

На правах рукописи

**Петрова
Ирина Валерьевна**

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ NO-СИНТАЗ ПРИ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ**

14.00.16 - патологическая физиология
14.00.09 - педиатрия

Автореферат на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

ТОМСК – 2004

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный
медицинский университет Минздрава России

Научные руководители: кандидат медицинских наук, старший научный
сотрудник **Иванчук Игорь Иванович**
доктор медицинских наук, профессор
Огородова Людмила Михайловна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Федорова Татьяна Сергеевна
кандидат медицинских наук
Басарева Наталья Ивановна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Новосибирская государственная
медицинская академия Минздрава России

Защита состоится «27» января 2005 г. в ____⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском
государственном медицинском университете (634050, Россия,
Томск, Московский тр., 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской
библиотеке Сибирского государственного медицинского
университета (634050, Россия, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан « » _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

Актуальность

Бронхиальная астма (БА) относится к числу наиболее частых заболеваний детского возраста. По данным эпидемиологических исследований, проведенных в разных странах, ею страдают от 3 до 10% детского населения [Spotik R. et al., 1990; Черняк Б.А., 2002]. До настоящего времени этиология, патогенез, классификация бронхиальной астмы являются предметом дискуссий. По данным ВОЗ, заболеваемость и смертность от этого заболевания имеют неуклонный рост, причины которого остаются неизвестными [GINA, 2002; Чучалин А.Г., 2003].

Бронхиальная астма, основу которой составляет хроническое воспаление дыхательных путей и гиперреактивность бронхов на физико-химические воздействия, является классическим примером мультифакториального заболевания. В реализации патологического процесса при астме важную роль играют многочисленные средовые и генетические факторы [Баранов В.С., 2003; Пузырев В.П., 2002; Фрейдин М. Б., 2000].

В настоящее время наиболее распространенным методом изучения генетических основ бронхиальной астмы является поиск ассоциаций заболевания с полиморфизмом кандидатных генов. Наличие полиморфизма может приводить к изменению уровня экспрессии данных генов и/или изменению структуры их белковых продуктов.

При изучении патогенеза бронхиальной астмы представляет интерес исследование возможного участия полиморфизма тех генов-кандидатов, которые отвечают за синтез белков, принимающих участие в формировании как бронхиальной гиперреактивности, так и атопического воспаления. В связи с этим, в настоящем исследовании в качестве генетических маркеров избраны полиморфизмы генов синтаз оксида азота.

Результатом исследований последних лет стало понимание важной роли оксида азота в развитии бронхиальной астмы. Оксид азота, в качестве сигнального мессенджера, вовлечен в регуляцию многих биологических процессов, включая воспаление и гиперреактивность бронхов. Обнаружена тесная корреляционная связь между уровнем выдыхаемого NO и бронхиальной гиперреактивностью [Chatkin J.M., 1999; GINA, 2002]. В ряде работ было показано, что повышение содержания оксида азота в выдыхаемом воздухе связано с выраженностью клинических симптомов астмы и наличием контакта с аллергеном. Описаны многие специфические иммуномодулирующие эффекты оксида азота [Barnes P.J., 1999].

Изучение причин гиперпродукции NO при бронхиальной астме, 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 установить механизмы участия аллельных вариантов генов NO-синтаз в патогенезе атопической бронхиальной астмы у детей.

Задачи исследования

1. Изучить взаимосвязь уровня мРНК генов NO-синтаз с патогенетическими маркерами бронхиальной астмы (ОФВ₁, ПСВ, БГР, уровень нитритов в дыхательном конденсате)
2. Изучить спектр полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз у больных бронхиальной астмой различной степени тяжести.
3. Провести анализ ассоциаций исследуемых аллельных вариантов с уровнем мРНК генов NO-синтаз и с количеством нитритов в дыхательном конденсате больных бронхиальной астмой.
4. Провести анализ ассоциаций исследуемых полиморфизмов генов NO-синтаз с клиническими и функциональными показателями при бронхиальной астме.
5. Оценить динамику клинических симптомов, ФВД и бронхиальной гиперреактивности при проведении базисной противовоспалительной терапии в зависимости от полиморфизма генов NO-синтаз.
6. Проанализировать механизмы участия полиморфных вариантов генов NO-синтаз в развитии и течении бронхиальной астмы.

Научная новизна работы

Впервые проведено комплексное, с использованием современных молекулярно-биологических методов, исследование аллельного спектра генов NO-синтаз и их патогенетической значимости в отношении атопической БА у детей с учетом тяжести заболевания и проводимой противовоспалительной терапии с применением ингаляционных глюкокортикостероидов (ИКС).

Установлена взаимосвязь между уровнем мРНК генов NO-синтаз и клинико-патогенетическими признаками БА. Показано, что повышение уровня мРНК генов NO-синтаз наблюдается у всех больных БА и степень этого повышения ассоциирована с выраженностью клинических симптомов. Снижение экспрессии генов NO-синтаз на фоне проводимой терапии ИКС сопровождается уменьшением клинических и функциональных проявлений БА.

Новыми являются данные о взаимосвязи и особенностях конечной продукции NO с экспрессией генов NO-синтаз, а также результаты, демонстрирующие роль ядерных факторов в регуляции продукции NO.

Приоритетными являются результаты, касающиеся ассоциации аллельных вариантов -189 (-/GTGTGTT) и -326 (G/T) гена *NOS-2*; аллелей -274 (T/G) и -186 (A/C) гена *NOS-1*; а также аллелей -258 (C/A) и -237 (G/A) гена *NOS-3* с бронхиальной астмой и рядом патогенетических признаков болезни.

Впервые установлена взаимосвязь полиморфных вариантов -189 (-/GTGTGTT) и -326 (G/T) гена *NOS-2*; аллелей -274 (T/G) и -186 (A/C) гена *NOS-1*; а также аллелей -258 (C/A) и -237 (G/A) гена *NOS-3* с высоким уровнем мРНК и эндогенного NO, а также с повышенной реактивностью бронхов и нарушением функции легких по обструктивному типу.

Получены новые сведения об ассоциации полиморфных вариантов генов NO-синтаз с тяжестью БА. Так, аллельный вариант -274 (T/G) гена *NOS-1* ассоциирован с развитием среднетяжелой БА.

Впервые показано, что у больных с аллельным вариантом -343 (C/-) гена *NOS-2* и (или) диким типом гена *NOS-3* в результате лечения достигнут полный контроль над симптомами БА, что свидетельствует о сохраненной чувствительности больных к антиастматической терапии.

Продемонстрирована целесообразность использования в качестве маркера подверженности к развитию бронхиальной астмы различной степени тяжести, а также восприимчивости к базисной противовоспалительной терапии полиморфизма генов NO-синтаз.

Теоретическое и практическое значение работы

В результате исследования получены новые данные о фундаментальных механизмах нарушения регуляции продукции NO при БА, вскрыты общие закономерности и особенности нарушений экспрессии генов NO-синтаз.

В работе представлены результаты исследования влияния различных аллельных вариантов генов NO-синтаз на фенотипические проявления количественных и качественных, патогенетически важных для астмы признаков, характеризующих функциональное состояние дыхательных путей и степень реактивности бронхов, что расширяет современные представления о патогенезе бронхиальной астмы.

Продемонстрирована взаимосвязь повышения экспрессии генов NO-синтаз с клиническими проявлениями БА. Важное теоретическое значение имеет установленная достоверная связь аллельного варианта -274 (T/G) гена *NOS-1* с развитием среднетяжелой 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

Положения, выносимые на защиту

1. Бронхиальная астма сопровождается значительным повышением уровня мРНК генов NO-синтаз, которое является стабильным и сохраняется после противовоспалительной терапии с применением ингаляционных глюкокортикостероидов. Степень выраженности этих нарушений определяется тяжестью бронхиальной астмы и периодом заболевания

2. Нарушение продукции мРНК генов NO-синтаз связано с формированием основных клинико-патогенетических признаков бронхиальной астмы, таких как бронхообструкция, бронхиальная гиперреактивность, увеличение содержания нитритов в выдыхаемом воздухе. Степень патологических проявлений ассоциирована с уровнем гиперпродукции мРНК генов NO-синтаз.

3. Полиморфизм промоторной области генов NO-синтаз связан с регуляцией их экспрессии, вследствие чего изменяется активность фермента и количество вырабатываемого эндогенного NO.

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

5. Нуклеотидные замены в сайтах связывания нуклеарных факторов являются одним из механизмов регуляции базальной и индуцированной транскрипционной активности генов NO-синтаз.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на кафедре патофизиологии СибГМУ; на конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», г. Томск, 2003 г.; на конкурсе молодых ученых, г. Томск, 2004 г.; на Европейском респираторном конгрессе, г. Глазго, 2004 г. (при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований).

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты используются в учебном процессе на кафедре факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета и на кафедре патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета. Методы РТ-ПЦР генов NO-синтаз и анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) адаптированы и внедрены в практику научных исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 1 журнальная статья в центральной печати.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав (Обзор литературы, Материал и методы, Результаты исследования и Обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 193 страницах и включает 48 таблиц и 27 рисунков. Список литературы содержит 169 источников, из них 138 зарубежных.

Работа выполнена на базе отдела биохимии (зав. отд. – к.м.н. А.Э. Сазонов) и отдела молекулярной биологии (зав. отд. – к.м.н. И.И. Иванчук) Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (зав. ЦНИЛ – профессор, д.м.н. А.Н.Байков); научно-исследовательского учреждения «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (директор института академик Власов В.В); кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета Сибирского государственного медицинского университета (зав. каф. – профессор, д.м.н. Л.М. Огородова); областного детского центра клинической иммунологии и аллергологии (руководитель – профессор Л.М. Огородова); отделения функциональной диагностики областного детского диагностического центра (зав. – И.А. Деев).

КЛИНИЧЕСКИЕ ГРУППЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические исследования

В период 2000-2004 гг. в Областном детском центре клинической иммунологии-аллергологии Областной детской больницы (руководитель – профессор, д.м.н. Л.М. Огородова) было обследовано 146 детей в возрасте от 7 до 14 лет: 26 здоровых и 120 больных персистирующей легкой, среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астмой.

Критерии включения в исследование пациентов с бронхиальной астмой

1. Амбулаторные и стационарные пациенты
2. Возраст пациентов от 7 до 14 лет
3. Положительные аллергопробы с одним и более аэроаллергенами
4. Пациенты, имеющие ранее подтвержденный диагноз бронхиальной астмы:

✓ **1 группа:** лёгкая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы чаще, чем 1 раз в неделю, но реже чем 1 раз в день; ночные симптомы чаще 2 раз в месяц, но не чаще 1 раза в неделю; вариабельность ПСВ (ОФВ₁) 20 – 30%, при этом ОФВ₁ ≥ 80% от должного и ПСВ ≥ 80% от персонального лучшего (ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за первую сек, ПСВ – пиковая скорость выдоха);

✓ **2 группа:** среднетяжелая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы ежедневные; ночные симптомы чаще 1 раза в неделю; ежедневное использование короткодействующих β₂-агонистов; вариабельность ПСВ (ОФВ₁) более 30%, при этом ОФВ₁ 60 - 80% от должного и ПСВ 60 - 80% от персонального лучшего;

✓ **3 группа:** тяжёлая персистирующая астма (на момент включения в исследование необходимо наличие одного и более следующих признаков: симптомы ежедневные; частые ночные симптомы; ограничение физической активности; вариабельность ПСВ (ОФВ₁) более 30%, при этом ОФВ₁ ≤ 60% от должного и ПСВ ≤ 60% от персонального лучшего.

5. Пациенты, у которых ПК₂₀ в метахолиновом тесте < или = 8 мг/мл

6. Пациенты, не получавшие (в течение последнего месяца) терапии следующими препаратами: глюкокортикостероиды (системные, ингаляционные, топические), антилейкотриеновые препараты, пролонгированные теофиллины, пролонгированные β₂ – агонисты, кромогликат натрия, недокромил натрия, омализумаб

7. Пациенты, не имевшие острых респираторных заболеваний в течение предшествующих 4 недель

8. Пациенты, умеющие правильно пользоваться ингалятором, пикфлоуметром, способные адекватно оценивать своё состояние, а также своевременно и верно заполнять дневники самоконтроля (ПСВ – утро, вечер; оценка дневных и ночных симптомов).

Критерии включения в контрольную группу

1. Возраст пациентов от 7 до 14 лет
2. Отрицательные аллергопробы
3. IgE < 100 МЕ/мл
4. Отсутствие аллергических заболеваний на момент включения и в анамнезе;
5. Пациенты, не получавшие (в течение последнего месяца) терапии следующими препаратами: глюкокортикостероиды (системные, топические), антилейкотриеновые препараты, пролонгированные теофиллины, пролонгированные β_2 – агонисты, кромогликат натрия, недокромил натрия, омализумаб
6. Пациенты, не имевшие острых респираторных заболеваний.

Лечение

Для лечения больных применялись следующие фармакотерапевтические режимы:

1 группа (больные лёгкой персистирующей БА):

- флутиказона пропионат 200 мкг/сутки;
- сальбутамол 100 мкг – по требованию;

2 группа (больные среднетяжелой персистирующей БА):

- серетид 50/100 x 2/сутки;
- сальбутамол 100 мкг – по требованию;

3 группа (больные тяжелой персистирующей БА):

- серетид 50/250 x 2/сутки;
- сальбутамол 100 мкг – по требованию.

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

Исследование функции легких

Оценку функции внешнего дыхания (ФВД) – анализ кривой «поток – объем» и показателей спирометрии проводили по стандартной методике с использованием спирографа Master Score (Erich Jaeger GmbH, Германия). Для изучения проходимости средних и мелких бронхов всем больным 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 APS системы с небулайзером, результаты выражались как концентрация метахолина, вызывающая 20% падение $ОФВ_1$ ($ПК_{20}$).

Специальные методы исследования

Подготовка периферической крови для молекулярно-биологических исследований

Полученную кровь смешивали с 3% ЭДТА (4:1), инкубировали 45-60 мин при температуре 37°C. Образовавшийся над эритроцитами слой плазмы осторожно собирали пастеровской пипеткой и переносили в стерильную пробирку. Добавляли 0,9% NaCl (1:1) и центрифугировали при 10 000g в

течение 10 мин. Затем удаляли супернатант и повторяли процедуру. Супернатант сливали, осадок использовали для дальнейшего исследования.

Определение неспецифического IgE в сыворотке крови

Определение неспецифического IgE в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с помощью стандартного набора «Вектор БЕСТ IgE – ИФА – БЕСТ – стрип» согласно инструкции.

Выделение геномной ДНК и тотальной РНК

Выделение геномной ДНК из венозной крови обследуемых проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора для выделения ДНК и РНК на колонках «QIAGEN RNA/DNA» (QIAGEN, Германия). Принцип метода основан на связывании РНК с сорбентом с последующей ее элиминацией специальным буфером.

Аmplификация ДНК и РНК в ПЦР

Реакцию амплификации проводили в микроцентрифужных пробирках типа «Eppendorf» объемом 0,5 мл 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 подбиралась соответствующая концентрация ионов Mg и программа амплификации.

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 процентах по отношению к экспрессии мРНК ГАФД.

Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 2% агарозном геле. Изображения электрофореграмм получали с использованием стационарной видеосистемы и обрабатывали при помощи адаптированной компьютерной программы «Biotest D» с целью получения количественной информации по каждой пробе. Основной характеристикой пробы был параметр «интегральной светимости», который выражался количественно. В каждой серии экспериментов результат оценки экспрессии мРНК ГАФД принимали в качестве эталонной пробы, а количественное значение – за 100%. Количественные значения остальных пробы в серии экспериментов оценивали относительно эталонной пробы и выражали в процентах.

Все праймеры были синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе («Биосет», Новосибирск).

Определение полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз

Для выявления полиморфных вариантов в исследуемых последовательностях генов NO-синтаз в промоторной области использовали анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP, single-strand conformational polymorphism). После проведения ПЦР 5 мкл продукта смешивали с 5 мкл денатурирующего раствора, содержащего 10мМ NaOH, 95% формамида, 0,05% бромфенолового синего, 0,05% ксиленцианола. Пробы инкубировали при

94°C в течение 2 мин и охлаждали на льду в течение 5 мин. Электрофорез проводили в 4% полиакриламидном геле (размер: 0,4мм x 210мм x 200мм, состав: акриламид/бисакриламид – 37,5:1; 10% глицерин, ТБ-буфер) при постоянном напряжении 400 В. Гель окрашивали нитратом серебра, пластину геля сканировали и анализировали с использованием программного обеспечения «BIOTEST-D».

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК

Для секвенирования по Сэнгеру использовали олигонуклеотидные праймеры, ранее использованные для ПЦР. Использовали 500 фмоль очищенного продукта ПЦР, 1 пмоль праймера, и 2 мкл набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 2.0. Реакции секвенирования проводили на амплификаторе (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems). После реакции Сэнгера проводили очистку от флуоресцентно меченных дидезокси нуклеотидтрифосфатов геле-фильтрацией, используя колонки с сорбентом Sephadex G-50 Fine (Amersham). ДНК высушивали в вакуумном концентраторе и растворяли в 20 мкл раствора Hi-Di Formamide (Applied Biosystems). Электрофорез реакций Сэнгера проводили на автоматическом секвенаторе ДНК модели ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems). После электрофореза полученные данные анализировали прилагаемой программой.

Получение дыхательного конденсата

Для получения дыхательного конденсата пациент осуществлял последовательные выдохи через рот, в отсутствие носового дыхания (назальные клипсы), в γ -образную полипропиленовую трубку с внутренним диаметром 5 мм, помещенную в полиэтиленовую пробирку, опущенную в стакан с водой комнатной температуры. γ -образная петля была необходима, чтобы предотвратить контаминацию экспирата слюной, которая, как известно содержит большие количества нитритов. Данный способ позволяет получать необходимые для анализа 200 мкл дыхательного конденсата в течение 5 мин. Концентрацию нитритов в дыхательном конденсате определяли в течение 30 мин после сбора.

Спектрофотометрическое определение нитритов

Спектрофотометрический метод определения нитритов в водных растворах основан на цветной реакции с реактивом Грисса. К 200 мкл исследуемого образца добавляли 50 мкл реактива Грисса, розовая окраска развивалась в течение 10 мин, после чего проводили измерения на планшетном спектрофотометре при длине волны 540 нм. Калибровочную кривую строили по стандартам с известной концентрацией нитрита натрия.

Статистическая обработка результатов

Оценку нормальности распределения полученных результатов по каждой величине проводили с помощью критерия Колмагорова-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. Для корреляционного анализа использовали критерий Пирсона. Для выявления наиболее значимых показателей, по которым наблюдались межгрупповые различия

был проведен кластерный и пошаговый дискриминантный анализ. Различия между показателями считали достоверными при значении $p < 0,05$. Сравнение частот аллелей в группах обследованных проводили с помощью точного критерия Фишера и Колмогорова-Смирнова. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Уровень мРНК генов NO-синтаз у детей, больных бронхиальной астмой, до и после лечения

Результаты проведенной работы свидетельствуют о безусловной связи уровня мРНК генов NO-синтаз с БА, что установлено при изучении уровня продукции мРНК генов *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* у больных БА и в группе здоровых доноров. У всех больных в период обострения 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*, *NOS2*, *NOS3*) по сравнению с данным показателем в группе контроля ($6,4 \pm 1,2\%$; $17,4 \pm 2,6\%$; $1,48 \pm 0,16$ соответственно для *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*) ($p < 0,001$).

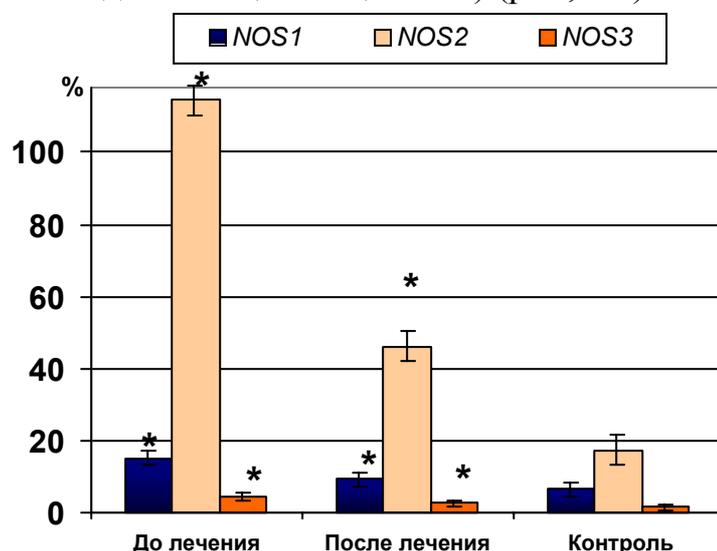


Рис. 1. Уровень мРНК генов NO-синтаз у больных бронхиальной астмой до лечения и в период ремиссии; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

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 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 *NOS3* и *NOS1* ($p < 0,001$) (рис. 2).

Высокий уровень мРНК гена *NOS2* при БА можно объяснить тем, что в очаге воспаления под действием различных стимуляторов происходит интенсивная активация экспрессии гена. *NOS2* является индуцибельной формой фермента и, в отличие от конститутивных форм, синтезируется только после сигнала со стороны других факторов при различных патологических состояниях. Экспрессия *NOS2* в макрофагах стимулируется цитокинами Т-хелперных лимфоцитов, такими как ИЛ-1, ИЛ-2, ИФН γ или его комбинацией с ФНО α , ФНО β и липидом А.

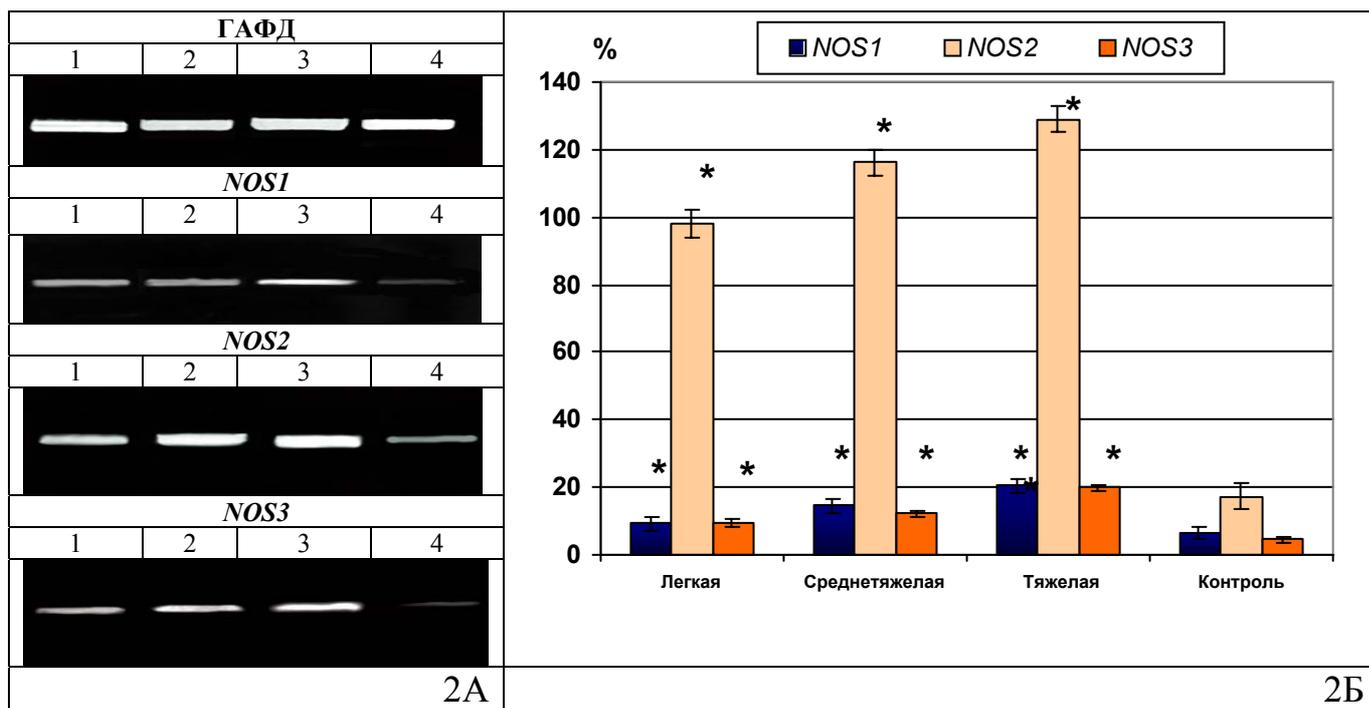


Рис. 2. Уровень мРНК генов NO-синтаз. 2А: результаты РТ-ПЦР; 1 – легкая бронхиальная астма; 2 – среднетяжелая бронхиальная астма; 3 – тяжелая бронхиальная астма; 4 – контроль. 2Б: уровень мРНК генов NO-синтаз у больных бронхиальной астмой различной степени тяжести в период обострения; *- $p < 0,05$ по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

Конститутивные NO-синтазы являются Ca^{2+} зависимыми, регулируемые ферментами и присутствуют в эпителиальных клетках бронхов и эндотелии сосудов. Исходя из известных данных, можно предположить, что активацию конститутивных NO-синтаз может вызывать множество стимулов, потенциально способных приводить к повышению внутриклеточного Ca^{2+} .

После терапии ИКС у многих больных обнаружена лишь тенденция к снижению уровня экспрессии генов NO-синтаз (рис.3). Так, у детей с тяжелой и среднетяжелой астмой уровень матричной активности *NOS2* значительно снизился и составил $50,4 \pm 7,1\%$ и $46,9 \pm 4,7\%$ соответственно, однако не достиг значений, полученных у здоровых детей ($17,4 \pm 2,6\%$; $p < 0,001$). При тяжелой астме 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).

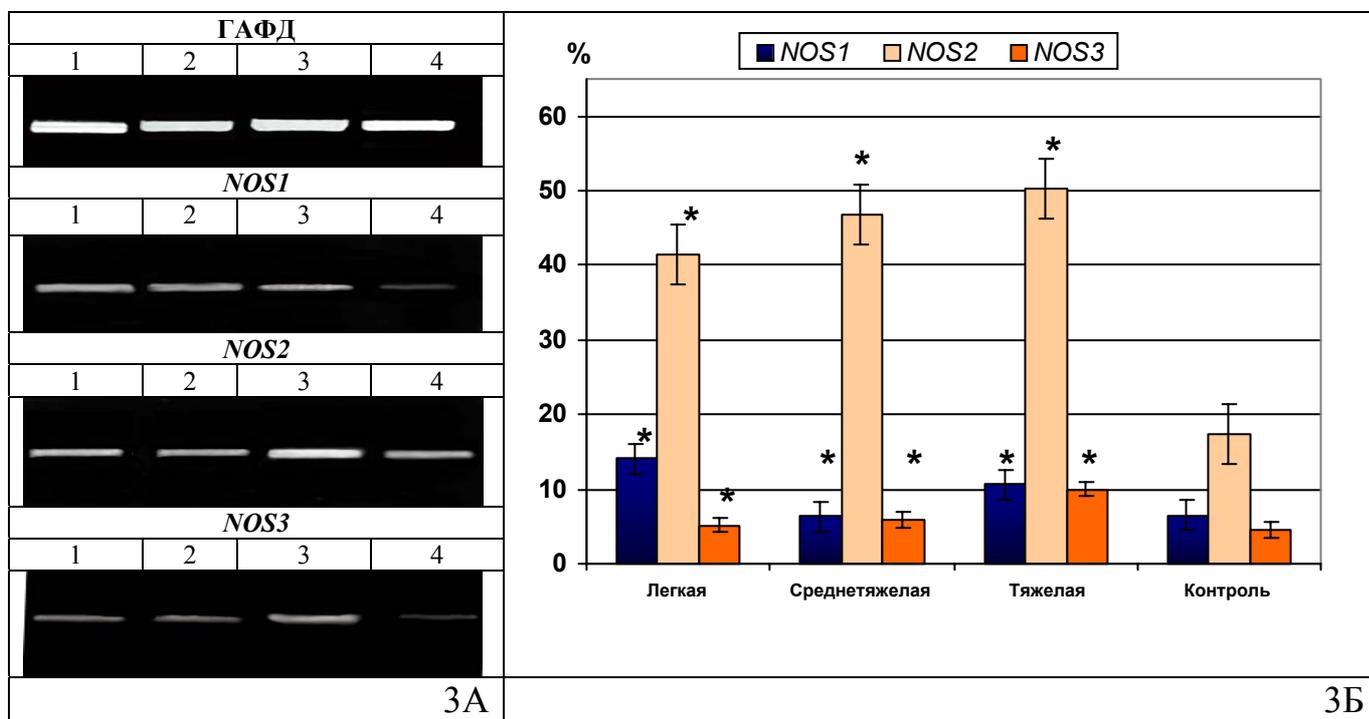


Рис. 3. Уровень мРНК генов NO-синтаз. 3А: результаты РТ-ПЦР; 1 – легкая бронхиальная астма; 2 – среднетяжелая бронхиальная астма; 3 – тяжелая бронхиальная астма; 4 – контроль. 3Б: уровень мРНК генов NO-синтаз у больных бронхиальной астмой различной степени тяжести в период ремиссии; *- $p < 0,05$ по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

При изучении взаимосвязи уровня мРНК генов NO-синтаз с клинико-патогенетическими признаками БА обнаружена отрицательная корреляционная зависимость между уровнем мРНК и показателями ФВД ($ОФВ_1$ и ПСВ) и БГР ($ПК_{20}$) как при обострении, так и в период ремиссии.

Для оценки связи уровня мРНК NO-синтаз с количеством синтезируемого оксида азота мы изучили содержание нитритов в дыхательном конденсате у 120 больных БА и 26 здоровых доноров. Как и следовало ожидать, в период обострения у всех больных БА вне зависимости от тяжести заболевания содержание нитритов в дыхательном конденсате было достоверно выше, чем в контрольной группе ($0,47 \pm 0,30$ мкМ при легкой БА, $0,67 \pm 0,30$ мкМ при среднетяжелой и $0,89 \pm 0,03$ мкМ при тяжелой астме против $0,30 \pm 0,01$ у здоровых детей; $p < 0,001$). На фоне терапии ИКС у всех больных БА уровень нитритов в выдыхаемом воздухе значительно снизился ($p < 0,001$), однако достиг контрольных значений только при легкой астме (рис.4). В период ремиссии наиболее высокое содержание нитритов было отмечено

у больных тяжелой астмой, оно составило $0,52 \pm 0,02$ мкМ, против $0,33 \pm 0,01$ мкМ и $0,39 \pm 0,02$ мкМ ($p < 0,001$) у пациентов с легкой и среднетяжелой БА соответственно.

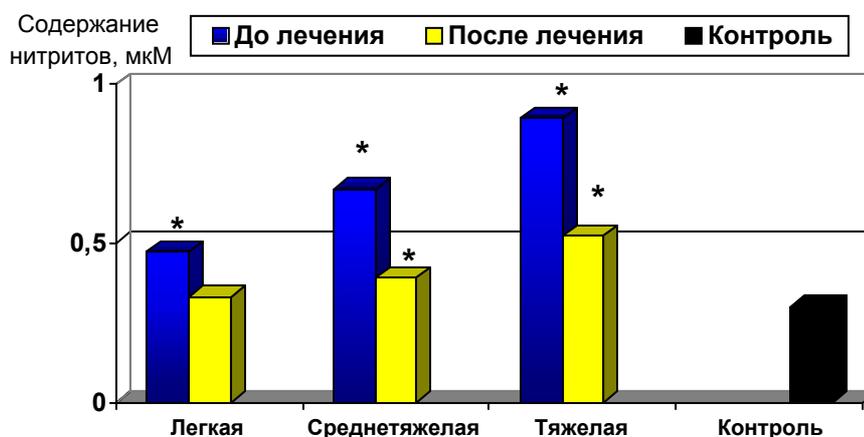


Рис. 4. Содержание нитритов в дыхательном конденсате больных бронхиальной астмой различной степени тяжести до и после лечения; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Корреляционный анализ позволил установить наличие зависимости между уровнем мРНК генов NO-синтаз и концентрацией нитритов в дыхательном конденсате у здоровых доноров. При проведении корреляционного анализа у больных БА такой зависимости обнаружено не было. Возможно, это связано с тем, что при интенсивном воспалительном процессе увеличение содержания нитритов в выдыхаемом воздухе происходит не только за счет высокой экспрессии генов NO-синтаз, но и за счет других механизмов. Кроме того, при помощи корреляционного анализа сложно дифференцировать вклад экспрессии каждого из генов NO-синтаз в общую продукцию NO.

Динамическая интегральная оценка вклада уровня экспрессии различных генов NO-синтаз в определение степени тяжести заболевания проводилась при помощи пошагового дискриминантного анализа. В результате установлено, что определяющими для оценки степени тяжести и эффективности терапии являются показатели уровня мРНК генов *NOS1* и *NOS2*. Таким образом, показатели экспрессии этих генов могут быть с высокой степенью надежности использованы для оценки ассоциации с другими объективными данными, такими как параметры ФВД, БГР, содержание нитритов в выдыхаемом воздухе с целью определения их патогенетической роли в развитии БА.

2. Полиморфные варианты промоторной области генов NO-синтаз

Для выявления мутаций в промоторной области генов NO-синтаз использовали анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP, single-strand conformational polymorphism).

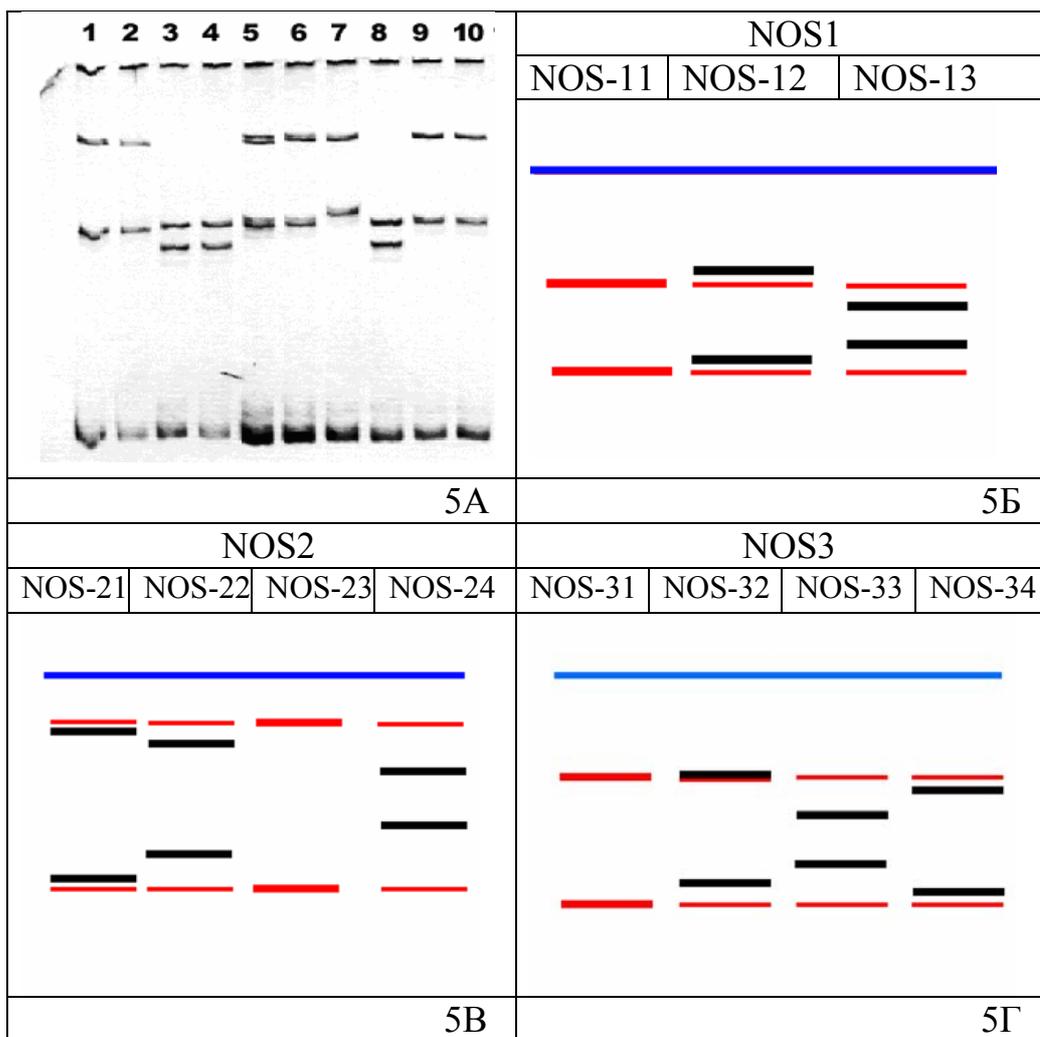


Рис.5. 5А: результаты анализа конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) у больных бронхиальной астмой с различным полиморфизмом генов NO-синтаз. Гомозигота NOS-31 – линии 1, 2, 9, 10; гетерозигота NOS-31/NOS-34 – линии 5,6; гомозигота NOS-32 – линия 7; гомозигота NOS-11 – линии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

В промоторной области гена *NOS1* было обнаружено три полиморфных варианта: NOS-11, NOS-12 и NOS-13 (рис.5Б). На электрофореграмме паттерн NOS-11 был представлен двумя бэндами, что соответствует гомозиготе. Паттерны NOS-12 и NOS-13 имели четыре бэнда, что соответствует гетерозиготе. В гетерозиготах один из аллелей всегда соответствовал варианту NOS-11.

В результате исследования промоторной области гена *NOS2* с помощью метода SSCP было идентифицировано четыре полиморфизма: NOS-21, NOS-22, NOS-23 и NOS-24 (рис.5В). Паттерн NOS-23 на электрофореграмме был представлен двумя бэндами, что соответствует гомозиготе. Все остальные паттерны

имели четыре бэнда, что свидетельствует о гетерозиготе. В гетерозиготах один из аллелей соответствовал варианту NOS-23.

В промоторной области гена *NOS3* с помощью метода SSCP было получено четыре полиморфных варианта: NOS-31, NOS-32, NOS-33 и NOS-34 (рис.5Г). Паттерн NOS-31 на электрофореграмме был представлен двумя бэндами, что соответствует гомозиготе. Все остальные паттерны имели четыре бэнда, что свидетельствует о гетерозиготе. В гетерозиготах один из аллелей всегда соответствовал варианту NOS-31.

3. Результаты определения нуклеотидной последовательности промоторных областей генов NO-синтаз

Следующим этапом работы было проведение сиквенса участков промоторной области генов NO-синтаз с целью установления точной нуклеотидной локализации полиморфизма. На рис. 6-8 представлены секвенированные нуклеотидные последовательности участков промоторной области генов *NOS1* (рис.6), *NOS3* (рис.7) и *NOS2* (рис.8) в сравнении с консенсусными последовательностями.

В результате секвенирования нуклеотидных последовательностей участков промоторной области генов NO-синтаз и выравнивания их по соответствующим консенсусным последовательностям, было установлено, что аллель NOS-11 гена нейрональной NO-синтазы (*NOS-1*) идентичен консенсусной последовательности (GenBank № U15666.1), аллели NOS-12 и NOS-13 имеют трансверсии -274 (T/G) и -186 (A/C) соответственно (относительно точки инициации транскрипции +1).

В аллельном варианте NOS-21 гена индуцибельной NO-синтазы (*NOS-2*) 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 (№ L36031.1).

Аллель NOS-33 гена эндотелиальной NO-синтазы (*NOS-3*) 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.

Обнаруженные мутации расположены в сайтах связывания для различных транскрипционных факторов или рядом с ними. Обобщенные данные результатов сиквенса и выравнивания нуклеотидных последовательностей представлены в табл. 1.

4. Анализ ассоциаций полиморфизма генов NO-синтаз с патогенетическими маркерами бронхиальной астмы

Основное внимание в проведенном исследовании было уделено функциональной значимости полиморфизма генов NO-синтаз в патогенезе atopической БА. В анализ ассоциаций полиморфизма генов NO-синтаз были включены показатели функции внешнего дыхания (ОФВ₁ и ПСВ); бронхиальной гиперреактивности (ПК₂₀); уровня мРНК генов и содержания нитритов в конденсате выдыхаемого воздуха.

№U15666.1	1295	CTCTGCGGGCTCCTGGGAGGGGCTCCCAGCACTGCCAGCCTGGGAGGCTGTGTGTTCCA	1354
NOS-11	121	CTCTGCGGGCTCCTGGGAGGGGCTCCCAGCACTGCCAGCCTGGGAGGCTGTGTGTTCCA	180
NOS-12	121	CTCTGCGGGCTCCTGGGAGGGGCTCCCAGCACTGCCAGCCTGGGAGGCTGTGTGTTCCA	180
NOS-13	121	CTCTGCGGGCTCCTGGGAGGGGCTCCCAGCACTGCCAGCCTGGGAGGCTGTGTGTTCCA	180

№U15666.1	1355	CTGTC C CATTAAGGAATGCTATCCCAACTGATGTAGAGGCAGAAATAACCATCCCTGC	1414
NOS-11	181	CTGTC C CATTAAGGAATGCTATCCCAACTGATGTAGAGGCAGAAATAACCATCCCTGC	240
NOS-12	181	CTGTC C CATTAAGGAATGCTATCCCAACTGATGTAGAGGCAGAAATAACCATCCCTGC	240
NOS-13	181	CTGTC A CATTAAGG AATGCTATCCCAACTGATGTAGAGGCAGAAATAACCATCCCTGC	240

OCT-1

№U15666.1	1415	CTCCCATGGGGCCTTCTCTGCCCAGATAGACC T GCCCTGCCCTGCGTGGCTACTACATTC	1474
NOS-11	241	CTCCCATGGGGCCTTCTCTGCCCAGATAGACC T GCCCTGCCCTGCGTGGCTACTACATTC	300
NOS-12	241	CTCCCATGGGGCCTTCTCTGCCAGATAGACC G GCCCTGCCCTGCGTGGCTACTACATTC	300

GATA

NOS-13	241	CTCCCATGGGGCCTTCTCTGCCCAGATAGACC T GCCCTGCCCTGCGTGGCTACTACATTC	300
--------	-----	--	-----

Рис.6. Выравнивание нуклеотидной последовательности участка промоторной области гена *NOS-1*.

№ U15666.1 –консенсусная последовательность; NOS-11, NOS-12, NOS-13 - нуклеотидная последовательность паттернов, полученных в результате SSCP анализа. Цветными прямоугольниками обозначены: X – точечная мутация; OCT-1 - сайт связывания для октамерсвязывающего фактора; GATA – сайт связывания для транскрипционного фактора GATA

№ D26607	986	CTGCCATCCCCTGCTACAGAAACGGTGCTCACCTTCTGCCCCAACCCCTCCAGGGAAA G GCA	1045
NOS-31	181	CTGCCATCCCCTGCTACAGAAACGGTGCTCACCTTCTGCCCCAACCCCTCCAGGGAAA G GCA	240
NOS-32	181	CTGCCATCCCCTGCTACAGAAACGGTGCTCACCTTCTGCCCCAACCCCTC CAGGGAAA A GCA	240
		NFAT	
NOS-33	181	CTGCCATCCCCTGCTACAGAAACGGTGCTCACCTTCTGCCCCAACCCCTCCAGGGAAA G GCA	240
NOS-34	181	CTGCCATCCCCTGCTACAGAAACGGTGCTCACCTTCTGCCCCAACCCCTCCAGGGAAA G GCA	240
№ D26607	1046	CACAGGGGTGAGCCGA A G GCCC TTCCGTCTGGTGCCACATCACAGAAGGACCTTTATGA	1104
NOS-31	241	CACAGGGGTGAGCCGA A G GCCC TTCCGTCTGGTGCCACATCACAGAAGGACCTTTATGA	296
NOS-32	241	CACAGGGGTGAGCCGA A G GCCC TTCCGTCTGGTGCCACATCACAGAAGGACCTTTATGA	296
NOS-33	241	CACAGGGGTGAGCCGA A G ---- TT CCGTCTGGTGCCACATCACAGAAGGACCTTTATGA	296
		PAX	
NOS-34	241	CACAGGGGTGAG CCGA C G GCCC TTCCGTCTGGTGCCACATCACAGAAGGACCTTTATGA	296
		МОК-2	

Рис. 7. Выравнивание нуклеотидной последовательности участка промоторной области гена *NOS-3*.

№ D26607.1 – консенсусная последовательность; NOS-31, NOS-32, NOS-33, NOS-34 – нуклеотидная последовательность паттернов, полученных в результате SSCP анализа. Цветными прямоугольниками обозначены: **X** – точечная мутация; **NFAT** – сайт связывания для для связывания ядерного фактора активации Т-лимфоцитов ; **PAX** – сайт связывания для для связывания ядерного фактора активации В-лимфоцитов; **МОК-2** – сайт связывания для транскрипционного фактора МОК-2.

№ L36031.1	1323	GAACCTGGGCATTTTCCA ----- CCATACTGTCAATATTCCCCCAGCTTCCTGGACTC	1375
NOS-21	171	GAACCTGGGCATTTTCCA ----- CCATACTGTCAATATTCCCCCAGCTTCCTGGACTC	230
NOS-22	171	GAACCTGGGCATTTTCCA ----- CCATACTGTCAATATTCCCCCAGCTTCCTGGACTC	230
NOS-23	171	GAACCTGGGCATTTTCCA ----- CCATACTGTCAATATTCCCCCAGCTTCCTGGACTC	230
NOS-24	171	GAACC TGGGCATTTTCCA GTGTGT TCCATACTGTCAATATTCCCCCAGCTTCCTGGACTC	230

NFKB

№ L36031.1	1446	TCCCAGATGCTGAAAGTGAGGCCAT T TGTTTGGCCAAGCCA C AACCTGGTCA CGTGGTG	1504
NOS-21	301	TCCCAGATGCTGAAAGTGAGGCCAT G TGTTTGG CCAAGCCA C AACCTGGTCA CGTGGTG	359
		MYC/MAX	
NOS-22	301	TCCCAGATGCTGAAAGTGAGGCCAT T TGTTTGGCCAAGCCA - AACCTGGTCA CGTGGTG	359
		RARF/RAR	
NOS-23	301	TCCCAGATGCTGAAAGTGAGGCCAT T TGTTTGGCCAAGCCA C AACCTGGTCA CGTGGTG	359
NOS-24	301	TCCCAGATGCTGAAAGTGAGGCCAT T TGTTTGGCCAAGCCA C AACCTGGTCA CGTGGTG	359

Рис. 8. Выравнивание нуклеотидной последовательности участка промоторной области гена *NOS-2*. № L36031.1 – консенсусная последовательность, NOS-21, NOS-22, NOS-23, NOS-24 – нуклеотидная последовательность паттернов, полученных в результате SSCP анализа. Цветными прямоугольниками обозначены: **X** – точечная мутация; **NFKB** – сайт связывания для ядерного фактора kB; **EBOX/MYCMAX** – сайт связывания для транскрипционного фактора Мус-Мас; **RARF/RAR** – сайт связывания для рецептора ретиноевой кислоты.

Таблица 1

Исследованные аллельные варианты генов NO- синтаз и сайты связывания транскрипционных факторов

Паттерн	Аллельный вариант	Тип мутации	Транскрипционный фактор
NOS-11	Дикий тип	Нет	
NOS-12	-274 (T/G)	Трансверсия	GATA-1
NOS-13	-186 (A/C)	Трансверсия	ОКТ-1
NOS-24	-189 (-/GTGTGTT)	Инсерция	NFkB
NOS-21	-326 (G/T)	Трансверсия	МусМас
NOS-22	-343 (C/-)	Делеция	RAR
NOS-23	Дикий тип	Нет	
NOS-34	-258 (C/A)	Трансверсия	МОК-2, PAX
NOS-32	-237 (G/A)	Транзиция	NFAT
NOS-33	-260 (GCCC/-)	Делеция	МОК-2, PAX
NOS-31	Дикий тип	Нет	

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.

4.1. Анализ связей полиморфных вариантов промоторной области гена NOS1 с патогенетически важными для астмы признаками

В период обострения у больных БА с аллелями -274 (T/G) и -186 (A/C) гена NOS1 уровень мРНК был достоверно выше ($18,3 \pm 1,1\%$ и $20,5 \pm 1,2\%$ соответственно), чем у пациентов с аллелем дикого типа и в группе контроля ($6,9 \pm 0,5\%$ и $6,4 \pm 1,2\%$ соответственно) ($p < 0,001$). После терапии ИКС уровень мРНК у этих больных существенно снизился ($p < 0,001$) и составил $9,3 \pm 0,5\%$ при наличии аллельного варианта -274 (T/G) и $12,5 \pm 0,6\%$ при наличии аллеля -186 (A/C), однако достоверно отличался от контрольных значений ($6,4 \pm 1,2\%$).

В период обострения у всех больных среднетяжелой и тяжелой астмой наблюдалось высокое содержание нитритов в дыхательном конденсате, вне зависимости от аллельного варианта гена. При тяжелой астме у пациентов с аллелями -274 (T/G) и -186 (A/C) изучаемый показатель был значимо выше и составил $0,93 \pm 0,03$ мкМ и $0,92 \pm 0,06$ мкМ против $0,84 \pm 0,04$ мкМ у больных с аллелем дикого типа ($p = 0,044$).

Точечные мутации -274 (T/G) и -186 (A/C) были расположены в сайтах для связывания транскрипционных факторов (ТФ) GATA-1 и ОКТ-1. Эти аллели обладали более сильной (по сравнению с диким типом) способностью к экспрессии, что приводило к повышению продукции NO.

Наиболее выраженное нарушение вентиляции легких по обструктивному типу отмечалось у больных с аллелем -186 (A/C). После лечения у этих пациентов была отмечена положительная динамика, однако параметры ФВД достоверно отличались от контрольных значений. В то же время, на фоне терапии ИКС у пациентов с аллелем дикого типа получен полный контроль над симптомами астмы, вне зависимости от тяжести заболевания. Таким образом, можно предположить, что различные аллельные варианты гена *NOS1* могут оказывать влияние на эффективность терапии в отношении симптомов БА.

Используя точный критерий Фишера, удалось установить, что у больных среднетяжелой БА частота встречаемости аллеля -274 (T/G) была значительно выше, чем в группе контроля ($p=0,02$) и в группах с легкой ($p=0,03$) и тяжелой ($p=0,007$) астмой.

4.2. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов промоторной области гена NOS2 с патогенетически важными для астмы признаками

При изучении распространенности аллелей гена *NOS2* было установлено, что аллель, соответствующий дикому типу, а также аллели -326 (G/T) и -343 (C/-) встречались как у больных БА, так и в группе контроля. В свою очередь, аллель -189 (-/GTGTGTT) был обнаружен только у больных БА, причем, только при тяжелой и среднетяжелой астме. У здоровых детей данный аллельный вариант найден не был. Вероятно, наличие инсерции -189 (-/GTGTGTT) в промоторной области гена *NOS2* может оказывать влияние на фенотипическую манифестацию характерных для БА патогенетических признаков.

Действительно, удалось установить ассоциацию аллеля -189 (-/GTGTGTT) практически со всеми исследованными количественными и качественными патогенетическими признаками заболевания. Так, средний уровень мРНК и, соответственно, содержание нитритов в дыхательном конденсате у пациентов с этим аллелем были значительно выше ($p<0,001$), чем у больных с другими аллельными вариантами гена *NOS2*. 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 ($p<0,001$).

Это может быть связано с тем, что аллель -189 (-/GTGTGTT) встречается только при тяжелой и среднетяжелой БА, когда в нижних ДП появляются характерные морфологические изменения, включающие гипертрофию гладкой мускулатуры, повышенное образование бокаловидных эпителиальных клеток и отложение интерстициального коллагена под эпителием (утолщение базальной мембраны). Усиленная слизистая секреция, экссудат белков сыворотки и клеточный детрит совместно формируют плотные пробки, которые при тяжелой БА вызывают окклюзию мелких бронхов, в результате затрудняется доставка ИКС в очаг воспаления. В то же время возрастает количество медиаторов, которые вызывают активацию экспрессии гена *NOS2*.

У детей с аллелем -189 (-/GTGTGTT) наблюдались также наиболее выраженные нарушения вентиляции легких по обструктивному типу. На фоне терапии ИКС отмечалось лишь незначительное увеличение показателей ФВД. В то время как у больных с другими аллелями значения ОФВ₁ и ПСВ приблизились к контрольным и значимо от них не отличались.

В период обострения у пациентов с аллелем -189 (-/GTGTGTT) были обнаружены наиболее низкие значения дозы метахолина, приводящей к бронхоспазму, ситуация не изменилась и на фоне терапии ИКС. 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 астме соответственно против $10,4 \pm 0,8$ мг/мл в группе контроля ($p < 0,001$). Ранее было установлено, что структурное ремоделирование дыхательных путей, характерное для тяжелой БА, способствует поддержанию бронхиальной гиперреактивности даже при отсутствии клинических проявлений.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что аллель -189 (-/GTGTGTT) ассоциирован как с обструкцией ДП, так и с высокой степенью БГР.

В основе полученных ассоциаций аллеля -189 (-/GTGTGTT) с БА и характерными для нее патогенетическими признаками, видимо, лежит функциональная значимость NO, который участвует в модуляции тонуса ДП, а также является важным регулятором иммунного ответа и воспаления.

У пациентов с аллелем -326 (G/T) гена *NOS2* наблюдался высокий уровень мРНК ($133,5 \pm 21,4\%$ против $16,5 \pm 1,7\%$ у здоровых детей) и повышенное содержание нитритов в дыхательном конденсате ($0,78 \pm 0,04$ мкМ против $0,33 \pm 0,03$ мкМ в группе контроля). Уровень мРНК у детей с данным аллелем возрастал пропорционально тяжести заболевания и в период ремиссии не достигал контрольных значений.

При обострении у больных с аллелем -326 (G/T) гена *NOS2* отмечались выраженные нарушения вентиляции легких по обструктивному типу. Так, было обнаружено, что уровень ОФВ₁ при легкой астме у пациентов с аллелем -326 (G/T) был значительно ниже, чем у больных с аллелем -343 (C/-) ($91,9 \pm 1,9\%$ против $100,6 \pm 3,8\%$ соответственно, $p < 0,05$) и аллелем, соответствующим дикому типу ($91,9 \pm 1,9\%$ против $100,3 \pm 5,3\%$, $p < 0,05$). На фоне терапии ИКС значения ОФВ₁ и ПСВ приблизились к контрольным и достоверно от них не отличались.

Установлено, что инсерция -189 (-/GTGTGTT) находится в сайте связывания для NFκB, а трансверсия -326 (G/T) – в сайте для связывания ТФ Мус-Мах. Вероятно, за счет мутации в сайте узнавания происходит усиление связывания NFκB и Мус-Мах с консенсусной последовательностью промоторной области. В результате данные формы гена обладают более сильной, по сравнению с другими аллелями, способностью к экспрессии и обуславливают повышенную продукцию оксида азота.

Следующий аллельный вариант гена *NOS-2* имеет делецию -/C в положении -343 (относительно точки инициации транскрипции +1), которая находится в сайте связывания для рецептора ретиноевой кислоты (RAR).

Опираясь на полученные в результате нашего исследования данные, можно полагать, что наличие делеции -343 (C/-) в промоторной области гена

индуцибельной NO-синтазы приводит к ингибированию экспрессии гена и уменьшению уровня мРНК у всех больных БА, независимо от степени тяжести заболевания. Данный эффект можно рассматривать как системный.

Нами установлен факт эффективности глюкокортикостероидной терапии у больных с аллельным вариантом -343 (C/-) гена *NOS2* 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.

4.3. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов промоторной области гена NOS3 с патогенетически важными для астмы признаками

Наличие замены -258 C/A в промоторной области гена *NOS3* связано с высоким уровнем мРНК ($15,6 \pm 1,4\%$ против $4,4 \pm 0,2\%$ в группе контроля и $11,3 \pm 0,9\%$ у пациентов с аллелем дикого типа) и повышенным содержанием нитритов в дыхательном конденсате ($0,87 \text{ мкМ}$ против $0,34 \text{ мкМ}$ в группе контроля и $0,76 \text{ мкМ}$ у пациентов с аллелем дикого типа).

У пациентов с заменой -258 C/A в промоторной области гена *NOS3* отмечались выраженные нарушения ФВД по обструктивному типу, кроме того, этот аллель, по крайней мере, частично ассоциирован с резистентностью к проводимой терапии, направленной на уменьшение гиперреактивности бронхов (ПК₂₀ после лечения составила $4,2 \pm 1,2 \text{ мг/мл}$ против $10,4 \pm 1,1 \text{ мг/мл}$ в контрольной группе).

Трансверсия -258 C/A находится в области связывания ядерных факторов PAX и МОК-2. В этой же области была обнаружена делеция -260 (GCCC/-). В период обострения у всех пациентов с делецией -260 (GCCC/-) отмечался характерный для больных БА высокий уровень мРНК гена *NOS3* и увеличение содержания нитритов в выдыхаемом воздухе. Однако, уровень мРНК у этих больных был в 2 раза меньше, чем у пациентов с трансверсией -258 C/A ($7,10 \pm 1,50\%$ против $15,60 \pm 1,40\%$). После терапии ИКС уровень мРНК у больных с аллелем -260 (GCCC/-) существенно снизился и значимо не отличался от контрольных значений ($4,20 \pm 0,70\%$ и $4,50 \pm 0,20\%$), в то время как у пациентов с аллелем -258 C/A была отмечена лишь тенденция к уменьшению данного показателя ($6,60 \pm 1,30\%$ против $4,40 \pm 0,20\%$ у здоровых детей).

У больных с аллельным вариантом -260 (GCCC/-) отмечались признаки умеренной вентиляционной недостаточности по обструктивному типу, а также БГР, на что указывало уменьшение ОФВ₁, ПСВ и ПК₂₀. Следует отметить, что все эти изменения были менее выражены, чем у пациентов с аллелем -258 C/A. После проведения терапии ИКС многие отклонения, выявленные при первоначальном обследовании, были скорректированы.

Таким образом, различные точечные мутации в консенсусной последовательности к ТФ МОК-2 и PAX по-разному влияют на характер молекулярного взаимодействия в комплексе ТФ-сайт связывания, и способны как увеличивать, так и уменьшать сродство и силу связывания ТФ с нуклеотидной последовательностью, что в свою очередь приводит к изменению эффективности

транскрипции и, соответственно, уровня мРНК. Так, наличие трансверсии -258 С/А связано с высоким уровнем мРНК, что, по крайней мере, частично обуславливает более выраженные нарушения ФВД и повышенную БГР, а делеция в положении -260 (GCCC/-) связана с более низким уровнем мРНК и менее выраженными клиническими проявлениями заболевания.

Аллель -237 (G/A) встречался как у больных, так и у здоровых детей и его частота составила 5% и 3,8% соответственно. Следует отметить, что у пациентов с легкой БА данный аллель обнаружен не был. Транзиция -237 (G/A) находится в сайте связывания для ТФ, активирующего Т-клетки (NFAT). Эта форма гена обладает более сильной, по сравнению с аллелем -260 (GCCC/-) и аллелем дикого типа способностью к экспрессии и обуславливает повышенную продукцию оксида азота.

В отличие от описанных выше случаев, у больных с аллелем, соответствующим дикому типу, при легкой астме в период обострения не было отмечено признаков вентиляционной недостаточности, поскольку показатели ОФВ₁ и ПСВ соответствовали возрастной норме. В то же время, уровень мРНК и нитритов в дыхательном конденсате был повышен, что свидетельствует о том, что на показатели ФВД оказывают влияние и другие факторы. Следует отметить, что все клинические изменения, отмеченные у больных с диким аллелем в период обострения, вне зависимости от степени тяжести БА, были гораздо менее выражены, чем у пациентов с описанными выше аллельными вариантами гена *NOS-3*. На этом основании сделано заключение о наличии отрицательной ассоциации дикого аллеля с проявлением характерных для БА патогенетических признаков.

После проведения терапии ИКС у больных легкой и среднетяжелой астмой, имеющих аллель дикого типа, достигнут полный контроль над симптомами БА. Так, в период ремиссии было отмечено уменьшение уровня мРНК гена *NOS3* и количества нитритов в дыхательном конденсате, а также увеличение провокационной дозы метахолина до контрольных значений. Данный факт позволяет предположить эффективность кортикостероидной терапии в отношении наиболее важных для БА клинических показателей именно у больных с аллелем дикого типа.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что повышение уровня мРНК генов NO-синтаз при БА является не только одним из базисных механизмов болезни, но также отражает активность воспаления и степень тяжести астмы.

Обнаружена взаимосвязь высокого уровня мРНК генов NO-синтаз с характерными для БА клиническими и параклиническими изменениями (снижение ОФВ₁, ПСВ и ПК₂₀, а также увеличение концентрации нитритов в дыхательном конденсате), что позволяет позиционировать этот показатель как один из ключевых, обуславливающих развитие характерного для БА патологического процесса.

Регуляция транскрипции и, соответственно, уровня мРНК опосредуется связыванием варьирующего числа разнообразных факторов транскрипции со специфическими родственными им элементами промоторов и энхансеров.

Эффективность транскрипции зависит от взаимодействия между этими связанными с ДНК белками и одним или более компонентами основного аппарата транскрипции. Согласно этой модели уровень экспрессии гена зависит от доступности, концентрации и активности одного или нескольких факторов, участвующих в его транскрипции.

Мутационные изменения в регуляторной области, как правило, не приводят к дисфункции белкового продукта, а изменяют силу связывания факторов, иницирующих транскрипцию с нуклеотидной последовательностью как в сторону усиления, так и в сторону ослабления, что, в свою очередь, приводит к понижению или повышению эффективности транскрипции, а следовательно, и уровня мРНК гена.

Инсерция (-/GTGTGTT) в положении -189 (относительно точки начала инициации транскрипции +1) и трансверсия -326 (G/T), обнаруженные в промоторной области гена *NOS-2*; точечные мутации -237 (G/A) и -258 (C/A) в промоторе гена *NOS3*; а также трансверсии -274 (T/G) и -186 (A/C) промоторной области гена *NOS-1* расположены в сайтах связывания для следующих транскрипционных факторов: NFκB, Мус-Мах, NFAT, PAX, МОК-2, GATA-1 и ОСТ-1. Все эти замены ассоциированы с повышением уровня мРНК генов NO-синтаз и увеличением содержания нитритов в дыхательном конденсате.

Вероятно, обнаруженные нами точечные мутации изменяют конформацию цис-элементов промотора таким образом, что она становится более удобной и доступной для подхода и присоединения перечисленных ТФ. Повышение эффективности транскрипции в данном случае может также происходить в ответ на усиление белок-связывающей способности цис-элементов промоторной области за счет удлинения времени связывания со специфическими транскрипционными факторами.

Аллель -343 (C/-) гена *NOS-2* ассоциирован со снижением уровня мРНК и низким содержанием нитритов в дыхательном конденсате. Делеция -343 (C/-) находится в сайте связывания для рецептора ретиноевой кислоты. Подавление экспрессии гена в этом случае может происходить либо за счет нарушения связывания рецептора ретиноевой кислоты с родственным ему элементом промотора, либо за счет нестабильности комплекса ТФ-сайт связывания.

Наличие точечных замен в сайтах связывания для таких ТФ, как NFκB, NFAT, Мус-Мах, PAX, МОК-2, RAR, GATA-1 и ОСТ-1, может оказывать влияние на экспрессию мРНК генов NO-синтаз и, соответственно, на количество эндогенного оксида азота. Таким образом, данные ТФ являются важной составной частью патогенетической структуры подверженности к atopической БА и вовлечены как в «воспалительное», так и в «обструктивное» звенья патогенеза заболевания.

В дальнейшем целесообразным представляется более подробное изучение путей инициации транскрипции и регуляции экспрессии генов-кандидатов БА и роли установленных в данном исследовании ТФ в этих процессах. Представляет интерес изучение молекулярных основ взаимодействия ТФ-сайт связывания, ТФ

друг с другом, а также с прочими молекулами, от чего зависит конечное влияние на активность генов.

Выводы

1. Полиморфизм промоторной области генов NO-синтаз ассоциирован с клиническим полиморфизмом фенотипических проявлений бронхиальной астмы. Течение бронхиальной астмы сопровождается повышенным (по сравнению с группой здоровых доноров) уровнем мРНК генов NO-синтаз как в период обострения бронхиальной астмы, так и в период ремиссии. На фоне противовоспалительной терапии уровень мРНК генов NO-синтаз снижается, до контрольных значений при легкой астме и не достигает контроля при тяжелой и среднетяжелой астме.

2. Уровень мРНК генов NO-синтаз у больных бронхиальной астмой находится в отрицательной корреляционной зависимости с показателями функции внешнего дыхания (ОФВ₁ и ПСВ) и бронхиальной гиперреактивности (ПК₂₀) как при обострении, так и в период ремиссии заболевания.

3. В промоторной области гена *NOS1* обнаружено три его аллельных варианта: аллель NOS-11 идентичен консенсусной последовательности, аллели NOS-12 и NOS-13 имеют трансверсии -274 (Т/Г) и -186 (А/С) соответственно. В промоторной области гена *NOS2* обнаружено четыре его аллельных варианта: -343 (С/-), -326 (Г/Т); -189 (-/GTGTGTT). Аллельный вариант NOS-23 соответствует консенсусной последовательности. В промоторной области гена *NOS3* обнаружено четыре его аллельных варианта: -260 (GCCC/-); -237 (Г/А) и -258 (С/А). Аллель NOS-31 соответствует консенсусной последовательности.

4. Инсерция -189 (-/GTGTGTT), трансверсия -326 (Г/Т), в промоторной области гена *NOS-2*; точечные мутации -237 (Г/А) и -258 (С/А) в промоторе гена *NOS3*, а также трансверсии -274 (Т/Г) и -186 (А/С) промоторной области гена *NOS-1* ассоциированы с увеличением уровня матричной РНК генов NO-синтаз и содержания нитритов в дыхательном конденсате. Аллели -343 (С/-) гена *NOS-2* и -260 (GCCC/-) гена *NOS3* ассоциированы со снижением уровня мРНК и низким содержанием нитритов в дыхательном конденсате.

5. Аллели -186 (А/С) гена *NOS-1*, -189 (-/GTGTGTT) и -326 (Г/Т) гена *NOS-2*, а также -237 (Г/А) и -258 (С/А) гена *NOS3* ассоциированы с бронхиальной гиперреактивностью и низкими значениями показателей функции внешнего дыхания. Аллельный вариант -274 (Т/Г) гена *NOS-1* ассоциирован с развитием среднетяжелой БА.

6. Пациенты с аллельным вариантом -343 (С/-) гена *NOS2* и диким аллелем гена *NOS3* в результате лечения демонстрируют достоверное повышение показателей ФВД и БГР до контрольных значений, а также уменьшение содержания нитритов в дыхательном конденсате.

7. Механизм участия полиморфизма генов NO-синтаз в патогенезе бронхиальной астмы связан с точечными заменами в сайтах связывания для транскрипционных факторов NFκB, NFAT, Myc-Max, PAX, MOK-2, RAR, GATA-1

и ОСТ-1 и реализуется их влиянием на экспрессию генов NO-синтаз и количество эндогенного оксида азота.

Практические рекомендации

Типирование полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз рекомендуется для получения предикторов, ассоциированных с благоприятным и неблагоприятным течением бронхиальной астмы и ответом на противовоспалительную терапию.

Так, аллели -186 (A/C) и -247 (G/T) гена NOS1; аллель -189 (-/GTGTGTT) гена NOS2; а также аллели -237 (G/A) и -258 (C/A) гена NOS3 ассоциированы с наихудшими показателями ФВД и БГР и с высоким уровнем эндогенного оксида азота.

Аллель -343 (C/-) гена NOS2 и дикий тип гена NOS3 характеризуют благоприятное течение БА, ассоциированы со снижением уровня мРНК и низким содержанием нитритов в дыхательном конденсате, менее выраженной обструкцией дыхательных путей и высокой чувствительностью к терапии.

Аллель -274 (T/G) гена NOS-1 ассоциирован со среднетяжелой бронхиальной астмой.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Гиперреактивность дыхательных путей при бронхиальной астме: основы патогенеза // Бюллетень Сибирской медицины. Томск, Том1, №4, 2002, с. 35-39 (соавторы: Деев И.И., Кармалита Е.Г., Петровский Ф.И., Огородова Л.М).

2. Эпидемиологическая и клиничко-аллергологическая характеристика бронхиальной астмы у детей города Томска // Актуальные проблемы медицины и биологии №1, 2002, Томск. с.14-15 (соавторы: Деев И.А., Логинова Н.А., Козырицкая Д.В., Васьковский Н.В).

3. Ассоциация полиморфизма 27 аминокислоты гена b2-адренорецептора с показателями бронхиальной гиперреактивности при бронхиальной астме среднетяжелого типа течения // Актуальные проблемы медицины и биологии №2, 2003, Томск. с.25-26 (соавторы: Васьковский Н.В., Кармалита Е.Г., Деев И.А., Петровский Ф.И., Серебров В.Ю.).

4. Изучение распространенности и влияния на бронхиальную гиперреактивность полиморфизма 79 аминокислотной позиции гена b2-адренорецептора в популяции Западной Сибири // Актуальные проблемы медицины и биологии №2, 2003, Томск. с.26-27 (соавторы: Васьковский Н.В., Кармалита Е.Г., Деев И.А., Петровский Ф.И., Серебров В.Ю.).

5. Ассоциация полиморфных вариантов генов NO-синтаз с бронхиальной астмой.// Науки о человеке. Пятый конгресс молодых ученых и специалистов. Томск, 20-21 мая 2004 г., с. 212 (соавторы: И.С. Попова, Е.С. Агеева, Ф.И. Петровский, И.И. Иванчук).

6. Linkage between NO synthases polymorphisms and asthma // European Respiratory Society. Annual Congress. – Glasgow. - 2004. - P. 136 (соавторы: Ivanchuk I.I., A Sazonov., Deyev I.A., Ogorodova L.M.).

7. Полиморфизмы генов NO-синтаз и их ассоциация с бронхиальной астмой и патогенетическими признаками болезни у детей // Пульмонология детского возраста: проблемы и решения / Под ред. Ю.Л. Мизерницкого, А.Д. Царегородцева. – Москва-Красноярск. – 2004. –Выпуск 4. – С 144-147 (соавторы: Огородова Л.М., Петровский Ф.И., Орлова Е.В., Попова И.С., Деев И.А.)

Список сокращений

БА – бронхиальная астма;
БГР –бронхиальная гиперреактивность;
ГАФД – глицеральдегидфосфат дегидрогеназа;
ДП – дыхательные пути;
ДНК –дезоксирибонуклеиновая кислота;
ИКС – ингаляционные кортикостероиды;
ИЛ – интерлейкин;
ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за первую секунду;
ПК20 – пиковая концентрация метахолина;
ПСВ – пиковая скорость выдоха;
РНК – рибонуклеиновая кислота;
РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с предварительной реакцией обратной транскрипции;
ТФ – транскрипционный фактор;
ФВД – функция внешнего дыхания;
ФНО α (β)– фактор некроза опухоли α (β);
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;
GATA-1 – транскрипционный фактор;
IgE – иммуноглобулин E;
МОК – транскрипционный фактор;
МусMax – транскрипционный фактор;
NFAT – нуклеарный фактор активации T-клеток;
NFkB – нуклеарный фактор kB;
NO – оксид азота;
NOS1 – нейрональная NO-синтаза;
NOS2 – индуцибельная NO-синтаза;
NOS3 – эндотелиальная NO-синтаза;
OCT-1– транскрипционный фактор;
NOS3 – эндотелиальная NO-синтаза;
PAX – нуклеарный фактор активации B-клеток;
RAR – транскрипционный фактор (рецептор ретиноевой кислоты);
SSCP – анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК.