

УДК: 543.272.3:575.113 4:616.211-008.4-053.2:504.054:614.876

Є. І. Степанова✉, І. Є. Колпаков, В. М. Зигало, В. Ю. Вдовенко, В. В. Василенко,
О. М. Леонович

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії
медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА РИЗИК РОЗВИТКУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У ДІТЕЙ З 4a/4b ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНА eNOS ПРИ ТРИВАЛОМУ НАДХОДЖЕННІ ¹³⁷Cs ДО ОРГАНІЗМУ

Мета. Визначити особливості метаболізму оксиду азоту та ризик розвитку ендотеліальної дисфункції у дітей з 4a/4b поліморфізмом гена e-NOS, які мешкають за умов тривалого надходження ¹³⁷Cs до організму.

Матеріали та методи. Проведено обстеження 117 дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій та 50 дітей контрольної групи. Визначали рівень стабільних метаболітів у сироватці крові (NO²⁻ та NO³⁻). Для реєстрації ендотеліалезалежної реакції судинного русла на зміни умов кровопостачання використовували термографічний спосіб. Вентиляційну спроможність легенів оцінювали за допомогою методу пневмотахографії. Дослідження поліморфізму в 4-му інтроні гена eNOS здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції. Вміст ¹³⁷Cs в тілі дітей визначали за допомогою лічильника випромінювання людини Скриннер-ЗМ.

Результати та висновки. У дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій з генотипом 4a/4b у порівнянні з дітьми, які мали генотип 4b/4b, відмічалось зниження вмісту нітриту в сироватці крові, збільшення термографічного показника тривалості періоду відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби, що вказує на зниження NO-синтазної активності судинного ендотелію в осіб-носіїв мінорного алеля a в 4-му інтроні гена eNOS (генотип 4a/4b) та є фактором ризику розвитку ендотеліальної дисфункції. Доведено зменшення показника еластичності і розтяжності легеневої тканини – ФЖЄЛ/НФЖЄЛ у дітей основної групи з генотипом 4a/4b в порівнянні з дітьми з генотипом 4b/4b, мало місце також зниження інтегрального показника прохідності дихальних шляхів – ОФВ₁/НОФВ₁. Виявлено зворотню кореляційну залежність між наявністю алеля a в генотипі та величиною показників ФЖЄЛ/НФЖЄЛ (r = -0,259; p < 0,05) і ОФВ₁/НОФВ₁ (r = -0,2627; p < 0,05). Ознаки бронхоспазму виявлені у носіїв алеля a в 1,5 раза частіше, ніж у дітей гомозигот з алеля b.

Ключові слова: діти, радіоактивний цезій, оксид азоту, 4a/4b поліморфізм гена eNOS, ендотеліальна дисфункція.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2018. Вип. 23. С. 462–470. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-462-470.

✉ Степанова Євгенія Іванівна, e-mail: profstepanova@i.ua

Ye. I. Stepanova✉, I. Ye. Kolpakov, V. M. Zyhala, V. Yu. Vdovenko, V. V. Vasylenko, O. M. Leonovych

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Melnykova str., Kyiv, 04050, Ukraine

FEATURES OF NITRIC OXIDE METABOLISM AND RISK OF DEVELOPING ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN CHILDREN WITH e-NOS GENE *4a/4b* POLYMORPHISM UNDER LONG-TERM ENTERING ¹³⁷Cs TO BODY

Objective. To determine the features of the nitrogen oxide metabolism and risk of developing endothelial dysfunction in children with e-NOS *4a/4b* gene polymorphism, who live under prolonged enter ¹³⁷Cs to the body.

Materials and methods. There were examined 117 children-residents of radioactively contaminated territories and 50 children of control group. The level of stable metabolites was defined in blood serum (NO²⁻ and NO³⁻). The thermographic method was used to register the endothelium dependent reaction of the vascular bed to changes in the blood supply. The ventilation capacity of the lungs was evaluated using this method of pneumotachography. Polymorphism in intron 4 of the gene e-NOS was studied by the method of polymerase chain reaction. The content of ¹³⁷Cs in the body of children was determined using a human radiation counter Skrynner M-3.

Results and conclusions. In children-residents of radioactively contaminated territories with genotype *4a/4b* comparing to children who had genotype *4b/4b*, the decrease in the nitric content of in the blood serum, the increase in the thermographic index of the recovery period of blood circulation to the baseline level after occlusion test were noted, that is indicative of the decreased NO-synthase active of vascular endothelium in the carriers of the minor allele *a* in the 4th intron of gene eNOS (genotype *4a/4b*), and is a risk factor for development of endothelial dysfunction. It was proved a decrease in the index of lung tissue elasticity and stretchability – FVC / NFVC of the lungs comparing to children with genotype *4b/4b*, there was a reduction of integral index of respiratory tract permeability – FEV₁/NFEV₁. The inverse correlation dependence between the presence of allele *a* in the genotype and the values of FVC/NFVC of the lungs ($r = -0.259$; $p < 0.05$) and FEV₁/NFEV₁ ($r = -0.2267$; $p < 0.05$) was found. Signs of bronchospasm were found in the carriers of the allele *a* in 1.5 times more often than in children-carriers of homozygotes from allele *b*.

Key words: children, radioactive cesium, nitric oxide, eNOS *4a/4b* gene polymorphisms.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2018;23:462-470. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-462-470.

ВСТУП

Відомо, що низькі дози радіації, отримані протягом тривалого часу, спричиняють значні зміни в пулах стабільних метаболітів NO, що призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції (ЕД) та може бути причиною порушення NO-залежних фізіологічних функцій організму [1, 2].

Дослідженнями останніх років доведено, що ймовірність розвитку та тяжкість перебігу переважної більшості мультифакторіальних захворювань залежить не лише від дії несприятливих факторів навколишнього середовища, але й від генотипу хворого, генетичних варіацій певних генів (алельного поліморфізму). У регуляції продукції оксиду азоту ендотеліальними клітинами важлива роль належить ендотеліальній синтазі NO – eNOS [3, 4]. Ендотеліальна синтаза оксиду азоту є продуктом гена eNOS, який розташований на хромосомі 7 (7q35–36), має розміри 21 т. п. н. і кодує білок з мо-

INTRODUCTION

It is known that low doses of radiation received for a long time, cause significant changes in the pools of NO stable metabolites, which lead to development of endothelial dysfunction and may cause disorders in NO-dependent physiological body functions [1, 2].

Recent studies have shown that the probability of development and the severity of the course of majority of multifactorial diseases depend not only on the adverse environmental factors, but also on the genotype of patient, genetic variations of certain genes (allelic polymorphism). Endothelial NO-synthase (eNOS) plays an important role in the regulation of nitric oxide production by endothelial cells [3, 4]. Endothelial nitric oxide synthase is a product of the eNOS gene located on chromosome 7 (7q35–36), has a size of 21 kb. and encodes a protein with a molecular weight of 135 kD, which con-

лекулярної масою 135 кД, що складається з 1203 амінокислот [5]. На сьогодні описані поліморфні варіанти гена eNOS в різних ділянках гена, у тому числі, в 4-му інтроні – 4a/4b VNTR-поліморфізм, дослідженням якого приділяється все більше уваги. Хоча поліморфізм в інтроні 4, представлений двома алелями (4a/4b), не є структурним, отримані наукові дані, які вказують на біологічну і функціональну роль поліморфних варіантів в некодуючих регіонах, що відкриває нові можливості досліджень патогенезу багатьох захворювань [2, 5–7].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Визначити особливості метаболізму оксиду азоту та ризик розвитку ендотеліальної дисфункції у дітей з 4a/4b поліморфізмом гена e-NOS, які мешкають за умов тривалого надходження ¹³⁷Cs до організму.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено обстеження 117 дітей – мешканців населених пунктів Народицького району Житомирської області та 50 дітей групи нозологічного контролю, які проживали на «чистих» щодо радіаційного забруднення територіях і не належали до постраждалих внаслідок Чорнобильської аварії контингентів.

Визначення рівня азотистих сполук у сироватці крові (NO²⁻ та NO³⁻) проводили за стандартною методикою з використанням реактиву Грісса [8]; вміст аргініну в сироватці крові вивчали за методом [9]; ендотелійзалежну реакцію судинного русла на зміни умов кровопостачання – термографічним способом [10]. Вентиляційну спроможність легенів оцінювали за допомогою методу пневмотахографії [11]. Поліморфізм в 4-му інтроні гена eNOS досліджували за методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яку проводили за протоколом [12] з використанням ліофілізованих комерційних наборів реагентів. Вміст ¹³⁷Cs в тілі дітей визначали за допомогою лічильника випромінювання людини Скриннер-3М.

Статистична обробка отриманих даних проводилась за допомогою стандартних програм на персональному комп'ютері з використанням пакету програм StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10 [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При клінічному обстеженні дітей основної групи виявлена патологія у вигляді функціональної диспепсії – у 57,3 %, дискінезії жовчовивідних шляхів – у 68,4 % дітей. У 37,6 % дітей виявлена вторинна кардіопатія, яка у 78,6 % випадків супроводжувалася вегетатив-

нозних варіантів гена eNOS в різних частинах гена описані, включаючи 4th інтрон – 4a/4b VNTR-поліморфізм, дослідженням якого приділяється все більше уваги. Хоча поліморфізм в інтроні 4, представлений двома алелями (4a/4b), не є структурним, отримані наукові дані вказують на біологічну і функціональну роль поліморфних варіантів в некодуючих регіонах, що відкриває нові можливості для вивчення патогенезу багатьох захворювань [2, 5–7].

OBJECTIVE

To determine the nitrous oxide metabolism and the risk of developing endothelial dysfunction in children with 4a/4b polymorphism of e-NOS gene, who live under prolonged enter ¹³⁷Cs to the body.

MATERIALS AND METHODS

There were examined 117 children-residents of settlements of Narodichy district of Zhytomyr region and 50 children of the nosological control group who lived in the «clean» radiation contamination territories and did not belong to the contingents affected by the Chernobyl accident.

The level of stable metabolites was defined in blood serum (NO²⁻ and NO³⁻) by standard method using the Griess reagent [8]; arginine content in blood serum was studied by the method [9]; endothelium-dependent reaction of the vascular bed to changes in blood supply – by thermographic method [10]. The ventilation capacity of the lungs was evaluated using the method of pneumotachography [11]. Polymorphism in intron 4 of the gene eNOS was studied by the method of polymerase chain reaction which carried out by the protocol [12] using commercial kits of lyophilized reagents. The content of ¹³⁷Cs in children body was determined using a human radiation counter Skrynner M-3.

Statistical processing of the data was performed using standard programs on a personal computer using the StatSoft, Inc. software package (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10 [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Pathology in the form of functional dyspepsia was found in 57.3 %, dyskinesia of the biliary tract – in 68.4 %, secondary cardiopathy – in 37.6 % of children, which was accompanied by vegetative dysfunction in 78.6 %, the presence of latent bronchospasm

ною дисфункцією, а в 55,6 % – наявністю прихованого бронхоспазму. З вогнищ хронічної інфекції виявлялися хронічний компенсований тонзиліт – у 70,9 % та карієс зубів – у 38,5 % дітей. До групи нозологічного контролю увійшли 50 дітей, які мешкали на «чистих» щодо радіоактивного забруднення територіях і не належали до постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи контингентів. Частота клінічних симптомів і виявленої патології у дітей групи нозологічного контролю не відрізнялася від дітей основної групи.

Дослідження вмісту інкорпорованого ^{137}Cs в тілі проведено у дітей, які постійно проживають у населених пунктах Народицького району зі щільністю забруднення ґрунтів ^{137}Cs від 185 до 555 кБк/м². Показано, що він коливався у значному діапазоні – від 111 до 7067 Бк, складаючи у середньому 1069 Бк. Розподіл дітей за вмістом інкорпорованого ^{137}Cs в тілі представлений на рисунку 1. Розрахунки показали, що для цього розподілу 90 % квантиль становив 2200 Бк. Це означає, що у 90 % обстежених дітей вміст ^{137}Cs в тілі не перевищуватиме 2200 Бк.

Результати дослідження показали, що серед дітей основної групи *4b/4b* генотип виявлявся у 78 (66,7 %), *4a/4b* – у 39 (33,3 %) дітей, а серед дітей контрольної групи, відповідно, – у 34 (68,0 %) та у 13 (26,0 %). Генотип *4a/4a* реєструвався зрідка. Він визначений всього у 3 дітей контрольної групи.

Співвідношення алелів *4a* та *4b* в основній і контрольній групах також було практично однаковим і складало, відповідно 16,8 % і 18,4 % ($p > 0,05$) та 83,2 % і 81,6 % ($p > 0,05$). Отримані результати суттєво не відрізнялися від даних досліджень інших авторів [6].

– in 55,6 % under the clinical examination of children of the main group. Chronic compensated tonsillitis was detected in 70.9 % and caries of teeth – in 38.5 % of children among the focal chronic infection. The group of nosological control included 50 children who lived on the «clean» areas of radioactive contamination and were not part of the contingents affected by the Chornobyl disaster. The frequency of clinical symptoms and detected pathology in children of the nosological control group did not differ from the children of the main group.

Content of incorporated ^{137}Cs was studied in children living permanently in settlements of Narodichy district with density of soil contamination with ^{137}Cs 185–555 kBq/m². It fluctuated in a significant range from 111 to 7067 Bq, making an average of 1069 Bq. Distribution of children according to incorporated content of ^{137}Cs is presented in Figure 1. The calculations showed that the 90 % quantile for this distribution was 2200 Bq. It means that in the 90 % of examined children, the content of ^{137}Cs in the body not exceeded 2200 Bq.

Among the children of the main group *4b/4b* genotype was found in 78 (66.7 %), *4a/4b* – in 39 (33.3 %) children, and among the control group of children, in 34 (68.0%) and in 13 (26.0%), respectively. Genotype *4a/4a* was registered occasionally, namely only in 3 children of control group.

The correlation of the alleles *4a* and *4b* in the main and control groups was also practically the same and accounted 16.8 % and 18.4 %, $p > 0.05$ and 83.2 % and 81.6 % $p > 0.05$, respectively. The results obtained did not differ significantly from those of other authors [6].

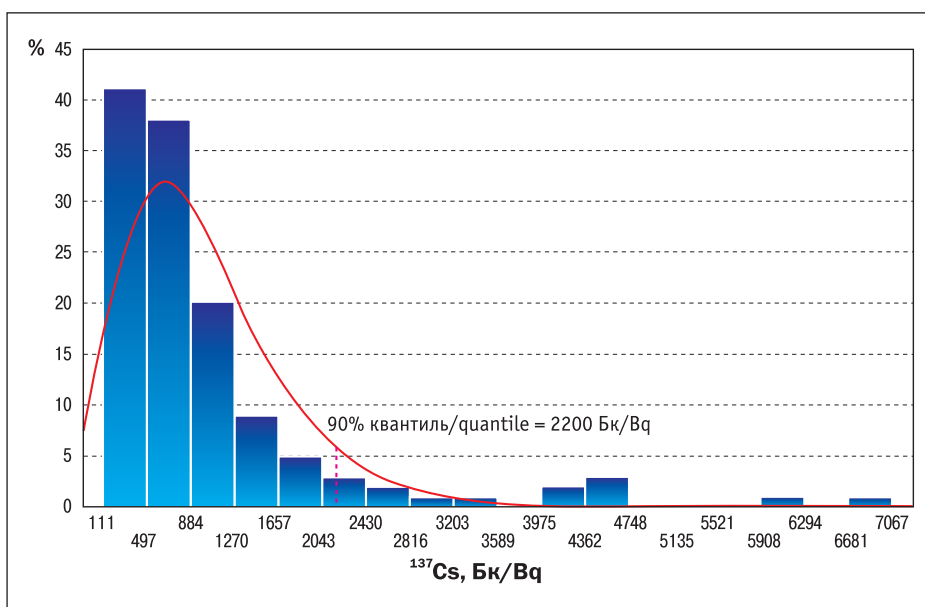


Рисунок 1. Розподіл дітей за вмістом інкорпорованого ^{137}Cs
Figure 1. Distribution of children by the content of incorporated ^{137}Cs

Для встановлення особливостей NO-синтазної активності ендотелію у дітей з *4a/4b* поліморфізмом гена eNOS досліджена тривалість періоду відновлення термографічного показника кровообігу (ТПв) до вихідного рівня після оклюзійної проби.

Отримані результати вказують на те, що у дітей основної групи з генотипом *4a/4b* відмічалось збільшення тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби – ($3,67 \pm 0,25$) хв, у порівнянні з дітьми, які мали генотип *4b/4b*, – ($3,00 \pm 0,21$) хв, $p < 0,05$. За даними кореляційного аналізу виявлено прямий кореляційний зв'язок між наявністю у генотипі алеля *a* та тривалістю відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби (ТПв), $r = 0,3549$ ($p < 0,01$).

Аналогічна тенденція спостерігалася у дітей контрольної групи, проте статистично значущого рівня вона не досягала.

Дослідження вмісту нітриту у сироватці крові показало, що у дітей основної групи з генотипом *4a/4b* він був нижчим, ніж у дітей, які мали генотип *4b/4b*, – ($5,53 \pm 0,26$) мкмоль/л і ($6,99 \pm 0,38$) мкмоль/л, відповідно, $p < 0,01$.

Для визначення ймовірної залежності рівня нітриту у сироватці крові від вмісту інкорпорованого ^{137}Cs у дітей з *4a/4b* та *4b/4b* генотипами гена eNOS застосовано регресійний аналіз. Встановлено, що рівень нітриту при генотипі *4a/4b* мав лінійну залежність від вмісту інкорпорованого ^{137}Cs в тілі (рівняння регресії (1), рис. 2).

Рівняння лінійної регресії мало наступний вигляд:

$$y = 6,82 - 0,0012 \cdot x \quad (1)$$

де y – рівень нітриту у сироватці крові, мкмоль/л; x – вміст ^{137}Cs в тілі, Бк.

To determine the characteristics of endothelial NO-synthase activity in children with *4a/4b* polymorphism of eNOS gene the duration of recovery period of the thermographic index of blood circulation to the baseline after occlusion test was studied.

The obtained results indicate that an increase in the duration of the blood circulation recovery to the baseline after the occlusion (3.67 ± 0.25 min) was observed in children of the main group with genotype *4a/4b* in comparison with children with genotype *4b/4b* (3.00 ± 0.21 min), $p < 0.05$. A direct correlation between the presence of the allele *a* in genotype and duration of recovery of blood circulation to baseline after occlusion test, $r = 0.3549$ ($p < 0.01$) were revealed according to data of correlation analysis.

A similar tendency was observed in the control group of children, but it did not reach a statistically significant level.

The study of nitrite content in serum blood showed that it was lower (5.53 ± 0.26 $\mu\text{mol/l}$) in children of the main group with genotype *4a/4b*, compared with children who had the genotype *4b/4b* (6.99 ± 0.38) $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.01$.

A regression analysis was used to determine the probable dependence of serum nitrite levels on the content of incorporated ^{137}Cs in children with *4a/4b* and *4b/4b* genotypes of the eNOS gene. It was established that the nitrite level in the genotype *4a/4b* had a linear dependence on the content of incorporated ^{137}Cs (regression equation (1), Fig. 2).

The linear regression equation was as follows:

$$y = 6.82 - 0.0012 \cdot x \quad (1)$$

where y is the level of nitrite in serum, $\mu\text{mol/l}$; x is content of ^{137}Cs in the body, Bk.

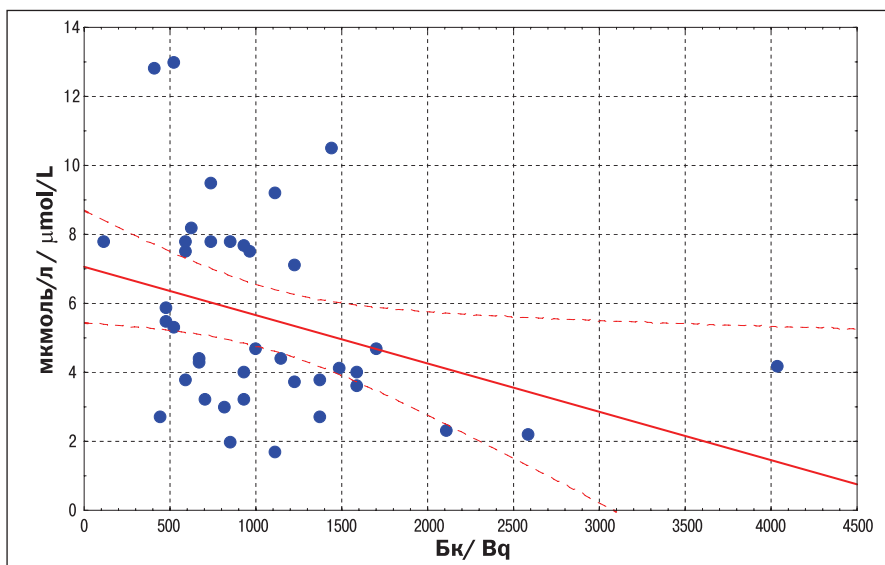


Рисунок 1. Залежність рівня нітриту у сироватці крові від вмісту інкорпорованого ^{137}Cs в тілі у дітей з генотипом *4a/4b* гена eNOS

Figure 1. Dependence of the serum nitrite level on the content of ^{137}Cs incorporated in children with genotype *4a/4b* of gene eNOS

Коефіцієнт кореляції становив $r = -0,340$, ($p < 0,001$), коефіцієнт детермінації $R^2 = 0,115$, ($p < 0,001$).

У дітей з $4b/4b$ генотипом, також спостерігалася тенденція до зниження рівня нітриту при підвищенні вмісту ^{137}Cs в тілі, проте вона не досягала статистичної значущості ($p > 0,05$). Що стосується рівня нітрату та суми метаболітів NO (нітрит + нітрат), то у дітей як з генотипом $4a/4b$, так і з генотипом $4b/4b$, статистичних відмінностей не встановлено.

Отже, зіставлення вмісту нітриту в сироватці крові та тривалості періоду відновлення термографічного показника кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби з вмістом інкорпорованого ^{137}Cs в тілі у дітей з $4a/4b$ і $4b/4b$ генотипами свідчить про зниження NO-синтазної активності ендотелію у носіїв мінорного алеля a гена eNOS та наявність лінійної залежності рівня нітриту від вмісту інкорпорованого ^{137}Cs в тілі.

Розрахунки відносного ризику (RR) розвитку ендотеліальної дисфункції при $4a/4b$ генотипі гена eNOS показали, що він дорівнював 1,600 (95,0 %; CI: 1,168–2,192, $p < 0,01$), тобто діти з генотипом $4a/4b$ мали підвищений ризик розвитку ендотеліальної дисфункції у порівнянні з $4b/4b$ генотипом.

Відомо, що зниження продукції оксиду азоту ендотеліальними клітинами супроводжується порушенням функції дихальної системи з розвитком бронхоспазму [14, 15]. З огляду на більш тривалий період відновлення кровообігу після оклюзії і низький рівень нітриту у носіїв алеля a , ми вважали доцільним проаналізувати стан вентиляційної спроможності легенів у дітей з поліморфізмом у 4-му інтроні гена eNOS.

При аналізі середніх показників вентиляційної спроможності легень у дітей основної групи з генотипом $4a/4b$ виявлено зменшення показника еластичності і розтяжності легеневої тканини – ФЖЄЛ / НФЖЄЛ ($90,5 \pm 2,1$) % в порівнянні з дітьми з генотипом $4b/4b$ – ($96,7 \pm 1,8$) % ($p < 0,05$); мало місце також зниження інтегрального показника прохідності дихальних шляхів – ОФВ₁/НОФВ₁ – ($93,3 \pm 2,8$) % і ($100,8 \pm 2,1$) % ($p < 0,05$). Виявлено зворотню кореляційну залежність між носійством алеля a , величиною показників ФЖЄЛ/НФЖЄЛ ($r = -0,259$; $p < 0,05$) і ОФВ₁/НОФВ₁ ($r = -0,263$; $p < 0,05$).

Дослідження вентиляційної спроможності легенів свідчать про те, що ознаки бронхоспазму виявлені у 66,7 % дітей з $4a/4b$ генотипом і у 44,12 % дітей з $4b/4b$ генотипом ($p < 0,05$), тобто порушення вентиляційної спроможності легенів у носіїв алеля a відзначалися в 1,5 раза частіше, ніж у дітей з $4b/4b$ генотипом.

Coefficients of correlation and determination were $r = -0.340$ ($p < 0.001$) and $R^2 = 0.115$ ($p < 0.001$).

In children with genotype $4b/4b$, there was also a tendency to decrease the level of nitrite when ^{137}Cs content was increased in the body, not reaching statistical significance ($p > 0.05$). Regarding the nitrate level and the amount of NO metabolites (nitrite + nitrate), no statistical differences were found in children with both $4a/4b$ and $4b/4b$ genotypes.

Hence, the comparison of serum nitrite content and duration of recovery of thermographic index in circulation to the baseline level after the occlusion test, in children with genotypes $4a/4b$ and $4b/4b$ indicates a decrease in the endothelial NO-synthase activity in the carriers of minor allele a of the eNOS gene and a presence of linear dependence of the nitrite level on the content of incorporated ^{137}Cs .

Relative risk for the development of endothelial dysfunction at genotype $4a/4b$ of the eNOS gene was 1.600 (95.0 %; CI: 1.168–2.192, $p < 0.01$), that is, children with genotype $4a/4b$ had an increased risk of developing endothelial dysfunction compared with genotype $4b/4b$.

It is known that the decrease in the nitric oxide production by endothelial cells is accompanied by a disorder of the respiratory system with the development of bronchospasm [14, 15]. Considering the longer period of post-occlusion recovery and the low level of nitrite in carriers of allele a , we considered advisable to analyze the state of lung ventilation in children with polymorphism in the 4th intron of eNOS gene.

In the analysis of ventilation capacity of lungs in children of the main group with genotype $4a/4b$, the decrease in the index of elasticity and stretchability of lung tissues – FVC/ NFVC (90.5 ± 2.1) % compared with children of the genotype $4b/4b$ – (96.7 ± 1.8) % ($p < 0.05$) was noted; there was also a decrease in the integral index of respiratory tract permeability – FEV₁/NFEV₁ – (93.3 ± 2.8) % and (100.8 ± 2.1) % ($p < 0.05$). The inverse correlation between the carrier of allele a and the values of the FVC/NFVC parameters ($r = -0.259$; $p < 0.05$) and FEV₁/NFEV₁ ($r = -0.263$; $p < 0.05$) was found.

Studies of lung ventilation capacity indicate that signs of bronchospasm were detected in 66.7 % of children with genotype $4a/4b$ and in 44.12 % of children with genotype $4b/4b$ ($p < 0.05$), that is, the disorders of lung ventilation capacity in carriers of allele a were occurred 1.5 times more frequently than in children with genotype $4b/4b$.

Патофізіологічні механізми виявлених функціональних змін у системі дихання можна розглядати з наступних позицій. Вважають, що нестача NO сприяє підвищенню тонуусу гладеньких м'язів бронхів та їх звуженню при обструктивних захворюваннях легенів [16, 17]. Про патогенетичне значення дефіциту NO при обструктивних бронхолегеневих захворюваннях свідчить той факт, що інгаляції низьких концентрацій NO дають сприятливий терапевтичний ефект стосовно усунення бронхоспазму і легеневої гіпертензії [16]. За даними [15, 17], у дітей з рецидивуючим обструктивним бронхітом і бронхіальною астмою виявлена наявність ендотеліальної дисфункції, проявами якої є низький рівень нітриту, пов'язаний з пригніченням NO-синтазної активності ендотелію.

Отже, результати проведених досліджень вказують на зниження NO-синтазної активності ендотелію у носіїв алеля *a*, тому дітей з генотипом *4a/4b* можна віднести до групи ризику з розвитку ендотеліальної дисфункції, особливо при проживанні в екологічно несприятливих умовах, а функціональні порушення системи дихання розглядати як її прояви.

ВИСНОВКИ

1. У дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій з генотипом *4a/4b* у порівнянні з дітьми, які мали генотип *4b/4b*, відмічалось зниження вмісту нітриту в сироватці крові, збільшення термографічного показника тривалості періоду відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби, що вказує на зниження NO-синтазної активності судинного ендотелію в осіб-носіїв мінорного алеля *a* в 4-му інтроні гена eNOS (генотип *4a/4b*), та є фактором ризику розвитку ендотеліальної дисфункції.
2. Доведено зменшення показника еластичності і розтяжності легеневої тканини – ФЖЄЛ/НФЖЄЛ у дітей основної групи з генотипом *4a/4b* порівняно з дітьми з генотипом *4b/4b*, мало місце також зниження інтегрального показника прохідності дихальних шляхів – ОФВ₁/НОФВ₁. Виявлено зворотню кореляційну залежність між наявністю алеля *a* в генотипі та величиною показників ФЖЄЛ/НФЖЄЛ ($r = -0,259$; $p < 0,05$) і ОФВ₁/НОФВ₁ ($r = -0,2627$; $p < 0,05$). Ознаки бронхоспазму виявлені у носіїв алеля *a* в 1,5 раза частіше, ніж у дітей-гомозигот з алеля *b*.

The pathophysiological mechanisms of the revealed functional changes in respiratory system can be considered from the following positions. It is believed that the lack of NO promotes an increase of the smooth muscle tone in bronchi and their narrowing in obstructive pulmonary diseases [16, 17]. On the pathogenic role of NO deficiency in the obstructive bronchopulmonary diseases is evidence the fact that inhalations of low NO concentrations provide beneficial therapeutic effect in respect of eliminating bronchospasm and pulmonary hypertension [16]. According to [15, 17], in children with recurrent obstructive bronchitis and bronchial asthma, endothelial dysfunction was detected, the manifestation of which is the low levels of nitrite associated with inhibition of endothelial NO-synthase activity.

Therefore, the results of conducted studies indicate a decrease in endothelial NO-synthase activity in the carriers of allele *a*, therefore, children of genotype *4a/4b* can be considered a risk group for the development of endothelial dysfunction, especially when living in environmentally unfavorable conditions, and functional disorders of the respiratory system should be regarded as manifestations.

CONCLUSIONS

1. In children-residents of radioactively contaminated territories with genotype *4a/4b* compared with children who had genotype *4b/4b*, there was the decrease in the serum nitrite concentration, the increase in the thermographic index of the recovery period of blood circulation to the baseline after occlusion test, indicating a decrease of NO-synthase activity of vascular endothelium in the carriers of the minor allele *a* in the 4th intron of the gene eNOS (genotype *4a/4b*), and is a risk factor for development of endothelial dysfunction.
2. In children of the main group with genotype *4a/4b* the decrease in the index of elasticity and stretchability of lung tissue – FVC/NFVC of the lungs comparing to children with genotype *4b/4b* is proved, along with a reduction of integral index of respiratory tract permeability – FEV₁/NFEV₁. A reverse correlation between the presence of allele *a* in the genotype and the value of parameters indices FVC/NFVC of the lungs ($r = -0.259$; $p < 0.05$) and FEV₁/NFEV₁ ($r = -0.2267$; $p < 0.05$) was found. Signs of bronchospasm were found in the carriers of the allele *a* in 1.5 times more often than in homozygous children with allele *b*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Оцінка змін метаболітів оксиду азоту у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій / Є. І. Степанова, Є. І. Колпаков, Г. Й. Лавренчук, В. Г. Кондрашова, О. М. Литвинець. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. Київ, 2013. Вип. 22 (кн. 3). С. 299–304.
2. Гороть І. В., Ткаченко М. М. Особливості ультраструктурної організації і метаболізму реактивних форм кисню і азоту в серцево-судинній системі за постійної дії іонізуючого випромінювання у низьких дозах. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2017. Вип. 22. С. 184–201.
3. Головченко Ю. И., Трещинская М. А. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции. *Consilium medicum Ukraina*. 2008. № 11. С. 38–40.
4. Bokhari A. R., Murrell G. A. The role of nitric oxide in tendon healing. *J. Shoulder Elbow Surg.* 2012. Vol. 21(2). P. 238–244.
5. Севостьянова И. В., Воронина Л. П., Полунина Е. А., Полунин И. Н. Влияние полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота на состояние сосудистого эндотелия у больных бронхиальной астмой. *Астраханский медицинский журнал*. 2013. Т. 8, № 3. – С. 83–85.
6. Endothelial no-synthase intron 4 polymorphism is associated with disturbed in vivo nitric oxide production in individuals prone to type 2 diabetes / K. Rittig, K. Holder, J. Stock et al. *Horm. Metab. Res.* 2008. №40. P. 13–17.
7. Генетический полиморфизм эндотелиальной синтазы оксида азота при ишемической болезни сердца / М. Hasanzad, М. Imeni, М. Mohammadhasani et al. *Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний*. 2014. Т. 2, № 2. С. 34–36.
8. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J. A. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982. Vol. 126, no. 1. P. 131–138.
9. Веремеенко К. Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Київ : Здоров'я, 1971. 216 с.
10. Березовський В. Я., Динник О. Д., Літовка І. Г. Реактивна гіперемія як показник якості функціонування ендотелію. *Мед. гідрологія та реабілітація*. 2006. Т.6, № 1. С. 4–11.
11. Савельев Б. П., Ширяева И. С. Функциональные параметры системы дыхания у детей и подростков : руководство для врачей. М. : Медицина, 2001. 231 с.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М. : Мир, 1984. – 480 с.
13. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М. : Медиа-сфера. 2014. 312 с.
14. Стародумов Н. И., Прохоренко И. О. Дисфункция эндотелия у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких под воздействием факторов внешней и внутренней среды. *Морфологические ведомости*. 2011. № 2. С. 115–119.
15. Одинец Ю. В., Васильченко Ю. В. Клиническое значение метаболитов оксида азота в развитии эндотелиальной дисфункции у детей с бронхиальной астмой. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2016. № 4. С. 65–68.

REFERENCES

1. Stepanova Yel, Kolpakov IYe, Lavrenchuk GI, Kondrashov VG, Lytvynets AM. [Estimation of changes in nitric oxide metabolites of children - residents of radioactively contaminated territories]. *Zbirnyk naukovykh prats? spivrobitnykiv NMAPO im. P. L. Shupyka*. - Kyiv, 2013. -Vyp. 22 (kn. 3). - P. 299-304. Ukrainian.
2. Horot IV, Tkachenko MM. Features of ultrastructural organization and metabolism of reactive oxygen and nitrogen forms in the cardiovascular system under continuous effect of ionizing radiation in low doses. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2017;22:184-201.
3. Golovchenko Yul, Treshchinskaya MA. [Review of contemporary ideas about endothelial dysfunction]. *Consilium medicum Ukraine*. 2008;(11):38-40. Russian.
4. Bokhari A. R., Murrell G. A. The role of nitric oxide in tendon healing. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012;21(2):238-44.
5. Sevost'yanova IV, Voronina LP, Polunina EA, Polunin IN. [Influence of the polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene on the state of vascular endothelium in patients with bronchial asthma]. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013;8(3):83-5. Russian.
6. Rittig K, Holder K, Stock J, Tschritter O, Peter A, Stefan N, et al. Endothelial NO-synthase intron 4 polymorphism is associated with disturbed in vivo nitric oxide production in individuals prone to type 2 diabetes. *Horm Metab Res*. 2008;40:13-7.
7. Hasanzad M, Imeni M, Mohammadhasani M, Hassanzad M, Jamalini SH. [Genetic polymorphism of endothelial nitric oxide synthase in ischemic heart disease]. *Mezhdunarodnyy zhurnal serdtsa i sosudistykh zabolevaniy*. 2014;2(2):34-6. Russian.
8. Green LC, Wagner DA, Glogowski JA. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982;126(1):131-8.
9. Veremeyenko KN. [Enzymes of proteolysis and their inhibitors in medical practice]. Kyiv: Health; 1971. 216 p. Russian.
10. Berezovsky VYa, Dynnyk OD, Litovka IH. [Reactive hyperemia as an indicator of the quality of the endothelial function]. *Medychna Hidrolohiya ta Reabilitatsiya*. 2006;6(1):4-11. Ukrainian.
11. Savel'yev BP, Shiryayev IS. [Functional parameters of the respiratory system in children and adolescents: a guide for doctors]. Moscow: Meditsina; 2001. 231 p. Russian.
12. Maniatist T, Fritz E, Sambruck J. [Methods of genetic engineering]. *Molecular cloning*. Moscow: Mir; 1984. 480 p. Russian.
13. Rebrova OYu. [Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTICA application package]. Moscow: Media Sphere; 2014. 312 p. Russian.
14. Starodumov NI, Prokhorenko IO. [Endothelial dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease under the influence of external and internal factors]. *Morfologicheskiye vedomosti*. 2011;(2):115-9. Russian.
15. Odinetes YuV, Vasychenko YuV. [Clinical significance of nitric oxide metabolites in the development of endothelial dysfunction in

16. Чайковская И. В., Семёнова О. А. Эндотелиальная дисфункция и её роль при патологических процессах. *Університетська клініка*. 2011. №2. С. 210–213.

17. Маркеры активации эндотелия у детей, больных бронхиальной астмой с разной степенью контроля симптомов заболевания / Л. Л. Гурьева, Н. А. Орлова, Э. И. Эткина, С. Э. Якута. *Вестник новых медицинских технологий*. 2011. Т. 18, № 3. С. 198–200.

children with bronchial asthma]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2016;(4):65-8. Russian.

16. Tchaikovsky IV, Semenova OA. [Endothelial dysfunction and its role in pathological processes]. *Universytets?ka klinika*. 2011;2:210-3. Russian.

17. Gur'yeva LL, Orlova NA, Etkina EI, Yakuta SE. [Activation markers of endothelium in children suffering from bronchial asthma with varying degrees of control with impulses of the disease]. *Vestnyk novykh medytsynskykh tekhnolohyy*. 2011;18(3)198-200. Russian.

Стаття надійшла до редакції 21.08.2018

Received: 21.08.2018