

УДК 616.248-056.52-018.74-07:575.174.015.3

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА T-786C ПРОМОТОРА ГЕНА
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ У БОЛЬНЫХ С БРОНХИАЛЬНОЙ
АСТМОЙ И ОЖИРЕНИЕМ

Пасиешвили Т.М.

Харьковский национальный медицинский университет

Бронхиальная астма (БА) принадлежит к наиболее распространенным хроническим заболеваниям легких, причем темпы роста заболеваемости наиболее высоки в экономически развитых странах мира, что позволяет рассматривать ее как болезнь цивилизации. По данным ВОЗ бронхиальная астма регистрируется у 5-10% населения, т.е. количество таких больных превышает 300 миллионов [5,7].

Статистика Национального института сердца и легких Великобритании приводит еще более впечатляющие данные: БА диагностирована у каждого пятого ребенка и у каждого восьмого взрослого, при этом в Новой Зеландии и Австралии количество таких больных достигает величин в 18% [10].

По данным НИИ пульмонологии ФБМБА (Россия) распространенность БА достигла 561,3 на 100 тысяч населения, а рост заболеваемости за последние 10 лет увеличился более чем в 3 раза [3].

Приведенная статистика института фтизиатрии и пульмонологии им.Ф.Г.Яновского показала, что таких больных в Украине зарегистрировано более 5%, при этом отмечено ежегодное увеличение заболеваемости и смертности при данной нозологии [2].

Течение БА, которое характеризуется прогрессирующим и циклическим процессом, приводит к структурным изменениям сосудистого русла (ремоделированию), для которого характерны пролиферация медиального слоя, миграция и пролиферация гладкомышечных клеток в интиму и ее фиброэластоз [6]. Однако ремоделирование легочных артерий

происходит не только при далеко зашедших стадиях заболевания, но и на ранних этапах развития данной патологии [11].

Одним из ключевых механизмов повышения давления в малом круге кровообращения длительное время считался вазоспазм в ответ на острую гипоксическую реакцию, однако в настоящее время важная роль в патогенезе легочной гипертензии отводится эндотелиальной дисфункции [4]. Одним из маркеров дисфункции эндотелия является оксид азота (NO). Традиционно выделяют три основные формы NO-синтаз: нейрональную (nNOS), эндотелиальную (eNOS) и индуцибельную (iNOS). Нейрональная и эндотелиальная изоформы фермента постоянно присутствуют в клетках и называются конститутивными, а индуцибельная форма синтезируется в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку [8].

Одним из генов сосудистой эндотелиальной функции является ген эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), наличие которого может рассматриваться в качестве показателя состояния сосудистой стенки. В таком случае можно предположить, что развитие эндотелиальной дисфункции у больных с БА, а, следовательно, прогрессирование заболевания, в той или иной мере зависит от полиморфизма данного гена.

Целью работы явилось изучение состояния и роли полиморфизма T-786C промотора гена eNOS в развитии дисфункции эндотелия у больных с бронхиальной астмой и при ее сочетании с ожирением.

Материал и методы. Обследовано 62 больных с БА, течение которой в 39 случаях протекало на фоне ожирения. Диагноз заболевания был установлен на предыдущих этапах обследования и лечения больных. Возраст обследованных в целом по группе составил $42,4 \pm 5,4$ года, преобладали женщины (64,3% - 45 лиц). Средняя тяжесть персистирующей БА регистрировалась у 27 больных, тяжелое персистирующее течение – у 35. Из 39 пациентов основной группы ожирение 1 степени было установлено у 19 больных, 2-й степени – у 16 пациентов.

Для получения показателей нормы было обследовано 50 практически здоровых лиц аналогичного пола и возраста. Всем обследованным пациентам проводилось изучение функции внешнего дыхания (ФВД) по данным динамической спирографии на аппарате Microlab 3300.

Оценку продукции оксида азота проводили путем регистрации нитрит-аниона в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) - биохимический метод с использованием реактива Грисса и регистрацией на спектрофотометре («Specord», Германия) при длине волны 540 нм.

ДНК-диагностика проведена в отделе молекулярно-генетических исследований ЦНИЛ ДонНМУ им. М. Горького. ДНК была выделена из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». В работе была использована диагностическая тест-система «SNP-экспресс» Т-786С промотора гена eNOS, разработанная НПФ Литех (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК с последующей электрофоретической детекцией. Реакция проводилась при следующих условиях: первичная денатурация при 93°C в течение 1 мин, после которой следовали 35 циклов, состоящих из денатурации при 93°C в течение 10 сек, отжига праймеров при 64°C в течение 10 сек, элонгации при 72°C в течение 20 сек. ПЦР проводили на амплификаторе Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems). Анализ амплифицированных фрагментов производили путем электрофореза в трис-боратном буфере в 3%-ном агарозном геле, окрашенном в бромистом этидии. Визуализация результатов осуществлялась в ультрафиолетовом трансиллюминаторе "TFX-20.M" ("Vilber Lourmat", Франция). Для выявления сопряжения между полиморфизмами гена eNOS, наличием диагноза бронхиальной астмы, показателями ФВД, содержанием нитрита в КВВ использованы методы: сопряжения, корреляции, частотного анализа и ряд других для оценки параметрических и непараметрических показателей статистики в SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку рисков, частот генотипов, аллелей и доверительных интервалов проводили с

использованием таблиц Microsoft Excel. Различия в частотах аллелей и генотипов между группами оценивали с помощью критерия χ^2 и расчета отношения рисков (OR) с доверительными интервалами (CI). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Статистическую обработку проводили с помощью прикладной программы «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение. Проведенное исследование показало, что течение БА приводит к уменьшению продукции нитритов, что проявлялось снижением их концентрации в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) до $1,9 \pm 0,2$ ммоль/л (в контроле - $3,3 \pm 0,8$ ммоль/л), $p < 0,05$. В тоже время, у больных с тяжелой формой БА формировалась тенденция ($p < 0,1$) к еще большей депрессии уровня нитритов - $1,4 \pm 0,3$ ммоль/л. Более низкое содержание нитритов в КВВ при тяжелой БА, по-видимому, связано с выраженной обструкцией дыхательных путей при данной форме заболевания. При этом возникновение эндотелиальной дисфункции можно объяснить с двух позиций. Во-первых, низкое содержание нитритов приводит к смещению рН среды в кислую сторону, что сопровождается образованием пероксинитрита. При этом высокая концентрация пероксинитрита в крови оказывает повреждающее действие на эндотелий сосудов [1,9]. Вторым возможным механизмом формирования эндотелиальной дисфункции является избыточная продукция NO индуцибельной NO-синтазы. Это, в свою очередь, угнетает образование эндотелиальной NO-синтазы и приводит к снижению выработки оксида азота эндотелиальными клетками сосудов. В тоже время можно думать, что оба эти механизма могут иметь место у данных больных на разных этапах формирования и течения БА.

В тоже время установлено, что у больных БА уровень нитритов в КВВ отрицательно коррелирует с риском развития хронического легочного сердца и отмечается корреляционная зависимость между уровнем NO крови и показателями легочной гипертензии [1,6].

При исследовании полиморфизма T-786C промотора гена eNOS были выявлены все три возможные генотипы: нормальные гомозиготы, гетерозиготы и патологические или мутантные гомозиготы. Так, у больных с изолированной БА распределение генотипов было следующим: нормальные гомозиготы (ТТ) определялись в 19,7% случаев; гетерозиготы (ТС) - в 52,2%, а мутантные гомозиготы (СС) – у 28,1% больных. В контрольной группе это соотношение составило соответственно: ТТ - 48,2%; ТС - 45,8% и СС - 6,0% (Рис.1).

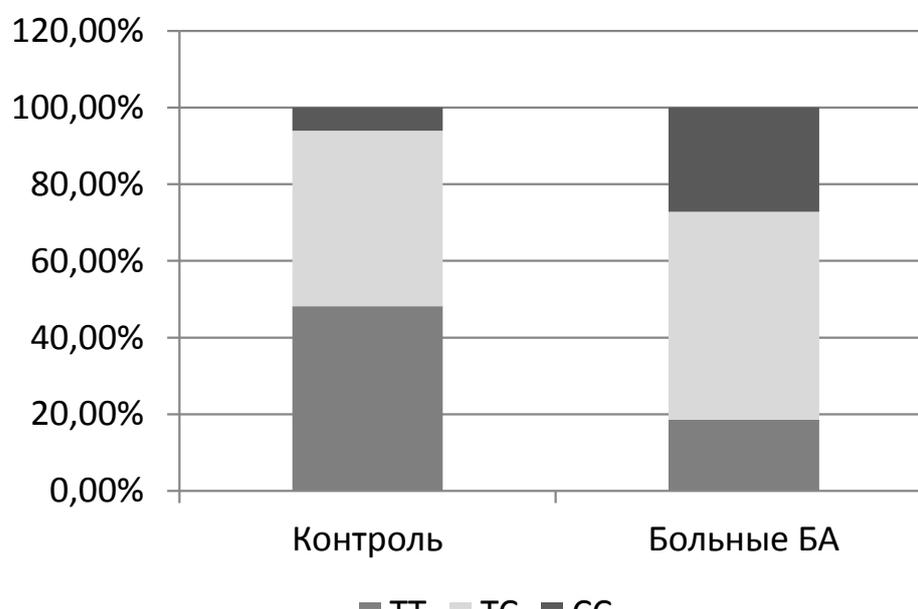


Рис.1. Частота встречаемости полиморфизма T-786C промотора гена eNOS среди больных БА и здоровых лиц

У больных с БА и ожирением отмечено значительное увеличение мутантных гомозигот (СС), уровень которых превышал показатели нормы в 7,7 раза и в 1,6 раз показатели больных с изолированной БА (рис.2).

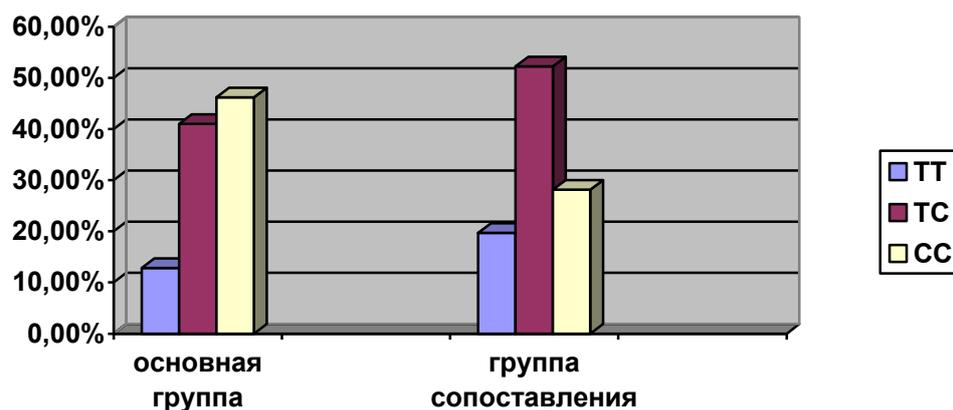


Рис.2. Частота встречаемости полиморфизма Т-786С промотора гена eNOS у больных БА и при ее сочетании с ожирением

Наблюдаемое распределение частоты генотипов промотора в группе обследованных больных и группе здоровых людей соответствовало равновесию Харди — Вейнберга.

Таким образом, у больных БА в 4,7 раза чаще, чем у здоровых доноров, выявляли гомозиготы с патологическим генотипом СС промотора гена eNOS (соответственно 28,1% и 6,0%; $p < 0,05$). Сопутствующее ожирение у больных с тяжелым персистирующим течением БА увеличивало количество пациентов с патологическим генотипом СС (46,2%). Полученные данные позволяют предположить патогенетическое значение данного полиморфизма в развитии БА. Формирующийся в результате этого недостаток фермента eNOS является причиной снижения синтеза и высвобождения оксида азота, а также дисфункции эндотелия [9]. По данным литературы, у людей с патологическим генотипом промотора гена eNOS (СС) наблюдается увеличение тонуса венечных артерий, повышенная склонность к коронарному спазму, вазоконстрикторному эффекту сосудов бронхолегочного дерева. Распространенность данного генотипа у больных с БА в нашем исследовании была достоверно выше, чем у здоровых доноров, что указывает на роль полиморфизма Т-786С гена eNOS в патогенезе БА, прогрессировании

эндотелиальной дисфункции и тканевой гипоксии бронхо-альвеолярного комплекса.

При анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера T-786C гена eNOS было показано, что носители генотипа CC имеют не только повышенный риск развития БА (OR(odds ratio) = 5,83 при DI -1,59-21,4), но и тяжелое персистирующее течение заболевания. В тоже время носители генотипа TT имеют низкий риск развития БА (OR = 0,25 при DI – 0,105-0,586).

Учитывая важную роль, которую оксид азота играет в регуляции сосудистого тонуса, вполне обосновано утверждение, что мутации в гене eNOS могут обуславливать прогрессирующее течение БА с развитием осложнений, таких как легочная гипертензия и хроническое легочное сердце.

Выводы. У больных бронхиальной астмой более чем в ¼ случаев (28,1%) наблюдаются изменения гена eNOS с образованием мутантных гомозигот T-786C промотора гена. Присоединение ожирения в большинстве случаев (46,2%) происходит у лиц с патологической гомозиготой CC. При этом тяжелое течение БА также присуще данной группе больных.

Наблюдающаяся патологическая мутация T-786C промотора гена эндотелиальной NO-синтазы и снижение синтеза оксида азота обеспечивает развитие эндотелиальной дисфункции, прогрессирование заболевания и, следовательно, формирование осложнений.

Перспективным направлением для дальнейших исследований является изучение других патогенетических механизмов сочетанного течения бронхиальной астмы и ожирения, с последующим сопоставлением полученных результатов с вышеприведенными данными.

Литература

1. Воронина Л.П. Влияние полиморфизма генов эндотелиальной синтазы оксида азота на функциональное состояние микрососудистого эндотелия при бронхиальной астме / Л.П. Воронина, В.Г. Ушакова, И.В. Нуржанова, Е.А. Полунина // Материалы XX Национального конгресса по болезням органов дыхания. – Москва, 2010. – С. 68.
2. Делягин В.М. Генетика бронхиальной астмы и атопии / Делягин В.М., Аракчеева Е.Е., Уразбагамбетов А., Будчанов Ю.И. // Медицинский совет. 2012. № 5. С. 33–39.
3. Перцева Т.А., Нудьга Н.П. Астма и ожирение: какова взаимосвязь? //Укр. пульмонологический журнал.-2011.-№3.-с.61-64.
4. Beyther D.A. et al. Overweight, obesity and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2010; 175: 661-667.
5. Gershon A., Wang C., Guan J. et al. Burden of comorbidity in individuals with asthma. *Thorax* 2010; 65: 612-618.
6. Kier C. et al. Childhood Overweight and Obesity and Their Association With Asthma. *Journal of Asthma & Allergy Educators.* 2010; October, 27.
7. Lenzer J. Obesity related illness consumes a sixth of UShealthcare budget. *BMJ* 2010; 341:c6014.
8. Mulrennan S.A., Redington A.E. Nitric oxide synthase inhibition: therapeutic potential in asthma// *Treat Respir. Med.* 2004. V. 3. P. 79-88.
9. Scott H. et al. Airway Inflammation is Augmented by Obesity and Fatty Acids in Asthma. *European Respiratory Journal.* 2011; February, 10.
10. Sood A. et al. Lean mass predicts asthma better than fat mass among females. *European Respiratory Journal.* 2011; 1 (37): 65-71.
11. Tong Y. A tailed primers protocol to identify the association of eNOS gene variable number of tandem repeats polymorphism with ischemic stroke in Chinese Han population by capillary electrophoresis/ Tong Y., Yin X., Wang Z. et al.// *Gene.* 2013; 517 (2): 218–223.

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА T-786C ПРОМОТОРА ГЕНА
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ У БОЛЬНЫХ С БРОНХИАЛЬНОЙ
АСТМОЙ И ОЖИРЕНИЕМ

Харьковский национальный медицинский университет

Пасиешвили Т.М.

В работе доказано, что больные бронхиальной астмой в большом количестве случаев (28,1%) являются носителями патологического генотипа CC полиморфного маркера T - 786C гена eNOS. При этом тяжелое течение заболевания и его сочетание с ожирением во всех случаях возникает у больных с данным генотипом. Таким образом, мутации в гене eNOS способствуют прогрессированию бронхиальной астме и развитию осложнений.

Ключевые слова: бронхиальная астма, ожирение, ген эндотелиальной NO - синтазы, оксид азота, патогенез.

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ T-786C ПРОМОТОРА ГЕНА
ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ NO-СИНТАЗИ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ
АСТМУ Й ОЖИРІННЯ

Харківський національний медичний університет

Пасієшвілі Т.М.

В роботі доведено, що хворі на бронхіальну астму в значній кількості випадків (28,1%) є носіями патологічного генотипу CC поліморфного маркера T-786C гена eNOS. При цьому тяжкий перебіг захворювання та його поєднання з ожирінням в усіх випадках виникає у хворих з даним генотипом. Таким чином, мутації в гені eNOS сприяють прогресуванню бронхіальній астмі та розвитку ускладнень.

Ключові слова: бронхіальна астма, ожиріння, ген ендотеліальної NO-синтази, оксид азоту, патогенез.

FREQUENCY OF T-786C PROMOTER ALLELE POLYMORPHISM OF
GENE OF ENDOTHELIAL NO-SYNTASE IN PATIENTS WITH ASTHMA
AND OBESITY

Kharkiv National Medical University

Pasiyeshvili T.M.

It is proved that patients with asthma in a significant number of cases (28.1%) are carriers of abnormal genotype CC polymorphic marker T-786S gene eNOS. This severe disease and its combination with obesity in all cases occur in patients with this genotype. Thus, mutations in the gene eNOS contribute to the progression of asthma and the development of complications.

Keywords: asthma, obesity, gene endothelial NO-syntase, nitric oxide, pathogenesis.