



## КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.248-056.52-018.74-056.7:577.152.1:575.174.015.3

### ОСОБЕННОСТИ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТЕАЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

**Т.М. ПАСИШВИЛИ**

*Харьковский национальный  
медицинский университет*

*e-mail: pasotoma@mail.ru*

У 76 больных с бронхиальной астмой (БА), у 39 из которых фоновым заболеванием было ожирение, проведено изучение продукции нитрит-аниона в конденсате выдыхаемого воздуха и аллельного полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтеазы. Показано, что как при изолированном течении БА, так и при ее сочетании с ожирением отмечается снижение продукции нитрит-аниона в конденсате выдыхаемого воздуха на фоне преобладания мутантных гомозигот полиморфизма T-786C промотора гена eNOS, количество которых в группе с сочетанной патологией составило 46,2% больных, против контроля – 27,0% и нормы – 6% больных. Данные изменения являются предикторами вазоконстрикторных нарушений в сосудах малого круга кровообращения и развития хронической тканевой гипоксии.

Ключевые слова: бронхиальная астма, ожирение, нитрит-анион, ген NO-синтеазы.

По данным ВОЗ, распространенность ожирения во всем мире приняла характер эпидемии. За последние 30 лет количество больных с повышенной массой тела удвоилось, и в настоящее время в мире насчитывается более 1,5 миллиарда таких пациентов, из них около 200 млн мужчин и более 300 млн женщин. То есть каждый пятый житель планеты имеет избыточный вес, а каждый четырнадцатый страдает ожирением, включая детей и лиц пожилого возраста [2, 11].

Среди детей 6-17 лет распространенность ожирения за последние 30 лет возросла с 4% до 10%. В России ожирение регистрируется у 54% взрослого населения, в Великобритании – у 52%, в Германии – у 50%. Среди взрослого населения США избыточный вес установлен у каждого пятого жителя, Северной Америки и Великобритании – у каждого третьего. Особую тревогу вызывает ожирение среди детей: в Великобритании избыточная масса тела регистрируется у 20% детей и подростков, в Испании – 27%, в Греции – 31%, в Италии – 36% [6].

Жители Украины также вошли в число европейских наций, у которых довольно часто регистрируется избыточная масса тела. В нашей стране в 2003 году более трети жителей городов имели избыточную массу тела, а 17,5% – ожирение. На сегодняшний день ожирение или избыточный вес имеют 35-36% украинских мужчин, 41% женщин, 15-16% детей; при этом сохраняется опасность увеличения этих показателей.

В связи с повышенным употреблением продуктов питания, с одной стороны, гипокинезией и снижением энергетических затрат в процессе работы – с другой стороны, ожирение стало одной из социальных проблем в промышленно развитых странах [7].

Ожирение рассматривают как фактор риска при многих состояниях и заболеваниях внутренних органов, при которых отмечается снижение качества жизни, значительного увеличения заболеваемости и преждевременной смерти. [4, 10]. В последние годы неизменный интерес вызывает связь между ожирением и заболеваниями дыхательной системы, а именно, бронхиальной астмой (БА).



БА является болезнью цивилизации: наибольшие темпы роста заболеваемости наблюдаются в экономически развитых странах мира. За последние 10 лет в мире количество больных БА удвоилось: она регистрируется у 300 миллионов жителей планеты [3, 5].

БА – это мультифакториальное заболевание. Для развертывания фенотипа заболевания необходимо наличие генетической предрасположенности и воздействие неблагоприятных факторов среды. Это полигенное заболевание со сложным типом наследования. Наследственная природа заболевания была отмечена еще в прошлые века и доказана в XX веке семейными и близнецовыми исследованиями. В течение последних десяти лет достигнуты большие успехи в выявлении генов предрасположенности к бронхиальной астме [4, 9]. С помощью кандидатного и позиционного клонирования были обнаружены участки генома человека, сочетающиеся с повышенной частотой развития БА, а затем картированы гены и полиморфные варианты генов, предрасполагающие к заболеванию [1, 8].

Все вышеизложенное явилось основанием к проведению исследования, **целью** которого было выявление особенностей полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтазы в формировании генетически детерминированной эндотелиальной дисфункции у больных БА, протекающей на фоне ожирения.

**Материалы и методы исследования.** В работе приняло участие 76 больных БА, средний возраст которых составил  $42,4 \pm 5,4$  года; преобладали женщины (64,3% – 45 лиц). В 39 случаях фоновым заболеванием при бронхо-легочной патологии было ожирение (основная группа) 1-й (23 больных) или 2-й (16) степени. Диагноз устанавливался на предыдущих этапах обследования и лечения больных. Настоящее пребывание на стационарном лечении было обусловлено обострением патологического процесса.

Всем обследованным пациентам проводилось изучение функции внешнего дыхания (ФВД) по данным динамической спирографии на аппарате Microlab 3300. Средняя тяжесть персистирующей БА регистрировалась у 37 больных, тяжелое персистирующее течение – у 39.

Для получения показателей нормы было обследовано 50 практически здоровых лиц аналогичного пола и возраста.

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

ДНК-диагностика проведена в отделе молекулярно-генетических исследований ЦНИЛ Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького. ДНК была выделена из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». В работе 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  $93^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин., после которой следовали 35 циклов, состоящих из денатурации при  $93^{\circ}\text{C}$  в течение 10 сек, отжига праймеров при  $64^{\circ}\text{C}$  в течение 10 с, элонгации при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 20 с ПЦР проводили на амплификаторе GeneAmp® PCRSystem 2400 (AppliedBiosystems). Анализ амплифицированных фрагментов производили путем электрофореза в трис-боратном буфере в 3% 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  $\chi^2$  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, как при изолированном течении БА, так и при ее сочетании с ожирением отмечается снижение продукции нитрит-аниона в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ), при этом показатель контроля ( $3,3 \pm 0,8$  ммоль/л) в основной группе был снижен в 2,2 раза, а у больных с изолированным течением БА – в 1,9 раз и составил соответственно  $1,5 \pm 0,07$  ммоль/л и  $1,8 \pm 0,05$  ммоль/л. Наиболее низкое содержание нитритов в КВВ зарегистрировано при тяжелом течении БА ( $1,31 \pm 0,02$  ммоль/л), что, по-видимому, обусловлено тяжестью воспалительного процесса в бронхо-легочной системе. В такой ситуации происходит изменение pH среды, приводящее к сдвигам метаболизма NO в сторону образования пероксинитрита [Tracey W.R., 1994; Behrendt D., Ganz P., 2002]. Последний, поступая в кровь, оказывает повреждающее действие на эндотелий сосудов. Другим механизмом поврежде-



ния сосудистой стенки рассматривают избыточную продукцию NO индуцибельной NO-синтазы, в результате чего происходит угнетение эндотелиальной NO-синтазы и снижение выработки оксида азота эндотелиальными клетками сосудов [Юлдашева И.А., 2003]. При этом рядом исследователей отмечена обратная корреляционная зависимость между уровнем нитритов в КВВ и риском развития хронического легочного сердца у больных БА [Kharitonov S.A., 2000], между уровнем NO крови и показателями легочной гипертензии [Юлдашева И.А., 2003].

Исследование полиморфизма T-786C промотора гена eNOS позволило выделить три возможных генотипа: нормальные гомозиготы, гетерозиготы и патологические или мутантные гомозиготы. У лиц контрольной группы (50 пациентов) эти взаимоотношения выглядели следующим образом: нормальные гомозиготы (TT) регистрировались в 48,2% случаев; гетерозиготы (TC) – в 45,8% и патологические мутантные гомозиготы (CC) – у 6,0% пациентов. У больных с изолированной БА генотипы T-786C промотора гена eNOS распределились следующим образом: TT – 18,9%, TC – 54,1%, CC – 27,0%. Таким образом, при изолированной бронхиальной астме частота встречаемости мутантных гомозигот по отношению к контролю более 4,5 раз превышала норму.

При исследовании полиморфизма T-786C промотора гена eNOS у больных с сочетанным течением БА и ожирения изменения в генотипах имели достоверные отличия от показателей нормы и группы сравнения. Так, нормальные гомозиготы были установлены в 12,8% случаев, гетерозиготы – в 41,0%, а мутантные гомозиготы регистрировались у 46,2% больных (см. рис.).

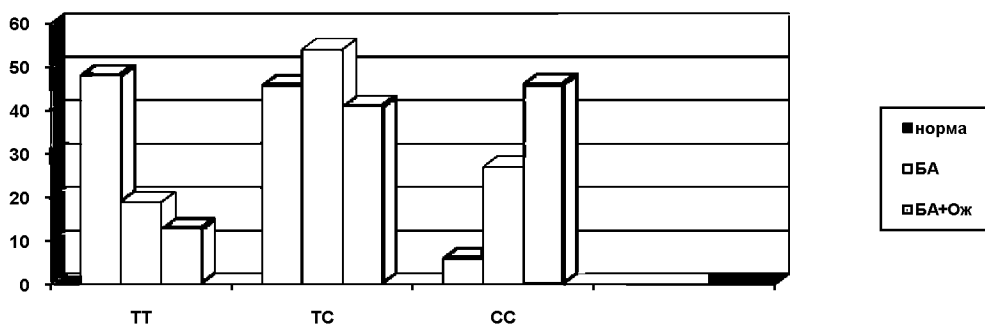


Рис. Частота определения генотипов промотора гена eNOS у больных БА, %

При этом распределение частоты генотипов промотора в группах больных и здоровых лиц соответствовало равновесию Харди – Вейнберга.

Распространенность данного генотипа у больных БА и при ее сочетании с ожирением в нашем исследовании была достоверно выше, чем у здоровых доноров, что указывает на роль полиморфизма T-786C гена eNOS в патогенезе БА в прогрессировании эндотелиальной дисфункции и тканевой гипоксии бронхо-альвеолярного комплекса. Возникающее подавление выработки фермента eNOS является причиной снижения синтеза и высвобождения оксида азота и, следовательно, дисфункции эндотелия. При этом отмечено, что патологический генотип промотора гена eNOS (CC) является тем «плацдармом», на фоне которого возникает увеличение тонуса венечных артерий, формируется повышенная склонность к коронарному спазму и вазоконстрикторному эффекту сосудов малого круга кровообращения. Таким образом, носители генотипа CC имеют повышенный риск развития БА и сосудисто-легочных осложнений, что необходимо учитывать при составлении схем терапии.

**Выводы.** У больных бронхиальной астмой, и особенно при ее сочетании с ожирением, отмечается снижение выработки оксида азота, играющего определяющую роль в регуляции сосудистого тонуса, что указывает на формирование эндотелиальной дисфункции.

Течение БА происходит на фоне мутаций в гене eNOS, что может явиться причиной резкого прогрессирования заболевания и формирования тяжелых форм нозологии.

Низкая активность eNOS и угнетение синтеза оксида азота у больных БА с CC генотипом являются предикторами вазоконстрикторных нарушений в сосудах малого круга кровообращения и развития хронической тканевой гипоксии.

#### Литература

1. Кравченко, Н.А. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы регуляции синтеза оксида азота эндотелиальной NO-синтазой в норме и при сердечно-сосудистой патологии / Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмыш // Укр. терапевт. журн. – 2007. – № 1. – С. 82-89.



2. Крючкова, О.Н. Липтин – ключевое звено в патогенезе ожирения / О.Н. Крючкова, Д. Шахбазиди, Г. Шахбазиди // Крымский терапевтический журнал. – 2012. – №1(18). – С. 33.
3. Перцева, Т.А. Астма и ожирение: какова взаимосвязь? / Т.А. Перцева, Н.П. Нудьга // Украинский пульмонологический журнал. – 2011. – № 3. – С. 61-64.
4. Beyther, D.A. Overweight, obesity and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies / D.A. Beyther et al. // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* – 2007. – № 175. – P. 661-667.
5. Gershon, A. Burden of comorbidity in individuals with asthma / A. Gershon, C. Wang, J. Guan et al. // *Thorax.* – 2010. – № 65. – P. 612-618.
6. Kier, C. Childhood Overweight and Obesity and Their Association With Asthm. / C. Kier et al. // *Journal of Asthma & Allergy Educators.* – 2010. – October, 27.
7. Kushner, R.F. Risk assessment of the overweight and obese patient. / R.F. Kushner, D.J. Blatner // *Journal of the American Dietetic Association.* – 2005. – № 105(5 suppl. 1). – P. 53-62.
8. Mulrennan, S.A. Nitric oxide synthase inhibition: therapeutic potential in asthma / S.A. Mulrennan, A.E. Redington // *Treat Respir. Med.* – 2004. – V. 3. – P. 79-88.
9. Oh, E.G. The relationship between disease control, symptom distress, functioning, and quality of life in adults with asthma. / E.G. Oh // *Journal of Asthma.* – 2008. – № 45. – P. 882-886.
10. Scott, H. Airway Inflammation is Augmented by Obesity and Fatty Acids in Asthma / H. Scott et al. // *European Respiratory Journal.* – 2011. – February, 10.
11. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of WHO Consultation / WHO Technical Report Series 894. – Geneva : World Health Organization, 2008. – P. 35.

## **FEATURES OF ALLELIC POLYMORPHISM OF ENDOTHELIAL NO-SYNTHEASE IN FORMATION OF GENETICALLY DETERMINED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH OBESITY AND ASTHMA**

**T.M.PASIESHVILI**

*Kharkiv National  
Medical University*

*e-mail: pasotoma@mail.ru*

In 76 patients with asthma, 39 of whom had underlying obesity diseases, the production of nitrite anion in exhaled breath condensate and allelic polymorphism of endothelial NO-synthase was studied. It is shown that both in the isolated case of asthma, and when it is combined with obesity observed decrease in production of nitrite anion in the exhaled breath condensate against the dominance of the mutant homozygotes T-786C polymorphism in the gene eNOS promoter. Number of such patients in the group with comorbidity was 46.2 % versus control - 27.0% and norms - 6%. These changes are predictors of vasoconstrictive disorders in the pulmonary circulation and the development of chronic tissue hypoxia.

Keywords: asthma, obesity, nitrite anion, NO-synthase gene.