

Ассоциация полиморфизмов генов NO-синтаз и аргиназы, клинико-лабораторных и функциональных показателей с уровнем оксида азота в выдыхаемом воздухе у детей, больных бронхиальной астмой

Б.Ц. Батожаргалова¹, С.Э. Дьякова², Н.В. Петрова³, Ю.Л. Мизерницкий², Р.А. Зинченко^{3,4}

¹ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия;

²ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева»

ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия;

⁴ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья им. Н.А. Семашко», Москва, Россия

Association of polymorphisms of NO synthases and arginase genes, clinical, laboratory and functional indicators with the level of nitrogen oxide in exhaled air in children with bronchial asthma

B.T. Batozhargalova¹, S.E. Diakova², N.V. Petrova³, Yu.L. Mizernitsky², R.A. Zinchenko^{3,4}

¹The Morozov children's city hospital, Moscow, Russia;

²Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

³Bochkov Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russia;

⁴N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia

Представлены результаты исследования ассоциаций генов NO-синтаз и аргиназы у детей с бронхиальной астмой с клинико-лабораторными и функциональными показателями в зависимости от уровня оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO). Обследованы 107 детей с бронхиальной астмой, которых разделили на 2 группы в зависимости от уровня FeNO.

В группе больных с повышенным уровнем FeNO (≥ 20 ppb) установлен ряд ассоциаций: носительство аллелей и генотипов, содержащих короткие tandemные повторы S (9–11) гена *NOS1(AAT)n*, с ранним дебютом и тяжелым течением болезни, повышенным уровнем общего IgE в сыворотке крови; носительство аллелей и генотипов, содержащих длинные tandemные повторы L (12–16) гена *NOS2A(CCTTT)n*, со среднетяжелым течением болезни, с повышенным уровнем IgE; носительство аллеля *A гена *ARGII(rs3742879)* со среднетяжелым течением болезни; носительство аллеля *G и гетерозиготного генотипа *AG гена *ARGII(rs3742879)* с пониженным уровнем ОФВ₁/ФЖЕЛ; носительства аллелей L и сочетания генотипов SL и LL гена *NOS1(AAT)n* с повышенным уровнем эозинофилов в крови (эозинофилия); сочетание генотипов S/L+L/L гена *NOS1(AAT)n* с грибковой сенсibilизацией. Установлены корреляции между тяжестью заболевания и *NOS1(AAT)n*; возрастом манифестации заболевания и *NOS1(AAT)n*; ОФВ₁/ФЖЕЛ и *ARGII(rs3742879)*; обратная связь между эозинофилией в крови и *NOS1(AAT)n*.

В группе больных с низким уровнем FeNO (<20 ppb) также определен ряд ассоциаций: носительство аллелей и генотипов, содержащих короткие tandemные повторы S (9–11) гена *NOS1(AAT)n*, с грибковой сенсibilизацией; носительство аллелей и генотипов, содержащих длинные tandemные повторы L (12–16) гена *NOS2A(CCTTT)n*, с пониженным ОФВ₁ и ОФВ₁/ФЖЕЛ; носительство гомозиготного генотипа *GG гена *ARGII(rs3742879)* с эпидермальной сенсibilизацией. При пониженном уровне FeNO определена связь между степенью тяжести бронхиальной астмы и *NOS1(AAT)n*; степенью эффективности противовоспалительной базисной терапии и *NOS1(AAT)n*; грибковой сенсibilизацией и *NOS1(AAT)n*; обратная связь между ОФВ₁ и *NOS2(CCTTT)n*; ОФВ₁/ФЖЕЛ и *NOS2(CCTTT)n*.

Ключевые слова: дети, бронхиальная астма, FeNO, полиморфизмы генов *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2*.

Для цитирования: Батожаргалова Б.Ц., Дьякова С.Э., Петрова Н.В., Мизерницкий Ю.Л., Зинченко Р.А. Ассоциация полиморфизмов генов NO-синтаз и аргиназы, клинико-лабораторных и функциональных показателей с уровнем оксида азота в выдыхаемом воздухе у детей, больных бронхиальной астмой. Рос вестн перинатол и педиатр 2019; 64:(5): 55–68. DOI: 10.21508/1027–4065–2019–64–5–55–68

The article presents the results of a study of the associations of NO synthase and arginase genes in children with bronchial asthma with clinical, laboratory and functional parameters depending on the level of nitrogen oxide in exhaled air (FeNO). We examined 107 children with bronchial asthma, they were divided into 2 groups depending on the level of FeNO.

We found a number of associations in the group of patients with an elevated level of FeNO (≥ 20 ppb): carriage of alleles and genotypes containing short tandem repeats of S (9–11) *NOS1(AAT)n* gene, with an early debut and severe course of the disease, an increased level of total IgE in blood serum; carriage of alleles and genotypes containing long tandem repeats L (12–16) of the *NOS2A(CCTTT)n* gene, with a moderate course of the disease, with an increased level of IgE; carriage of the allele *A of the *ARGII* gene (rs3742879) with a moderate course of the disease; carriage of the *G allele and heterozygous *AG genotype of the *ARGII* gene (rs3742879) with a decreased level of FEV₁/FVC; carriage of L alleles and a combination of the SL and LL genotypes of the *NOS1(AAT)n* gene with elevated blood eosinophils (eosinophilia); a combination of S/L + L/L genotypes of the *NOS1(AAT)n* gene with fungal sensitization. The authors established the correlations between disease severity and *NOS1(AAT)n*; the age of the manifestation of the disease and *NOS1(AAT)n*; FEV₁/FVC and *ARGII* (rs3742879); feedback between blood eosinophilia and *NOS1(AAT)n*.

The authors also determined a number of associations in the group of patients with low level of FeNO (<20 ppb): carriage of alleles and genotypes containing short tandem repeats of S (9–11) gene *NOS1(AAT)n*, with fungal sensitization; carriage of alleles and genotypes containing long tandem repeats of L (12–16) gene *NOS2A(CCTTT)n*, with reduced FEV₁ and FEV₁/FVC; carriage of the homozygous genotype of *GG gene *ARGII(rs3742879)* with epidermal sensitization. With a reduced level of FeNO, the study

determined a relationship between the severity of bronchial asthma and NOS1(AAT)n; degree of effectiveness of anti-inflammatory basic therapy and NOS1(AAT)n; fungal sensitization and NOS1(AAT)n; feedback between FEV1 and NOS2(CCTTT)n; FEV1/FVC and NOS2(CCTTT)n.

Key words: children, bronchial asthma, FeNO, polymorphisms of genes NOS1, NOS2, NOS3, ARG1, ARG2.

For citation: Batozhargalova B.T., Diakova S.E., Petrova N.V., Mizernitsky Yu.L., Zinchenko R.A. Association of polymorphisms of NO synthases and arginase genes, clinical, laboratory and functional indicators with the level of nitrogen oxide in exhaled air in children with bronchial asthma. *Ros Vestn Perinatol i Peditri* 2019; 64:(5): 55–68 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-5-55-68

Определение уровня оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) общепризнано в качестве неинвазивного теста для выявления аллергического воспаления дыхательных путей [1]. Уровень FeNO значительно повышается у детей и взрослых с эозинофильным воспалением дыхательных путей, текущей бронхиальной астмой [1–5]. В то же время у ряда пациентов с бронхиальной астмой повышенный уровень FeNO не определяется [1, 6].

В литературе нам встретилось лишь несколько работ, выявивших ту или иную ассоциацию уровня FeNO с генами оксида азота и аргиназы [6–10]. Однако есть все основания полагать, что исследование у детей с бронхиальной астмой полиморфизма генов ферментов, синтезирующих из L-аргинина оксид азота II (NO), позволит верифицировать аллели и генотипы, определяющие различные особенности течения этого заболевания в зависимости от уровня FeNO.

Цель исследования: сравнительный анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2*, клинико-лабораторных и функциональных показателей у детей, больных бронхиальной астмой, с различным уровнем оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO).

Характеристика детей и методы исследования

Обследовали 107 детей с бронхиальной астмой, проживающих в Москве, госпитализированных в отделение пульмонологии НИКИ педиатрии им. акад.

© Коллектив авторов, 2019

Адрес для корреспонденции: Батожаргалова Баирма Цыдендамбаевна – д.м.н., врач-пульмонолог Морозовской детской городской клинической больницы, ORCID: 0000-0001-8804-2122

119049 Москва, 4-й Добрынинский переулок д. 1/9

Мизерницкий Юрий Леонидович – д.м.н., проф., зав. отделом хронических воспалительных и аллергических болезней легких Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, рук. Детского научно-практического пульмонологического центра Минздрава РФ, ORCID: 0000-0002-0740-1718
e-mail: yulmiz@mail.ru

Дьякова Светлана Эвальдовна – к.м.н., вед. науч. сотр. отделения хронических воспалительных и аллергических болезней легких Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-3445-4903

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

Петрова Ника Валентиновна – д.м.н., вед. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии Медико-генетического научного центра, ORCID: 0000-0001-5933-6594

Зинченко Рена Абульфазовна – д.м.н., проф., зам. директора по научно-клинической работе, зав. лабораторией генетической эпидемиологии Медико-генетического научного центра, гл. науч. сотр. Национального НИИ общественного здоровья им. Н.А. Семашко, ORCID: 0000-0003-3586-3458

115522 Москва, ул. Москворечье, д. 1

Ю.Е. Вельтищева. Исследование одобрено этическим комитетом и выполнено при информированном согласии детей, подростков и их родителей. Диагноз верифицировали в соответствии с критериями Национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2017). Средний возраст обследованных детей составил 12,1±3,1 года.

Больных бронхиальной астмой разделили на 2 группы, исходя из уровня FeNO в выдыхаемом воздухе: 1-я группа – 62 (57,9%) ребенка с FeNO ≥20 ppb (20,5±187 ppb), из них у 48 больных уровень FeNO более 35 ppb; 2-я группа – 45 (42,1%) больных с FeNO <20 ppb (0,7–19,5 ppb). В среднем уровень FeNO в выдыхаемом воздухе в 1-й группе составил 66,1±34,8 ppb, во 2-й – 8,3±5,1 ppb; $p=0,0000001$ (табл. 1). Уровень FeNO определяли с помощью хемилюминесцентного анализатора NOBreath. Распределение детей по уровню FeNO проводили до начала терапии ингаляционными глюкокортикостероидами (в группе с пониженным FeNO) в соответствии с рекомендациями Американского торакального общества [3].

Проведен сравнительный анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов-кандидатов у больных бронхиальной астмой в зависимости от следующих факторов (см. табл. 1):

- клинических особенностей: степень тяжести бронхиальной астмы, возраст дебюта заболевания, объем необходимой базисной терапии;
- функциональных параметров: данные спирометрии (ОФВ₁* ОФВ₁/ФЖЕЛ**);
- лабораторных параметров: уровень эозинофилов в крови, общего IgE и специфических IgE к респираторным аллергенам (клещи *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*; эпидермис таракана; пыльца ольхи, березы, лещины, дуба; смесь луговых трав, ржи, полыни, подорожника; эпителий и шерсть кошки, собаки, лошади, морской свинки, хомячка, кролика; грибы *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*).

Молекулярно-генетические исследования выполнены в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ». Материалом исследования являлась ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Полимеразную цепную

* ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1-ю секунду.

** ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких.

Таблица 1. Характеристика обследованных больных бронхиальной астмой в зависимости от уровня FeNO
Table 1. Characteristics of the examined patients with bronchial asthma depending on the level of FeNO

Параметр	Уровень FeNO, ppb		p
	>20	<20	
Число больных	62 (57,9%)	45 (42,1%)	0,029
FeNO, ppb (M±m)	66,1±34,8	8,3±5,1	0,0000001
min–max	20,5–187	0,7–19,5	
<i>По степени тяжести</i>			
легкая	14 (22,6%)	4 (8,9%)	>0,05
среднетяжелая	16 (25,8%)	14 (31,1%)	>0,05
тяжелая	32 (51,6%)	27 (60,0%)	>0,05
<i>Манифестация заболевания</i>			
ранняя, до 5 лет	45 (72,6%)	32 (71,1%)	>0,05
поздняя, после 5 лет	17 (27,4%)	13 (28,9%)	
в среднем, годы	3,69±2,99	3,33±2,32	0,08
<i>Проводимая базисная противовоспалительная терапия</i>			
без лечения	19 (30,6%)	4 (8,9%)	0,014
ИГКС	43 (69,4%)	41 (91,1%)	
<i>из них</i>			
монотерапия	6	7	
комбинированная	26	25	
таргетная терапия (омализумаб + комбинированные ИГКС с β ₂ -агонистами ДД)	11	9	
<i>Показатели функции внешнего дыхания</i>			
ЖЕЛ, %	89,58±13,23	89,06±10,94	>0,05
ФЖЕЛ, %	86,47±12,32	87,64±9,73	>0,05
ОФВ ₁ , %	86,89±17,67	86,49±16,67	>0,05
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %	81,11±11,01	80,22±10,99	>0,05
ПСВ, %	87,76±18,83	82,18±18,29	>0,05
МОС ₂₅ , %	80,32±23,75	74,58±23,59	>0,05
МОС ₅₀ , %	72,47±27,43	69,36±27,02	>0,05
МОС ₇₅ , %	68,63±32,07	61,71±30,67	>0,05
МОС _{25/75} , %	72,02±26,52	67,51±26,28	>0,05
ОФВ ₁ менее 80%	17 (27,4%)	12 (26,7%)	>0,05
ОФВ ₁ более 80%	45 (72,6%)	33 (73,3%)	
<i>Эозинофилия</i>			
более 5%	46 (74,2%)	15 (33,3%)	0,006
менее 5%	16 (25,8%)	30 (66,7%)	
в среднем, %	6,8±3,4	4,4±4,0	0,001
<i>Общий IgE в крови</i>			
более 100 МЕ	59 (95,2%)	28 (62,2%)	0,00006
менее 100 МЕ	3 (4,8%)	17 (37,8%)	
в среднем	637,7±426,7	344,2±372,6	0,0003
<i>Сенсибилизация</i>			
выявлена/нет	59/1	28/13	

Примечание. FeNO – уровень выдыхаемого оксида азота; ИГКС – ингаляционные глюкокортикостероиды; ДД – (препараты) длительного действия; ЖЕЛ – жизненная емкость легких; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких; ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1-ю секунду; ПСВ – пиковая скорость выдоха; МОС – максимальная объемная скорость (выдоха); МОС₅₀ – МОС выдоха на уровне 50% ФЖЕЛ; МОС₂₅ – МОС выдоха на уровне 25% ФЖЕЛ, МОС_{25–75} – средняя МОС выдоха на уровне 25–75% ФЖЕЛ.

Note. FeNO – level of exhaled nitric oxide; ИГКС – inhaled glucocorticosteroids; ДД – (drugs) long-acting; ФЖЕЛ – vital capacity of the lungs; FZHEL – forced vital capacity of the lungs; ОФВ₁ – forced expiratory volume in 1 second; ПСВ – peak expiratory flow rate; МОС – maximum space velocity (expiration); МОС₅₀ – МОС of exhalation at the level of 50% ФЖЕЛ; МОС₂₅ – МОС of exhalation at the level of 25% ФЖЕЛ, МОС_{25–75} – average МОС of exhalation at the level of 25–75% ФЖЕЛ.

реакцию (ПЦР) ДНК проводили на амплификаторе фирмы «ДНК-технология» (Россия). Для определения нуклеотидных замен осуществляли гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующими рестриктазами. Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции выполняли при помощи электрофореза в 8% полиакриламидном геле («Helicon»). Идентификацию фрагментов ДНК проводили с помощью окрашивания геля раствором бромистого этидия (5 мкг/л) с последующей визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете и использованием системы фотодокументации Vilber Lourmat (Франция). Изучение полиморфизма генов осуществляли методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием праймеров для генотипирования:

NOS1 (ATT)_n F5'-CTGGGGGCAATGGTGTGT-3'
и R5'-GAGTAAAATTAAGGGTCAGC-3';

NOS2 (CCTTT)_n
F5'-ACCCCTGGAAGCCTACAACCTGCAT-3'
и R5'-GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA-3';

NOS3 (VNTR)
F5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3'
и R5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3';

ARG1 (rs2781667)
F5'-AAGGATTTTAAATGGATTTATGAAGC-3'
и R5'-CAAATGCAGTTTGGGCCTCT-3';

ARG2 (rs3742879)
F5'-GCCACTTCTCTGCCTGACA-3'
и R5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'.

Для каждого из изучаемых ДНК-маркеров проводили оценку соответствия распределения генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди–Вайнберга. В целях сравнения распределений частот аллелей и генотипов в выборках больных использовали критерий χ^2 . Силу ассоциаций оценивали по отношению шансов (odds ratio – OR) с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Для расчетов использовали программу «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях случай–контроль» (http://test.tapotili.ru/calculator_or.php), Statistica 7. Оценку взаимосвязи между исследуемыми показателями выполняли методом ранговой корреляции по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе мы определили наличие ассоциаций исследуемых генов *NOS1*(AAT)_n, *NOS2*(CCTTT)_n, *NOS3*(VNTR), *ARG1*(rs2781667), *ARG2*(rs3742879) с уровнем FeNO в выдыхаемом воздухе у больных бронхиальной астмой. Повышенный уровень FeNO ≥ 20 ppb у больных был ассоциирован с аллелями (0,758 и 0,578; $p=0,005$; OR 2,29, 95% ДИ 1,3–4,1) и генотипами (0,613 и 0,311; $p=0,008$; OR 3,51, 95% ДИ 1,6–7,9), содержащими короткие tandemные

повторы S и SS соответственно гена *NOS1*(AAT)_n ($n=9-11$). При рассмотрении каждого аллеля и генотипа гена *NOS1*(AAT)_n в отдельности у больных была выявлена статистически значимая ассоциация с повышенным уровнем FeNO (≥ 20 ppb) аллеля *10 (0,710 и 0,511; $p=0,003$; OR 2,34, 95% ДИ 1,3–4,1) и генотипа *10/*10 (0,548 и 0,244; $p=0,002$; OR 3,75, 95% ДИ 1,6–8,7). Напротив, у больных бронхиальной астмой аллель *12 гена *NOS1*(AAT)_n был ассоциирован с пониженным уровнем FeNO < 20 ppb (0,222 против 0,081; $p=0,003$; OR =3,26, 95% ДИ 1,4–7,4) (табл. 2).

Нами установлена ассоциация аллелей и генотипов, содержащих «длинные» tandemные повторы L гена *NOS2A* (CCTTT)_n ($n=12-16$) у больных бронхиальной астмой с повышенным уровнем FeNO в выдыхаемом воздухе ≥ 20 ppb (частота аллелей L гена *NOS2A* 0,750 в сравнении с короткими аллелями S 0,589; $p=0,01$; OR 2,09, 95% ДИ 1,2–3,8). Отношение шансов для носителей генотипа LL гена *NOS2A* (CCTTT)_n составило 2,35 (95% ДИ 1,1–5,2; $p=0,03$; см. табл. 2). В то же время у больных мы не выявили ассоциацию уровня FeNO с генами *NOS3*(VNTR), *ARG1* rs3742879, *ARG2* rs2781667 ($p > 0,05$).

Затем мы рассмотрели ассоциацию клинических особенностей бронхиальной астмы (степень тяжести, объем проводимой противовоспалительной базисной терапии, возраст дебюта заболевания) с исследуемыми генами *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2* в зависимости от уровня FeNO. По степени тяжести заболевания в зависимости от уровня FeNO больные не различались ($p > 0,05$). У 84 (78,5%) подростков бронхиальная астма сочеталась с аллергическим ринитом, у 16 (15,0%) – с аллергическим ринитом в сочетании с atopическим дерматитом. Наследственный анамнез был отягощен по бронхиальной астме у 48 (44,9%) пациентов, по другим atopическим заболеваниям – у 18 (16,8%).

У больных тяжелой бронхиальной астмой нами определена ассоциация с повышенным уровнем FeNO (≥ 20 ppb) аллелей, содержащих короткие tandemные повторы S (9–11) гена *NOS1*(AAT)_n (0,844 и 0,648; $p=0,01$; OR 2,93, 95% ДИ 1,2–7,0) и генотипов SS (0,750 и 0,407; $p=0,03$; OR 4,36, 95% ДИ 1,4–13,2). Установлена более высокая частота аллеля *10 и гомозиготного генотипа *10/*10 гена *NOS1*(AAT)_n у больных тяжелой бронхиальной астмой с повышенным уровнем FeNO ($p=0,009$ и $p=0,014$ соответственно; табл. 3).

У больных бронхиальной астмой средней степени тяжести выявлена ассоциация повышенного уровня FeNO (≥ 20 ppb) с аллелями и генотипами, содержащими длинные tandemные повторы L (12–16) гена *NOS2A*(CCTTT)_n (0,844 и 0,607; $p=0,04$; OR 3,49, 95% ДИ 1,03–11,8) и аллелем *A полиморфизма rs3742879 гена *ARG2* (0,688 и 0,429; $p=0,04$; OR 2,93, 95% ДИ 1,02–8,5; см. табл. 3).

Таблица 2. Ассоциация частот аллелей и генотипов генов *NOS1*(AAT)n, *NOS2A*(CCTTT)n с уровнем FeNO и ОФВ1 у детей, больных бронхиальной астмой

Table 2. Association of frequencies of alleles and genotypes of *NOS1*(AAT)n, *NOS2A*(CCTTT)n genes with the level of FeNO and FEV1 in children with bronchial asthma

Аллели, генотипы n (%)	NO >20 ppb (n=62)	NO <20 ppb (n=45)	χ^2 p	OR (95% ДИ)
Ассоциация генов <i>NOS1</i>(AAT)n, <i>NOS2A</i>(CCTTT)n с уровнем FeNO				
<i>NOS1</i>(AAT)n				
Аллели	n=124	n=90		
S 9–11 повторов	94 (0,758)	52 (0,578)	7,82	2,29 (1,3–4,1)
L 12–15 повторов	30 (0,242)	38 (0,422)	p=0,005	0,44 (0,2–0,8)
*10	88 (0,710)	46 (0,511)	8,78 p=0,003	2,34 (1,3–4,1)
*12	10 (0,081)	20 (0,222)	8,67 p=0,003	3,26 (1,4–7,4)
Генотипы	n=62	n=45		
SS	38 (0,613)	14 (0,311)		3,51 (1,6–7,9)
SL	18 (0,290)	24 (0,533)	9,55 p=0,008	0,36 (0,2–0,8)
LL	6 (0,097)	7 (0,156)		0,58 (0,2–1,9)
*10/*10	34 (0,548)	11 (0,244)	9,89 p=0,002	3,75 (1,6–8,7)
HWE (χ^2 ; p)	2,7; p>0,05	0,39; p>0,05		
<i>NOS2A</i>(CCTTT)n				
Аллели	n=124	n=90		
S 9–11 повторов	31 (0,250)	37 (0,411)	6,24	0,48 (0,3–0,9)
L 12–16 повторов	93 (0,750)	53 (0,589)	p=0,01	2,09 (1,2–3,8)
Генотипы	n=62	n=45		
SS+ SL	27 (0,435)	29 (0,644)	4,56	0,43 (0,2–0,9)
LL	35 (0,565)	16 (0,356)	p=0,03	2,35 (1,1–5,2)
HWE (χ^2 ; p)	0,01; p>0,05	0,06; p>0,05		
Ассоциация гена <i>ARG11</i> (rs3742879)n с ОФВ1/ФЖЕЛ при повышенном уровне FeNO (<20 ppb)				
<i>ARG11</i> (rs3742879)				
Аллели	n=46	n=78		
A	23 (0,500)	56 (0,718)	5,94	0,39 (0,18–0,8)
G	23 (0,500)	22 (0,282)	p=0,01	2,55 (1,2–5,4)
Генотипы	n=23	n=39		
AA	4 (0,174)	22 (0,564)		0,16 (0,05–0,6)
AG	15 (0,652)	12 (0,308)	9,40 p=0,009	4,22 (1,4–12,6)
GG	4 (0,174)	5 (0,128)		1,43 (0,34–6,0)
HWE (χ^2 ; p)	2,13; p>0,05	2,25; p>0,05		
Ассоциация гена <i>NOS2A</i>(CCTTT)n с ОФВ1, ОФВ1/ФЖЕЛ при пониженном уровне FeNO (<20 ppb)				
<i>NOS2A</i>(CCTTT)n				
	ОФВ1 <81%	ОФВ1 >81%		
Аллели	n=30	n=60		
S 9–11 повторов	5 (0,167)	32 (0,533)	11,11	0,18 (0,06–0,5)
L 12–16 повторов	25 (0,833)	28 (0,467)	p=0,0009	5,71 (1,9–16,9)

Окончание таблицы 2.

*11	2 (0,067)	19 (0,317)	$p=0,006$	0,16 (0,02–0,6)
*13	9 (0,300)	7 (0,117)	$p=0,034$	3,20 (1,04–10,2)
Генотипы	$n=15$	$n=30$		
SS	1 (0,067)	7 (0,233)	$14,02$ $p=0,0009$	0,23 (0,03–2,1)
SL	3 (0,200)	18 (0,600)		0,17 (0,04–0,7)
LL	11 (0,733)	5 (0,167)		13,75 (3,1–61,2)
HWE (χ^2 , p)	1,18; $p>0,05$	1,27; $p>0,05$		
<i>NOS2A(CCTTT)n</i>				
	ОФВ ₁ /ФЖЕЛ <80%			
Аллели	$n=48$	$n=42$		
S 9–11 повторов	14 (0,292)	23 (0,548)	6,06	0,34 (0,14–0,8)
L 12–16 повторов	34 (0,708)	19 (0,452)	$p=0,01$	2,94 (1,2–7,0)
*11	7 (0,146)	14 (0,333)	$p=0,032$	0,35 (0,12–0,96)
*13	13 (0,271)	3 (0,071)	$p=0,012$	4,75 (1,32–22,3)
Генотипы	$n=24$	$n=21$		
SS+ SL	12 (0,500)	17 (0,810)	4,68	0,24 (0,06–0,9)
LL	12 (0,500)	4 (0,190)	$p=0,03$	4,25 (1,1–16,4)
HWE (χ^2 ; p)	0,00; $p>0,05$	0,07; $p>0,05$		

Примечание. FeNO – уровень выдыхаемого оксида азота; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких; ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1-ю секунду; HWE – равновесие Харди–Вайнберга; OR – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.
Note. FeNO – level of exhaled nitric oxide; ФЖЕЛ – forced vital capacity of the lungs; ОФВ₁ – forced expiratory volume in 1st second; HWE – Hardy–Weinberg equilibrium; OR – odds ratio; ДИ – confidence interval

На момент включения в исследование базисную противовоспалительную терапию ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) получали 84 больных, из них комбинированные ИГКС с β_2 -агонистами длительного действия – 51, монотерапию ИГКС – 13; 20 больным с тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой назначена V степень лечения – сочетание комбинированных ИГКС и β_2 -агонистов длительного действия с омализумабом (таргетная терапия); не получали базисную терапию ИГКС до госпитализации 23 больных. В зависимости от уровня FeNO в выдыхаемом воздухе и базисной терапии пациентов разделили следующим образом: с пониженным FeNO – 41 (91,1%) больной и с повышенным уровнем FeNO – 43 (69,4%) больных ($p=0,014$).

Статистически значимых ассоциаций исследуемых генов *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2* с проводимой базисной противовоспалительной терапией ИГКС у больных с разным уровнем FeNO не установлено. У больных с пониженным уровнем FeNO определена тенденция к ассоциации проводимой базисной терапии с аллелями, содержащими короткие tandemные повторы S гена *NOS1(AAT)n* (0,610 и 0,250; $p=0,05$).

Бронхиальная астма манифестировала в возрасте младше 5 лет у 77 (72%) больных (до 1 года – у 2 больных; с 1 года до 2 лет – у 27), что чаще, чем в возрасте старше 5 лет, – у 30 (28%) больных; $p<0,0000001$.

В среднем возраст появления первых симптомов составил $3,5\pm 2,7$ года. По возрасту манифестации заболевания больные с различным уровнем FeNO статистически значимо не различались.

Раннее начало бронхиальной астмы до 5 лет у детей с повышенным уровнем FeNO (<20 ppb) было ассоциировано с «короткими» аллелями и генотипами гена *NOS1(AAT)n* (частота аллелей S 0,833 и 0,559; $p=0,001$; OR 3,95; 95% ДИ 1,7–9,5). Отношение шансов для носителей генотипа SS гена *NOS1(AAT)n* составило 6,6 (95% ДИ 1,9–22,7; $p=0,007$). У больных с повышенным уровнем FeNO выявлена более высокая частота ассоциации аллеля *10 и генотипа *10/*10 гена *NOS1* с ранним дебютом бронхиальной астмы по сравнению с поздним (0,789 против 0,500; $p=0,003$; OR 3,74, 95% ДИ 1,6–8,7) и (0,667 против 0,235; $p=0,006$; OR 6,5, 95% ДИ 1,8–23,4) соответственно. Гетерозиготный генотип *10/*12 гена *NOS1(AAT)n* чаще определялся у больных с поздним дебютом бронхиальной астмы (0,294 против 0,022; $p=0,006$; см. табл. 3).

Следующим этапом мы определили ассоциацию частот исследуемых генов с ОФВ₁ и ОФВ₁/ФЖЕЛ по данным спирометрии. При исследовании функции внешнего дыхания не выявлено достоверных различий в двух исследуемых группах в зависимости от уровня FeNO ($p>0,05$). Проба с бронхолитиком выполнена у 76 больных, из них положительная опре-

Таблица 3. Ассоциация частот аллелей и генотипов гена *NOS1A*(AAT)n, *NOS2A*(CCTTT)n и *ARG11* (rs3742879) со степенью тяжести бронхиальной астмы, возрастом ее манифестации и уровнем FeNO

Table 3. Association of allele frequencies and genotypes of the *NOS1A* (AAT) n, *NOS2A* (CCTTT) n and *ARG11* (rs3742879) gene with the severity of bronchial asthma, the age of its manifestation and the level of FeNO

Аллели, генотипы n (%)	NO >20 ppb	NO <20 ppb	χ^2 p	OR (95% ДИ)
Тяжелая бронхиальная астма				
<i>NOS1A</i> (AAT)n				
Аллели	n=64	n=54		
S 9–11 повторов	54 (0,844)	35 (0,648)	6,05	2,93 (1,2–7,0)
L 12–15 повторов	10 (0,156)	19 (0,352)	p=0,01	0,34 (0,1–0,8)
*10	51 (0,797)	30 (0,556)	6,84 p=0,009	3,13 (1,4–7,1)
Генотипы	n=32	n=27		
SS	24 (0,750)	11 (0,407)	7,24 p=0,03	4,36 (1,4–13,2)
SL	6 (0,188)	13 (0,481)		0,25 (0,08–0,8)
LL	2 (0,063)	3 (0,111)		0,53 (0,08–3,5)
*10/*10	22 (0,688)	9 (0,333)	6,02 p=0,014	4,4 (1,5–13,2)
HWE (χ^2 ; p)	2,67; p>0,05	0,08; p>0,05		
Среднетяжелая бронхиальная астма				
<i>NOS2A</i> (CCTTT)n				
Аллели	n=32	n=28		
S 9–11 повторов	5 (0,156)	11 (0,393)	4,28	0,29 (0,08–0,97)
L 12–16 повторов	27 (0,844)	17 (0,607)	p=0,04	3,49 (1,03–11,8)
Генотипы	n=16	(n=14		
SS+ SL	4 (0,250)	9 (0,643)	4,69	0,19 (0,04–0,9)
LL	12 (0,750)	5 (0,357)	p=0,03	5,40 (1,1–26,1)
HWE (χ^2 ; p)	1,34; p>0,05	0,03; p>0,05		
<i>ARG11</i> (rs3742879)				
Аллели	n=32	n=28		
A	22 (0,688)	12 (0,429)	4,08	2,93 (1,02–8,5)
G	10 (0,313)	16 (0,571)	p=0,04	0,34 (0,1–0,98)
Генотипы	n=16	n=14		
AA	7 (0,438)	3 (0,214)	4,44 p>0,05	
AG	8 (0,500)	6 (0,429)		
GG	1 (0,063)	5 (0,357)		
HWE (χ^2 ; p)	0,43; p>0,05	0,22; p>0,05		
Ассоциация гена <i>NOS1A</i>(AAT)n с повышенным уровнем FeNO (NO >20 ppb) и возрастом манифестации бронхиальной астмы				
<i>NOS1A</i> (AAT)n				
Аллели, генотипы n (%)	Возраст манифестации, годы		χ^2 p	OR (95% ДИ)
	младше 5 n=45	старше 5 n=17		
Аллели	n=90	n=34		
S 9–11 повторов	75 (0,833)	19 (0,559)	10,14	3,95 (1,7–9,5)
L 12–15 повторов	15 (0,167)	15 (0,441)	p=0,001	0,25 (0,1–0,6)

Окончание таблицы 3.

*10	71 (0,789)	17 (0,500)	8,64 $p=0,003$	3,74 (1,6–8,7)
Генотипы	$n=45$	$n=17$		
SS	33 (0,733)	5 (0,294)		6,60 (1,9–22,7)
SL	9 (0,167)	9 (0,529)	10,03 $p=0,007$	0,22 (0,07–0,7)
LL	3 (0,750)	3 (0,176)		0,33 (0,06–1,8)
*10/*10	30 (0,667)	4 (0,235)	7,61 $p=0,006$	6,50 (1,8–23,4)
*10/*12	1 (0,022)	5 (0,294)	7,56 $p=0,006$	18,33 (1,95–172,2)
HWE (χ^2 ; p)	3,53; $p>0,05$	0,09; $p>0,05$		

Примечание. FeNO – уровень выдыхаемого оксида азота; HWE – равновесие Харди–Вайнберга; OR – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Note. FeNO – level of exhaled nitric oxide; HWE – Hardy–Weinberg equilibrium; OR – odds ratio; ДИ – confidence interval.

делена у 44, сомнительная – у 28, отрицательная – у 4. Проба с физической нагрузкой (бег на тредмилле) выполнена у 17 пациентов, из них положительная – у 8, сомнительная – у 1, отрицательная – у 8.

У детей с повышенным уровнем FeNO определена ассоциация показателя $ОФВ_1/ФЖЕЛ <80\%$ с аллелем *G гена *ARG11(rs3742879)* (0,500 против 0,282; $p=0,01$; OR 2,55, 95% ДИ 1,2–5,4) и гетерозиготным генотипом *AG гена *ARG11(rs3742879)* (0,652 против 0,308; $p=0,009$; OR 4,2, 95% ДИ 1,4–12,6) соответственно (см. табл. 2).

У больных бронхиальной астмой с низким уровнем FeNO нами установлена ассоциация $ОФВ_1 <81\%$ с частотой аллелей L с «длинными» tandemными повторами гена *NOS2A(CCTTT)n* (0,833 и 0,467; $p=0,0009$; OR 5,0, 95% ДИ 1,9–16,9) и генотипов, содержащих длинные tandemные повторы L гена *NOS2A(CCTTT)n* (0,733 и 0,167; $p=0,0009$; OR 13,75, 95% ДИ 3,1–61,2), и аллелем *13 ($p=0,034$); а также $ОФВ_1/ФЖЕЛ <80\%$ с аллелями L и генотипами, содержащими «длинные» tandemные повторы гена *NOS2A(CCTTT)n* (0,708 против 0,452; $p=0,01$; OR 2,94, 95% ДИ 1,2–7,0) и (0,500 против 0,190; $p=0,03$; OR 4,25, 95% ДИ 1,1–16,4), и аллелем *13 ($p=0,012$) соответственно (см. табл. 2).

После этого мы определили ассоциации исследуемых генов с лабораторными показателями (уровнем эозинофилов и общего IgE в крови, наличием сенсibilизации). В общем анализе крови наблюдалась эозинофилия 5% и более у 61 (57%) больного бронхиальной астмой. Уровень IgE в крови более 100 МЕ/мл отмечен у 97 (90,7%) пациентов, из них более 1000 МЕ/мл – у 16. По результатам определения специфических IgE, выполненного у 101 больного бронхиальной астмой, изолированная бытовая сенсibilизация выявлена у 4, эпидермальная – у 11, пыльцевая – у 5, поливалентная сенсibilизация – у 66 (71,0%).

У больных с повышенным уровнем FeNO нами установлена ассоциация эозинофилии более 5% с аллелями, содержащими длинные tandemные

повторы LL (12–16) гена *NOS1(AAT)n* (0,304 и 0,063; $p=0,006$; OR 6,6, 95% ДИ 1,5–29,4); с сочетанием генотипов SL+LL, содержащих длинные tandemные повторы гена *NOS1(AAT)n* (0,478 и 0,125; $p=0,01$; OR 6,4, 95% ДИ 1,3–31,5). Аллель *10 гена *NOS1(AAT)n* (0,641 и 0,906; $p=0,009$; OR 0,19, 95% ДИ 0,05–0,7) и генотип *10/*10 гена *NOS1(AAT)n* (0,457 и 0,813; $p=0,01$, OR 0,19, 95% ДИ 0,05–0,8) ассоциировались с протективным эффектом и встречались чаще при нормальном уровне эозинофилов в крови (табл. 4).

У больных с повышенным содержанием IgE в крови нами определена ассоциация повышенного уровня FeNO более 20 ppb с генами *NOS1(AAT)n* и *NOS2A(CCTTT)n*. Так, частота аллелей, содержащих короткие tandemные повторы S гена *NOS1(AAT)n* у этих пациентов составила 0,746, что статистически значимо выше, чем у больных с уровнем FeNO менее 20 ppb (0,589; $p=0,04$; OR 2,04, 95% ДИ 1,04–4,0); частота генотипов SS гена *NOS1(AAT)n* также оказалась выше у больных с уровнем FeNO более 20 ppb (0,593 против 0,357; $p=0,04$; OR 2,63, 95% ДИ 1,03–6,7). Соответственно аллель *10 и генотип *10/*10 гена *NOS1(AAT)n* встречались чаще у пациентов с повышенным уровнем FeNO ($p=0,022$ и $p=0,042$; см. табл. 4).

У больных с повышенным содержанием IgE в крови нами определена ассоциация повышенного уровня FeNO с аллелями, содержащими длинные tandemные повторы L гена *NOS2A(CCTTT)n* (0,746 против 0,554; $p=0,01$; OR 2,37, 95% ДИ 1,2–4,6), и генотипами, содержащими длинные tandemные повторы LL гена *NOS2A(CCTTT)n* (0,559 против 0,321; $p=0,04$; OR 2,68, 95% ДИ 1,04–6,9), а также с частотой аллеля *12 ($p=0,036$). Аллель *11 встречался чаще у больных с пониженным FeNO ($p=0,038$; см. табл. 4).

Далее мы определили наличие достоверных ассоциаций грибковой и эпидермальной сенсibilизации у больных бронхиальной астмой. У пациентов с повышенным уровнем FeNO нами установлена

Таблица 4. Ассоциация частот аллелей и генотипов гена *NOS1*(AAT)n, *NOS2A*(CCTTT)n, *ARG11* (rs3742879) с уровнем эозинофилов и общего IgE в крови, с наличием грибковой и эпидермальной сенсибилизации и уровнем FeNO у больных бронхиальной астмой

Table 4. Association of allele frequencies and genotypes of the *NOS1*(AAT) n, *NOS2A*(CCTTT) n, *ARG11*(rs3742879) gene with the level of eosinophils in the blood, the level of total IgE in the blood, the presence of fungal and epidermal sensitization and the level of FeNO in patients with bronchial asthma

Аллели, генотипы n (%)	NO >20 ppb		χ^2 p	OR (95% ДИ)
	Содержание эозинофилов > 5% (n=46)	< 5% (n=16)		
Ассоциация частот аллелей и генотипов с уровнем эозинофилии при повышенном уровне FeNO				
<i>NOS1</i> (AAT)n				
Аллели	n=92	n=32		
S 9–11 повторов	64 (0,696)	30 (0,938)	7,57	0,15 (0,03–0,7)
L 12–15 повторов	28 (0,304)	2 (0,063)	p=0,006	6,56 (1,5–29,4)
*10	59 (0,641)	29 (0,906)	p=0,009	0,19 (0,05–0,7)
Генотипы	n=46	n=16		
SS	24 (0,522)	14 (0,875)	6,24	0,16 (0,03–0,8)
SL + LL	22 (0,478)	2 (0,125)	p=0,01	6,42 (1,3–31,5)
*10/*10	21 (0,457)	13 (0,813)	p=0,03	0,19 (0,05–0,8)
HWE (χ^2 ; p)	1,47; p>0,05	0,07; p>0,05		
Ассоциация частот аллелей и генотипов с уровнем FeNO при повышенном уровне общего IgE в крови				
Аллели, генотипы n (%)	Общий IgE более 100 МЕ/мл		χ p	OR (95% ДИ)
	FeNO >20 ppb	FeNO >20 ppb		
<i>NOS1</i> (AAT)n				
Аллели	n=118	n=56		
S 9–11 повторов	88 (0,746)	33 (0,589)	4,39	2,04 (1,04–4,0)
L 12–15 повторов	30 (0,254)	23 (0,411)	p=0,04	0,49 (0,25–0,96)
*10	84 (0,712)	30 (0,536)	p=0,022	2,13 (1,1–4,1)
Генотипы	n=59	n=28		
SS	35 (0,593)	10 (0,357)	4,24	2,63 (1,03–6,7)
SL + LL	24 (0,407)	18 (0,643)	p=0,04	0,38 (0,15–0,97)
*10/*10	32 (0,542)	8 (0,286)	p=0,042	2,93 (1,1–8,1)
HWE (χ^2 ; p)	2,25; p>0,05	0,05; p>0,05		
<i>NOS2A</i> (CCTTT)n				
Аллели	n=118	n=56		
S 9–11 повторов	30 (0,254)	25 (0,446)	6,49	0,42 (0,22–0,8)
L 12–16 повторов	88 (0,746)	31 (0,554)	p=0,01	2,37 (1,2–4,6)
*11	18 (0,152)	15 (0,268)	p=0,038	0,38(0,15–0,98)
*12	43 (0,364)	14 (0,250)	p=0,036	2,66 (1,03–6,93)
Генотипы	n=59	n=28		
SS + SL	26 (0,441)	19 (0,679)	4,30	0,37 (0,15–0,96)
LL	33 (0,559)	9 (0,321)	p=0,04	2,68 (1,04–6,9)
HWE (χ^2 ; p)	0,02; p>0,05	0,10; p>0,05		

Продолжение таблицы 4.

Ассоциации аллелей и генотипов с наличием грибковой и эпидермальной сенсibilизации у больных с повышенным уровнем FeNO				
Грибковая сенсibilизация				
NOS1(AAT)n				
	грибковая (+) (n=28)	грибковая (-) (n=32)	χ^2 p	OR (95% ДИ)
Аллели	n=56	n=64		
S 9–11 повторов	38 (0,679)	52 (0,813)	2,86	
L 12–15 повторов	18 (0,321)	12 (0,188)	p=0,09	
Генотипы	n=28	n=32		
SS	13 (0,464)	23 (0,719)	4,03	0,12 (0,1–0,99)
SL+LL	15 (0,536)	9 (0,281)	p=0,04	2,95 (1,01–8,6)
HWE (χ^2 , p)	0,01; p>0,05	4,73; p=0,03		
Эпидермальная сенсibilизация				
NOS2A(CCTTT)n				
	эпидермальная (+) (n=40)	эпидермальная (-) (n=20)		
Аллели	n=80	n=40		
S 9–11 повторов	17 (0,213)	12 (0,300)	1,11	
L 12–16 повторов	63 (0,788)	28 (0,700)	p>0,05	
Генотипы	(n=40)	(n=20)		
SS+ SL	13 (0,325)	12 (0,600)	4,15	0,32 (0,11–0,98)
LL	27 (0,675)	8 (0,400)	p=0,04	3,12 (1,02–9,5)
HWE (χ^2 , p)	4,30; p=0,04	3,67; p>0,05		
Ассоциации аллелей и генов с наличием грибковой и эпидермальной сенсibilизации у больных с пониженным уровнем FeNO				
Грибковая				
NOS1(AAT)n				
	грибковая (+) (n=15)	грибковая (-) (n=26)	χ^2 p	OR (95% ДИ)
Аллели	n=30	n=52		
S 9–11 повторов	22 (0,733)	24 (0,462)	5,71	3,21 (1,2–8,5)
L 12–15 повторов	8 (0,267)	28 (0,538)	p=0,02	0,31 (0,12–0,8)
*10	20 (0,667)	20 (0,385)	p=0,026	3,15(1,2–8,4)
Генотипы	n=15	n=26		
SS	9 (0,600)	3 (0,115)	10,79	11,50 (2,4–56,2)
SL+ LL	6 (0,400)	15 (0,885)	p=0,001	0,09 (0,02–0,42)
HWE (χ^2 ; p)	1,52; p>0,05	4,01; p=0,05		
Эпидермальная				
ARG11 (rs3742879)				
	эпидермальная (+) (n=14)	эпидермальная (-) (n=27)		
Аллели	n=28	n=54		

Окончание таблицы 4.

A	13 (0,464)	27 (0,667)	3,14	
G	15 (0,536)	11 (0,333)	$p=0,08$	
Генотипы	$n=14$	$n=27$		
AA+AG	9 (0,643)	25 (0,926)	5,22	0,14 (0,02–0,88)
GG	5 (0,357)	2 (0,074)	$p=0,02$	6,94 (1,1–42,4)
HWE (χ^2 ; p)	1,11; $p>0,05$	0,75; $p>0,05$		

Примечание. Примечание. FeNO – уровень выдыхаемого оксида азота; HWE – равновесие Харди–Вайнберга; OR – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Note. FeNO – level of exhaled nitric oxide; HWE – Hardy–Weinberg equilibrium; OR – odds ratio; ДИ – confidence interval.

ассоциация генотипов S/L и L/L гена *NOS1*(AAT)n с наличием грибковой сенсibilизации (0,536 и 0,281; $p=0,04$; OR 2,95, 95% ДИ 1,01–8,6), а также аллелей, содержащих длинные tandemные повторы LL гена *NOS2A*(CCTTT)n, с наличием эпидермальной сенсibilизации (0,675 и 0,281; $p=0,04$; OR 3,12, 95% ДИ 1,02–9,5).

У больных бронхиальной астмой с пониженным FeNO нами определена ассоциация аллелей и генотипов, содержащих короткие tandemные повторы SS гена *NOS1*(AAT)n с наличием грибковой сенсibilизации (0,733 против 0,462; $p=0,02$; OR 3,21, 95% ДИ 1,21–8,51 и 0,600 против 0,115; $p=0,001$; OR 11,50, 95% ДИ 2,4–56,2 соответственно); при этом также отмечена более высокая частота аллеля *10 гена *NOS1*(AAT)n ($p=0,026$). У них же выявлена ассоциация эпидермальной сенсibilизации и гомозиготного генотипа *GG полиморфизма rs3742879 гена *ARG1* (0,357 против 0,074; $p=0,02$; OR 6,94, 95% ДИ 1,1–42,4) соответственно.

Следующим этапом исследования мы определили статистически значимые корреляции в зависимости от уровня FeNO. При повышенном уровне FeNO выявлены следующие взаимосвязи: между тяжестью заболевания и *NOS1*(AAT)n ($r=0,28$; $p=0,02$), возрастом его манифестации и *NOS1*(AAT)n ($r=0,30$; $p=0,02$); ОФВ₁/ФЖЕЛ и *ARG1*(rs3742879) ($r=0,33$; $p=0,009$); обратная связь между эозинофилией в крови и *NOS1*(AAT)n ($r=-0,32$; $p=0,01$). При пониженном уровне FeNO: между степенью тяжести заболевания и *NOS1*(AAT)n ($r=0,30$; $p=0,04$), эффективностью противовоспалительной базисной терапии и *NOS1*(AAT)n ($r=0,33$; $p=0,03$), грибковой сенсibilизацией и *NOS1*(AAT)n ($r=0,41$; $p=0,0008$); обратная связь между ОФВ₁ и *NOS2*(CCTTT)n ($r=-0,51$; $p=0,0004$); ОФВ₁/ФЖЕЛ и *NOS2*(CCTTT)n ($r=-0,36$; $p=0,015$).

Обсуждение

В результате исследования выявлена ассоциация трех полиморфизмов генов *NOS1*, *NOS2* и *ARG1* у больных бронхиальной астмой с уровнем FeNO и клинико-лабораторными и инструментальными показателями.

Известно, что нейрональная синтаза оксида азота (*NOS1*) локализуется в холинергических нервах дыхательных путей и опосредует ингибирующее воздействие неадренергической нехолинергической нейронной бронходилатации (iNANC), действуя как функциональный антагонист котрансмиттера ацетилхолина [3]. *NOS1* также экспрессируется в эпителиальных клетках и пневмоцитах I типа. Известно, что *NOS1* может способствовать увеличению выработки периферического оксида азота при тяжелой астме [11]. Индуцибельная NOS (*NOS2*) индуцируется провоспалительными цитокинами при воспалении дыхательных путей и экспрессируется в основном в макрофагах и эпителиальных клетках [12]. Известно также, что уровень FeNO снижается при применении у больных бронхиальной астмой ИГКС [1–5].

Обе изоформы аргиназы (кодируемые генами *ARG1* и *ARG2*) экспрессируются в эпителии дыхательных путей, гладких мышцах, перибронхиальной и периваскулярной соединительной ткани [13, 14]. Аргиназа ослабляет ингибирующую неадренергическую нехолинергическую нервно-опосредованную релаксацию гладких мышц дыхательных путей (iNANC) за счет снижения (ингибирования) выработки оксида азота, что обусловлено конкуренцией с нейрональной NO-синтазой (*nNOS*) за общий субстрат – L-аргинин. Повышенная активность аргиназы после ранней астматической реакции ухудшает воздействие iNANC и опосредованное ею расслабление гладких мышц дыхательных путей, вызывая дефицит оксида азота, производимого с участием nNOS [13]. Повышенная активность аргиназы в дыхательных путях способствует развитию алергениндуцированной гиперреактивности дыхательных путей за счет ограничения биодоступности L-аргинина в отношении изоферментов sNOS и iNOS, что приводит к дефициту бронхолитического оксида азота и увеличению образования проконтрактивного и провоспалительного пероксинитрита.

Полученные нами результаты согласуются с данными М.Е. Wechsler и соавт. (2000), выявивших у американских взрослых пациентов с легкой бронхиальной астмой ассоциацию аллелей с корот-

кими повторами $S < 12$ в интроне AATn гена *NOS1* с высоким уровнем FeNO ($16,6 \pm 10,1$ ppb), тогда как аллели с длинными повторами $L \geq 12$ этого полиморфизма были связаны с более низким уровнем FeNO ($10,8 \pm 3,6$ ppb; $p=0,00008$). Не установлено достоверных различий в зависимости от уровня ОФВ₁ ($p=0,23$). Около 25% больных бронхиальной астмой с низким уровнем FeNO имели два аллеля длинных tandemных повтора *NOS1*. Исследователи предположили, что у больных этой когорты отсутствует часть неврогенного механизма, отвечающего за фенотип астмы у других пациентов [6].

У китайских детей в возрасте от 5 до 18 лет с бронхиальной астмой ($n=295$) обнаружена ассоциация полиморфизма гена *NOS1*(AAT)n с высоким уровнем общего IgE в плазме крови ($p=0,044$), однако не установлено достоверной ассоциации с уровнем FeNO ($p=0,158$) [15]. У 225 детей с бронхиальной астмой (от 6 до 12 лет) штата Огайо в проспективном когортном исследовании не выявлено ассоциации полиморфизмов гена *NOS1*(AAT)n и воздействия окружающей среды (никотин, находящийся в воздухе, зарегистрированное воздействие табачного дыма, сывороточного и волосяного котинина, аллергенов помещений, повышенная чувствительность к любому внешнему аллергену), проводимой терапии ИГКС, недавней инфекции верхних дыхательных путей, времени года, пола, расы с уровнем FeNO [16].

В литературе опубликованы статьи с двумя статистическими подходами к расчету частоты аллелей гена *NOS2A*(CCTTT)n при разделении на генотипы. Одни авторы считают генотипами с длинными аллелями (LL) генотипы с *14 или *15 повторами и более (CCTTT)n [10, 17], другие – с *12 повторами и более [8, 18]. В нашем исследовании мы применили второй способ статического расчета, так как у больных бронхиальной астмой определялись аллели с *9–*16 повторами, где наибольшая частота аллеля с *12 повторами – 0,351. Короткие аллели S содержали 9–11 повторов, длинные L – 12–16 повторов. Нам установлено, что для больных бронхиальной астмой с повышенным уровнем FeNO характерна ассоциация аллелей и генотипов, содержащих длинные tandemные повторы L гена *NOS2A*(CCTTT)n, со среднетяжелым течением бронхиальной астмы и с повышенным уровнем IgE. При низком уровне FeNO определена ассоциация аллелей и генотипов, содержащих длинные tandemные повторы L гена *NOS2A*(CCTTT)n, с пониженным ОФВ₁.

У китайских детей (возраст от 5 до 18 лет; $n=291$), больных бронхиальной астмой, при многофакторном регрессионном анализе не установлено ассоциации гена *NOS2*(CCTTT)n с диагнозом бронхиальной астмы ($p=0,949$), атопией ($p=0,305$), IgE-сенситизацией к аэроаллергенам ($p>0,2$ для всех) и уровнем FeNO ($p=0,847$). Показан унимодальный пик распределения аллелей с *12 повторами.

Полученные данные не подтверждают, что *NOS2* является основным геном-кандидатом для бронхиальной астмы или IgE-опосредованных аллергических заболеваний у китайских детей [19].

У взрослых больных с высоким уровнем FeNO (≥ 35 ppb; $n=23$) установлена повышенная экспрессия *iNOS* ($p=0,04$) и *ARGII* ($p=0,05$) в дыхательных путях, низкие ОФВ₁ ($p<0,001$), ОФВ₁/ФЖЕЛ ($p=0,0002$) и PC₂₀^{***} ($p<0,001$), подтверждая, что FeNO служит маркером метаболического эндотипа с высоким уровнем аргинина, который клинически характеризуется более выраженной обструкцией и реактивностью дыхательных путей. У больных с низким уровнем FeNO (< 35 ppb; $n=29$) определена почти нормальная экспрессия *iNOS* и *ARGII* ($p>0,05$) и более высокая PC₂₀ ($p<0,001$). Исследования *in vitro* по оценке метаболических эффектов показали, что сверхэкспрессия *iNOS* и коэкспрессия *iNOS* + *ARGII* в эпителиальных клеточных линиях бронхов человека приводят к большей зависимости от гликолиза и более высокой скорости превращения пирувата в лактат у лиц с высоким FeNO. Фенотип с высоким уровнем FeNO представляет большую часть популяции больных бронхиальной астмой и характеризуется повышенным метаболизмом аргинина, большей реактивностью дыхательных путей и более тяжелым течением заболевания [7].

Так, у взрослых пациентов из Японии со среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астмой не установлено различий между двумя группами генотипов (S/S+ S/L и L/L) по уровню FeNO (30,0 ppb; 16,9–48,2) и концентрации нитритов и нитратов в плазме крови, ОФВ₁, уровню общего IgE и эозинофилов в крови. Определялась ассоциация высокого уровня экспрессии мРНК *NOS2* ($p=0,001$) и ОФВ₁/ФЖЕЛ ($p=0,038$) с генотипами, содержащими короткие аллели (S/S и S/L), имеющими *11 или менее повторов *NOS2*(CCTTT)n. Кроме того, выявлена ассоциация более высокого риска обострения заболевания с генотипами, содержащими короткие аллели (S/S и S/L) *NOS2* (OR=2,4, 95% ДИ 1,1–5,3). Исследователи предположили, что наличие коротких аллелей (*11 и менее повторов) способствовало ухудшению клинических результатов после лечения бронхиальной астмы у пациентов со среднетяжелой и тяжелой формами заболевания [8].

В другом японском исследовании у 91 взрослого больного диагноз бронхиальной астмы был установлен еще в детстве. Средний уровень FeNO до лечения составил 105,1 ppb (10,3–585,0). Больных распределили на 2 группы: генотипы с обеими аллелями коротких ($\leq 14^*$) повторов (S/S) и генотипы с одним длинным аллелем и с одним коротким повтором (L/S или L/L). Средний уровень FeNO до лечения был

*** Концентрация метахолина, вызвавшая уменьшение ОФВ₁ на 20%.

значительно выше у больных с генотипами L/S+L/L *NOS2*(CCTTT)_n (154,0±26,8 ppb), чем с генотипами S/S (87,6±9,4 ppb; $p=0,019$). Выявлена также слабая корреляция между уровнем FeNO до лечения и генотипами L/S+L/L *NOS2* (CCTTT)_n ($r=0,233$; $p=0,026$). Ассоциации между этими генотипами и специфическими IgE к домашней пыли не установлено. Однако определена слабая корреляция между уровнем в сыворотке крови специфического IgE к домашней пыли и генотипами L/S+ L/L *NOS2*(CCTTT)_n ($r=0,224$; $p=0,034$). После лечения уровень FeNO достоверно не различался между двумя группами. Исследователи пришли к заключению, что уровень FeNO не всегда отражает активность эозинофильного воспаления дыхательных путей у японских больных бронхиальной астмой, имеющих короткие повторы S/S *NOS2A*(CCTTT)_n [9].

Мы нашли в литературе только одно исследование, в котором выявлена ассоциация *NOS2A* с уровнем FeNO у больных бронхиальной астмой, но в нем исследовались лишь гаплотипы. В нашем исследовании у детей с повышенным уровнем FeNO установлена ассоциация аллеля *A гена *ARG11* (rs3742879) со среднетяжелым течением заболевания. Полученные данные совершенно не противоречат результатам исследования, проведенного в Южной Калифорнии, в котором у детей с бронхиальной астмой (6–11 лет) была выявлена ассоциация гаплотипа *NOS2A* 3 h1000010 с уровнем FeNO, значительно варьирующая в зависимости от варианта *ARG2*(rs3742879) ($p=0,009$). Среди детей с генотипом AA* *ARG11*(rs3742879) гаплотип *NOS2A* ассоциировался с более высоким уровнем FeNO. Напротив, среди детей, несущих генотип GG* *ARG11*(rs3742879), гаплотип *NOS2A* ассоциировался с более низким уровнем FeNO. Распределение на генотипы проведено по *NOS2A*(CCTTT)_n с ≥14* повторами. Не установлено ассоциаций респираторной аллергии в анамнезе с уровнем FeNO и *NOS2A* [10]. Исследователи предположили, что гаплотипы *NOS2A* promoter могли влиять на уровень FeNO посредством дифференциальной экспрессии генов. *ARG11*(rs3742879) является детерминантой уровня FeNO, особенно у детей с бронхиальной астмой. Механизм наблюдаемого взаимодействия генов может быть обусловлен конкуренцией за общий субстрат – L-аргинин, поскольку аргиназа была связана с пониженным синтезом оксида азота путем ингибирования экспрессии iNOS на уровне трансляции [20].

Полученные нами данные согласуются со сведениями литературы, утверждающими, что аллели с 8–9 повторами CCTTT гена *NOS2* имеют более низкие уровни транскрипционной активности, чем аллели с 12–15 повторами. У индивидов – носителей аллелей с короткими повторами продуцируется меньше iNOS и, как следствие, вырабатывается меньше оксида азота II. У индивидов – носителей

аллелей с длинными повторами отмечалась более высокая скорость транскрипции iNOS, индуцированная IL-1β, в ответ на экзогенные стимулы, включая такие патогены, как вирусы и бактерии, что приводит к повышенной продукции оксида азота. К.М. Warpeha и соавт. обнаружили, что повторы 9, 12 и 14 *NOS2A*(CCTTT)_n давали прогрессивное увеличение экспрессии генов [12, 17, 21].

Область применения результатов. Измерение уровня FeNO в выдыхаемом воздухе как маркера аллергического воспаления для диагностики или контроля эффективности терапии бронхиальной астмы и связь уровней FeNO с полиморфизмами промотора *NOS2A* может нести важную диагностическую информацию. Анализ экспрессии генов может помочь в определении новых терапевтических подходов, направленных на контроль уровня оксида азота и аллергического воспаления в целом, а также выявить генетические факторы, определяющие предрасположенность к бронхиальной астме.

Выводы

У больных бронхиальной астмой доказано наличие определенной, но неоднозначной и не абсолютной взаимосвязи между уровнем FeNO, детерминирующими его генами NO-синтаз и аргиназы и особенностями течения заболевания. А именно:

– в группе больных с повышенным уровнем FeNO (≥20 ppb) установлен ряд ассоциаций, носительства аллелей и генотипов, содержащих короткие tandemные повторы S (9–11) гена *NOS1*(AAT)_n с ранним дебютом и тяжелым течением болезни, повышенным уровнем общего IgE в сыворотке крови; носительства аллелей и генотипов, содержащих длинные tandemные повторы L (12–16) гена *NOS2A*(CCTTT)_n со среднетяжелым течением болезни, с повышенным уровнем IgE; носительства аллеля *A гена *ARG11*(rs3742879) со среднетяжелым течением болезни; носительства аллеля *G и гетерозиготного генотипа *AG гена *ARG11*(rs3742879) с пониженным уровнем ОФВ₁/ФЖЕЛ; носительства аллелей L и сочетания генотипов SL и LL гена *NOS1*(AAT)_n с повышенным уровнем эозинофилов в крови (эозинофилией); сочетания генотипов S/L+L/L гена *NOS1*(AAT)_n с грибковой сенсibilизацией. Установлены корреляции между тяжестью заболевания и *NOS1*(AAT)_n, возрастом манифестации заболевания и *NOS1*(AAT)_n; ОФВ₁/ФЖЕЛ и *ARG11*(rs3742879); обратная связь между эозинофилией в крови и *NOS1*(AAT)_n;

– в группе больных с низким уровнем FeNO (<20 ppb) также определен ряд ассоциаций: носительства аллелей и генотипов, содержащих короткие tandemные повторы S (9–11) гена *NOS1*(AAT)_n с грибковой сенсibilизацией; носительства аллелей и генотипов, содержащих длинные tandemные повторы L (12–16) гена *NOS2A*(CCTTT)_n с пони-

женными ОФВ₁ и ОФВ₁/ФЖЕЛ; носительства гомозиготного генотипа *GG гена *ARG11(rs3742879)* с эпидермальной сенсibilизацией. При пониженном уровне FeNO определена связь между степенью тяжести бронхиальной астмы и *NOS1(AAT)n*,

степенью эффективности противовоспалительной базисной терапии и *NOS1(AAT)n*; грибковой сенсibilизацией и *NOS1(AAT)n*, а также обратная связь между ОФВ₁ и *NOS2(CCTTT)n*; ОФВ₁/ФЖЕЛ и *NOS2(CCTTT)n*.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES)

1. Мизерницкий Ю.Л., Цыпленкова С.Э., Мельникова И.М. Современные методы оценки функционального состояния бронхолегочной системы у детей. М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2012; 176. [Mizernitsky Yu.L., Tsyplenkova S.E., Mel'nikova I.M. Modern methods of assessing the functional state of the bronchopulmonary system in children. M.: MEDPRAKTIKA-M, 2012;176 (in Russ.)]
2. Patsky H.L., Kew K.M., Chang A.B. Review Exhaled nitric oxide levels to guide treatment for children with asthma. Cochrane Database Systematic Reviews. 2016; Issue 11. Art. NO.: CD011439.
3. Dweik R.A., Boggs P.B., Erzurum S.C., Irvin C.G., Leigh M.W., Lundberg J.O. et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FeNO) for clinical applications. Am J Respir Crit Care Med 2011; 184(5): 602–615. DOI: 10.1164/rccm.9120-11ST
4. Barnes P.J., Dweik R.A., Gelb A.F., Gibson P.G., George S.C., Grasemann H. et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. Chest 2010; 138(3): 682–692. DOI: 10.1378/chest.09-2090
5. Rao D.R., Phipatanakul W. An Overview of Fractional Exhaled Nitric Oxide and Children with Asthma. Expert Rev. Clin Immunol 2016; 12(5): 521–530. DOI: 10.1586/1744666X.2016.1141049
6. Wechsler M.E., Grasemann H., Deykin A., Silverman E.K., Yandava C.N., Israel E. et al. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with *NOS1* genotype. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162(6): 2043–2047.
7. Xu W., Comhair S.A.A., Janocha A.J., Lara A., Mavrikis L.A., Bennett C.D. et al. Arginine metabolic endotypes related to asthma severity. PLoS One 2017; 12(8): e0183066. DOI: 10.1371/journal.pone.0183066
8. Hirai K., Shirai T., Suzuki M., Shimomura T., Itoh K. Association between (CCTTT)_n repeat polymorphism in *NOS2* promoter and asthma exacerbations. J Allergy Clin Immunol 2018; 142(2): 663–665. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.02.023
9. Sato S., Wang X., Saito J., Fukuhara A., Uematsu M., Suzuki Y. et al. Exhaled nitric oxide and inducible nitric oxide synthase gene polymorphism in Japanese asthmatics. Allergol Internat 2016; 65(3): 300–305. DOI: 10.1016/j.alit.2016.02.007
10. Salam M.T., Bastain T.M., Rappaport E.B., Islam T., Berhane K., Gauderman W.J. et al. Genetic variations in nitric oxide synthase and arginase influence exhaled nitric oxide levels in children. Allergy 2011; 66(3): 412–419. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02492.x
11. Brindicci C., Ito K., Barnes P.J., Kharitonov S.A. Differential flow analysis of exhaled nitric oxide in patients with asthma of differing severity. Chest 2007; 131(5): 1353–1362. DOI: 10.1378/chest.06-2531
12. Warpeha K.M., Xu W., Liu L., Charles I.G., Patterson C.C., Ah-Fat F. et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)_n repeat of *NOS2A* in diabetic retinopathy. FASEB J 1999; 13(13): 1825–1832.
13. Maarsingh H., Leusink J., Bos I.S., Zaagsma J., Meurs H. Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. Respir Res 2006; 7(1): 6. DOI: 10.1186/1465-9921-7-6
14. Maarsingh H., Zaagsma J., Meurs H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. British J Pharmacol 2009; 158(3): 652–664. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00374.x
15. Leung T.F., Liu E.K., Tang N.L., Ko F.W., Li C.Y., Lam C.W., Wong G.W. Nitric oxide synthase polymorphisms and asthma phenotypes in Chinese children. Clin Exp Allergy 2005; 35(10): 1288–1294.
16. Spanier A.J., Kahn R.S., Hornung R.W., Wang N., Sun G., Lierl M.B. et al. Environmental Exposures, Nitric Oxide Synthase Genes, and Exhaled Nitric Oxide in Asthmatic Children. Pediatr Pulmonol 2009; 44(8): 812–819. DOI: 10.1002/ppul.21071
17. Konno S., Hizawa N., Yamaguchi E., Jinushi E., Nishimura M. (CCTTT)_n repeat polymorphism in the *NOS2* gene promoter is associated with atopy. J Allergy Clin Immunol 2001; 108(5): 810–814.
18. Батожаргалова Б.Ц., Мизерницкий Ю.Л., Дьякова С.Э., Петрова Н.В., Зинченко Р.А. Роль полиморфных вариантов генов NO-синтазы и аргиназы в формировании бронхиальной астмы у детей. Медицинская генетика 2017; 16(2): 40–48. [Batozhargalova B.TS., Mizernitsky Yu.L., Dyakova S.E., Petrova N.V., Zinchenko R.A. The role of polymorphic variants of NO synthases and arginase genes in the formation of bronchial asthma in children. Meditsinskaya genetika 2017; 16(2): 40–48 (in Russ.)]
19. Leung T.F., Liu E.K., Li C.Y., Chan I.H., Yung E., Lam C.W., Wong G.W. Lack of association between *NOS2* pentanucleotide repeat polymorphism and asthma phenotypes or exhaled nitric oxide concentration. Pediatric Pulmol 2006; 41(7): 649–655. DOI: 10.1002/ppul.20428
20. Lee J., Ryu H., Ferrante R.J., Morris S.M.Jr., Ratan R.R. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 4843–4848.
21. Sarnelli G., Grosso M., Palumbo I., Pesce M., D'Alessandro A., Zaninotto G. et al. Allele-specific transcriptional activity of the variable number of tandem repeats of the inducible nitric oxide synthase gene is associated with idiopathic achalasia. United Eur Gastroenterol J 2017; 5(2): 200–207. DOI: 10.1177/2050640616648870

Поступила: 07.08.19

Received on: 2019.08.07

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.