

УДК: 616.341-056.43-053.2

DOI: 10.34215/1609-1175-2019-4-32-35

Молекулярные и генетические механизмы эндотелиальной дисфункции у детей с аллергической энтеропатией

Т.А. Шуматова, Н.Г. Приходченко, Е.С. Зернова

Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия

Цель: анализ молекулярных и генетических механизмов формирования эндотелиальной дисфункции у детей с энтеропатией аллергического генеза. **Материал и методы.** Изучены полиморфизмы гена эндотелиальной нитрооксидсинтазы и содержание метаболитов оксида азота в копрофильтратах у 43 детей в возрасте от 6 месяцев до 3 лет с аллергической энтеропатией. **Результаты.** Эндотелиальная дисфункция при аллергической энтеропатии ассоциирована с молекулой оксида азота. Носительство гомозиготного аллеля CC T786C гена эндотелиальной нитрооксидсинтазы увеличивает риск развития IgE-независимой пищевой аллергии в 8,8 раза. **Заключение.** Проведенное исследование свидетельствует об активном участии нитрооксидергических механизмов в реализации аллергического воспаления.

Ключевые слова: эндотелиальная нитрооксидсинтаза, метаболиты оксида азота, пищевая аллергия, полиморфизм гена

Поступила в редакцию 12.06.2019 г. Принята к печати 06.11.2019 г.

Для цитирования: Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Зернова Е.С. Молекулярные и генетические механизмы эндотелиальной дисфункции у детей с аллергической энтеропатией. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2019;4:32–5. doi: 10.34215/1609-1175-2019-4-32-35

Для корреспонденции: Шуматова Татьяна Александровна – д-р мед. наук, профессор, директор Института педиатрии ТГМУ, ORCID: 0000-0003-2668-8483; e-mail: shumatov@mail.ru

Molecular and genetic mechanisms of endothelial dysfunction in children with allergic enteropathy

Т.А. Shumatova, N.G. Prihodchenko, E.S. Zernova

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Objective. The objective is to analyze molecular and genetic mechanisms of endothelial dysfunction development in children with allergic enteropathy. **Methods:** We have studied the polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and the level of nitric oxide metabolites in coprofiltrates in 43 children aged from 6 months to 3 years with allergic enteropathy. **Results:** The endothelial dysfunction in allergic enteropathy is associated with nitric oxide molecule. Carriage of the homozygous allele CC T786C of the endothelial nitric oxide synthase gene raises the risk of IgE-independent food allergy development by 8.8 times. **Conclusions:** The conducted study evidences the active participation of nitric-oxidergic mechanism in allergic inflammation development.

Keywords: endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide metabolites, food allergy, gene polymorphism

Received: 12 June 2019; Accepted: 6 November 2019

For citation: Shumatova TA, Prihodchenko NG, Zernova ES. Molecular and genetic mechanisms of endothelial dysfunction in children with allergic enteropathy. *Pacific Medical Journal*. 2019;4:32–5. doi: 10.34215/1609-1175-2019-4-32-35

Corresponding author: Tatiana A. Shumatova, MD, PhD, professor, head of the Institute of Pediatrics, Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave., Vladivostok, 690002, Russian Federation); ORCID:0000-0003-2668-8483; e-mail: shumatov@mail.ru

Прогресс в области медицинских технологий напрямую связан с пересмотром существующих диагностических и лечебных тактик. Для осуществления прецизионного терапевтического подхода наряду с информацией о клинической картине заболевания необходимы знания о состоянии основных молекулярных маркеров патологического процесса, наличии геномных и эпигеномных факторов, влияющих на его реализацию [1–4].

Коллектив Института педиатрии ТГМУ проводит научные исследования по расшифровке патогенетических механизмов функциональной активности клеточных структур слизистой оболочки тонкой кишки у детей с мальабсорбцией различного генеза. Выбранное научное направление сохраняет высокую

актуальность, так как до настоящего времени не решен вопрос о возможной триггерной роли некоторых биологически активных молекул при воспалительных заболеваниях кишечника и нарушениях пристеночного пищеварения. Особое внимание в научных исследованиях института уделяется нитрооксидергическим механизмам мальабсорбции, возрастным аспектам этой проблемы, поиску неинвазивных маркеров, позволяющих прогнозировать течение патологического процесса, контролировать его тяжесть и прогноз [5–7].

Молекула оксида азота обладает широким спектром биологических эффектов [8, 9]. Ее роль в обеспечении работы желудочно-кишечного тракта до конца не изучена. Установлено, что иммунные процессы в тонкой

кишке сопровождаются повреждением эпителиоцитов с изменением их нитроксидпродуцирующей способности. Высказано мнение, что патологические процессы могут затрагивать и эндотелий сосудов слизистой оболочки, вызывая нарушения микроциркуляции и, при персистенции, – трофические изменения тканей [8, 10, 11]. Сведения об эндотелиальной дисфункции слизистой оболочки тонкой кишки довольно противоречивы. Считается, что основная защитная роль в интактном эндотелии принадлежит молекуле оксида азота. При этом она обеспечивает не только вазодилатацию, но и уменьшает экспрессию молекул адгезии и агрегации тромбоцитов, оказывает антипролиферативное, антиапоптотическое и антитромботическое действие [9]. Наличие непарного электрона обеспечивает этой молекуле способность проходить через биологические мембраны и вступать в реакции с другими соединениями. Клеточными мишенями оксида азота служат железосодержащие ферменты и белки (гуанилатциклаза, нитроксидсинтаза, митохондриальные дыхательные ферменты, ферменты цикла Кребса, ферменты синтеза белка и ДНК), белковые SH-группы и др. Связываясь с кислородом, оксид азота образует чрезвычайно токсичные соединения – пероксинитриты. Синтезированный оксид азота влияет на характер метаболизма, как в самих клетках-продуцентах, так и в клетках, расположенных по соседству. Установлено, что он может оказывать мощное повреждающее действие на проникающие в организм микробные клетки, осуществляя защитную функцию, а при определенных условиях способен нарушать работу клеток, в которых синтезируется [9, 10]. Наиболее изученными полиморфизмами гена эндотелиальной нитроксидсинтазы (eNOS – endothelial nitric oxide synthase) считаются полиморфизм *G894T* седьмого экзона и полиморфизм *T786C* промотора [12]. Информация по полиморфизму гена eNOS у пациентов с аллергической энтеропатией отсутствует.

Цель настоящего исследования состояла в анализе молекулярных и генетических механизмов формирования эндотелиальной дисфункции у детей с энтеропатией аллергического генеза.

Материал и методы

Наблюдали 43 ребенка грудного и раннего возраста (от 6 месяцев до 3 лет), у которых в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями (2015), рекомендациями Европейского общества детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов (ESPGAN, 2012), Европейской академии алергологии и клинической иммунологии (EAACI, 2014) была диагностирована энтеропатия, ассоциированная с белком коровьего молока. Контрольная группа – 30 здоровых детей с неотягощенным по аллергии анамнезом. Критериями исключения стало наличие врожденных пороков развития, острых и хронических заболеваний, эндокринной патологии.

Все пациенты с энтеропатией были разделены на две группы. 1-ю группу сформировали 20 детей с IgE-зависимой пищевой аллергией (ПА), имевшие повышенный

уровень IgE и специфических IgE-антител к белку коровьего молока. Во 2-ю группу вошли 23 ребенка с IgE-независимой ПА (уровень общего IgE и специфических антител у которых не отличался от контрольного). Группы исследования и контроля были сопоставимы по полу и возрасту. Во всех случаях получено письменное согласие на участие в исследовании с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (2000) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г., № 266).

Концентрацию метаболитов оксида азота (эндогенный нитрит и суммарный уровень нитратов) в копрофильтрах определяли с помощью иммуноферментного анализа и набора Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit (R&D Systems, США). Исследования проводили в динамике – на фоне выраженной клинической симптоматики, на 5–7-е и 21–28-е сутки. Генотипирование выполняли в лаборатории молекулярно-генетических исследований Краевого клинического центра современных видов медицинской помощи (Владивосток). Изучали полиморфные варианты *G894T* и *T786C* гена eNOS с помощью амплификации соответствующих участков генома и полимеразной цепной реакции (лаборатория «Терцик»), используя наборы реагентов для выявления полиморфизмов в геноме человека с электрофоретической схемой детекции производства НПФ «ЛИТЕХ».

Статистическая обработка материала выполнена с помощью специализированных пакетов прикладных программ Excel-2010 и Statistica 10. Определение характера распределения признаков проводилось по критериям Шапиро–Уилка (W) и Колмогорова–Смирнова. При критическом уровне значимости, равном $p \leq 0,05$, нулевая гипотеза о нормальности распределения отклонялась. Описательные статистики рассчитывались по общепринятым методикам. Для количественных признаков, если распределение признавалось нормальным, вычислялись среднее и его стандартное отклонение ($M \pm s$). Если распределение отличалось от нормального, определялись медиана и 25 % и 75 % квартили. Для сравнения частот распределения по качественным признакам использовался статистический критерий χ^2 . При $p \leq 0,05$ гипотеза об отсутствии различий частот внутри групп отклонялась. При сравнении количественных показателей применяли непараметрический тест Манна–Уитни с коррекцией на множественность сравнений по методу Холма. Ассоциативная связь показателей с признаками оценивалась с помощью отношения шансов (ОШ) и их 95 % доверительных интервалов (ДИ).

Результаты исследования

Содержание нитритов в копрофильтрах у детей с аллергической энтеропатией (1-я и 2-я группы) оказалось в 1,6 раза ниже ($14,05 \pm 0,89$ мкмоль/л), чем в контроле. Суммарный же уровень метаболитов оксида азота ($280,45 \pm 23,52$ мкмоль/л) не имел достоверных

Таблица 1
Фекальный уровень метаболитов оксида азота (NO) у детей с аллергической энтеропатией

Показатель ^a	Уровень метаболитов NO (M±s), мкмоль/л		
	1-я группа	2-я группа	Контроль
УН	18,21±1,09 ^{b, в}	9,94 ±0,89 ^{b, в}	22,68±4,62
СУМ NO	336,61±19,89 ^{b, в}	226,32±11,31 ^b	270,42±21,86

^a УН – уровень нитритов, СУМ – суммарный уровень метаболитов.

^b Различия с контролем статистически значимы.

^в Различия между 1-й и 2-й группами статистически значимы.

Таблица 2
Частота регистрации аллелей и генотипов G894T и T786C гена eNOS

Генотипы, аллели	Частота регистрации				p
	1-я группа		2-я группа		
	абс.	%	абс.	%	
GG G894T	17	83,3	16	71,5	0,045
GT G894T	3	16,7	4	19,0	
TT G894T	0	–	3	9,5	
Аллель G	33	91,6	34	80,9	0,032
Аллель T	3	8,4	8	19,1	
ОШ; 95 % ДИ	0,262; 0,062–1,098		0,523; 0,159–1,721		–
TT T786C	10	50,0	3	13,1	0,032
ТС T786C	9	44,4	11	47,8	
СС T786C	1	5,6	9	39,1	
Аллель T	26	55,1	17	73,3	0,011
Аллель C	10	44,9	25	26,7	
ОШ; 95 % ДИ	1,308; 0,405–4,225		7,846; 1,897–32,450		–

различий у детей с ПА и у здоровых (табл. 1). В динамике – на 5–7-е и 21–28-е сутки – у пациентов с аллергической энтеропатией в копрофильтрах сохранялась сниженная концентрация эндогенного нитрита: 14,68±1,24 и 15,21±1,81 мкмоль/л, соответственно. Суммарный уровень метаболитов оксида азота в эти сроки достоверно не изменялся и оставался в пределах 281,01±19,98 и 266,61±26,19 мкмоль/л, соответственно.

У детей с IgE-независимой ПА (2-я группа) фекальный уровень нитритов и суммарный уровень метаболитов оксида азота были ниже, чем у детей с IgE-зависимой ПА (1-я группа). Содержание же метаболитов оксида азота в копрофильтрах оказалось значимо выше, чем в контроле, только у представителей 1-й группы наблюдения (табл. 1). При типировании гена eNOS установлено, что частоты генотипов и аллелей находились в пределах варибельности этих признаков в популяциях европеоидов и соответствовали данным литературы. При изучении полиморфизма G894T eNOS у пациентов с энтеропатией установлено снижение частоты редких гомозигот TT. Среди детей с аллергической энтеропатией распространенный гомозиготный генотип GG встретился в 76,9 %, гетерозиготный генотип GT – в 17,9 % и редкий гомозиготный генотип TT – в 6,2 % случаев. В контрольной группе частота регистрации этих генотипов составила 56,7, 33,3 и 10 %, соответственно. У пациентов с энтеропатией частота регистрации аллеля T была ниже, чем у здоровых детей,

но статистически значимых различий получено не было: ОШ – 0,392 (95 % ДИ: 0,139–1,107) при p=0,196.

При анализе генотипов и аллелей по полиморфизму T786C гена eNOS показано, что у детей с энтеропатией благоприятный гомозиготный генотип (TT) встречался достоверно реже (в 30,7 % наблюдений), чем у их здоровых сверстников (56,7 % наблюдений). Частота гомозигот по аллели C в исследуемых группах составила 20,3 %, что оказалось более чем в два раза выше аналогичного показателя здоровых детей (10 %).

У детей с ПА в 1,7 раза чаще регистрировался неблагоприятный аллель C: 44,9 % против 26,7 % наблюдений в контроле. У представителей контрольной группы в 1,3 раза чаще определялся благоприятный аллель T анализируемого гена по сравнению с аллелем C: 73,4 и 55,1 %, соответственно. ОШ для развития ПА у носителей генотипа CC было 2,942 (95 % ДИ: 1,191–7,934).

Достоверных различий в частоте ассоциаций IgE-зависимой и IgE-независимой энтеропатии с наличием аллеля T генотипа G894T eNOS не установлено. Частота встречаемости аллеля C генотипа T786C в группах наблюдения также не различалась, но патологический генотип CC чаще регистрировался во 2-й группе. Носительство гомозиготного варианта CC генотипа T786C eNOS увеличивало риск развития IgE-независимой ПА в 8,8 раза и не влияло на частоту IgE-зависимой энтеропатии (табл. 2). Таким образом, подтверждена ассоциация полиморфных локусов CC и TC генотипа T786C eNOS с повышением риска развития ПА у детей.

Обсуждение полученных данных

Для поддержания нормального тонуса сосудов желудочно-кишечного тракта и обеспечения барьерных функций необходима непрерывная базальная выработка оксида азота [13]. Мутации некоторых аллелей гена eNOS могут приводить к нарушению экспрессии фермента и к уменьшению выработки оксида азота [12]. Обнаруженные нами разнонаправленные изменения продукции этого соединения при IgE-зависимой и IgE-независимой ПА может быть обусловлено особенностями активности конститутивных форм нитроксидсинтаз, поддерживающих базисную продукцию оксида азота.

Результаты исследования свидетельствуют об активном участии нитроксидагических механизмов в аллергическом воспалении слизистой оболочки тонкой кишки с развитием клиники энтеропатии. Мы считаем, что как гипо-, так и гиперпродукция оксида азота может играть значительную роль в каскаде разнонаправленных иммунопатологических реакций. Блокада синтеза этого соединения, обнаруженная при IgE-независимой ПА, вызывает значительное уменьшение кровотока в сосудах слизистой оболочки тонкой кишки. Нарушение кровоснабжения сказывается на секреторной функции кишечника, на его способности противостоять факторам агрессии, вызывает повреждение клеточных структур слизистой оболочки и снижает ее возможности к репарации. Гиперпродукция оксида азота, выявленная

при IgE-зависимой ПА, вероятно, служит защитной реакцией, направленной на адаптацию клеток слизистой оболочки тонкой кишки к изменившимся условиям существования в результате активации цитокинового каскада, развития гипериммуноглобулинемии E, и, может быть, обусловлена переходом клеток кишечника на более экономный (нитритный) путь дыхания.

В настоящей работе показано, что носительство гомозиготного варианта СС T786C гена eNOS увеличивает риск развития IgE-независимой энтеропатии в 8,8 раза и не влияет на частоту возникновения IgE-зависимой энтеропатии. Это может свидетельствовать о разном вкладе упомянутых полиморфизмов в развитие различных видов ПА. Можно предположить, что, попадая в организм человека, в зависимости от исходных рисков (наличие полиморфизмов определенных генов), антиген вызывает сложный комплекс иммунных реакций, способствующих и формированию толерантности, и развитию аллергического воспаления. Оксид азота, при этом, на разных стадиях иммунного ответа может оказывать как протективный, так и повреждающий эффект. В ранней фазе иммунного ответа он помимо эффекторных выполняет и важные регуляторные функции. Эндогенный оксид азота защищает НК-клетки от апоптоза, поддерживает их цитолитическую активность, способствует повышенной продукции интерферона- γ . Он энергично участвует в подавлении активности и элиминации бактерий, а также его гиперпродукция играет значимую роль в повреждении тканей и транслокации бактерий. Условия, при которых оксид азота меняет протективные свойства на токсичные, могут зависеть от локальной концентрации тиолов, металлов переходной валентности, аденозинфосфорной кислоты и, возможно, других соединений, реагирующих с ним [14, 15]. Полученные данные необходимо использовать в дальнейшем для разработки диагностических и прогностических маркеров и новой тактики лечения, активирующей нитрооксидзависимые механизмы.

Заключение

Проведенное исследование свидетельствует об активном участии нитрооксидергических механизмов в реализации аллергического воспаления в слизистой оболочке тонкой кишки. Подтверждена роль эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с молекулой оксида азота, в патогенезе аллергической энтеропатии. Выявлена ассоциация локусов СС и ТС полиморфизма T786C гена eNOS с нарушением формирования иммунологической оральной толерантности у детей и развитием аллергической энтеропатии. Установлено, что носительство гомозиготного аллеля СС полиморфизма T786C гена eNOS увеличивает риск развития IgE-независимой ПА.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

Литература / References

1. Пампура А.Н. Пищевая аллергия у детей раннего возраста. *Педиатрия*. 2016;95(3):152–7. [Pampura AN. Food allergy in young children. *Pediatrics*. 2016;95(3):152–7 (In Russ.)]
2. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Зернова Е.С., Ефремова И.В., Шишацкая С.Н., Ни А.Н. и др. Полиморфизм генов фолатного цикла и эндогенные пептиды у детей с аллергией к белкам коровьего молока. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2016;61(6): 113–8. [Shumatova TA, Prihodchenko NG, Zernova ES, Efremova IV, Shishatskaya SN, Ni AN, et al. The gene polymorphism of the folate cycle and endogenous peptides in children with allergy to cow's milk protein. *Russian Journal of Perinatology and Pediatrics*. 2016;61(6): 113–8 (In Russ.)]
3. Berin MC, Sampson HA. Mucosal immunology of food allergy. *Curr Biol*. 2013;6(23):389–400.
4. Steele L, Mayer L, Berin MC. Mucosal immunology of tolerance and allergy in the gastrointestinal tract. *Immunol Res*. 2012; 54(1):75–82.
5. Шуматова Т.А., Зернова Е.С., Григорян Л.А., Шишацкая С.Н. Антимикробные пептиды и белки в диагностике синдрома мальабсорбции у детей. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;3. [Shumatov TA, Zernova ES, Grigoryan LA, Shishatskaya SN. Antimicrobial peptides and proteins in the diagnosis of malabsorption syndrome in children. *Modern Problems of Science and Education*. 2015;3 (In Russ.)]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=20324> (Accessed: 9 Nov 2016).]
6. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Ни А.Н., Катенкова Э.Ю., Григорян Л.А., Зернова Е.С., Шишацкая С.Н. Зонулин, TNF- α и оксид азота в диагностике IgE-зависимой и IgE-независимой пищевой аллергии у детей. *Тихоокеанский мед. журнал*. 2017;2:18–20. [Shumatova TA, Prihodchenko NG, Nee AN, Katenkova EYu, Grigoryan LA, Zernova ES, Shishatskaya SN. Zonulin, TNF- α and nitric oxide in the diagnosis of IgE-dependent and IgE-independent food allergies in children. *Pacific Medical Journal*. 2017;2:18–20 (In Russ.)]
7. Шуматова Т.А., Катенкова Э.Ю., Зернова Е.С., Шишацкая С.Н., Григорян Л.А., Егорова С.В. Особенности метаболизма эндогенных пептидов у детей с гастроинтестинальной формой пищевой аллергии. *Вопр. детской диетологии*. 2016;14(2):13–7. [Shumatova TA, Katenkova EYu, Zernova ES, Shishatskaya SN, Grigoryan LA, Egorova SV. Features of the metabolism of endogenous peptides in children with gastrointestinal form of food allergy. *Questions of Children's Nutrition*. 2016;14(2):13–7 (In Russ.)]
8. Cibor D, Domagala-Rodacka R, Rodacki T, Jurczynski A, Mach T, Owczarek D. Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: pathogenesis, assessment and implications. *World J Gastroenterol*. 2016;22(3):1067–77.
9. Kochar NI, Chandewal AV, Bakal RL, Kochar PN. Nitric oxide and the gastrointestinal tract. *Int J Pharmacol*. 2011;7:31–9.
10. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol*. 2015;36(3):161–78.
11. Scurlock AM, Vickery BP, Hourihane JO, Burks AW. Pediatric food allergy and mucosal tolerance. *Mucosal Immunol*. 2010; 3(4):345–54.
12. Stepanova EI, Skvarkaia EA. Role of polymorphism NOS gene in the pathogenesis of multifactorial diseases. *Lik Sprava*. 2014;5–6:47–55.
13. Mattila JT, Thomas AC. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol*. 2014;9(5):478.
14. Колесов С.А., Жукова Е.А., Коркоташвили Л.В., Федуллова Э.Н., Тутина О.А., Толкачева Н.И. Метаболиты оксида азота, белок теплового шока 70 и провоспалительные цитокины у детей с заболеваниями кишечника. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014; 4:75–8. [Kolesov SA, Zhukova EA, Korkotashvili LV, Fedulova EN, Tutina OA, Tolkacheva NI. Metabolites of nitric oxide, heat shock protein 70 and proinflammatory cytokines in children with intestinal diseases. *International journal of applied and fundamental research*. 2014;4:75–8 (In Russ.)]
15. Панова И.В., Дудникова Э.В. Оксид азота и эндотелин-1 при патологии органов пищеварения у детей. *Вопросы совр. педиатрии*. 2012;11(5):56–62. [Panova IW, Dudnikova IW. Nitric oxide and endothelin-1 in the pathology of the digestive system in children. *Questions of modern pediatrics*. 2012;11(5):56–62 (In Russ.)]