

Ассоциация полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз с развитием бронхиальной астмы

ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, г. Томск

I.V.Petrova, D.V.Kozyritskaya, E.M.Kamaltynova, L.M.Ogorodova

Association between polymorphism at the promotor region of NO-synthase gene and bronchial asthma development

Summary

The purpose of this work was to study NO-synthase gene polymorphic variants in term of asthma occurrence. Clinical and functional characteristics of asthma with regards to different NO-synthase gene polymorphic variants were analyzed in 250 asthmatic children aged 7 to 14 years under the 12-wk standard basic therapy for asthma. We used the typical spectrum of tests for children with asthma and molecular genetic methods. Polymorphism at the promotor region of the NO-synthase gene was found to be associated with phenotype of pathogenic features of asthma and was an important part of inherited predisposition to asthma.

Резюме

Цель работы — исследование роли полиморфных вариантов генов NO-синтаз в развитии бронхиальной астмы (БА). У 250 детей 7–14 лет с БА различной степени тяжести, проводилось исследование ассоциации клинко-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.

В настоящее время наиболее распространенным методом изучения генетических основ бронхиальной астмы (БА) является поиск ассоциаций заболевания с полиморфизмом кандидатных генов [1, 2]. При изучении патогенеза БА представляет интерес исследование возможного участия полиморфизма тех генов-кандидатов, продукты которых принимают участие в формировании как бронхиальной гиперреактивности, так и атопического воспаления [3, 4]. В результате многочисленных исследований была продемонстрирована важная роль оксида азота (NO) в патогенезе БА. Обнаружена корреляция между уровнем выдыхаемого NO и бронхиальной гиперреактивностью [5, 6]. В ряде работ было показано, что повышение содержания NO в выдыхаемом воздухе связано с выраженностью клинических симптомов астмы [7, 8]. Описаны многие специфические иммуномодулирующие эффекты NO [4, 5, 8]. Изучение причин гиперпродукции NO при БА, исследование показателей активности синтеза NO и его роли в механизмах болезни, а также определение патогенетического значения полиморфных вариантов генов NO-синтаз и возможное их использование в диагностике астмы имеет большое значение для понимания патогенеза заболевания и для решения важных клинических проблем.

Цель исследования — изучить роль полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз в развитии БА различной степени тяжести, а также ассоциацию полиморфных вариантов генов с кли-

ническими и функциональными характеристиками болезни.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе Областного детского центра клинической иммунологии и аллергологии Областной детской больницы (главный врач — *В.А.Сальников*) и центральной научно-исследовательской лаборатории ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава. Обследованы 250 детей 7–14 лет с БА различной степени тяжести. Контрольную группу составили 50 здоровых детей того же возраста. Диагноз БА устанавливался на основании характерного анамнеза, типичных клинических симптомов заболевания, обратимости бронхиальной обструкции в тесте с бронхолитиком > 15 %. Степень тяжести заболевания оценивали по критериям проекта GINA 2002 [4].

Для лечения пациентов применялись следующие фармакотерапевтические режимы: при легкой персистирующей БА — флутиказона пропионат 100 мкг/сут, сальбутамол 100 мкг по требованию; при среднетяжелой персистирующей БА — сальметерол / флутиказона пропионат 50/100 2 раза/сут, сальбутамол 100 мкг по требованию; при тяжелой персистирующей БА — сальметерол / флутиказона пропионат 50/250 2 раза/сут, сальбутамол 100 мкг по требованию.

Больных обследовали в период обострения (до лечения) и через 12 нед. с начала лечения (на стадии

ремиссии). Функцию внешнего дыхания (ФВД) — кривую "поток—объем" и показатели спирометрии — оценивали по стандартной методике на спирографе *Master Scope (Erich Jaeger GMBH, Германия)*.

Для изучения проходимости средних и мелких бронхов у всех больных проводилось измерение пиковой скорости выдоха (ПСВ) при помощи пикфлоуметра "Минирайт" стандартной модификации 2 раза в день. Уровень неспецифической бронхиальной гиперреактивности (БГР) оценивали при помощи провокационного теста с метахолином. Тест проводили дозовым методом при помощи системы APS с небулайзером, результаты выражались как концентрация метахолина, вызывающая 20%-ное падение объема форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁) — ПК₂₀. Оценку NO в выдыхаемом воздухе проводили по регистрации стабильных продуктов (нитритов) в конденсате выдыхаемого воздуха спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса.

Выделение геномной ДНК из венозной крови выполняли методом фенол-хлороформной экстракции, выделение тотальной РНК — с использованием набора для выделения ДНК и РНК на колонках *QIAGEN RNA/DNA (QIAGEN, Германия)*. Реакцию амплификации проводили на автоматическом амплификаторе "Терцик" ("ДНК-технология", г. Москва), обратную транскрипцию полимеразной цепной реакции (РТ-ПЦР) — с использованием набора *Titan One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Германия)* согласно приложенной инструкции. Для каждой пары праймеров подбиралась соответствующая концентрация ионов Mg и программа амплификации. Все праймеры были синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе ("Биосет", Новосибирск). Экспрессию мРНК оценивали количественно в сравнении с экспрессией мРНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФД). Ген этого фермента относится к постоянно экспрессирующим (*house keeping*), его экспрессия является стабильной и постоянной во всех клетках организма. Степень экспрессии мРНК выражали в процентах по отношению к экспрессии мРНК ГАФД. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 2%-ном агарозном геле.

Для выявления полиморфных вариантов в изучаемых последовательностях генов NO-синтаз в промоторной области применяли анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP, *single-strand conformational polymorphism*). Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК (по Сенгеру) проводили на автоматическом секвенаторе ДНК модели *ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems*.

Нормальность распределения полученных результатов по каждой величине оценивали с помощью критерия Колмагорова—Смирнова. Для статистической обработки результатов использовали t-критерий Стьюдента, U-тест Манна—Уитни, точный критерий Фишера и Колмагорова—Смирнова. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе клинического обследования пациентов у 78 детей установлена легкая БА (средний возраст — 10,3 года), у 82 — среднетяжелая БА (средний возраст — 9,5 года) и у 100 детей — тяжелая форма заболевания (средний возраст — 10,5 года).

Результаты данной работы свидетельствуют о безусловной связи уровня мРНК генов NO-синтаз с БА, что установлено при изучении продукции мРНК генов нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS) NO-синтазы у больных БА и в группе здоровых доноров. У всех больных в период обострения уровень мРНК генов NO-синтаз был значительно выше ($16,2 \pm 1,1 \%$; $112,8 \pm 2,5 \%$; $4,41 \pm 0,33 \%$ соответственно для nNOS, iNOS, eNOS) по сравнению с данным показателем в группе контроля ($6,6 \pm 1,3 \%$; $19,1 \pm 2,6 \%$; $1,42 \pm 0,5 \%$ соответственно для nNOS, iNOS, eNOS) при $p < 0,001$. Более того, даже в период ремиссии значения мРНК генов NO-синтаз достоверно превышали аналогичный показатель у здоровых детей ($9,4 \pm 2,7 \%$; $45,6 \pm 5,7 \%$; $2,63 \pm 0,11 \%$ соответственно для nNOS, iNOS, eNOS) против $6,9 \pm 1,2 \%$; $17,7 \pm 2,2 \%$; $1,39 \pm 0,13 \%$ у здоровых; $p < 0,05$), что подчеркивает значимость этого признака в качестве маркера БА.

Экспрессия генов NO-синтаз возрастала пропорционально тяжести заболевания. Так, уровень мРНК iNOS при тяжелой БА был значительно выше, чем при легкой и среднетяжелой астме ($p < 0,001$), 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 eNOS и nNOS ($p < 0,001$), как показано на рис. 1.

После терапии ингаляционными кортикостероидами (иГКС) у многих больных обнаружена лишь тенденция к снижению экспрессии генов NO-синтаз (рис. 2). Так, у детей с тяжелой и среднетяжелой астмой уровень матричной активности iNOS значительно снизился и составил $50,4 \pm 7,1 \%$ и $46,9 \pm 4,7 \%$ соответственно, но не достиг значений,

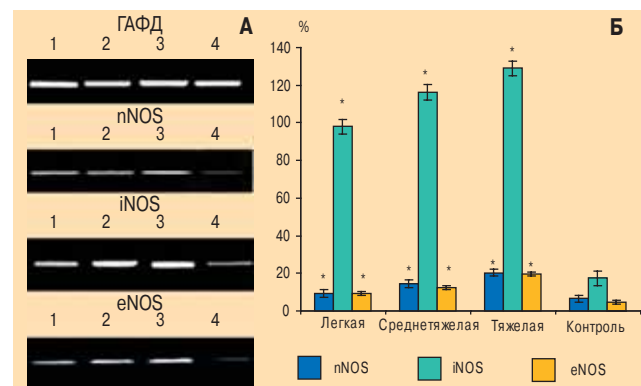


Рис. 1. Уровень мРНК генов NO-синтаз. А — результаты РТ-ПЦР: 1 — легкая БА; 2 — среднетяжелая БА; 3 — тяжелая БА; 4 — контроль. Б — уровень мРНК генов NO-синтаз у больных БА различной степени тяжести в период обострения; * — $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля

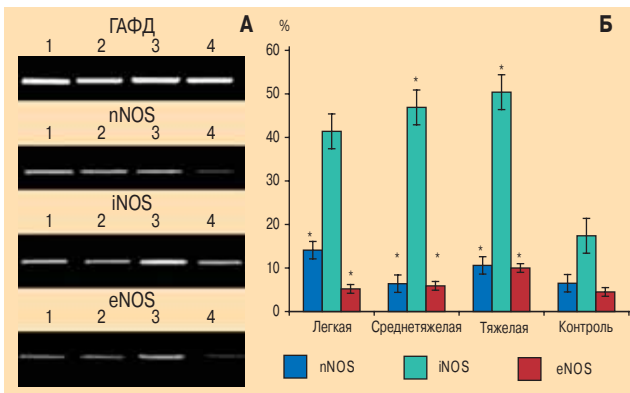


Рис. 2. Уровень мРНК генов NO-синтаз. А — результаты РТ-ПЦР: 1 — легкая БА; 2 — среднетяжелая БА; 3 — тяжелая БА; 4 — контроль. Б — уровень мРНК генов NO-синтаз у больных БА различной степени тяжести в период ремиссии; * — $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля

полученных у здоровых детей ($17,4 \pm 2,6\%$; $p < 0,001$). При тяжелой БА отмечалось достоверное уменьшение уровня экспрессии генов nNOS до $10,6 \pm 1,4\%$ ($p < 0,001$) и eNOS 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). Таким образом, результаты свидетельствуют о безусловной связи уровня мРНК генов NO-синтаз с подверженностью к БА.

Как и следовало ожидать, уровень нитритов в конденсате выдыхаемого воздуха в период обострения был также достоверно выше у всех больных по сравнению с группой контроля. При этом наиболее высокое содержание нитритов было отмечено у детей с тяжелой БА (таблица). На фоне терапии иГКС у всех больных БА уровень нитритов в выдыхаемом воздухе значительно снизился, однако достиг контрольных значений только при легкой астме (табл. 1).

Следующим этапом работы было проведение анализа конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP, *single-strand conformational polymorphism*) для определения полиморфизма генов NO-синтаз и секвенирование последовательностей с целью установления точной нуклеотидной локали-

Таблица

Содержание нитритов в дыхательном конденсате больных БА различной степени тяжести до лечения, $M \pm m$

Группы пациентов, чел.	Содержание нитритов до лечения, мкМ	Содержание нитритов после лечения, мкМ
Легкая БА, $n = 78$	$0,50 \pm 0,10$ рс = 0,001 рт < 0,001 рк = 0,001	$0,35 \pm 0,01$ рс = 0,08 рт < 0,001 рк = 0,06
Среднетяжелая БА, $n = 82$	$0,69 \pm 0,20$ рс < 0,001 рк < 0,001	$0,38 \pm 0,02$ рс < 0,001 рк = 0,049
Тяжелая БА, $n = 100$	$0,96 \pm 0,02$ рс < 0,001	$0,55 \pm 0,02$ рс < 0,001
Контроль, $n = 50$	$0,30 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$

Примечание: рк — уровень значимости различий по сравнению с группой контроля; рс — уровень значимости различий по сравнению с показателями у пациентов со среднетяжелой БА; рт — уровень значимости различий по сравнению с показателями у пациентов с тяжелой БА.

зации замен. В результате в промоторной области гена nNOS было обнаружено три полиморфных варианта: NOS-11, NOS-12 и NOS-13. В промоторной области гена iNOS — четыре полиморфизма: NOS-21, NOS-22, NOS-23 и NOS-24. В промоторной области гена eNOS было идентифицировано четыре аллельных варианта: NOS-31, NOS-32, NOS-33 и NOS-34. Результаты SSCP-анализа полиморфизма генов NO-синтаз представлены на рис. 3.

При секвенировании нуклеотидных последовательностей и выравнивании их по соответствующим консенсусным последовательностям было установлено, что аллель NOS-11 гена нейрональной NO-синтазы (nNOS) 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 (iNOS) 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 (eNOS) имеет делецию (GCCC/-) в положении -260 п. о., аллель NOS-31 соответствует консенсусной последовательности (GenBank № D26607.1), в свою очередь в аллелях NOS-32, NOS-34 обнаружены замены -237 (G/A) и -258 (C/A) соответственно.

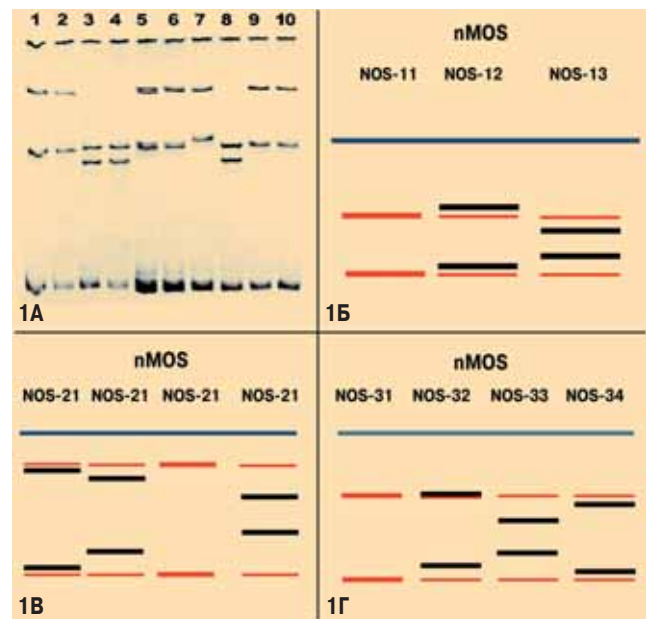


Рис. 3. Результаты SSCP-анализа полиморфизма генов NO-синтаз. А — результаты анализа конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) у больных БА с различным полиморфизмом генов NO-синтаз. Гомозигота NOS-31 — линии 1, 2, 9, 10; гетерозигота NOS-31 / NOS-34 — линии 5, 6; гомозигота NOS-32 — линия 7; гомозигота NOS-11 — линии 3, 4, 8. Б–Г — расположение бэндов одноцепочечных фрагментов ДНК промоторной области гена nNOS (Б), iNOS (В), eNOS (Г) на электрофореграмме (SSCP-анализ) Примечание: две полосы — гомозиготы, четыре полосы — гетерозиготы.

Основное внимание в данном исследовании уделялось функциональной значимости полиморфизма генов NO-синтаз в патогенезе атопической БА. В анализ ассоциаций полиморфизма генов NO-синтаз были включены показатели ФВД (ОФВ₁ и ПСВ), бронхиальной гиперреактивности (ПК₂₀), уровня мРНК генов и содержания нитритов в конденсате выдыхаемого воздуха.

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 iNOS, аллелей -274 (T/G) и -186 (A/C) гена nNOS, а также аллелей -258 (C/A) и -237 (G/A) гена eNOS с высоким уровнем мРНК и эндогенного NO. Средний уровень мРНК и содержание нитритов в дыхательном конденсате 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 нитритов в конденсате выдыхаемого воздуха 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 (A/C) гена nNOS, аллелями -189 (-/GTGTGTT) и -326 (G/T) гена iNOS и у пациентов с аллелем -258 C/A гена NOS3 ($p < 0,05$). На фоне терапии иГКС у этих больных была отмечена положительная динамика, однако параметры ФВД достоверно отличались от контрольных значений ($p < 0,05$).

В период обострения у пациентов с аллелем -189 (-/GTGTGTT) гена iNOS были обнаружены наиболее низкие значения дозы метахолина, приводящей к бронхоспазму, ситуация не изменилась и на фоне терапии иГКС. В период ремиссии уровень ПК₂₀ у детей с аллелем -189 (-/GTGTGTT) составил $3,5 \pm 0,7$ и $4,8 \pm 0,3$ мг/мл при тяжелой и среднетяжелой БА соответственно против $10,4 \pm 0,8$ 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 nNOS была значительно выше, чем в группе контроля ($p = 0,02$) и в группах с легкой ($p = 0,03$) и тяжелой ($p = 0,007$) астмой. Таким образом, можно говорить о том, что аллельный вариант -274 (T/G) гена nNOS ассоциирован с развитием среднетяжелой БА.

Нами установлен факт эффективности глюкокортикостероидной терапии у больных с аллельным вариантом -343 (C/-) гена iNOS в отношении лабораторных (уровень мРНК, содержание нитритов в

выдыхаемом воздухе) и клинических показателей (ОФВ₁, 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 уровня мРНК генов NO-синтаз, которое является стабильным и сохраняется после противовоспалительной терапии с применением иГКС.

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.

В научном плане целесообразным представляется изучение путей инициации транскрипции и регуляции экспрессии генов NO-синтаз, а также роли различных транскрипционных факторов в этих процессах. Представляет интерес изучение молекулярных основ взаимодействия транскрипционного фактора и сайта связывания, транскрипционных факторов друг с другом, а также с прочими молекулами, от чего зависит конечное влияние на активность генов.

Литература

1. Пузырев В.П., Степанов В.А., Фрейдлин М.Б. Молекулярные основы распространенных мультифакториальных заболеваний. В кн.: Иванов В.И., Киселев Л.Л. (ред.). Геномика — медицине. М.: ИКЦ "Академкнига"; 2005.
2. Пузырев В.П., Назаренко С.А., Одинокова О.Н., Степанов В.А. Геномная медицина: подходы и достижения. Бюл. СО РАМН 2000; 2: 107–112.
3. Пузырев В.П., Степанов В.А., Назаренко С.А. Геномные исследования наследственной патологии и генетического разнообразия сибирских популяций. Мол. биол. 2004; 38 (1): 129–138.
4. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention [Электронный ресурс]. — Электрон. дан. — 2002. — Режим доступа: www.ginasthma.com.
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; 189 (10):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; 161 (3): 1047–1050.
7. Ashutosh K. Nitric oxide and asthma: a review. Curr. Opin. Pulm. Med. 2000; 6 (1): 21–25.
8. Payne D.N. Nitric oxide in allergic airway inflammation. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2003; 2: 133–137.