

© Коллектив авторов, 2006

Л.М. Огородова<sup>1</sup>, И.В. Петрова<sup>1</sup>, И.И. Иванчук<sup>1</sup>, И.А. Деев<sup>1</sup>, М.Б. Фрейдин<sup>2</sup>

## РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ NO-СИНТАЗ В РАЗВИТИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

<sup>1</sup>Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет», <sup>2</sup>Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Томского научного центра Сибирского отделения РАМН, г. Томск, РФ

**Цель работы** – исследование роли полиморфных вариантов генов NO-синтаз в развитии бронхиальной астмы (БА). У 120 детей в возрасте от 7 до 14 лет, больных БА различной степени тяжести, проводили исследование ассоциации клинико-функциональных характеристик заболевания с различными полиморфными вариантами генов NO-синтаз на фоне 12-недельного курса стандартной базисной терапии. В работе использован общепринятый комплекс обследования детей, страдающих БА, молекулярные методы исследования, а также методы статистической обработки. Установлено, что полиморфизм промоторной области генов NO-синтаз ассоциирован с фенотипическим проявлением значимых для БА патогенетических признаков и является важной компонентой наследственной подверженности атопической БА.

The aim of present study was to investigate role of NO- synthase gene-polymorphous variants in development of bronchial asthma (BA). Association of clinical and functional BA characteristics with different NO- synthase gene polymorphous variants was investigated in 120 children with different BA severity on the background of standard 12-weeks course of controlled therapy. Investigation included routine complex examination for patients with BA, molecular methods and methods of statistic analysis. Authors determined that polymorphism of promoter zone of NO-synthase gene was associated with phenotypic manifestation of pathogenetic features playing role in BA development and was one of important components of hereditary predisposition for atopic BA.

Бронхиальная астма (БА) относится к наиболее распространенным хроническим заболеваниям легких. Профилактика данного заболевания, а также совершенствование методов диагностики и лечения являются важной задачей современной медицины. Итогом исследований последних лет стало понимание важной роли оксида азота (NO) в развитии БА [1–3]. NO, в качестве сигнального мессенджера, вовлечен в регуляцию многих биологических процессов, включая воспаление и гиперреактивность бронхов [4, 5]. Установлено, что повышение NO в выдыхаемом воздухе в ответ на вдыхание аллергена сопряжено с выраженностью клинических симптомов БА, бронхиальной гиперреактивностью (БГР) [6, 7]. Описано участие NO в развитии иммунного ответа при аллергическом воспалении [8, 9].

В регуляции продукции NO важную роль играют NO-синтазы (NOS1 – нейрональная, NOS2 – индуцибельная, NOS3 – эндотелиальная) [10]. Аллельный полиморфизм генов NO-синтаз может определять вариабельность продукции NO и составляет биологическую сущность подверженности к развитию БА.

Целью данной работы явилось исследование роли полиморфных вариантов генов NO-синтаз в развитии БА.

### Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе Областного детского центра клинической иммунологии и аллергологии Областной детской больницы (главный врач – В.А. Сальников).

Обследовано 120 детей в возрасте от 7 до 14 лет, больных БА различной степени тяжести. Контрольную группу составили 26 здоровых детей того же возраста.

Диагноз БА устанавливали на основании характерного анамнеза, типичных клинических симптомов заболевания, обратимости бронхиальной обструкции в тесте с бронхолитиком >15%. Степень тяжести БА оценивали согласно критериям проекта GINA [11].

Для лечения больных применяли следующие фармакотерапевтические режимы.

Легкая персистирующая БА:

- флутиказона пропионат 100 мкг/сут;
- сальбутамол 100 мкг – по требованию.

Среднетяжелая персистирующая БА:

- серетид 50/100 мг 2 р/сут;
- сальбутамол 100 мкг – по требованию.

Тяжелая персистирующая БА:

- серетид 50/250 мг 2 р/сут;
- сальбутамол 100 мкг – по требованию.

Больные были обследованы в период обострения (до лечения) и через 12 недель от начала лечения (в стадии ремиссии).

Оценку функции внешнего дыхания (ФВД) – анализ кривой «поток – объем» – и показателей спирометрии проводили по стандартной методике с использованием спирографа Master Scope (Erich Jaeger GmbH, Германия). Для изучения проходимости средних и мелких бронхов всем больным проводили измерение пиковой скорости выдоха (ПСВ) при помощи пикфлоуметра «Минирайт» стандартной модификации 2 раза в день. Уровень неспецифической БГР оценивали при помощи провокационного теста с метахолином. Тест проводили дозовым методом при помощи APS-системы с небулайзером, результаты выражались как концентрация метахолина, вызывающая 20% падение ОФВ<sub>1</sub> (ПК<sub>20</sub>).

Уровень NO в выдыхаемом воздухе определяли путем регистрации нитритов с использованием реактива Грисса.

Выделение геномной ДНК из венозной крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора для выделения ДНК и РНК на колонках «QIAGEN RNA/DNA» (QIAGEN, Германия).

Реакцию амплификации проводили на автоматическом амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Москва). РТ-ПЦР (reverse transcription PCR) проводили с использованием набора «Titan One Tube RT-PCR System» (Roche Diagnostics GmbH, Германия) согласно приложенной инструкции.

Для каждой пары праймеров подбирали соответствующую концентрацию ионов Mg и программу амплификации. Все праймеры были синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе («Биосет», г. Новосибирск).

Экспрессию мРНК оценивали количественно в сравнении с экспрессией мРНК глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФД). Ген этого фермента относится к постоянно экспрессирующим (house keeping) генам, экспрессия этого гена является стабильной и постоянной во всех клетках организма. Степень экспрессии мРНК выражали в % по отношению к экспрессии мРНК ГАФД.

Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 2% агарозном геле.

Для выявления полиморфных вариантов в исследуемых последовательностях генов NO-синтаз в промоторной области использовали анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP, single-strand conformational polymorphysm).

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК (по Сенгеру) проводили на автоматическом секвенаторе ДНК модели ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Оценку нормальности распределения полученных результатов по каждой величине проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Статистическую обработку результатов для признаков с нормальным распределением проводили с использованием t-критерия Стьюдента; для признаков, не соответствующих нормальному закону распределения, применяли U-тест Манна–Уитни. Сравнение частот аллелей в группах об-

ледованных проводили с помощью точного критерия Фишера и Колмогорова–Смирнова. Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

В результате клинического обследования пациентов у 35 детей установлена легкая БА (средний возраст 10,3 лет), у 39 – среднетяжелая БА (средний возраст 9,5 лет) и у 46 детей – тяжелая форма заболевания (средний возраст 10,5 лет).

Уровень NO в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) в период обострения был достоверно повышен у всех больных по сравнению с группой контроля. При этом наиболее высокое содержание NO было отмечено у детей с тяжелой БА (табл. 1).

На фоне базисной противовоспалительной терапии у всех больных БА уровень NO в КВВ значительно снизился (табл. 2), однако достиг контрольных значений только при легкой БА.

Установлена корреляция NO в КВВ с уровнем мРНК генов NO-синтаз и характерными для БА клиническими показателями, такими как ОФВ<sub>1</sub>, ПСВ, ПК<sub>20</sub> (табл. 3).

При изучении экспрессии генов ферментов NO-синтаз (NOS1, NOS2, NOS3) у больных БА и в контрольной группе было установлено, что у всех больных в период обострения БА уровень мРНК генов NO-синтаз был значительно выше ( $15,1 \pm 1,2\%$ ;  $114,4 \pm 2,7\%$ ;  $4,40 \pm 0,34\%$  соответственно для NOS1,

Таблица 1

#### Содержание NO в КВВ у больных БА различной степени тяжести до лечения

Группы пациентов	Содержание нитритов, мкМ
Легкая БА (n=35)	$0,47 \pm 0,3^{1),2),3)}$
Среднетяжелая БА (n=39)	$0,67 \pm 0,3^{2),3)}$
Тяжелая БА (n=46)	$0,89 \pm 0,03^{3)}$
Контрольная (n=26)	$0,30 \pm 0,01$

Здесь и в табл. 2: достоверность различия: <sup>1)</sup> при сравнении с показателями группы контроля; <sup>2)</sup> при сравнении с показателями у пациентов со среднетяжелой БА; <sup>3)</sup> при сравнении с показателями у пациентов с тяжелой БА.

Таблица 2

#### Содержание NO в КВВ у больных БА различной степени тяжести после лечения

Группы пациентов	Содержание нитритов, мкМ
Легкая БА (n=35)	$0,33 \pm 0,01^{1),2),3)}$
Среднетяжелая БА (n=39)	$0,39 \pm 0,02^{2),3)}$
Тяжелая БА (n=46)	$0,52 \pm 0,02^{3)}$
Контрольная (n=26)	$0,30 \pm 0,01$

Таблица 3

**Результаты корреляционного анализа между содержанием NO в КВВ, клиничко-патогенетическими и лабораторными показателями**

Показатели	ОФВ <sub>1</sub>	ПСВ	ПК <sub>20</sub>	мРНК NOS1	мРНК NOS2	мРНК NOS3
NO в КВВ:						
r	0,19	0,32	0,09	0,34	0,34	0,31
p	0,07	0,002	0,039	0,001	0,001	0,003

NOS2, NOS3) по сравнению с показателями в группе контроля ( $6,4 \pm 1,2\%$ ;  $17,4 \pm 2,6\%$ ;  $1,48 \pm 0,16$  соответственно для NOS1, NOS2, NOS3) ( $p < 0,001$ ).

Более того, даже в период ремиссии значения мРНК генов NO-синтаз достоверно превышали аналогичный показатель у здоровых детей ( $9,2 \pm 2,8\%$ ;  $46,2 \pm 5,9\%$ ;  $2,51 \pm 0,05\%$  соответственно для NOS1, NOS2, NOS3 против  $6,4 \pm 1,2\%$ ;  $17,4 \pm 2,6\%$ ;  $1,48 \pm 0,16\%$  у здоровых) ( $p < 0,05$ ), что подчеркивает значимость этого признака в качестве маркера БА (рис. 1).

Экспрессия генов NO-синтаз возрастала пропорционально тяжести заболевания. Так, уровень мРНК NOS2 при тяжелой БА был значительно выше, чем при легкой и среднетяжелой БА ( $p < 0,001$ ), а также почти в 10 раз превышал значение исследуемого показателя в контрольной группе. Аналогично, при тяжелой и среднетяжелой БА был отмечен более высокий уровень мРНК генов NOS3 и NOS1 ( $p < 0,001$ ) (рис. 2).

После 12 недель противовоспалительной терапии с применением ингаляционных кортикосте-

роидов у многих больных обнаружена лишь тенденция к снижению экспрессии генов NO-синтаз (рис. 3). Так, у детей с тяжелой и среднетяжелой БА уровень матричной активности NOS2 значительно снизился и составил  $50,4 \pm 7,1\%$  и  $46,9 \pm 4,7\%$  соответственно, однако не достиг значений здоровых детей ( $17,4 \pm 2,6\%$ ;  $p < 0,001$ ). При тяжелой БА отмечалось достоверное уменьшение уровня экспрессии генов NOS1 до  $10,6 \pm 1,4\%$  ( $p < 0,001$ ) и NOS3 до  $10,0 \pm 2,6\%$  ( $p < 0,001$ ), который также не достиг контрольных значений ( $6,5 \pm 0,2\%$  и  $4,5 \pm 0,3\%$  соответственно). Данные результаты свидетельствуют о безусловной связи уровня мРНК генов NO-синтаз с развитием БА.

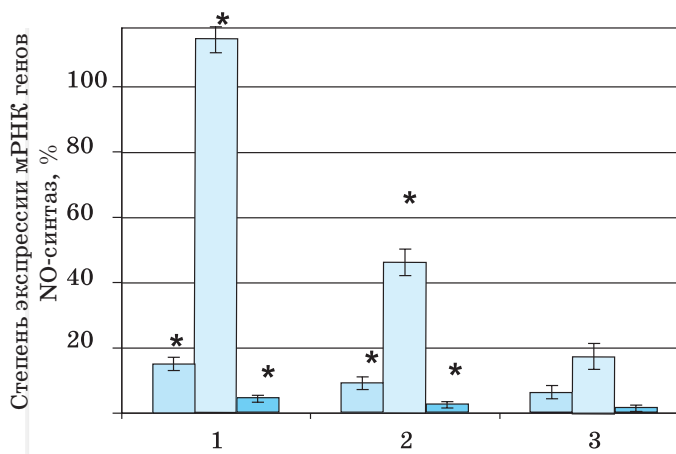


Рис. 1. Уровень мРНК генов NO-синтаз у больных БА до лечения и в период ремиссии.

\*  $p < 0,05$  при сравнении показателей с контрольной группой; здесь и на рис. 2б и 3б: 1-й столбик – NOS1, 2-й столбик – NOS2, 3-й столбик – NOS3.

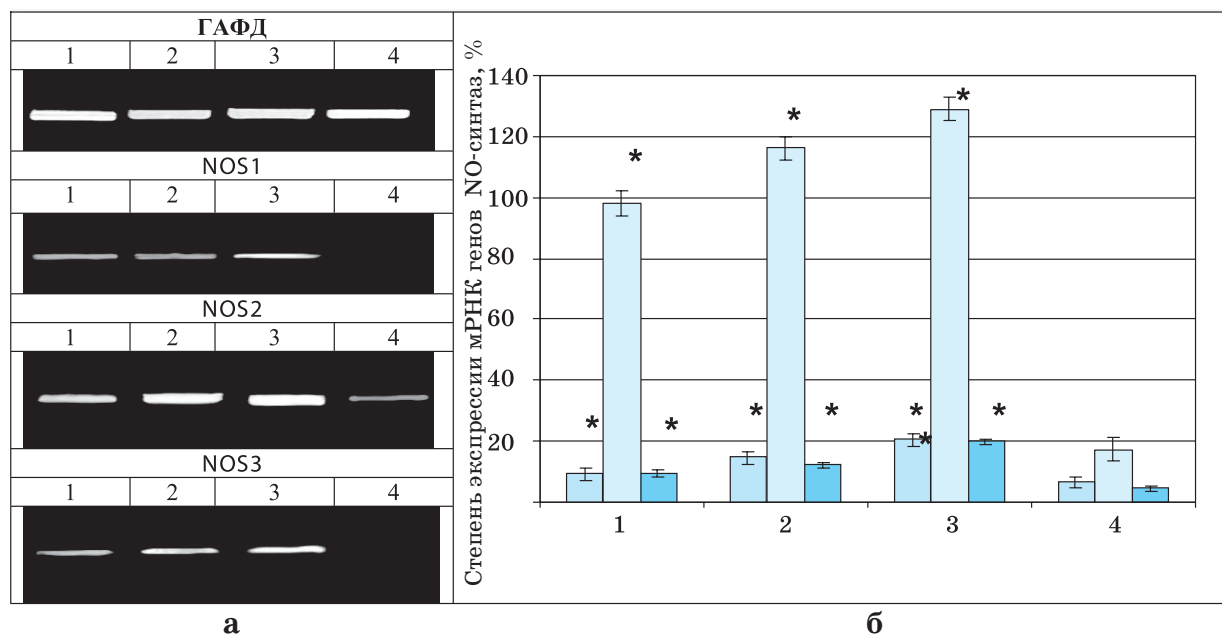


Рис. 2. Уровень мРНК генов NO-синтаз по результатам РТ-ПЦР (а) у больных БА различной степени тяжести в период обострения (б).

Здесь и на рис. 3: 1 – легкая БА, 2 – среднетяжелая БА, 3 – тяжелая БА, 4 – контрольная группа.

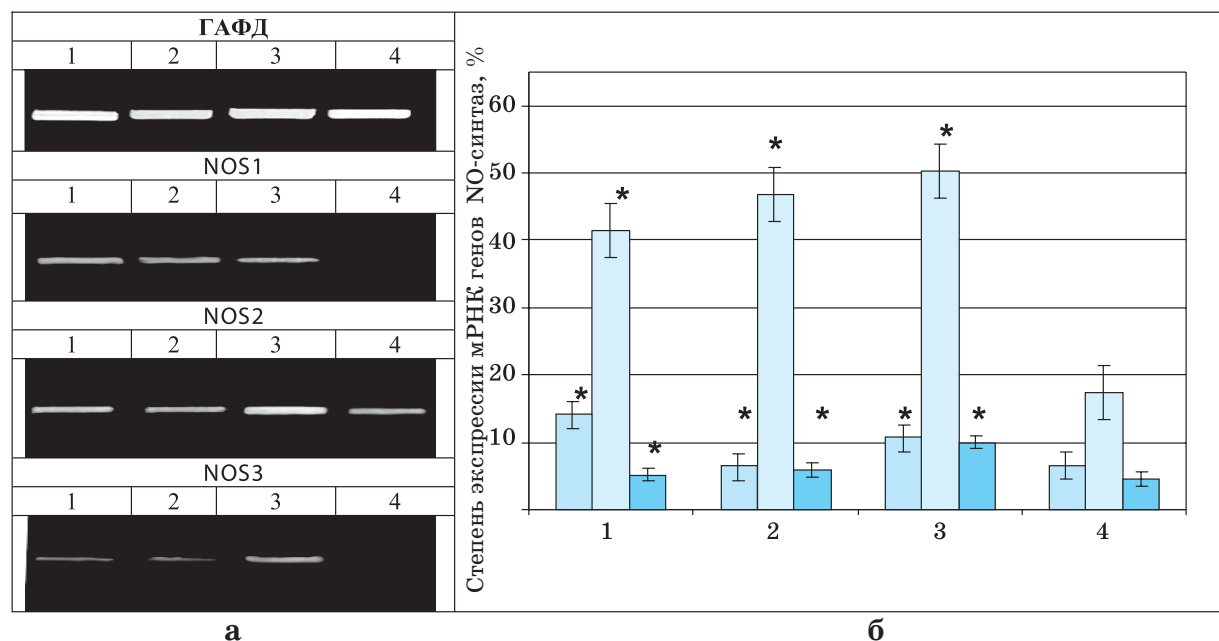


Рис. 3. Уровень мРНК генов NO-синтаз по результатам РТ-ПЦР (а) у больных бронхиальной астмой различной степени тяжести в период ремиссии (б).

В результате анализа конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК в промоторной области гена NOS1 было обнаружено 3 полиморфных варианта: NOS-11, NOS-12 и NOS-13; в промоторной области гена NOS2 – 4 полиморфизма: NOS-21, NOS-22, NOS-23 и NOS-24. В промоторной области гена NOS3 было идентифицировано 4 аллельных варианта: NOS-31, NOS-32, NOS-33 и NOS-34.

Следующим этапом работы было проведение секвенса участков промоторной области генов NO-синтаз с целью установления точной нуклеотидной локализации замен. В результате секвенирования нуклеотидных последовательностей и выравнивания их по соответствующим консенсусным последовательностям, было установлено, что аллель NOS-11 гена нейрональной NO-синтазы (NOS1) идентичен консенсусной последовательности (GenBank № U15666.1), аллели NOS-12 и NOS-13 имеют трансверсии –274 (Т/Г) и –186 (А/С) соответственно (относительно точки инициации транскрипции +1).

В аллельном варианте NOS-21 гена индуцибельной NO-синтазы (NOS2) была обнаружена замена (G/T) в положении –326 п.о., аллель NOS-22 имеет делецию –343 (C/–), а аллель NOS-24 – инсерцию –189 (–/GTGTGT). Аллельный вариант NOS-23 соответствует консенсусной последовательности (GenBank № L36031.1).

Аллель NOS-33 гена эндотелиальной NO-синтазы (NOS3) имеет делецию (GCCC/–) в положении –260 п.о., аллель NOS-31 соответствует консенсусной последовательности (GenBank № D26607.1), в свою очередь в аллелях NOS-32 и NOS-34 обнаружены замены –237 (G/A) и –258 (C/A) соответственно.

Основное внимание в проведенном исследовании было уделено функциональной значимости полиморфизма генов NO-синтаз в патогенезе атопической БА. В анализ ассоциаций полиморфизма генов NO-синтаз были включены показатели функции внешнего дыхания (ОФВ<sub>1</sub> и ПСВ); БГР (ПК<sub>20</sub>), уровня мРНК генов и содержания NO в КВВ.

Исследование роли полиморфизма генов NO-синтаз в детерминации изменчивости количественных, патогенетически важных для БА признаков, проводили, анализируя различия средних значений показателей у носителей разных генетических вариантов. В результате была установлена взаимосвязь аллелей –189 (–/GTGTGTT) и –326 (G/T) гена NOS2; аллелей –274 (Т/Г) и –186 (А/С) гена NOS1, а также аллелей –258 (С/А) и –237 (G/A) гена NOS3 с высоким уровнем мРНК и эндогенного NO. Средний уровень мРНК и, соответственно, содержание NO в КВВ у пациентов с этими аллелями были значительно выше ( $p < 0,001$ ), чем у больных с другими аллельными вариантами генов NO-синтаз. В период ремиссии наблюдалась лишь тенденция к уменьшению этих показателей. Уровень мРНК и содержание NO в КВВ оставались на достаточно высоком уровне и достоверно отличались от контрольных значений ( $p < 0,001$ ).

Наиболее выраженное нарушение вентиляции легких по обструктивному типу отмечалось у больных с аллелем –186 (А/С) гена NOS1, аллелями –189 (–/GTGTGTT) и –326 (G/T) гена NOS2, и у пациентов с аллелем –258 С/А гена NOS3. На фоне базисной противовоспалительной терапии у этих больных была отмечена положительная динамика, однако параметры ФВД достоверно отличались от контрольных значений даже в период ремиссии.



В период обострения у пациентов-носителей аллеля -189 (-/GTGTGTT) гена NOS2 были обнаружены наиболее низкие значения дозы метахолина, приводящей к бронхоспазму. Ситуация не изменилась и после курса лечения. В период ремиссии уровень ПК<sub>20</sub> у детей с аллелем -189 (-/GTGTGTT) составил 3,5±0,7 мг/мл и 4,8±0,3 мг/мл при тяжелой и среднетяжелой БА соответственно против 10,4±0,8 мг/мл в группе контроля (p<0,001). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что аллель -189 (-/GTGTGTT) ассоциирован как с обструкцией дыхательных путей, так и с высокой степенью БГР.

Используя точный критерий Фишера, удалось установить, что у больных среднетяжелой БА частота встречаемости аллеля -274 (T/G) гена NOS1 была значительно выше, чем в группе контроля (p=0,02) и в группах с легкой (p=0,03) и тяжелой (p=0,007) БА. Таким образом, можно говорить о том, что аллельный вариант -274 (T/G) гена NOS1 ассоциирован с развитием среднетяжелой БА.

Нами установлен факт эффективности базисной противовоспалительной терапии у больных с аллельным вариантом -343 (C/-) гена NOS2 в отношении

лабораторных (уровень мРНК; содержание NO в КВВ) и клинических показателей (ОФВ<sub>1</sub>; ПСВ), что дает возможность рассматривать этот полиморфизм как благоприятный в плане прогноза лечения больных.

### Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что БА сопровождается значительным повышением экспрессии генов NO-синтаз, которое является стабильным и сохраняется через 12 недель противовоспалительной терапии с применением ингаляционных кортикостероидов. Степень выраженности этих нарушений определяется тяжестью БА и периодом заболевания.

Полиморфизм промоторной области генов NO-синтаз ассоциирован с фенотипическим проявлением значимых для БА патогенетических признаков и является важной компонентой наследственной подверженности атопической БА.

Полученные сведения о полиморфизме генов NO-синтаз важны для формирования групп риска и планирования терапии БА с учетом генотипа индивидов по генам NO-синтаз.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Berlyne G., Barnes N. No role for NO in asthma? // *Lancet*. – 2000. – Vol. 355. – P. 1029–1030.
2. Silkoff P.E., Robbins R.A., Gaston B. et al. Endogenous nitric oxide in allergic airway disease. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2000. – Vol. 105. – P. 438–448.
3. Ashutosh K. Nitric oxide and asthma: a review. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2000. – Vol. 6, № 1. – P. 21–25.
4. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. // *J. Biosci. Rep.* – 1999. – Vol. 19, № 3. – P. 133–154.
5. De Sanctis G.T., MacLean J.A., Hamada K. et al. Contribution of nitric oxide synthases 1, 2 and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 17. – P. 1621–1630.
6. Scollo M., Zanconato S., Ongaro R. et al. Exhaled nitric oxide and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 161, № 3. – P. 1047–1050.
7. Jatakanon A., Lim S., Kharitonov S.A., Chung K.F. et al. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. // *Thorax*. – 1998. – Vol. 53, № 2. – P. 91–95.
8. Ferreira H.H., Bevilacqua E., Gaglioti S.M. Nitric oxide modulates eosinophils infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 358. – P. 253–259.
9. Payne D.N. Nitric oxide in allergic airway inflammation. // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 2. – P. 133–137.
10. Alderton W. K., Cooper C.E. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 16, №3. – P. 17–20.
11. Global Initiative for asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com).