



ГЕНЕТИКА

УДК 616-056.3-053.2:575.174.015.3:1577.15:546.172.6-311

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА НЕЙРОНАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ (276С/Т И -186А/С) В СТРУКТУРЕ ПОДВЕРЖЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ «АТОПИЧЕСКОГО МАРША» У ДЕТЕЙ

**Л.М. ОГОРОВОДА
И.В. ПЕТРОВА
К.Ю. РУКИН**

*Сибирский государственный
медицинский университет*

e-mail: naukatomsk@yandex.ru

В регуляции продукции оксида азота важную роль играют NO-синтазы. Учитывая связь аллельного полиморфизма гена nNOS с клинико-функциональными характеристиками бронхиальной астмы (БА) и развитием атопии, можно предположить его участие в формировании атопического дерматита (АД) и реализации «атопического марша». Цель исследования – установить ассоциацию полиморфных вариантов гена нейрональной NO-синтазы с развитием атопического дерматита и реализацией «атопического марша» у детей. Установлено, что аллельные варианты 276С/Т и -186А/С гена нейрональной NO-синтазы принимают участие в развитии АД, однако не являются факторами риска формирования «атопического марша» у детей.

Ключевые слова: NO-синтаза, полимеразная цепная реакция, ген, полиморфизм, «атопический марш».

Широкая распространенность аллергических болезней является актуальной проблемой детского возраста, как в России, так и в других странах мира [1]. Основу развития аллергопатологии составляет «атопический марш», который представляет собой последовательную манифестацию аллергических симптомов и болезней у предрасположенных к атопии лиц [2].

Началом «атопического марша» часто является атопический дерматит (АД), поэтому дерматит рассматривается в качестве фактора высокого риска развития бронхиальной астмы (БА). Приблизительно у 50% детей, больных АД, в дальнейшем развиваются аллергические респираторные болезни: БА и аллергический ринит (АР).

Оксид азота (NO) и его метаболиты являются важными участниками аллергического воспаления, что отражается на изменении их концентрации в сыворотке крови и в выдыхаемом воздухе у больных АД и БА [3, 4]. NO участвует в процессах вазодилатации, адекватной воздухонаполняемости легких, влияет на пролиферацию кератиноцитов, фибробластов, эпителия бронхов, эндотелиоцитов, является нейромедиатором периферических нервов.

В регуляции продукции оксида азота важную роль играют NO-синтазы. Особого внимания заслуживает нейрональная NO-синтаза (nNOS, NOS1). По мнению ряда исследователей, среди генов, кодирующих NO-синтазу, nNOS является наиболее вероятным кандидатом на участие в развитии БА [5, 6]. Ген нейрональной NO-синтазы расположен на 12 хромосоме в районе 12q24.2 – 12q24.3, имеет протяженность 150 килобаз и содержит 29 экзонов и 28 интронов.

Изучение полиморфизма гена нейрональной NOS при различных болезнях проводилось учеными разных стран. Так, Grasemann H. и коллеги идентифицировали 8 аллелей с разным числом ААТ повторов (от 9 до 16 повторов) в 20-м интроне гена

NOS1 и установили, что высокое число ААТ повторов (более 12) связано с низким уровнем выдыхаемого NO. Исследование полиморфизма 5266 С/Т гена nNOS у детей, проведенное китайскими учеными, не выявило ассоциации с БА, но большая часть пациентов с генотипом Т/Т имели повышенный уровень IgE в сыворотке крови. Для этого генотипа также обнаружена ассоциация с сенсibilизацией к *Dermatophagoides pteronyssinus* ($P=0,049$). У больных бронхиальной астмой достоверно чаще, чем у здоровых людей ($p<0,05$), встречается точечная мутация 276 С/Т в 29 экзоне.

Учитывая связь аллельного полиморфизма гена nNOS с клинико-функциональными характеристиками БА и развитием атопии, можно предположить его участие в формировании АД и реализации «атопического марша».

Цель исследования – установить ассоциацию полиморфных вариантов гена нейрональной NO-синтазы с развитием атопического дерматита и реализацией «атопического марша» у детей.

Материалы и методы. В исследование были включены больные БА ($n=929$) в возрасте от 7 до 17 лет и больные АД ($n=847$) в возрасте от 1 до 17 лет. Группа контроля включала 720 детей. Диагноз БА устанавливали на основании клинического обследования, данных лабораторных и инструментальных методов; степень тяжести заболевания оценивали по критериям проекта GINA. Диагноз АД устанавливали на основании клинического обследования, данных лабораторных и инструментальных исследований.

Критерии включения больных бронхиальной астмой:

- Амбулаторные и стационарные пациенты.
- IgE в сыворотке крови ≥ 100 МЕ/мл.
- Пациенты, имеющие подтвержденный диагноз бронхиальной астмы:
 - легкая персистирующая: симптомы чаще 1 раза в неделю, но реже 1 раза в день, обострения, нарушающие активность и сон, ночные симптомы чаще 2 раз в месяц ОФВ₁ или ПСВ не менее 80% от должных значений, вариабельность пиковой скорости выдоха (ПСВ) или объем форсированного выдоха за 1 с (ОФВ₁) не более 30%
 - персистирующая среднетяжелая: симптомы ежедневно, обострения, нарушающие активность и сон, ночные симптомы более 1 раза в неделю, ежедневный прием ингаляционных β_2 -агонистов короткого действия, ОФВ₁ или ПСВ 60-80% от должных значений, вариабельность ПСВ или ОФВ₁ более 30%
 - тяжелая персистирующая: симптомы ежедневно, частые обострения, частые ночные симптомы БА, ограничения физической активности, ОФВ₁ или ПСВ не превышает 60% от должных значений, вариабельность ПСВ или ОФВ₁ не менее 30% (GINA 2006).

Критерии включения больных атопическим дерматитом:

- Амбулаторные и стационарные пациенты.
- IgE в сыворотке крови ≥ 100 МЕ/мл.
- Пациенты, имеющие подтвержденный диагноз атопического дерматита: легкий АД – индекс SCORAD – 0-20 баллов; средней степени тяжести АД – индекс SCORAD – 21-40 баллов; тяжелый АД – индекс SCORAD – 41 и более баллов) («Атопический дерматит и инфекции кожи у детей: диагностика, лечение и профилактика», Москва, 2004 г)

Критерии включения в контрольную группу:

- Возраст от 5 до 17 лет.
- Отсутствие аллергических болезней на момент включения и в анамнезе.
- Отсутствие острых респираторных заболеваний в течение 4-х недель до включения в исследование.
- Отрицательные результаты кожных аллергопроб.
- IgE в сыворотке крови <100 МЕ/мл.

ДНК выделяли из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции по стандартной неэнзиматической методике [7, 8]. Генотипирование по полиморфным вариантам 276С/Т и -186А/С проводили в пробирках 0,5 мл типа «Эппендорф», на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Москва). Состав реакционной смеси (50 мкл): 67 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 16,7 мМ аммоний сульфата, 1,5 мМ хлорид магния, 0,2 мМ каждого dNTP; 0,1% твин-20; 2 ед. Таq полимеразы, 50 – 100 нг геномной ДНК человека. Использовали следующие праймеры:



(-186A→C)sense 5'-cagggagagccaatcagt-3'; antisense 5'-atgatgtccagactccaggatct-3';
(276 C→T) sense 5'-actccttgagtttctctgctg cgatg-3'; antisense
5'-ccatgttccagggtttcatgcacac-3';

и рестриктазы: AlwN I и Eco72I соответственно.

Статистический анализ: При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в группах больных и здоровых лиц использовался критерий χ^2 (p) для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йетса на непрерывность. Анализ соответствия наблюдаемых частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга определяли по критерию χ^2

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 ($\chi^2 = \sum (H-O)^2 / O$), где H – наблюдаемое значение; O – ожидаемое значение; Σ – символ, обозначающий суммирование по всем сериям эксперимента.. Для сравнения частот аллелей и генотипов между исследованными группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы, равном 1.

Для сравнения средних значений независимых распределений использовали однофакторный дисперсионный анализ. Расчеты проводили с помощью программ «STATISTICA6» и «Microsoft Excel».

Результаты.

Полиморфизм 276C/T является транзицией, расположенной в 29 экзоне гена nNOS. Распределение генотипов по полиморфному варианту 276C/T в группе больных АД не соответствовало ожидаемому при РХВ ($\chi^2 = 6,32$ d.f. = 1, p = 0,01).

Таблица 1

Частоты генотипов полиморфизма 276C/T гена nNOS у больных атопическим дерматитом

Группы	n	Генотипы (наблюдаемые частоты генотипов)			χ^2*	P*	Ho	He	D	χ^2**	P**
		C/C	C/T	T/T							
АД	847	91 (0.107)	441 (0.521)	315 (0.372)	7,34	0,006	0,52± 0,001	0,46± 0,006	0,12	6,32	0,01
Контроль	720	216 (0.300)	330 (0.458)	174 (0.242)			0,46 ± 0,001	0,5± 0,001	-0,08		

Примечание: χ^2* , χ^2** – критерий для оценки различий между частотами генотипов и для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга соответственно. P* , P** – уровень значимости при оценке различий частот генотипов и РХВ соответственно. Ho, He – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно. D – относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой.

Случаи отклонения распределения от ожидаемого могут отражать специфику популяционно-генетических процессов, которые могут быть связаны как с характеристиками генетико-демографической структуры изученных этнических групп, так и с функциональной значимостью данных локусов – гены NOS, в частности ген NOS1, вовлечены в патогенез многих мультифакториальных заболеваний и полиморфизмы этих генов не могут являться селективно нейтральными вариантами.

Частота аллеля 276C у детей с АД составила около 37%, в то время как у здоровых детей – 53%. Однако, при сравнении частот аллелей точным тестом Фишера различия оказались статистически не достоверными.

У больных АД отмечена тенденция к повышению уровня наблюдаемой гетерозиготности по отношению к ожидаемой при равновесии Харди-Вайнберга (табл. 1). Достоверных различий между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью как внутри каждой группы, так и между больными АД и здоровыми детьми обнаружено не было (p < 0,05).

Установлено достоверное различие между частотами генотипов полиморфизма 276C/T при атопическом дерматите и в группе контроля ($\chi^2 = 7,34$ p = 0,006) (табл. 1). Расчет относительного риска показал, что вероятность формирования АД у пациентов, имеющих генотип ТТ достоверно выше (p < 0,001), чем при других генотипах полиморфизма 276C/T гена NOS1 (табл.2). Транзиция C → T не приводит к замене аминокислоты в белковом продукте, однако, для данной мутации обнаружена также достоверная



ассоциация с развитием бронхиальной астмы [5]. Коллектив авторов, установивших эту связь, считает, что замена 276С→Т может быть сцеплена с соседней мутацией, которая приводит к изменению в последовательности белка или mRNA.

Таблица 2

Риск формирования атопического дерматита в зависимости от генотипа полиморфизма 276С/Т гена nNOS

Генотип	Больные АД, % (n=847)	Контроль, % (n=720)	OR	CI95%	P
CC	10,74	30,0	0,41	0,29-0,45	<0,00
CT	52,06	45,8	1,19	1,03-1,26	0,014
TT	37,1	24,2	1,55	1,32-1,80	<0,00

Примечание: OR – отношение шансов; CI95% -доверительный интервал; p – достигнутый уровень значимости.

Учитывая высокий риск развития АД при наличии генотипа TT (276С/Т), мы проанализировали влияние этого и других генотипов данного полиморфизма на первую манифестацию и характер течения АД, определяемый тяжестью заболевания (табл. 3).

Таблица 3

Распределение генотипов полиморфизма 276С/Т гена nNOS у больных атопическим дерматитом разной степени тяжести

Генотип	Легкий и среднетяжелый АД, n=686	Тяжелый АД, n=161	OR	CI 95%	p
CC	91	21	0,88	0,63-1,53	0,79 (CT)
CT	350	84	1,13	0,87-1,21	0,82 (TT)
TT	245	56	0,78	0,77-1,23	0,94 (CC)

Примечание: OR – относительный риск; CI95% -доверительный интервал; p – достигнутый уровень значимости.

Первые клинические проявления дерматита у большинства детей отмечены в возрасте до 1 года, у единичных больных после 5 лет. Поиск ассоциации исследуемых генотипов полиморфизма 276С/Т гена nNOS с возрастом дебюта и тяжестью АД не дал достоверных результатов.

Не установлено также различий в структуре сенсibilизации и по уровню общего IgE в крови у пациентов-носителей разных генотипов. Не смотря на это, расчет относительного риска показал, что вероятность формирования АД у пациентов с генотипом TT полиморфизма 276С/Т гена nNOS достоверно выше, чем у детей с другими генотипами (табл. 2). Учитывая, что атопический дерматит является первым проявлением «атопического марша», мы проанализировали наличие связи между бронхообструктивным синдромом в анамнезе пациентов и аллельными вариантами 276С/Т гена nNOS, но частота бронхиальной обструкции не зависела от генетического полиморфизма.

Однонуклеотидная замена в положении 276А/С является трансверсией, расположенной в промоторе гена nNOS. Мутационные изменения в регуляторной области, как правило, не приводят к дисфункции белкового продукта, но 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. Наличие гомозиготы по аллелю С в положении -186, вероятно, вызывает нарушение экспрессии гена нейрональной NO-синтазы и, соответственно, нарушение образования NO в кератиноцитах, что приводит к дисбалансу пролифера-



ция/дифференцировка и влечет за собой изменение барьерной функции кожи, способствуя эпикутанной сенсibilизации.

Установлено, что распределение генотипов по полиморфизму -186A/C гена nNOS в группе больных АД соответствует ожидаемому при PХВ ($\chi^2 = 1,22$ d.f. = 1, $p = 0,27$). В то же время, распределение генотипов по данному полиморфизму в контрольной группе не соответствовало ожидаемому при PХВ ($\chi^2 = 80,19$ d.f. = 1, $p = 0,001$) (табл. 4).

Таблица 4

Частоты генотипов полиморфизма -186 A/C гена NOS1 у больных атопическим дерматитом

Группы	n	Генотипы (наблюдаемые частоты генотипов)			χ^2^*	P*	Ho	He	D	χ^2^{**}	P**
		A/A	A/C	C/C							
АД	847	399 (0.471)	350 (0.413)	98 (0.116)	13.35	0,001	0,41± 0,001	0,44± 0,008	-0,05	1,22	0,27
Контроль	720	618 (0.858)	48 (0.067)	54 (0.075)			0,33± 0,06	0,38± 0,02	-0,14		

Примечание: χ^2^* , χ^2^{**} – критерий для оценки различий между частотами генотипов и для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга соответственно. P*, P** – уровень значимости при оценке различий частот генотипов и PХВ соответственно. Ho, He – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно. D – относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой.

Установлено достоверное различие между частотами генотипов в группе больных АД и в группе контроля ($\chi^2 = 13,35$, $p = 0,001$) (табл. 4). В природных популяциях давлению отбора подвергаются отдельные генотипы, и приспособленность популяции в целом определяется личным вкладом каждого из них. Если рассматривать заболевание как фактор отбора, влияющий на приспособленность отдельного носителя определенного генотипа, то обнаружение различий в частотах генотипов в группах здоровых и больных представляет большой интерес.

Таблица 5

Риск формирования атопического дерматита в зависимости от генотипа полиморфизма -186A/C гена nNOS

Генотип	Больные АД n=847	Контроль n=720	RR	CI95% – 95%	P
AA	47,1 %	85,83 %	0,55	0,51-0,59	<0,00
AC	41,3 %	6,66 %	1,20	4,66-8,24	<0,001
CC	11,6 %	7,5 %	1,54	1,12-2,12	<0,007

Примечание: RR – относительный риск; CI95% – 95% -доверительный интервал; p – достигнутый уровень значимости.

Расчет относительного риска показал, что формирование АД связано с аллелем C -186A/C. Так, у детей с генотипом CC риск развития АД оказался более чем в 2 раза выше, чем у детей с генотипом AA (табл. 5). Вероятно, это связано с тем, что у носителей генотипа CC подверженность к формированию сенсibilизации эпидермальными аллергенами достоверно выше, чем у пациентов-носителей других генотипов этого полиморфизма (RR=1,54; CI95%: 1,12-2,12; $p < 0,007$).

При сравнении распределения генотипов полиморфизма -186A/C гена nNOS у больных АД, разделенных на подгруппы в зависимости от тяжести заболевания, между ними не было обнаружено достоверных различий (табл. 6).

Таблица 6

Распределение генотипов полиморфизма -186A/C гена nNOS у больных атопическим дерматитом разной степени тяжести

Генотип	Легкий и среднетяжелый АД, n=686	Тяжелый АД, n=161	RR	CI95%	P
AA	343	91	0,68	0,97-1,32	0,57 (AC)
AC	252	63	1,07	0,86-1,32	0,001 (CC)
CC	91	7	0,33	0,15-0,69	0,14 (AA)

Примечание: OR – отношение шансов, CI95% – 95% – доверительный интервал, p – достигнутый уровень значимости.



В результате предыдущих исследований установлено, что точечная мутация -186A/C в промоторной области гена nNOS также ассоциирована с развитием БА [9, 10], однако, она лишь опосредованно влияет на вариабельность ОФВ₁ и ПСВ. Таким образом, можно сделать вывод, что наличие обструктивных нарушений у больных БА зависит от других генетических и внешнесредовых факторов, а наличие генотипа СС полиморфизма -186A/C гена nNOS в большей мере связано с формированием атопии, чем с развитием обструкции дыхательных путей. Поэтому данный генотип нельзя считать фактором риска для формирования «атопического марша» у детей.

Таким образом, в результате нашего исследования установлено, что аллельные варианты 276C/T и -186A/C гена нейрональной NO-синтазы принимают участие в развитии АД. Предыдущие исследования показали связь этих аллелей с клинической картиной и патогенезом БА, тем не менее, изученные аллельные варианты гена нейрональной NO-синтазы не являются факторами риска формирования «атопического марша» у детей.

С другой стороны, ни один ген не функционирует изолированно, каждый тесно взаимодействует напрямую, или посредством своего белкового продукта со многими другими генами и белками, и доля каждого гена в формирование признака неравнозначна. Для успешного определения молекулярных изменений, лежащих в основе аллергических болезней, и развития представлений о механизмах формирования «атопического марша» важен комплексный подход в оценке роли генетических факторов риска. С этой точки зрения, перспективным является исследование группы генов, объединенных общим патогенетическим механизмом. Поэтому, в дальнейшем планируется изучение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов NO-синтаз, которые принимают участие в формировании как общих, так и специфических механизмов БА и АД.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ ГК №02.120.11.3520-МК от 24.09.09.

Литература

1. Атопический дерматит у детей: диагностика, лечение и профилактика: научно-практическая программа Союза педиатров России. М., 2000.
2. Генпе, А. «Аллергия у детей» / А. Генпе, В.А. Ревякина // СПб., ЭЛБИ. 2002.
3. Козырицкая, Д.В. Биологические маркеры атопического воспаления при аллергических заболеваниях как предикторы развития бронхиальной астмы в будущем / Д.В. Козырицкая, Л.М. Огородова, И.А. Деев, И.А. А.В. Екимовских // Педиатрия. – 2007. – № 4. – С. 9-13.
4. Петровский, Ф.И. Роль эндогенного оксида азота в регуляции атопического воспаления при бронхиальной астме у детей / Ф.И. Петровский, Л.М. Огородова, В.Ю. Серебров, Е.М. Камалтынова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – С. 57-60.
5. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma / H. Grasermann, C.N. Yandava, J.M. Drazen // Clinical and Experimental Allergy. – 1999. – № 4. – P. 39-41.
6. NOS1 Gene Polymorphism Associated with Asthma and Specific Immunoglobulin E Response to Mite Allergens in a Colombian Population / B. Martínez, K. Barrios, C. Vergara [et al.] // Int Arch Allergy Immunol. – 2007. – Vol.144. – P. 105-113.
7. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование. / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // М., Мир. 1984.
8. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality / K. Debomoy, N. Lahiri // Bill Schnabel Biochemical Genetics. – Vol.7. – P. 321-328.
9. Огородова, Л.М. Роль полиморфизма генов NO-синтаз в развитии БА у детей / Л.М. Огородова, И.В. Петрова, И.И. Иванчук, И.А. Деев, М.Б. Фрейдин // Педиатрия. – 2007. – № 4. – С. 14-18.
10. Огородова, Л.М. Ассоциация полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз с развитием БА у детей / Л.М. Огородова, И.В. Петрова // Пульмонология. – 2007. – № 4. – С. 52-55.



POLYMORPHISM OF THE NEURONAL NO-SYNTHASE (276S/T AND-186A/C) IN THE STRUCTURE OF THE EXPOSURE TO IMPLEMENTATION OF THE "ATOPIC MARCH" IN CHILDREN

**L.M. OGORODOVA
I.V. PETROVA
K.Y. RUKIN**

*Siberian State
Medical University*

*e-mail:
naukatomsk@yandex.ru*

In the regulation of nitric oxide production an important role belongs to NO-synthase. After estimation of the relationship of allelic polymorphism of nNOS with clinical and functional characteristics of asthma and atopy development, we can assume, that it is a part in the formation of AD and implementation of the "atopic march". The purpose of the study – to establish an association of polymorphic variants of the gene of the neuronal NO-synthase with the development of atopic dermatitis and implementation of "atopic march" in children. It is established that the allelic variants 276C/T and -186A/C gene neuronal NO-synthase involved in the development of AD, but are not risk factors for formation of the "atopic march" in children.

Key words: NO-synthase, PCR, gene, polymorphism, "atopic march".