

## РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Людмила Михайловна ОГОРОДОВА, Ирина Валерьевна ПЕТРОВА,  
Константин Юрьевич РУКИН

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

В последние годы отмечается неуклонный рост распространенности IgE-опосредованных аллергических заболеваний, в том числе и бронхиальной астмы. Сегодня в мире насчитывается около 300 миллионов больных бронхиальной астмой; согласно прогнозам, к 2025 г. этот показатель может составить 400 миллионов. Результатом исследования последних лет стало понимание того, что оксид азота и его метаболиты являются важными участниками аллергического воспаления. С целью исследования роли полиморфных вариантов гена индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в формировании бронхиальной астмы исследован генетический полиморфизм (–954G/C, (CCTTT)*n*) промоторной области гена фермента у 929 больных бронхиальной астмой и 720 практически здоровых детей. Установлено, что полиморфизм –954G/C, (CCTTT)*n* гена iNOS ассоциирован с формированием бронхиальной астмы. Обнаружены генотипы, обладающие протективным эффектом.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, полиморфизм гена, оксид азота.

Бронхиальная астма (БА) является глобальной медико-социальной проблемой. Сегодня в мире насчитывается около 300 миллионов больных БА. Согласно прогнозам, к 2025 г. этот показатель может составить 400 миллионов. В России ежегодно регистрируется около 115 тысяч впервые выявленных больных. В структуре инвалидности удельный вес БА среди болезней органов дыхания составляет 64,9 %, а в трудоспособном возрасте – 80,9 % [1].

Оксид азота (NO) и его метаболиты, участвующие в формировании окислительного и нитрозирующего стресса, являются важными участниками аллергического воспаления, что отражается на изменении их концентрации в сыворотке крови у больных БА [2, 3].

В регуляции продукции оксида азота важную роль играют NO-синтазы. Ключевое значение имеет индуцибельная NO-синтаза (iNOS, NOS2). По мнению ряда исследователей, среди генов, кодирующих NO-синтазу, ген iNOS является наиболее вероятным кандидатом на участие в развитии болезни [4]. Так, например, ученые из Чехии описали полиморфные варианты гена iNOS, локализованные в позиции 1659C/–1026G, ассоциированные с атопией [5]. Ген индуцибельной NO-синтазы (№ NCBI L36031.1) расположен на 17-й хромосоме в райо-

не 17cen-q11.2, содержит 26 экзонов и 25 интронов и имеет длину 37 килобаз.

Исследование полиморфизма генов NO-синтаз и определение причин гиперпродукции NO при аллергическом воспалении имеют большое значение для понимания патогенеза БА. Однако пока не ясно, какие мутации данных генов наиболее значимы [6]. В связи с этим было спланировано и проведено исследование полиморфизма промоторной области (CCTTT)*n* и одонуклеотидной замены –954G/C в гене iNOS.

Цель исследования – установить роль полиморфных вариантов гена индуцибельной NO-синтазы в формировании бронхиальной астмы.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили образцы ДНК больных БА детей (*n* = 929, средний возраст  $10,9 \pm 1,6$  года, средняя продолжительность болезни  $2,8 \pm 0,5$  года). В качестве контроля использовали ДНК практически здоровых детей (*n* = 720). Диагноз БА устанавливали на основании клинического обследования, данных лабораторных и инструментальных исследований.

Критерии включения в группу больных бронхиальной астмой [1]:

- амбулаторные и стационарные пациенты;
- возраст пациентов от 1 до 17 лет;

Огородова Л.М. – д.м.н., проф., член-корр. РАМН, проректор по научно-исследовательской работе и после-  
дипломной подготовке, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Петрова И.В. – к.м.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ, e-mail: irinavall@mail.ru

Рукин К.Ю. – студент 6-го курса медико-биологического факультета, e-mail: naukatomsk@yandex.ru

– содержание IgE в сыворотке крови  $\geq 100$  МЕ/мл;  
– наличие подтвержденного диагноза бронхиальной астмы:

○ легкая персистирующая: симптомы чаще 1 раза в неделю, но реже 1 раза в день, обострения, нарушающие активность и сон, ночные симптомы чаще 2 раз в месяц, объем форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1) или вариабельность пиковой скорости выдоха (ПСВ) не менее 80 % от должных значений, ПСВ или ОФВ1 не более 30 %;

○ персистирующая среднетяжелая: симптомы ежедневно, обострения, нарушающие активность и сон, ночные симптомы более 1 раза в неделю, ежедневный прием ингаляционных  $\beta_2$ -агонистов короткого действия, ОФВ1 или ПСВ 60–80 % от должных значений, вариабельность ПСВ или ОФВ1 более 30 %;

○ тяжелая персистирующая: симптомы ежедневно, частые обострения, частые ночные симптомы БА, ограничения физической активности, ОФВ1 или ПСВ не превышает 60 % от должных значений, вариабельность ПСВ или ОФВ1 не менее 30 %.

Критерии включения в контрольную группу:

– возраст от 5 до 17 лет;  
– отсутствие аллергических болезней на момент включения и в анамнезе;  
– отсутствие острых респираторных заболеваний в течение 4-х недель до включения в исследование;  
– отрицательные результаты кожных аллергопроб;  
– содержание IgE в сыворотке крови  $< 100$  МЕ/мл.

Исследование соответствовало этическим стандартам биоэтического комитета Сибирского государственного медицинского университета. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом 30.10.2007, № 669, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками (2000 г.) и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденными Приказом № 266 Минздрава РФ от 19.06.2003. Родители (опекуны) всех включенных детей подписали информированное согласие на участие в настоящем исследовании.

ДНК выделяли из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции по стандартной неэнзиматической методике [7]. Генотипирование по полиморфным вариантам (CCTTT)*n*, –954 G/C и (TAAA)*n* проводили в пробирках

0,5 мл типа «Эппендорф» на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Москва). Состав реакционной смеси (50 мкл): 67 mM Трис-HCl, pH 8,8, 16,7 mM аммония сульфата, 1,5 mM хлорида магния, dNTP по 0,2 mM каждого, 0,1 % твин-20, 2 ед. Taq-полимеразы, 50–100 нг геномной ДНК человека. Использовали следующие праймеры: NOS2 (–954G/C) прямой 5'-GTATGAGGTGGGGAGACTCAGAAAGC-3', обратный 5'-TTCTAAATGCCAAGAGCTTCAGC-3'. Амплификат подвергали гидролизу рестриктазой AlwN I. Анализ амплификата проводили в 2 % агарозном геле с использованием ТБЕ-буфера (5,4 г Трис, 2,75 г борной кислоты, 0,46 г ЭДТА, dH<sub>2</sub>O до 1 л, pH 8,3) с бромистым этидием (2 мкл/100 мл буфера). Электрофорез проводили при напряжении 20 В/см в течение 10 мин. Результаты визуализировали на видеосистеме BIOTEST-D (Германия).

Для амплификации фрагмента ДНК, содержащего полиморфный маркер (CCTTT)*n*, использовали следующие праймеры: NOS2 (CCTTT)*n* прямой 5'-ACCCCTGGAAGCCTACAAC-3', обратный 5'-GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA-3'. Детекцию проводили в 5 % денатурирующем полиакриламидном геле.

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия  $\chi^2$ . Для сравнения частот аллелей и генотипов между исследованными группами использовали критерий  $r_p$  Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы, равном 1. Для сравнения средних значений независимых распределений использовали однофакторный дисперсионный анализ. Расчеты проводили с помощью программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании у больных БА изучены два полиморфизма, которые локализируются в промоторной области гена индуцибельной NO-синтазы: пентануклеотидный tandemный повтор (CCTTT)*n*, количество которых варьирует от 8 до 21, и однонуклеотидная замена (SNP) –954G/C.

Установлено, что в группе больных БА распределение генотипов по полиморфному варианту –954G/C гена iNOS не соответствует ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга (PXB) ( $\chi^2 = 37,24$ , d.f. = 1,  $p = 0,001$ ). В группе больных отмечено отклонение наблюдаемой гетерозиготности в сторону недостатка гете-

Таблица 1

**Распределение генотипов полиморфизма –954G/C гена *i*NOS  
у больных бронхиальной астмой и в группе контроля**

Генотип	Больные БА, % ( <i>n</i> = 929)	Контроль, % ( <i>n</i> = 720)	Относительный риск	95% доверительный интервал	Уровень значимости
GG	67,82	80,0	0,85	0,80–0,90	< 0,001
GC	27,99	19,16	1,46	1,22–1,75	< 0,001
CC	4,19	0,84	5,04	2,14–11,83	< 0,001

Примечание. GG – гомозигота по аллелю G, GC – гетерозигота по аллелю C, CC – гомозигота по аллелю C.

Таблица 2

**Распределение генотипов полиморфизма (CCTTT)*n* гена *i*NOS  
у больных бронхиальной астмой и в группе контроля**

Генотип	Больные БА, % ( <i>n</i> = 929)	Контроль, % ( <i>n</i> = 720)	Относительный риск	95 % доверительный интервал	Уровень значимости
14/14	4,84	15,84	0,31	0,22–0,43	< 0,001
14/х	9,05	43,33	0,41	0,17–0,26	< 0,001
х/х	86,11	40,83	2,11	2,92–2,31	< 0,001

Примечание. Здесь и в табл. 3 14/14 – гомозигота по количеству повторов, равных 14, х/х – гомозигота по количеству повторов, не равных 14, 14/х – гетерозигота.

розигот ( $D = -0,27$ ). В группе контроля распределение частот генотипов по полиморфному варианту соответствует ожидаемому при РХВ ( $\chi^2 = 6,17$ , d.f. = 1,  $p = 0,18$ ).

Обнаружено, что наиболее часто встречаемым генотипом как у больных БА, так и в контрольной группе является гомозигота GG. Также отмечено, что гетерозигота GC и гомозигота CC достоверно увеличивают риск развития бронхиальной астмы (табл. 1). Предположительно, аллель C является патологическим аллелем, увеличивающим риск развития болезни.

Наблюдаемое распределение генотипов по количеству tandemных повторов (CCTTT)*n* в группе больных БА не соответствовало ожидаемому при РХВ ( $\chi^2 = 49,33$ , d.f. = 1,  $p = 0,001$ ). Выявлено достоверное различие между частотами генотипов полиморфизма (CCTTT)*n* гена NOS2 у больных БА и здоровых детей ( $\chi^2 = 41,58$ ,

$p = 0,001$ ). Отмечено отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой в сторону недостатка гетерозигот ( $D = -0,47$ ). В контрольной группе распределение частот генотипов по полиморфному варианту (CCTTT)*n* гена NOS2 соответствует ожидаемому при РХВ.

Расчет рисков показал, что вероятность формирования БА достоверно ниже у носителей гомозигот с 14 повторами (14/14) и гетерозигот 14/х. В свою очередь, наличие у больного гомозиготы х/х с числом повторов, не равным 14, увеличивало риск развития бронхиальной астмы больше чем в 2 раза (табл. 2).

Анализ клинико-функциональных характеристик болезни в зависимости от полиморфизма гена *i*NOS у больных БА показал, что возраст первых клинических проявлений астмы значимо различается у больных с различным количеством повторов (CCTTT)*n*. Наиболее раннее начало болезни ( $1,40 \pm 0,42$  года,  $p = 0,02$ ) характерно для пациентов, имеющих гомозиготу по 14 повторам (CCTTT)*n*. Достоверно позже ( $5,79 \pm 0,51$  года,  $p = 0,04$ ) отмечен дебют БА у пациентов, у которых число повторов было не равным 14 по обоим аллелям.

Согласно результатам, представленным в табл. 3, достоверно большее содержание общего IgE в сыворотке крови отмечено для гомозигот, у которых число повторов (CCTTT)*n* не равнялось 14.

Таблица 3

**Содержание общего IgE в сыворотке крови  
у больных бронхиальной астмой с различным  
количеством повторов (CCTTT)*n*  
в промоторе гена *i*NOS**

Генотип	<i>n</i>	Содержание IgE, МЕ/мл	Уровень значимости
х/х	147	$1178,53 \pm 241,01$	0,003 (14/14)
14/х	16	$301,11 \pm 34,01$	0,37 (х/х)
14/14	5	$285,71 \pm 35,11$	0,008 (14/X)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наличие определенных полиморфных вариантов гена iNOS может оказывать влияние на фенотипические проявления бронхиальной астмы и важные патогенетические признаки болезни. Полученные данные можно использовать для предиктивной диагностики предрасположенности к бронхиальной астме.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Ред. А.Г. Чучалин. М.: Атмосфера, 2007. 104 с.

Global strategy of the treatment and prevention of bronchial asthma / Ed. A.G. Chuchalin. M.: Atmosfera, 2007. 104 p.

2. Alderton W., Cooper C., Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. 2001. 357. 593–615.

3. Fabio L., Ricciardolo M., Peter J. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system // Physiol. Rev. 2004. 84. 731–765.

4. Pitt B.R., St Croix C.M. Complex regulation of iNOS in lung // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002. 26. (1). 6–9.

5. Holla L., Stejskalova A., Znojil V., Vasku A. Analysis of the inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms in Czech patients with atopic diseases // Clin. Exp. Allergy. 2006. 36. (12). 1592–1601.

6. Локишина Э.Э. Роль генетических маркеров в ранней диагностике atopических заболеваний // Педиатрия. 2006. (3). 87–89.

Lokshina E.E. Role of genetic markers in early diagnosis of atopic diseases // Pediatriya. 2006. (3). 87–89.

7. Фрейддин М.Б. Генетические основы подверженности к бронхиальной астме // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: Альфа Виста, 2001. 130–141.

Freidin M.B. Genetic basis of susceptibility to bronchial asthma // Molekulyarno-biologicheskie tehnologii v medicinskoj practice. Novosibirsk: Al'fa-Vista, 2001. 130–141.

## ROLE OF GENE POLYMORPHISM OF INDUCIBLE NO-SYNTHASE IN BRONCHIAL ASTHMA FORMING

**Lyudmila Mikhailovna OGORODOVA, Irina Valerevna PETROVA, Konstantin Yourevich RUKIN**

*Siberian State Medical University  
634050, Tomsk, Moskovskii tract, 2*

The steady increase in the prevalence of IgE-mediated allergic diseases including asthma has been registered in recent years. Today there are about 300 million patients with asthma. According to forecasts, by 2025 this figure could reach 400 million. The understanding of nitric oxide and its metabolites important value to allergic inflammation have been developed as the result of investigations carried out in recent years. In order to establish the role of polymorphic variants of the gene of inducible NO-synthase in bronchial asthma forming, genetic polymorphism (–954G/C, (CCTTT)*n*) of iNOS gene promoter region in 929 patients with bronchial asthma and 720 healthy children has been investigated. It has been established that the polymorphism –954G/C, (CCTTT)*n* iNOS gene is associated with bronchial asthma forming. Genotypes with protective effect have been revealed.

**Key words:** bronchial asthma, genetic polymorphism, nitric oxide.

**Ogorodova L.M.** – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, pro-rector on research scientific work and post-graduate training, [lm-ogorodova@mail.ru](mailto:lm-ogorodova@mail.ru)

**Petrova I.V.** – candidate of medical sciences, senior researcher of the central research laboratory, e-mail: [irinavall@mail.ru](mailto:irinavall@mail.ru)

**Rukin K.Y.** – student of 6 courses of the medical-biological faculty, e-mail: [naukatomsk@yandex.ru](mailto:naukatomsk@yandex.ru)