисную терапию. Дополнительные препараты для лечения заболеваний органов дыхания принимали 5 пациентов, интраназальные ГКС — 1, монтелукаст — 1, антигистаминные препараты — 2. Вариабельность показателя ОФВ₁ составила от 52 до 115 %. У большинства пациентов (15 человек — 75 %) был нормальный показатель ОФВ₁. Лишь у 4 (20 %) — отмечались признаки бронхиальной обструкции (ОФВ₁ от 52 до 70 %) с положительным бронходилатационным тестом.

Количество амбулаторных обращений за последние 3 месяца варьировало от 0 до 3, в среднем — 1,8. Не обращались по месту жительства за медицинской помощью по поводу БА подавляющее большинство — 15 человек (75 %). Пациентов, которые практически не обращались в службу скорой медицинской помощи, было 18 человек (90 %). Лишь 2 человека (10 %) вызывали бригаду неотложной помощи 2 раза за 3 месяца. Пациенты редко госпитализировались — только 2 человека (10 %) по 14 дней пребывания в стационаре. Общий срок временной нетрудоспособности за год был от 9 до 28 дней, в среднем — 18 дней. Аллергоанамнез у большинства пациентов (18 человек — 90 %) не отягощен. БА, аллергический ринит у родственников отмечены у 4 пациентов (20 %).

«Группа-контроль»

Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие хронической бронхолегочной патологии, в том числе аутоиммунной и аллергической этиологии; отсутствие аллергических заболеваний в анамнезе; неотягощенная наследственность в отношении БА. Критерии исключения из контрольной группы: тяжелые острые и хронические соматические

или психические заболевания; злокачественные новообразования; психическая или юридическая недееспособность пациентов, пребывание в специальных учреждениях по решению соответствующих органов или суда. В контрольную группу были включены здоровые добровольцы (доноры станции переливания крови), 105 человек (56 (53,3 %) женщин, 49 (46,7 %) мужчин) в возрасте от 19 до 68 лет, средний возраст — $38,6 \pm 11,59$ года.

В качестве материала для исследования использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов крови пациентов, с применением коммерческих реагентов для выделения ДНК из клинического материала.

Для изучения влияния молекулярно-генетических факторов на патогенез различных форм БА выбраны следующие маркеры: ген ADRB2 (rs1042713); ген ABCB1 (MDR1) (rs1045642); ген IL-13 (rs20541).

Выявление изучаемых SNP проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

последующим рестрикционным анализом. Для проведения ПЦР, электрофоретической детекции и рестрикционного анализа использовали реагенты фирмы «ThermoScientific» (США). Амплификацию проводили, используя амплификатор «PalmCycler» фирмы «CorbettResearch» (Австралия). Структура праймеров («Праймтех», Беларусь) приведена в таблице 1. Программа амплификации: денатурация 1 цикл — $95\text{ }^\circ\text{C}$, 3 мин; 35 циклов ($95\text{ }^\circ\text{C}$ — 20 с, $65\text{ }^\circ\text{C}$ — 20 с, $72\text{ }^\circ\text{C}$ — 20 с); финальная элонгация 1 цикл $72\text{ }^\circ\text{C}$ — 2 мин.

Рестрикционный анализ проводили с применением коммерческих рестриктаз согласно инструкции производителя. Детекцию продуктов ПЦР и рестрикционных фрагментов проводили с помощью горизонтального гель-электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием раствором бромистого этидия. Для визуализации полученных результатов использовали видеосистему фирмы «BioRad» (США) GelDocXR.

Таблица 1 — Структура праймеров, используемых для выявления изучаемых SNP, размер амплифицируемой зоны, рестриктаза

Изучаемый полиморфизм	Нуклеотидная последовательность праймеров	Амплифицируемая зона, пар нуклеотидов	Рестриктаза
rs1045642 MDR1	5'-tgtatgftggcctccttggctg-3'	89	MboI
	5'-agcattgctgagaacattgccta-3'		
rs1042713, ADRB2	5'-gccttcttgctggcaccat-3'	168	NcoI
	5'-cagacgctcgaactggccat-3'		
rs20541 IL-13	5'-ccagttgttaaaggacctgct-3'	75	AluI

Таким образом был определен генотип пациентов, включенных в группы исследования, по генам ADRB2 (rs1042713), MDR1 (rs1045642), IL-13 (rs20541). Статистическую обработку частоты появления генотипов в группах пациентов и контрольной группе проводили методом описательной статистики качественных признаков [12, 13]. Рассчитывали частоту каждого генотипа по исследуемым генам в группе и ее достоверность. Различия между частотами соответствующих генов в исследуемых группах рассчитаны с помощью t-критерия Стьюдента. Частоты всех генотипов в «Группе-контроль» (здоровые добровольцы) достоверна, что подтверждается t-критерием Стьюдента (от 2,55 до 9,6 при уровне значимости $p < 0,01$). Уровень значимости рассчитанного t-критерия Стьюдента определяли по таблицам вероятности при нормальном распределении. Проанализированы доли и их ошибки для всех генотипов исследованных генов.

Результаты и обсуждение

Среди объединенной группы пациентов («Резистентная астма» и «Контролируемая

астма») независимо от установленного диагноза недостоверно определена только частота генотипа ТТ гена IL-13 (rs20541) (t-критерий Стьюдента составил 1,78 при уровне значимости 0,075). Частота остальных аллелей достигает 0,5 при уровне значимости $p < 0,001$.

Статистическую значимость различий между частотами генотипов проводили для «Группы-контроль» (здоровые добровольцы) и объединенной группы пациентов («Резистентная астма» и «Контролируемая астма»), а также «Группы-контроль» и каждой группы пациентов отдельно. Результаты оценки статистической значимости различий частот встречаемости генотипов по исследуемым генам MDR1 (rs1045642), ADRB2 (rs1042713) и IL-13 (rs20541) в контрольной группе и объединенной группе пациентов («Резистентная астма» и «Контролируемая астма») представлены в таблице 2.

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований и последующей статистической обработки полученных данных при уровне значимости $p < 0,05$ выявлены отличия по частоте встречаемости генотипов СС и ТТ (ген MDR1 (rs1045642)) между контрольной группой

и объединенной группой пациентов («Резистентная астма» и «Контролируемая астма»). Частота встречаемости генотипа СС ниже в контрольной

группе (0,219), чем в группе пациентов (0,386), а частота генотипа ТТ выше в контрольной группе (0,390), чем в группе пациентов (0,228).

Таблица 2 — Оценка статистической значимости различий частот встречаемости генотипов по изучаемым генам в контрольной группе и объединенной группе пациентов («Резистентная астма» и «Контролируемая астма»)

Ген	Генотип	Частота встречаемости генотипов и ошибка		t-критерий, Стьюдента	Уровень значимости, p
		«Группа-контроль» (здоровые)	объединенная группа пациентов		
MDR1	СС	0,219 ± 0,040	0,386 ± 0,064	2,265	0,024
	СТ	0,390 ± 0,048	0,386 ± 0,064	0,056	0,95
	ТТ	0,390 ± 0,048	0,228 ± 0,056	2,094	0,041
ADRB2	АА	0,162 ± 0,036	0,175 ± 0,050	0,221	0,83
	GA	0,467 ± 0,049	0,421 ± 0,065	0,557	0,57
	GG	0,371 ± 0,047	0,404 ± 0,065	0,401	0,69
IL-13	СС	0,467 ± 0,049	0,509 ± 0,066	0,512	0,61
	СТ	0,476 ± 0,049	0,439 ± 0,066	0,458	0,64
	ТТ	0,057 ± 0,023	0,053 ± 0,030	0,120	0,81

Выявлены статистически значимые ($p < 0,05$) различия между контрольной группой и группой пациентов с резистентной астмой по частоте встречаемости генотипа СС (ген MDR1 (rs1045642) — 0,219 и 0,459 соответственно, а также по частоте встречаемости генотипа ТТ — 0,390 и 0,243 соответственно. В группу «Резистентная астма» были включены пациенты с неконтролируемым течением астмы, следовательно, можно предположить, что выявлена ассоциация генотипа СС rs1045642 гена MDR1 с потребностью в больших дозах системных глюкокортикостероидов, что согласуется с результатами, полученными другими исследователями [8]. При сравнении частот встречаемости генотипов по изучаемым генам MDR1 (rs1045642), ADRB2 (rs1042713) и IL-13 (rs20541) в контрольной группе и у пациентов с контролируемой астмой отмечено отсутствие статистически значимых отличий, t-критерий Стьюдента не превысил 1,627 при уровне значимости $p > 0,1$.

Несмотря на то что некоторыми авторами описана ассоциация генотипа АА гена ADRB2 (rs1042713) с повышенным риском развития более тяжелой формы бронхиальной астмы, а также ее ночной формы по сравнению с гомозиготами по аллелю G, в нашем исследовании не установлено статистически значимых различий по частотам встречаемости всех генотипов гена ADRB2 (rs1042713) между контрольной группой и группой пациентов с контролируемой астмой, а также между группой пациентов с резистентной и контролируемой астмой.

Также не установлено статистически значимых различий по частотам встречаемости

всех генотипов гена IL-13 (rs20541) между контрольной группой и группой пациентов с контролируемой астмой, а также между группой пациентов с резистентной и контролируемой астмой. Этот результат подтверждает информацию о том, что SNP в гене IL-13, особенно те, которые охватывают промотор/кодирующую область IL-13, могут влиять на развитие атопии и, в меньшей степени, на тяжесть астмы [14].

Таким образом, дальнейшими направлениями работы являются увеличение групп пациентов с резистентной и контролируемой астмой, а также выбор других генов для изучения их вклада в развитие БА и определения молекулярно-генетических особенностей различных форм БА.

Заключение

1. Выявлены статистически значимые ($p < 0,05$) различия между контрольной группой и группой пациентов с резистентной астмой по частоте встречаемости генотипа СС (ген MDR1 (rs1045642)) — 0,219 и 0,459 соответственно, а также по частоте встречаемости генотипа ТТ — 0,390 и 0,243 соответственно, что свидетельствует об ассоциации генотипа СС rs1045642 гена MDR1 с потребностью в высоких дозах только ингаляционных глюкокортикостероидов или в их сочетании с системными глюкокортикостероидами.

2. Не выявлены статистически значимые различия по частотам встречаемости всех генотипов генов ADRB2 (rs1042713) и IL-13 (rs20541) между контрольной группой и группой пациентов с контролируемой астмой, а также между группой пациентов с резистентной и контролируемой астмой.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Global Initiative for Asthma (GINA) Teaching slide set 2017 update / Mode of access: <http://ginasthma.org/>. — Data of access: 10.02.2018.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2014) / под ред. А. С. Белевского. — М.: Российское респираторное общество, 2015. — 148 с.
3. International ERS/ATS Guidelines on Definition Evaluation and Treatment of Severe Asthma / K. F. Chang [et al.] // *Eur. Respir. J.* — 2014. — № 43. — P. 343–373.
4. Overall asthma control: The relationship between current control and future risk / E. D. Bateman [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2010. — № 125 (3). — P. 600–608.
5. Комплексная динамическая оценка качества жизни пациентов с бронхиальной астмой / Д. Ю. Рузанов [и др.] // *Медицинская панорама.* — 2014. — № 7 (151). — С. 84–86.
6. March, M. E. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma / M. E. March, P. M. Sleiman, H. Nakonaron // *Int. J. Gen. Med.* — 2013 Apr. — Vol. 6. — P. 253–265.
7. Хайтович, М. В. Фармакогенетика бронхіальної астми / М. В. Хайтович // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* — 2015. — № 3 (44). — С. 17–27.
8. Мутация С3435Т в гене множественной лекарственной устойчивости MDR1 — фармакогенетический маркер тяжелого течения бронхиальной астмы / Ж. А. Миронова [и др.] // *Российский аллергологический журнал.* — 2012. — № 2. — С. 9–12.
9. Adrenergic beta (2)-receptor genotype predisposes to exacerbations in steroid-treated asthmatic patients taking frequent albuterol or salmeterol / K. Basu [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* — 2009. — Dec; 124(6). — P. 1188–1194.
10. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1045642 [Electronic resource] / Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1045642. — Data of access: 31.05.2016.
11. Association of IL-13 gene polymorphisms with airway hyper-responsiveness in a Japanese adult asthmatic population / Yu Utsumi [et al.] // *Respiratory Investigation.* — 2013. — 51(3). — P. 147–152.
12. Рокіцкі, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокіцкі. — Минск: Выш. шк., 1967. — 327 с.
13. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
14. Polymorphisms in IL13 pathway genes in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / B. Béghe [et al.] // *Allergy.* — 2010. — № 65. — P. 474–481.

Поступила 21.02.2018

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 579.842.16:615.281

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРЕПАРАТАМ БАКТЕРИОФАГОВ
КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
С РАЗЛИЧНЫМИ УРОВНЯМИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Д. В. Тапальский, А. И. Козлова

Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»,
г. Гомель, Республика Беларусь

Цель: оценить чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности к коммерческим препаратам бактериофагов.

Материал и методы. Выполнена реидентификация и определена чувствительность к антибиотикам и препаратам бактериофагов 109 клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных от госпитализированных пациентов в лечебных учреждениях трех регионов Беларуси. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени определено наличие генов карбапенемазы.

Результаты. Показано широкое распространение экстремальной антибиотикорезистентности среди *K. pneumoniae*, связанное с продукцией карбапенемазы NDM и OXA-48. Установлена недостаточная литическая активность препаратов бактериофагов в отношении штаммов *K. pneumoniae*. Наиболее широким спектром активности обладал препарат «Секстаф», который лизировал с высокой активностью 28,4 % изолятов клебсиелл.

Заключение. Препараты бактериофагов можно рассматривать как возможную альтернативу антибиотикам для лечения инфекций, вызванных экстремально антибиотикорезистентными изолятами *K. pneumoniae*. Необходимо дополнить состав выпускаемых препаратов фаговыми штаммами, активными в отношении изолятов клебсиелл, продуцирующих карбапенемазы.

Ключевые слова: клебсиеллы, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, бактериофаги.

SENSITIVITY OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES
WITH VARIOUS LEVELS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE
TO BACTERIOPHAGE PREPARATIONS

D. V. Tapalsky, A. I. Kozlova

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Objective: to assess sensitivity of *K. pneumoniae* clinical isolates with different levels of antibiotic resistance to commercial bacteriophage preparations.

Material and methods. We have performed re-identification and determination of the sensitivity to antibiotics and bacteriophage preparations of 109 *K. pneumoniae* clinical isolates isolated from patients hospitalized in medical institutions of three regions of Belarus. The presence of carbapenemase genes has been detected by real-time PCR.