



УДК 616.248-02:616.23-002-053.2]:575.113.2

БЕЗРУКОВ Л.О., КОЛОСКОВА О.К., БІЛОУС Т.М., БОГУЦЬКА Н.К.

Буковинський державний медичний університет МОЗ України, кафедра педіатрії та дитячих інфекційних хвороб, м. Чернівці

## АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА *eNOS* У ДІТЕЙ, ЯКІ СТРАЖДАЮТЬ ВІД БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ, ЗА ЕОЗИНОФІЛЬНОГО ТА ПАУЦИГРАНУЛОЦИТАРНОГО СУБТИПУ ЗАПАЛЕННЯ БРОНХІВ

**Резюме.** Метою роботи було вивчити вплив алельного поліморфізму гена *eNOS*, що кодує активність ендотеліальної NO-синтази та синтез монооксиду нітрогену в дихальних шляхах, на окремі клінічно-параклінічні показники бронхіальної астми в дітей шкільного віку за еозинофільного і пауцигранулоцитарного запального фенотипу.

Обстежені 22 хворі на бронхіальну астму з еозинофільним характером запалення дихальних шляхів та 15 пацієнтів — із пауцигранулоцитарним. Проведено імунологічні, спірометричні дослідження, генотипування ендотеліальної *NOS*.

Тяжкість бронхіальної астми у хворих із різним типом запалення бронхів суттєво не залежить від алельного поліморфізму гена *eNOS*. Відсутність мутацій гена *eNOS* у вигляді генотипу *GG* виявилася характернішою для хворих із пауцигранулоцитарним характером запалення бронхів, алельний поліморфізм *GT/TT* — для дітей з еозинофільним запаленням. За наявності алельного поліморфізму гена *eNOS* за генотипу *GT/TT* дітям із пауцигранулоцитарним характером запалення бронхів були притаманні частіші клінічні прояви атопічного дерматиту й алергічного риніту, більший індекс лабільності бронхів та нижча концентрація метаболітів *NO* в конденсаті повітря, що видихається.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, діти, тип запалення, генотип *eNOS*.

### Вступ

Бронхіальна астма (БА) наразі розглядається як гетерогенне захворювання, за якого, зокрема, можуть визначатися різноманітні субтипи запалення бронхів [1, 2]. Поміж них найбільш вивченим є еозинофільний характер запалення, а найменше — пауцигранулоцитарний [3, 4]. Різноманітний патерн запалення дихальних шляхів у хворих на БА виникає внаслідок взаємодії спадкових факторів і різноманітних патогенних стимулів навколишнього середовища. Серед численних спадкових характеристик, що є факторами схильності до хронічного запалення бронхів та їх гіперреактивності, особливу цікавість викликає поліморфізм генів, що кодує синтез монооксиду нітрогену в дихальних шляхах. Найменш вивченим із цього погляду слід вважати вплив мутації гена *eNOS*, який кодує активність ендотеліальної NO-синтази, на такі характеристики БА, як тяжкість захворювання, характер запалення бронхів та їх гіперреактивність, а також вміст моно-

оксиду нітрогену в повітрі, що видихається, як непрямого показника функціонального стану даної основної ізоформи NO-синтази [5–8]. Враховуючи важливість даних показників перебігу БА для обґрунтування індивідуалізованого лікування, вивчення мутаційного поліморфізму *eNOS* у хворих із гетерогенним запаленням бронхів можна вважати актуальним і перспективним [9–10].

**Мета роботи:** для покращення індивідуалізованої терапії БА в дітей шкільного віку за еозинофільного й пауцигранулоцитарного запального фенотипу ви-

#### Адреса для листування з авторами:

Безруков Леонід Олексійович  
E-mail: [pediatry\\_inf@bsmu.edu.ua](mailto:pdiatry_inf@bsmu.edu.ua)

© Безруков Л.О., Колоскова О.К., Білоус Т.М.,  
Богуцька Н.К., 2015

© «Здоров'я дитини», 2015

© Заславський О.Ю., 2015

вчити вплив алельного поліморфізму гена *eNOS* на окремі клінічно-параклінічні показники захворювання.

## Матеріал і методи

У пульмонологічному відділенні обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці у позанападному періоді БА проведене комплексне обстеження 37 дітей шкільного віку. Серед них у 22 хворих встановлено еозинофільний характер запалення дихальних шляхів (I клінічна група), а у 15 пацієнтів — пауцигранулоцитарний субтип запалення (II клінічна група). За основними клінічними характеристиками групи були порівнянні. Так, у I групі хлопчиків було 60,7 %, а середній вік представників даної групи сягав 11,9 року. У групі порівняння хлопчиків було 67,1 %, а середній вік становив 11,0 року ( $P > 0,05$ ). Перші прояви БА в ранньому віці в дітей з еозинофільним запаленням бронхів відмічені у 55,4 % випадків, а у групі порівняння — у 46,7 % спостережень ( $P > 0,05$ ).

Поряд із клінічним обстеженням діагностичний комплекс передбачав: оцінку генеалогічного індексу за атопічними захворюваннями, визначення вмісту в сироватці крові загального IgE, а в конденсаті повітря, що видихається, — метаболітів монооксиду нітрогену [11]. Окрім того, в обстежених дітей визначено бронхоспазм фізичної напруги в пробі з дозованим бігом (індекс бронхоспазму) та показник лабільності бронхів з урахуванням бронхомоторної реакції після інгаляції сальбутамолу.

Характер запалення бронхів визначали на підставі цитологічного аналізу індукованого мокротиння, одержаного шляхом інгаляції гіпертонічних (3, 5, 7%) розчинів натрію хлориду [12]. За наявності в мокротинні 3 % та більше еозинофільних лейкоцитів робили висновок про еозинофільний характер запальних (ЕХЗ) змін дихальних шляхів, а за наявності менше 59 % нейтрофільних та 2 % і менше еозинофільних гранулоцитів встановлювали пауцигранулоцитарний запальний варіант (ПХЗ) [4, 13].

Генетичні дослідження проводилися на кафедрі молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету ім. Ю. Федьковича. Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно зі стандартним протоколом [14]. Для генотипування ендотеліальної *NOS* за однонуклеотидною заміною G894T (Glu<sup>298</sup>→Asp) отримані продукти полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) (очікувана довжина 250 нп) обробляли рестриктазою Eco24 I (=BanI). При цьому за наявності алелі G дикого типу рестриктаза розщеплювала ПЛР-продукт на два фрагменти довжиною 90 та 160 нп, а за наявності мутантної алелі T ПЛР-продукт залишався нерозщепленим. Обробку ПЛР-продукту рестриктазою проводили згідно з рекомендаціями виробника ферменту (Fermentas). Отримані рестриктні фрагменти аналізували методом електрофорезу у 2% агарозному гелі.

Одержані результати дослідження аналізували з використанням непараметричних методів. Правильність нульової гіпотези визначали з урахуванням рівня значущості *P* (за Стьюдентом): для відносних величин — методом кутового перетворення Фішера (*P*<sub>F</sub>), а для абсолютних величин — за методом Вілкоксона — Манна (*P*<sub>M</sub>). Дослідження проведене з урахуванням основних положень ІСН GCP та Хельсінської декларації щодо біомедичних досліджень, у яких людина виступає їх об'єктом.

## Результати та їх обговорення

Показано, що в дітей з еозинофільного характеру запалення бронхів легка персистуюча БА визначалася у 8,7 % спостережень, середньотяжка — у 32,6 % і тяжка — у 58,7 % випадків. У групі порівняння хворих із легким персистуванням БА не траплялося, середньотяжкий перебіг відмічено у 40,0 % дітей, а тяжкий — у 60,0 % хворих ( $P > 0,05$ ).

Маргінальні значення маси тіла при народженні як один із показників схильності до розвитку БА у дітей груп порівняння мали певні розбіжності. Так, у I клінічній групі маса тіла при народженні понад 3400 г визначалася у 71,0 % дітей, а менше 2500 г — у 11,0 % хворих. У групі порівняння наведені показники маси тіла при народженні визначалися відповідно в 60,0 % випадків ( $P > 0,05$ ) та 40,0 % спостережень ( $P < 0,05$ ).

Частота грудного вигодовування на першому році життя у представників I клінічної групи становила 63,0 % випадків, а в дітей II групи — 46,7 % спостережень ( $P > 0,05$ ).

Генеалогічний індекс за атопічними захворюваннями у дітей з ЕХЗ бронхів сягав у середньому 0,06 ум.од., а у хворих із ПХЗ дихальних шляхів — 0,09 ум.од. ( $P < 0,05$ ).

Не встановлено суттєвих розбіжностей за частотою присутності потенційно сенсibiliзуючих факторів в оточенні дітей груп порівняння. Так, у хворих I клінічної групи хронічна експозиція тютюнового диму відмічена у 18,4 % випадків, наявність домашніх тварин — у 6,0 %, а таких акумуляторів домашнього пилу, як килими в кімнаті, де спить дитина, — у 19,0 % спостережень. У представників II клінічної групи наведені потенційно сенсibiliзуючі фактори траплялися відповідно у 13,3; 13,3 та 20,0 % спостережень.

У табл. 1 наведена частота алельного поліморфізму гена *eNOS* у дітей за різного характеру запального процесу в бронхах.

Наведені дані дають підстави вважати, що відсутність мутацій гена *eNOS* у вигляді генотипу *GG* виявилася характернішою для хворих із пауцигранулоцитарним характером запалення бронхів, натомість алельний поліморфізм *GT/TT* — для дітей I групи порівняння.

У табл. 2 наведена особливість розподілу тяжкості перебігу БА у дітей груп порівняння за наявності чи відсутності алельного поліморфізму гена *eNOS*.

Таблиця 1. Частота генотипів *eNOS* у дітей із різним характером запалення бронхів

Клінічні групи	Кількість хворих, n	Розподіл генотипів <i>eNOS</i>					
		GG		GT		TT	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Еозинофільний субтип	22	9	40,9	9	40,9	4	18,2
Пауцигранулоцитарний субтип	15	9	60,0	5	33,3	1	6,7
P			> 0,05		< 0,05		> 0,05

Таблиця 2. Частота розподілу тяжкості БА за різного характеру запалення бронхів та алельного поліморфізму гена *eNOS*

Клінічні групи	Кількість хворих, n	Розподіл генотипів <i>eNOS</i>					
		GG			GT/TT		
		Легка БА	Середньо-тяжка БА	Тяжка БА	Легка БА	Середньо-тяжка БА	Тяжка БА
Еозинофільний субтип	22	–	33,3	66,7	10,8	32,4	56,8
Пауцигранулоцитарний субтип	15	–	33,3	66,7	7,14	50,0	42,9
P			> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Отримані дані в цілому збігаються з думкою F.L. Ricciardolo [15] про те, що алельний поліморфізм гена *eNOS* є фактором схильності до БА, проте суттєво не впливає на тяжкість її перебігу.

Водночас слід відмітити, що за наявності алельного поліморфізму гена *eNOS* у дітей із пауцигранулоцитарним характером запалення бронхів частіше визначалися супутні алергічні захворювання порівняно з групою порівняння за даного генотипу. Так, клінічні прояви atopічного дерматиту й алергічного риніту в дітей I клінічної групи за генотипу *GT/TT* визначалися в 11,1 % спостережень, а у хворих групи порівняння з указаним генотипом — відповідно у 21,4 та 28,6 % випадків.

Поряд із частішим виявленням у хворих із ПХЗ бронхів та при генотипі *GT/TT* супутніх алергічних захворювань у них траплялися виразніші ознаки неспецифічної гіперреактивності бронхів, atopічної реактивності організму при зменшенні вмісту метаболітів монооксиду нітрогену у видихуваному повітрі. Так, у даних хворих індекс лабільності бронхів становив у середньому 46,7 %, середній вміст у сироватці крові загального імуноглобуліну E — 766,0 МО/мл, а концентрація метаболітів NO в конденсаті повітря, що видихається, — 22,6 мкмоль/мл. У дітей з ЕХЗ бронхів за даного алельного поліморфізму гена *eNOS* ці показники відповідно становили 16,8 % ( $P < 0,05$ ), 550,2 МО/мл ( $P > 0,05$ ) та 39,2 мкмоль/мл ( $P < 0,05$ ).

Розглядаючи зниження вмісту метаболітів монооксиду нітрогену в повітрі, що видихається, як непрямий показник функціонального стану *eNOS*, можна зробити висновок про те, що наявність алельного поліморфізму даного гена сприяє розвитку алергічного запалення та формуванню гіперреактивності бронхів, що узгоджується в цілому з результатами, отриманими іншими дослідниками [7, 8].

Таким чином, наведені результати з вивчення особливостей перебігу БА за алельного поліморфізму гена *eNOS* у дітей та різного характеру запального процесу в бронхах дають підстави вважати, що такі характерні особливості захворювання, як гіперреактивність бронхів, atopічна реактивність організму та вираженість місцевого запального процесу (за даними вмісту метаболітів монооксиду нітрогену в конденсаті повітря, що видихається), визначаються як мутаціями гену *eNOS*, так і характером запальних змін у дихальних шляхах.

## Висновки

1. Алельний поліморфізм гена *eNOS* у вигляді генотипу *GT/TT* відмічено у хворих на бронхіальну астму з еозинофільним характером запалення бронхів у 59,1 % випадків, а при пауцигранулоцитарному субтипі запалення — у 40,0 % спостережень.

2. Тяжкість бронхіальної астми у хворих з еозинофільного та пауцигранулоцитарного варіантів запалення бронхів суттєво не залежить від алельного поліморфізму гена *eNOS*.

3. При алельному поліморфізмі гена *eNOS* у дітей із пауцигранулоцитарним характером запалення бронхів частіше відмічені прояви atopічної реактивності організму, ніж за еозинофільного субтипу запалення. Зокрема, вдвічі більшою є частота супутніх алергічних захворювань, а вміст загального IgE у сироватці крові становить 766,0 проти 550,2 МО/мл у групі порівняння.

4. У дітей за алельного поліморфізму гена *eNOS* при пауцигранулоцитарному варіанті запалення бронхів індекс лабільності бронхів є суттєво вищим, ніж за алергічного характеру запальних змін (46,7 проти 16,8 %), а вміст у конденсаті видихуваного повітря метаболітів монооксиду нітрогену — вірогідно меншим (22,6 проти 39,2 мкмоль/мл).

## Список літератури

1. Pedersen S.F. Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger / S.E. Pederson, S.S. Hurd, R.F. Lemanske [et al.] // *Pediatr. Pulmonol.* — 2011. — Vol. 46(1). — P. 1-17.
2. Bacharier L.B. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report / L.B. Bacharier, A. Boner, K.H. Carlsen et al.] // *Allergy.* — 2008. — Vol. 63(1). — P. 5-34.
3. Бабаджан Н.Д. Імуно-патогенетичні діагностичні аспекти запальних фенотипів бронхіальної астми / Н.Д. Бабаджан, Л.В. Кузнецова, Г.І. Назаренко, І.А. Асика // *Імунологія та алергологія: наука і практика.* — 2011. — № 3. — С. 51-60.
4. Simpson J.L. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum / J.L. Simpson, R. Scott, M.J. Boyle, P.G. Gibson // *Respirology.* — 2006. — Vol. 11(1). — P. 54-61.
5. Broeke R.L. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic in mice / R.T. Broeke, R. De Crom, R. Van Haperen [et al.] // *Respir. Res.* — 2006. — Vol. 7(1). — P. 54-61.
6. Yanamandra K. Novel allele of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in Caucasian asthmatics / K. Yanamandra, P.B. Boggs, T.F. Thurmon [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — Vol. 335(2). — P. 545-549.
7. Meurs H. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models / H. Meurs, R. Gosens, J. Zaagsma // *Eur. Respir. J.* — 2008. — Vol. 32(2). — P. 487-502.
8. Kabayashi K. The effect of overexpression of endothelial nitric oxide synthase on eosinophilic lung inflammation in a murine

model / K. Kabayashi, Y. Nishimura, T. Yamashita [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* — 2006. — Vol. 6(7). — P. 1040-1052.

9. Курбачева О.М. Современный подход к выбору терапии бронхиальной астмы: от понимания клинических фенотипов к практическим аспектам / О.М. Курбачева, К.С. Павлова, И.Е. Козулина // *РМЖ. Болезни дыхательных путей.* — 2013. — Т. 21, № 29. — С. 1452-1460.
10. Перцева Т.А. Диагностическая трактовка понятия «бронхиальная астма». Фенотипы и уровень контроля над заболеванием [Электронный ресурс] / Т.А. Перцева. — Режим доступа: <http://www.likar.info/biblioteka/50056/>
11. Емченко Н.Л. Универсальный метод определения нитратов в биосредах организма / Н.Л. Емченко, О.И. Цыганенко, Т.В. Ковальская // *Клиническая и лабораторная диагностика.* — 1994. — № 6. — С. 19-20.
12. Pavord I.D. The use of induced sputum to investigate airway inflammation / I.D. Pavord, M.M. Pizzichini, E. Pizzichini [et al.] // *Thorax.* — 1997. — Vol. 52(6). — P. 498-501.
13. Lex C. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility and inflammatory cell patterns / C. Lex, D.N.R. Rayne, A. Zacharasiewicz [et al.] // *Pediatr. Pulmonol.* — 2005. — Vol. 39(4). — P. 318-324.
14. Выделение ДНК из крови / Практическая молекулярная биология [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://molbiol.edu.ru/map.html>
15. Ricciardolo F.L. Multiple roles of nitric oxide in the airways / F.L. Ricciardolo // *Thorax.* — 2003. — Vol. 58(2). — P. 175-182.

Отримано 20.12.14 ■

Безруков Л.А., Колоскова А.К., Билоус Т.М., Богуцкая Н.К.  
Буковинский государственный медицинский университет  
МЗ Украины, кафедра педиатрии и детских инфекционных  
болезней, г. Черновцы

Bezrukov L.O., Koloskova O.K., Bilous T.M., Bohutska N.K.  
Bukovinian State Medical University of Ministry of Healthcare  
of Ukraine, Department of Pediatrics and Pediatric Infectious  
Diseases, Chernivtsi, Ukraine

#### АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *eNOS* У ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ПРИ ЭОЗИНОФИЛЬНОМ И ПАУЦИГРАНУЛОЦИТАРНОМ СУБТИПАХ ВОСПАЛЕНИЯ БРОНХОВ

#### ALLELIC POLYMORPHISM OF *eNOS* GENE IN CHILDREN WHO SUFFER FROM BRONCHIAL ASTHMA, WITH EOSINOPHILIC AND PAUCIGRANULOCYTIC SUBTYPES OF BRONCHIAL INFLAMMATION

**Резюме.** Целью работы было изучить влияние аллельного полиморфизма гена *eNOS*, кодирующего активность эндотелиальной NO-синтазы и синтез монооксида азота в дыхательных путях, на отдельные клинико-параклинические показатели бронхиальной астмы у детей школьного возраста с эозинофильным и пауцигранулоцитарным воспалительным фенотипом.

**Summary.** The objective of the research was to study the effect of allelic polymorphism of *eNOS* gene, encoding the activity of endothelial NO-synthase and synthesis of nitrogen monoxide in the airways, on some clinical and paraclinical parameters of bronchial asthma in school-age children with eosinophilic and paucigranulocytic inflammatory subtypes.

Обследовано 22 больных бронхиальной астмой с эозинофильным характером воспаления дыхательных путей и 15 пациентов — с пауцигранулоцитарным. Проведены иммунологические, спирометрические исследования, генотипирование эндотелиальной *NOS*.

We have examined 22 patients with bronchial asthma with eosinophilic nature of the airway inflammation and 15 patients — with paucigranulocytic one. The immunological, spirometric studies, genotyping of endothelial *NOS* were carried out.

Тяжесть бронхиальной астмы у больных с различным типом воспаления бронхов существенно не зависит от аллельного полиморфизма гена *eNOS*. Отсутствие мутаций гена *eNOS* в виде генотипа *GG* было характерным для больных с пауцигранулоцитарным характером воспаления бронхов, аллельный полиморфизм *GT/TT* — для детей с эозинофильным воспалением. При наличии аллельного полиморфизма гена *eNOS* с генотипом *GT/TT* у детей с пауцигранулоцитарным характером воспаления бронхов были характерными более частые клинические проявления атопического дерматита и аллергического ринита, больший индекс лабильности бронхов и более низкая концентрация метаболитов NO в конденсате выдыхаемого воздуха.

The severity of bronchial asthma in patients with different types of bronchial inflammation doesn't depend on allelic polymorphism of the *eNOS* gene. The absence of *eNOS* gene mutations as *GG* genotype was characteristic of patients with paucigranulocytic bronchial inflammation, allelic polymorphism *GT/TT* — of children with eosinophilic inflammation. In the presence of allelic polymorphism of *eNOS* gene as *GT/TT* genotype, children with paucigranulocytic bronchial inflammation were characterized by more frequent clinical manifestations of atopic dermatitis and allergic rhinitis, higher bronchial lability index and lower concentrations of NO metabolites in the exhaled breath condensate.

**Key words:** bronchial asthma, children, type of inflammation, *eNOS* genotype.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, дети, тип воспаления, генотип *eNOS*.