

Ассоциации полиморфных вариантов генов подверженности бронхиальной астме

Бабушкина Н.П.¹, Брагина Е.Ю.¹, Буйкин С.В.¹, Салтыкова И.В.², Назаренко М.С.¹, Тарасенко Н.В.¹, Кулиш Е.В.¹, Маркова В.В.¹, Половкова О.Г.¹, Кучер А.Н.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», Томск, 634050, Набережная р. Ушайки, 10. E-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru
² — ГБОУ ВПО Сибирского государственного медицинского университета Минздрава РФ, Томск, 634050, ул. Московский тракт, 2

Бронхиальная астма (БА) является клинически гетерогенной многофакторной патологией с существенной наследственной компонентой в этиологии, которая до конца не установлена. Целью настоящего исследования было изучение ассоциаций полиморфизма плейотропных генов с БА и её эндофенотипами. Проанализировано 23 полиморфных варианта 17 генов. Выявлены ассоциации с астмой и её эндофенотипами девяти генов (*IL12A*, *LTA*, *TNF*, *TNFRSF1B*, *IFNGR2*, *NOS3*, *AGTR1*, *GNB3*, *PPP3R1*); показано, что в развитие изолированной БА и её сочетаний с сопутствующими заболеваниями ассоциированные гены вовлечены в различной степени. Продукты большинства патогенов БА: воспаления и бронхоспазма. Установлено, что клинические фенотипы лёгкой, средней и тяжёлой форм БА имеют свои отличительные генетические особенности. Для генов *PPP3R1*, *TNFRSF1B*, *GNB3*, *AGTR1* ассоциативное исследование с БА проведено впервые.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, бронхиальная астма, эндофенотипы

Введение

БА является клинически гетерогенной многофакторной патологией, характеризующейся, в первую очередь, обратимой бронхиальной обструкцией и повышенным уровнем IgE. Заболевание может развиваться в любом возрасте, но в большинстве случаев первые симптомы наблюдаются ещё в детстве. Многочисленные эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что на развитие и формирование особенностей клинического течения аллергических заболеваний значительное влияние оказывает среда обитания (микробное окружение, особенности питания, курение, воздушные загрязнители, аллергены и многое другое). Существенный вклад в развитие БА вносит наследственная компонента, и многочисленные полногеномные исследования, посвящённые данной проблеме, позволили идентифицировать маркеры, ассоциированные с основными фенотипическими проявлениями, совокупность которых реализует патологический фенотип БА. Так, было установлено, что немаловажную роль в подверженности БА играют гены врождённого иммунного ответа, дефекты в которых приводят к нарушению активации и дифференцировки Th2 клеток [13]. Вместе с тем, спектр генов подверженности БА до сих пор не может считаться полным, поскольку БА, как и другие сложные фенотипы, является результатом комплекса биохимических и морфологических преобразований, затрагивающих разные звенья их патогенеза [12]. В то же время, наличие значительной клинической гетерогенности БА позволяет предположить возможность того, что за патологическим фенотипом скрывается несколько различных заболеваний [29], что также вносит опре-

делённые сложности при исследовании генов подверженности БА. Вследствие этого, одним из наиболее актуальных направлений исследования генетической основы БА является оценка вклада различных генетических вариантов в риск развития конкретных форм заболевания, а также выявление их вовлечённости в степень проявления клинических признаков болезни. В настоящее время очерчен круг генов с ярко выраженным плейотропным эффектом, продукты которых задействованы во многих биохимических путях в клетках многих тканей, что определяет их вовлечённость в формирование подверженности широкому спектру многофакторных заболеваний (МФЗ) различной этиологии. Целью настоящего исследования было изучение ассоциаций полиморфизма плейотропных генов с бронхиальной астмой и её эндофенотипами.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись ДНК и клинические данные из Биобанка ФГБНУ «НИИ медицинской генетики». Выборка больных БА составила 150 человек (средний возраст $39,27 \pm 12,31$ года), из которых 114 женщин, 36 мужчин. Диагноз *бронхиальная астма* ставился в медицинских учреждениях г.Томска на основании общепринятых критериев ВОЗ.

Исследованная группа включала 46 чел. с лёгкой формой БА, 95 чел. — со средней и 9 чел. — с тяжёлой формой. Из сопутствующих заболеваний у 124 индивидов был диагностирован атопический ринит (АР) и у 53 чел. — описторхоз (у 26 и 86 чел. соответственно, клинических признаков указанных заболеваний не вы-

явлено). У больных БА были проанализированы следующие количественные показатели: уровень IgE, пиковая скорость выдоха (ПСВ, литры/с), объём форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1, литры), жизненная ёмкость лёгких (ЖЕЛ, литры), индекс Тиффно (ИТ).

В качестве контрольной группы использована популяционная выборка жителей города Томска среднего возраста (96 человек). В обеих изученных группах русские составляли более 90%. От всех обследованных лиц получено информированное согласие на проведение исследования.

Всего было проанализировано 23 полиморфных варианта (22 SNP и 1 VNTR), локализованных в 17 генах: *LTA* (rs909253), *TNF* (rs1800629), *TNFRSF1B* (rs1061622), *IL4* (rs2243291), *IL4R* (rs1801275, rs2074570), *IL12A* (rs568408), *IL12B* (rs3212227, rs3212220), *IL12RB1* (rs3746190, rs11575926), *IFNG* (rs2069705), *IFNGR2* (rs17880053), *ADRB2* (rs1042713, rs1042714), *NOS3* (rs2070744, rs61722009 (VNTR), rs1799983), *ACE* (rs4343), *AGTR1* (rs186), *GNB3* (rs5443), *PPP3R1* (rs11126176), *GATA4* (rs804271).

Сравнения частот аллелей и генотипов проводились как между группой больных БА и контролем, так и между подгруппами больных БА, дифференцированных по качественным признакам, и между каждой из этих подгрупп с контрольной выборкой. Расчёт частот гаплотипов и оценку неравновесия по сцеплению (с использованием показателя *D* и его нормированного значения *r*) проводили методом Хилла [2, 25]. Анализ внутригенных попарных сочетаний генотипов проведён для пяти генов (*NOS3*: rs2070744/VNTR, VNTR/rs1799983, rs2070744/rs1799983; *ADRB2*; *IL4R*; *IL12B*; *IL12RB1*) и пары SNP в генах, формирующих хромосомный кластер (*TNF* и *LTA*). Об ассоциации аллелей, гаплотипов и генотипов с патологическим состоянием и его клиническими формами судили по величине отношения шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI) [35]. При первичном анализе количественных признаков была устранена зависимость их от возраста и пола [8, 14]; для проверки на нормальность распределения использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Для сравнения дисперсий применяли тест Левина; сравнение средних значений нескольких независимых распределений — однофакторный дисперсионный анализ по Фишеру (F-критерий), включая метод линейных контрастов Шеффе [7]. Анализ проводился с использованием пакета программ Statistica for Windows 7.0.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа изученных полиморфных вариантов в контрольной выборке подробно описаны ранее [3—6]. В группе больных отклонение наблюдаемого распределения генотипов от ожидаемого при равновесии Харди—Вайнберга зафиксировано по трём локусам: rs4343 (*ACE*) — за счёт избытка гетерозигот, по обоим исследованным локусам гена *IL12B* — за счёт недостатка гетерозигот.

Сравнение частот аллелей, генотипов, сочетаний генотипов и гаплотипов исследованных маркеров показало, что в формирование патологического фенотипа БА в целом и её эндофенотипов вовлечён полиморфизм четырёх генов (*IL12A*, *NOS3*, *LTA*, *TNF*) (табл. 1, 2); ещё для пяти генов (*AGTR1*, *GNB3*, *TNFRSF1B*, *IFNGR2*, *PPP3R1*) ассоциации выявлены только при анализе её эндофенотипов (табл. 3, 4). Статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов между сравниваемыми в пределах каждого качественного признака подгруппами (лёгкая и средняя формы БА; БА в сочетании с атопическим ринитом и без атопического ринита; БА в сочетании с описторхозной инвазией и изолированная БА) зарегистрировано не было, однако, в ряде случаев выявлены различия между контрольной выборкой и отдельными подгруппами (*AGTR1*, *GNB3*, *IL12A*, *NOS3*, *LTA*, *IFNGR2*, *PPP3R1*) (табл. 3). Также установлены ассоциации ряда генов с количественными признаками, клинически значимыми для БА (*GNB3*, *TNFRSF1B*, *IL12A*) (табл. 4). Продукты большинства генов, показавших в настоящем исследовании ассоциации с БА и её эндофенотипами, участвуют в реализации двух основных механизмов патогенеза БА: воспаления (*LTA*, *TNF*, *TNFRSF1B*, *IL12A*, *IFNGR2*) и бронхоспазма (*NOS3* и *AGTR1*).

В настоящем исследовании для гена *IL12A* (rs568408) получены отличия группы больных БА от популяционной выборки по частотам аллелей ($p = 0,038$) и генотипов ($p = 0,027$) (табл. 1); предрасполагающими являются аллель G ($p = 0,038$), и генотип GG ($p = 0,015$) (табл. 2). Частота гомозигот по аллелю риска максимальна (76,09%) в подгруппе с лёгкой степенью тяжести заболевания, тем не менее статистически значимые отличия от контрольной выборки регистрируются для подгруппы с БА средней степени тяжести ($p = 0,037$) (табл. 3), за счёт более ярко выраженного протективного эффекта гетерозиготного генотипа, частота которого в этой подгруппе в 1,8 раза ниже, чем в контроле. Интересно, что rs568408 гена *IL12A* также оказался ассоциирован с ОФВ1 в изученной группе пациентов, но следует отметить некоторое противоречие, поскольку у носителей генотипа GG, ассоциированного с риском БА, регистрируются наиболее высокие значения этого показателя (2,51 литра) (табл. 4). Данный эффект реализуется главным образом у больных с БА средней степени тяжести: средние значения ОФВ1 в этой подгруппе составили 1,64, 2,45 и 2,47 литров для генотипов AA, GA и GG соответственно ($p = 0,045$); в то время как для подгрупп с лёгкой и тяжёлой степенью такой тенденции не показано. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, согласно которым полиморфизм гена *IL12A* (кодирующего субъединицу p35 ИЛ-12 (модулирует врождённый и адаптивный иммунные ответы; играет значительную роль в дифференцировке Th1 и Th2 клеток; активирует синтез IFN- γ), влияет на лёгочную функцию, тяжесть БА и развитие его обострения [19, 31].

Распределение частот генотипов исследованных полиморфных вариантов в группе больных бронхиальной астмой и в контрольной выборке

Ген (полиморфизм)	Выборка	Генотипы, %			Объем выборки	χ^2 (p)
		3	4	5		
1	2	3	4	5	6	7
ADRB2 (rs1042713)		GG	AG	AA		
	Контроль	40,62	47,92	11,46	96	0,957 (0,62) ¹ 0,001 (0,973) ²
БА	43,92	41,89	14,19	148		
ADRB2 (rs1042714)		CC	CG	GG		
	Контроль	38,54	45,83	15,63	96	0,472 (0,79) ¹ 0,28 (0,611) ²
БА	34,23	48,99	16,78	149		
NOS3 (rs2070744)		T/T	C/T	C/C		
	Контроль	48,96	32,29	18,75	96	4,626 (0,099) ¹ 0,005 (0,941) ²
БА	43,45	44,83	11,72	145		
NOS3 (VNTR)		B/B	A/B	A/A		
	Контроль	67,71	30,21	2,08	96	0,163 (0,922) ¹ 0,041 (0,839) ²
БА	65,33	32,67	2,00	150		
NOS3 (rs1799983)		G/G	G/T	T/T		
	Контроль	62,50	30,21	7,29	96	6,741 (0,034) ¹ 3,914 (0,048) ²
БА	46,00	46,00	8,00	150		
ACE (rs4343)		A/A	A/G	G/G		
	Контроль	31,25	50	18,75	96	1,737 (0,42) ¹ 0,015 (0,904) ²
БА	28,28	57,93	13,79	145		
AGTR1 (rs5186)		A/A	A/C	C/C		
	Контроль	55,21	38,54	6,25	96	1,326 (0,515) ¹ 0,909 (0,34) ²
БА	50,34	39,46	10,2	147		
GNB3 (rs5443)		C/C	C/T	T/T		
	Контроль	57,29	37,5	5,21	96	2,861 (0,239) ¹ 2,522 (0,112) ²
БА	46,00	42,67	11,33	150		
PPP3R1 (rs11126176)		A/A	A/G	G/G		
	Контроль	26,14	55,68	18,18	88	1,362 (0,506) ¹ 0,269 (0,604) ²
БА	26,39	49,3	24,31	144		
GATA4 (rs804271)		GG	GT	TT		
	Контроль	30,11	44,08	25,81	93	0,038 (0,981) ¹ 0,002 (0,969) ²
БА	31,25	43,06	25,69	144		
IL4 (rs2243291)		GG	CG	CC		
	Контроль	52,08	41,67	6,25	96	2,079 (0,354) ¹ 0,844 (0,358) ²
БА	60,66	32,67	6,67	150		
IL4RA (rs1801275)		AA	AG	GG		
	Контроль	76,04	20,83	3,13	96	2,374 (0,305) ¹ 0,652 (0,419) ²
БА	68,67	29,33	2,00	150		
IL4R (rs2074570)		AA	AG	GG		
	Контроль	91,67	8,33	0	96	0,300 (0,587) ¹ 0,250 (0,615) ²
БА	88,67	11,33	0	150		
IL12A (rs568408)		GG	GA	AA		
	Контроль	58,33	38,54	3,13	96	7,236 (0,027) ¹ 4,289 (0,038) ²
БА	74,00	22,67	3,33	150		

Таблица 1 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
<i>IL12B</i> (rs3212227)		AA	AC	CC		
	Контроль	64,58	33,34	2,08	96	3,678 (0,159) ¹ 0,018 (0,893) ²
	БА	67,33	26,00	6,67	150	
		GG	GT	TT		
<i>IL12B</i> (rs3212220)	Контроль	61,46	36,46	2,08	96	4,607 (0,100) ¹ 0,001 (0,975) ²
	БА	66,67	26,67	6,66	150	
<i>IL12RB1</i> (rs3746190)		CC	CT	TT		
	Контроль	41,67	43,75	14,58	96	0,717 (0,699) ¹ 0,586 (0,444) ²
	БА	36,67	46	17,33	150	
		GG	GA	AA		
<i>IL12RB1</i> (rs11575926)	Контроль	66,67	31,25	2,08	96	2,373 (0,305) ¹ 1,348 (0,246) ²
	БА	61,07	32,89	6,04	149	
<i>IFNG</i> (rs2069705)		CC	CT	TT		
	Контроль	34,37	47,92	17,71	96	1,505 (0,471) ¹ 1,273 (0,259) ²
	БА	27,7	50,00	22,3	148	
		dd	Gd	GG		
<i>IFNGR2</i> (rs17880053)	Контроль	62,50	36,46	1,04	96	4,62 (0,099) ¹ 3,457 (0,063) ²
	БА	75,00	24,24	0,76	150	
<i>LTA</i> (rs909253)		A/A	A/G	G/G		
	Контроль	60,41	30,21	9,38	96	8,01 (0,018) ¹ 1,625 (0,202) ²
	БА	45,64	48,32	6,04	149	
		G/G	G/A	A/A		
<i>TNF</i> (rs1800629)	Контроль	76,04	18,75	5,21	96	4,94 (0,085) ¹ 0,0 (0,987) ²
	БА	71,23	27,4	1,37	146	
<i>TNFRSF1B</i> (rs1061622)		TT	GT	GG		
	Контроль	60,42	37,5	2,08	96	1,167 (0,558) ¹ 0,388 (0,533) ²
	БА	57,33	38,00	4,67	150	

Примечание. χ^2 — значение критерия хи-квадрат при сравнении распределений генотипов и аллелей между группой БА и контрольной выборкой; p — достигнутый уровень значимости; ¹ — при сравнении генотипов; ² — при сравнении аллелей.

Значения отношения шансов для генетических маркёров, ассоциированных с БА

Таблица 2

Ген (полиморфный вариант)	Ассоциированные генетические варианты	OR (95%CI)	χ^2 (p)
<i>IL12A</i> (rs568408)	G	1,68 (1,03–2,75)	4,29 (0,038)
	GG	2,03 (1,14–3,64)	5,89 (0,015)
<i>NOS3</i> (rs1799983)	T	1,56 (1,00–2,42)	3,91 (0,048)
	TG	1,97 (1,11–3,51)	5,45 (0,02)
<i>LTA</i> (rs909253)	AG	2,16 (1,22–3,85)	7,18 (0,007)
<i>NOS3</i> (rs2070744/ rs1799983)	CT/GT	2,95 (1,32–6,73)	7,46 (0,006)
<i>LTA/TNF</i> (rs909253/ rs1800629)	AG/GG	(2,06) 1,02–4,21	4,04 (0,045)

Примечание. Здесь и в табл. 3–4 представлены только случаи статистически значимых ассоциаций; OR — значение отношения шансов; 95%CI — 95% доверительный интервал; p — достигнутый уровень значимости.

Генетические маркёры, показавшие ассоциации с клиническими особенностями течения БА

Аллель, генотип	Сравниваемые подгруппы*	OR	CI	χ^2	p
AGTR1, rs5186					
C	БА без AP (42,00) – контроль (25,52)	2,11	1,05–4,24	4,47	0,035
GNB3, rs5443					
T	Лёгкая форма (36,96) – контроль (23,96)	1,86	1,05–3,3	4,57	0,033
T	БА с AP (35,08) – контроль (23,96)	1,72	1,1–2,67	5,83	0,016
CC	БА с AP (41,94) – контроль (57,29)	0,54	0,30–0,96	4,51	0,034
TT + CT	БА с AP (58,06) – контроль (42,71)	1,86	1,05–3,30	4,51	0,034
NOS3, rs1799983					
T	Лёгкая форма (36,96) – контроль (22,40)	2,03	1,14–3,62	5,96	0,015
GT	Лёгкая форма (52,17) – контроль (30,21)	2,52	1,15–5,55	5,51	0,019
GG	Лёгкая форма (36,96) – контроль (62,50)	0,35	0,16–0,77	7,18	0,007
GT	БА с описторхозом, (52,83) – контроль (30,21)	2,59	1,22–5,50	6,47	0,011
LTA, rs909253					
AG	Лёгкая форма (52,7) – контроль (30,21)	2,52	1,15–5,55	5,51	0,019
AG	Средняя форма (47,87) – контроль (30,21)	2,12	1,12–4,02	5,51	0,019
AG	БА без AP (57,69) – контроль (30,21)	3,15	1,19–8,46	5,56	0,018
IL12A, rs568408					
GG	БА без описторхоза, (75,58) – контроль (58,33)	2,21	1,12–4,40	5,31	0,021
GG	БА с AP (74,19) – контроль (58,33)	2,05	1,12–3,79	5,48	0,019
GG	Средняя форма (73,68) – контроль (58,33)	2,00	1,04–3,86	4,35	0,037
IFNGR2, rs17880053					
d	БА без описторхоза, (88,95) – контроль (80,73)	1,92	1,02–3,65	4,1	0,043
PPP3R1, rs11126176					
GG	БА без AP (40,00) – контроль (18,18)	3,00	1,03–8,78	4,07	0,044

Примечание. * – в скобках приведены частоты аллелей или генотипов в сравниваемых группах (%)

Значения количественных параметров у больных БА в зависимости от генотипов исследованных полиморфных вариантов генов

Ген (rs)	Генотипы*			Показатель (ед. измерения)	F (p)
	CC	CT	TT		
GNB3 (rs5443)	5,42 ± 1,64 n = 53	6,10 ± 1,54 n = 49	6,57 ± 1,59 n = 16	ПСВ (литры/с)	4,167 (0,018)
TNFRSF1B (rs1061622)	3,50 ± 0,66 n = 72	3,24 ± 0,69 n = 42	3,95 ± 0,585 n = 4	ЖЕЛ (литры)	3,349 (0,039)
IL12A (rs568408)	2,51 ± 0,65 n = 92	2,49 ± 0,72 n = 23	1,64 ± 0,47 n = 4	ОФВ1 (литры)	3,334 (0,039)

Примечание. n – численность генотипов; * – приведены средние значения признака ± стандартное отклонение; F – значение критерия Фишера; p – достигнутый уровень значимости

Статистически значимо чаще в группе больных БА в сочетании с АР ($p = 0,019$) и в группе больных БА без описторхоза ($p = 0,021$), обследованных при выполнении настоящего исследования, встречался генотип GG (табл. 3). Была сформирована подгруппа больных (БА с АР без описторхоза, $n = 76$ чел.), в которой частота генотипа риска оказалась на 20% выше (рис. 1), чем в популяционном контроле ($p = 0,012$). Известно, что БА, АР и атопический дерматит, образуя аллергический континуум, являются синтропными состояниями, что предполагает общую генетическую основу данных заболеваний [9]. Согласно результатам настоящего исследования, ассоциация rs568408 в гене *IL12A* с синтропным аллергическим состоянием (БА с АР) более ярко выражена, чем с общей группой больных БА (рис. 1). Описторхоз в данном случае, вероятно, является независимым событием и не оказывает влияния на ассоциацию rs568408 с основной патологией, хотя в литературе описано модифицирующее влияние гельминтной инвазии на атопическое воспаление при БА [1, 21].

Кластер генов *TNF* и *LTA* (кодируют ФНО α и лимфотоксин α) локализован в хромосомном сегменте 6p21, в котором картирован целый ряд генов, ассоциированных с различными проявлениями атопии [10, 41]. В настоящем исследовании была показана вовлечённость в развитие БА замены rs909253 в гене *LTA* — по частотам генотипов показаны различия ($p = 0,018$) между общей группой больных БА и контрольной выборкой, предрасполагающим является генотип AG (OR = 2,16, $p = 0,007$) (табл. 1). По замене rs1800629 в гене *TNF* общая группа больных БА статистически значимо не отличается от контрольной выборки, однако, исключение из неё больных с тяжёлой формой БА (9 чел.) меняет картину: с уровнем значимости $p = 0,034$ больные отличаются от контроля, предрасполагающим эффектом обладает генотип GA (OR = 2,49, $p = 0,008$). Вместе с тем, суммарная группа больных статистически значимо отличается от контроля по сочетаниям частот генотипов rs909253/rs1800629 (*LTA/TNF*) ($\chi^2 = 8,07$; $p = 0,045$) и гаплотипов ($\chi^2 = 8,20$; $p = 0,042$) (рис. 2): предрасполагающей является комбинация генотипов AG/GG ($p = 0,045$), гаплотип А-А встречался только в группе больных БА (с частотой 0,04%). Кроме того, гетерозиготный генотип AG rs909253 в гене *LTA* преобладает в выборке пациентов с лёгкой формой БА по сравнению со здоровыми индивидами ($p = 0,019$), а также в подгруппе с БА без АР ($p = 0,018$) (табл. 3). Эти результаты согласуются с данными литературы [42, 44]. Кроме того, в контроль уровня ЖЕЛ вовлечен rs1061622 в гене *TNFRSF1B* (кодирует рецептор TNFRSF1B, через который осуществляется большая часть метаболических эффектов ФНО α и часть эффектов лимфотоксина α): индивиды с гетерозиготным генотипом характеризуются наименьшим значениями этого показателя (3,24 литра), а максимальное значение зафиксировано у носителя генотипа GG (3,95 литра) (табл. 4).

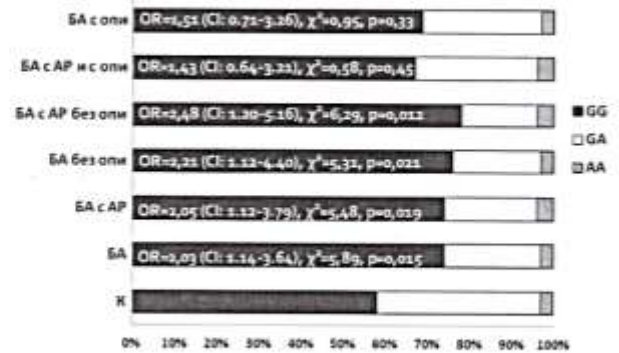


Рис. 1. Распределение генотипов rs568408 гена *IL12A* в подгруппах, дифференцированных по наличию сопутствующих заболеваний: БА — бронхиальная астма; АР — атопический ринит; опл — описторхоз; К — контроль.

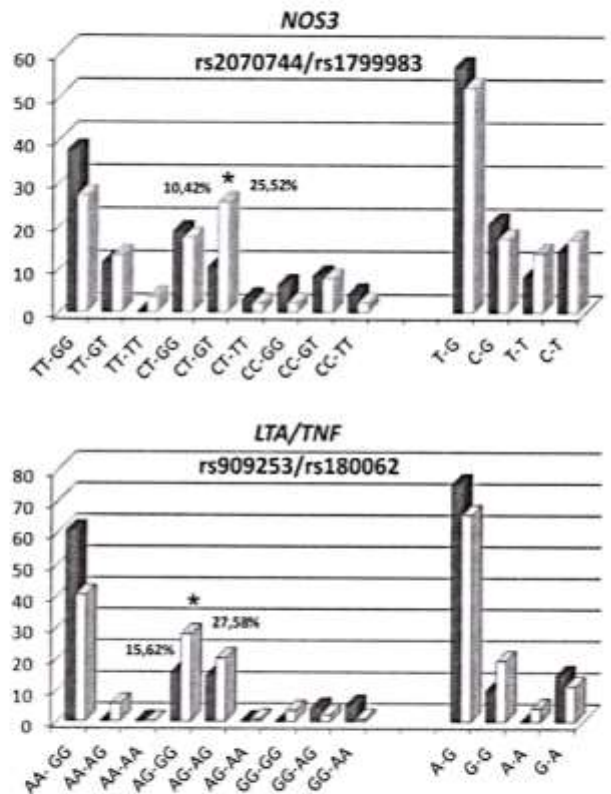


Рис. 2. Распределение в группах больных БА и контрольной выборке парных внутригенных комбинаций генотипов и гаплотипов, ассоциированных с БА: достигнутый уровень значимости обозначен * — для $p < 0,05$.

Согласно полученным результатам, аллель d rs17880053 в гене *IFNGR2* ассоциирован с развитием БА в подгруппе без описторхоза ($p = 0,043$), главным образом за счёт гомозиготного генотипа, частота которого в этой подгруппе более чем на 15% выше, чем в контроле. Известна вовлечённость гена *IFNGR2* в формирование предрасположенности к БА и продукции IgE [22]. *IFNGR2* кодирует R2-цепь рецептора к IFN- γ , который играет важную роль в координации иммунного ответа [17].

В изученной подгруппе больных БА без АР чаще встречается аллель С rs5186 в гене *AGTR1* ($p = 0,035$). Возможно, данная ассоциация в большей степени отражает вовлечённость гена *AGTR1* в патогенез не атопии в целом, а непосредственно БА, причём, учитывая биологическую роль продукта гена (рецептора к ангиотензину II — одному из наиболее мощных вазоконстрикторов, также являющемуся и бронхоконстриктором [32]), можно говорить о его роли в развитии бронхоспазма.

Продукт гена *NOS3* задействован в процессе снятия бронхоспазма. Существует противоречивая информация относительно экспрессии гена *NOS3* в эпителии дыхательных путей, в более поздних работах указывается на исключительную экспрессию гена *NOS3* в эндотелии [18, 33], тем не менее, его вовлечённость в патогенез БА была ранее показана в разных этнических группах; для ряда полиморфных вариантов (в том числе и для rs2070744, rs61722009, rs1799983) гена *NOS3* ранее было зарегистрировано участие в определении вариативности ответа на терапию ингаляционными глюкокортикоидами, уровнем IgE и выдыхаемого NO [16, 20, 27, 28]. Эндогенный оксид азота играет ключевую роль в физиологической регуляции функции дыхательных путей [24, 37]. Известно, что уровень NO отражает степень эозинофильного воспаления дыхательных путей пациентов с БА [23], и обуславливает патологические изменения при БА [34].

В настоящем исследовании ассоциации с БА и её эндотипами были выявлены только для rs1799983 гена *NOS3* — индивидуально и в сочетании с rs2070744. Так, группа больных БА отличалась от контрольной по частотам аллелей ($p = 0,048$) и генотипов ($p = 0,034$) rs1799983 (табл. 1). К БА предрасполагает аллель Т ($p = 0,048$), главным образом за счёт гетерозиготного генотипа TG ($p = 0,020$), частота которого в группе больных в 1,52 раза выше, чем в контроле. Наиболее выражены отличия от контроля для группы больных с лёгкой формой БА, в которой частота аллеля Т превышает контрольную в 1,65 раза (так же преимущественно в гетерозиготном состоянии) (табл. 3). Генотип GT rs1799983 предрасполагает также к развитию БА в сочетании с описторхозной инвазией ($p = 0,011$) (табл. 3). Статистически значимые различия между больными БА и контрольной выборкой зарегистрированы и по сочетанию генотипов двух аллельных вариантов гена *NOS3* (rs2070744/rs1799983) — комбинация гетерозиготных ге-

нотипов практически в три раза увеличивает шанс развития БА (табл. 2).

Продукт гена *GNB3* (12p13) связывает G-белок γ -3 [38], основная функция которого заключается в передаче информации от рецептора к внутриклеточным системам. Согласно полученным результатам, группа больных с лёгкой формой БА отличается от популяционного контроля по частотам аллелей rs5443 в гене *GNB3* ($p = 0,033$), предрасполагающим является аллель Т (табл. 3). Этот же аллель предрасполагает к развитию сочетанной патологии БА с АР ($p = 0,016$), преимущественно через гомозиготный генотип, который в группе больных встречается более чем в 2,3 раза чаще по сравнению с контролем, тем не менее, различия не достигают уровня статистической значимости ($p = 0,127$); альтернативный генотип СС оказывает протективный эффект ($p = 0,034$). Полиморфизм rs5443 гена *GNB3* ассоциирован также с ПСВ: средние значения этого показателя увеличиваются в ряду СС < СТ < ТТ (5,42 < 6,10 < 6,57 соответственно; $p = 0,04$) (табл. 4). Ассоциация полиморфного варианта С825Т гена *GNB3* с лёгким течением аллергического процесса является первым результатом в отношении связи этого гена с БА, но для региона 12p13 (в котором локализован ген *GNB3*) в публикациях других авторов описаны ассоциации как с уровнем общего IgE [15], так и с БА в целом (при полногеномном анализе) [26, 40].

В настоящем исследовании также впервые была выявлена ассоциация rs1126176 с БА без АР — предрасполагающим является генотип GG ($p = 0,044$) (табл. 3). Данный полиморфизм был включен в исследование как таqSNP гена *PPP3R1*, продукт которого вовлечен в регуляцию многих процессов через сигнальные каскады, управляющие развитием и функционированием иммунной, нервной, сердечно-сосудистой и мышечной систем [11, 30]. Фактически же эта замена локализована в транскрибируемом, но не транслируемом регионе гена *CID* [45] (локализованный в ядрах ДНК-связывающий и апоптоз-индуцирующий белок, может также действовать как ко-репрессор для рецептора тиреоидного гормона [39, 43]) и в псевдогене *LOC100287361* [46]. Ранее при полногеномном анализе, для региона 2p15, в котором локализован rs1126176, была показана ассоциация с гиперреактивностью бронхов [36].

Анализ сочетания генотипов полиморфных вариантов трёх генов, ассоциированных с БА в целом, позволил выявить как предрасполагающие, так и протективные сочетания. Как и следовало ожидать, предрасполагающими к развитию патологии были сочетания генотипов: GT/GG для *NOS3/IL12A* (OR = 2,08, $p = 0,022$), GT/AG для *NOS3/LTA* (OR = 2,55, $p = 0,016$), AG/GG для *LTA/IL12A* (OR = 2,11, $p = 0,022$). Редкие генотипы, очевидно, ввиду своей малочисленности, не оказывали значимого влияния на различия распределений сочетаний между группой

больных и контролем; протективными оказались сочетания частых (или вторых по частоте встречаемости) генотипов соответствующих полиморфных вариантов: GG/AG для *NOS3/IL12A* (OR = 0,39, p = 0,007), GG/AA для *NOS3/LTA* (OR = 0,45, p = 0,009), AA/AG для *LTA/IL12A* (OR = 0,30, p = 0,002). Частота сочетания генотипов трёх генов GT/AG/GG (*NOS3/LTA/IL12A*) в группе больных в два раза выше, чем в контрольной выборке, однако различия не достигают уровня статистической значимости (p = 0,071); в то же время, частота сочетания протективных генотипов GG/AA/AG в группе больных почти в 4 раза превышала частоту в контроле; значение OR для них составило 0,23 (p = 0,002).

Таким образом, в настоящем исследовании, с развитием БА и особенностями её клинических проявлений ассоциированы гены, продукты которых контролируют различные патофизиологические реакции. В то же время, с точки зрения характерных для БА патологических процессов, на настоящий момент, можно объяснить не все полученные ассоциации. Среди генов, включенных в настоящее исследование, к наиболее изученным (в том числе и с использованием мета-анализа) в отношении оценки риска развития БА можно отнести *NOS3*, *TNF*, *LTA*, *ADRB2*, *IL4*, *IL4R*, *IFNG*, *ACE*; для ряда локализованных в них полиморфных вариантов доказана роль в развитии как БА, так и связанных с ней аллергических проявлений. В то же время для генов *GATA4*, *PPP3R1*, *TNFRSF1B*, *GNB3*, *AGTR1* ассоциативное исследование с бронхиальной астмой проведено впервые, при этом интересно, что для полиморфных вариантов генов *PPP3R1*, *TNFRSF1B*, *GNB3*, *AGTR1* выявлены ассоциации с рядом качественных и количественных признаков данной патологии. Среди наиболее интересных (с учётом численности изученных подгрупп и частоты встречаемости ассоциированных генотипов или их сочетаний) представляются ассоциации генов *IL12A*, *LTA* и *NOS3* с бронхиальной астмой и генов *IL12A*, *LTA*, *NOS3* и *GNB3* с рядом клинических признаков. Для более корректной интерпретации остальных ассоциаций требуются дополнительные исследования.

Важным результатом исследования является получение данных, указывающих на то, что в развитие изолированной БА и её сочетаний с сопутствующими заболеваниями ассоциированные гены вовлечены в различной степени. Согласно полученным результатам, выявлены общие генетические локусы подверженности БА и её различным клиническим формам. Результаты исследования свидетельствуют о включенности ассоциированных генов в структуру наследственной компоненты подверженности БА и других связанных с ней аллергических фенотипов. Очевидно, что клинические фенотипы лёгкой, средней и тяжёлой форм БА имеют свои отличительные генетические особенности.

Список литературы

1. Евдокимова Т.А., Огородова Л.М. Влияние хронической описторхозной инвазии на клиническое течение и иммунный ответ при atopической бронхиальной астме у детей // Педиатрия. — 2006. — №6. — С. 12–17.
2. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. — М.: Наука. — 1991. — 271 с.
3. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов у представителей четырех этнических групп сибирского региона // Медицинская генетика. — 2009. — Т. 10. — С. 43–52.
4. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Маркова В.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы у представителей четырех этнических групп сибирского региона // Медицинская генетика. — 2010. — №5. — С. 24–34.
5. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Тарасенко Н.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов факторов некроза опухоли и их рецепторов у представителей четырех этнических групп сибирского региона // Медицинская генетика. — 2010. — №6. — С. 16–23.
6. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Кулиш Е.В. и др. Характеристика изменчивости четырех полиморфных вариантов (rs2069705, rs17880053, rs11126176 и rs804271) у представителей коренного и пришлого населения сибирского региона // Генетика. — Принято в печать.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. Пособие для биол. спец. ВУЗов — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
8. Лильин Е.Т., Трубинов В.И., Ванюков М.М. Введение в современную фармакогенетику. — М.: Медицина. — 1984. — 160 с.
9. Фрейдлин М.Б., Пузырев В.П. Ситропные гены аллергических заболеваний // Генетика. — 2010. — Т. 46. — С. 255–261.
10. Andiappan A.K., Wang de Y., Anantharaman R. et al. Genome-wide association study for atopy and allergic rhinitis in a Singapore Chinese population // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. — e19719.
11. Aramburu J., Heitman J., Crabtree G.R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes // EMBO Rep. — 2004. — Vol. 5. — P. 343–348.
12. Bhakta N.R., Woodruff P.G. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again // Immunol. Rev. — 2011. — Vol. 242. — P. 220–232.
13. Binia A., Kabesch M. Respiratory medicine — genetic base for allergy and asthma // Swiss. Med. Wkly. — 2012. — Vol. 142. — w 13612.
14. Blumenthal M.N., Nambodiri K.K., Mendell N. et al. Genetic transmission of serum IgE levels // Am. J. Med. Genet. — 1981. — Vol. 10. — P. 219–228.
15. Bouzigon E., Dizier M.H., Krahenbuhl C. Clustering patterns of LOD scores for asthma-related phenotypes revealed by a genome-wide screen in 295 French EGEA families // Hum. Mol. Genet. — 2004. — Vol. 13. — P. 3103–3113.
16. Bouzigon E., Monier F., Boussaha M. et al. Associations between nitric oxide synthase genes and exhaled NO-related phenotypes according to asthma status // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7. — e36672.
17. Brewington R., Chatterji M., Zoubine M. et al. IFN-γ-independent autocrine cytokine regulatory mechanism in reprogramming of macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 392–398.
18. Chan Y., Fish J.E., D'Abreo C. et al. The Cell-specific Expression of Endothelial Nitric-oxide Synthase: a role for DNA methylation // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — P. 35087–35100.
19. Chen T., Liang W., Gao L. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin 12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population // Hum. Immunol. — 2011. — Vol. 72, №7. — P. 603–606.

20. Dahgam S., Nyberg F., Modig L. et al. Single nucleotide polymorphisms in the NOS2 and NOS3 genes are associated with exhaled nitric oxide // *J. Med. Genet.* — 2012. — Vol. 49. — P. 200–205.
21. Fitzsimmons C.M., Falcone F.H., Dunne D.W. Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity // *Frontiers in Immunology.* — 2014. — Vol. 5. — A.61. — P. 1–12.
22. Gao P.S., Mao X.Q., Jouanguy E. et al. Nonpathogenic common variants of IFNGR1 and IFNGR2 in association with total serum IgE levels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — Vol. 263, №2. — P. 425–429.
23. Ge C.L., Hao C.L., Tang N.B. et al. Changes of exhaled nitric oxide and peripheral blood eosinophils in children with asthma // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* — 2009. — Vol. 11. — P. 986–988.
24. Ghosh S., Erzurum S.C. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — Vol. 1810. — P. 1008–1016.
25. Hill W.G. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations // *Heredity.* — 1974. — Vol. 33, №2. — P. 229–239.
26. Hirota T., Takahashi A., Kubo M. et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population // *Nat. Genet.* — 2011. — Vol. 43. — P. 893–896.
27. Holla L.L., Jurajda M., Pohunek P., Znojil V. Haplotype analysis of the endothelial nitric oxide synthase gene in asthma // *Hum. Immunol.* — 2008. — Vol. 69. — P. 306–313.
28. Iordanidou M., Paraskakis E., Tavridou A. et al. G894T polymorphism of *eNOS* gene is a predictor of response to combination of inhaled corticosteroids with long-acting $\beta(2)$ -agonists in asthmatic children // *Pharmacogenomics.* — 2012. — Vol. 13. — P. 1363–1372.
29. Kiley J., Smith R., Noel P. Asthma phenotypes // *Curr. Opin. Pulm. Med.* — 2007. — Vol. 13. — P. 19–23.
30. Li J., Hu M., Guo J. et al. Calcineurin subunit B is an immunostimulatory protein and acts as a vaccine adjuvant inducing protective cellular and humoral responses against pneumococcal infection // *Immunol. Lett.* — 2011. — Vol. 140, №1–2. — P. 52–58.
31. Li X., Hawkins G.A., Ampleford E.J., et al. Genome-wide association study identifies TH1 pathway genes associated with lung function in asthmatic patients // *J. Allergy. Clin. Immunol.* — 2013. — Vol. 132, №2. — P. 313–320. e15.
32. Lue K.-H., Ku M.-S., Li C. et al. ACE gene polymorphism might disclose why some Taiwanese children with allergic rhinitis develop asthma symptoms but others do not // *Pediatr Allergy Immunol.* — 2006. — Vol. 17. — P. 508–513.
33. Matouk C.C., Marsden P.A. Epigenetic Regulation of Vascular Endothelial Gene Expression // *Circ Res.* — 2008. — Vol. 102. — P. 873–887.
34. Moghaddam A.S., Shabani M., Fateminasab F., Reza Khakzad M. Level of Nitric Oxide in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Asthmatic Mice Model // *IJI.* — 2005. — Vol. 2, №2. — P. 103–110.
35. Morris J.A. and Gardner M.J. Statistics in Medicine: Calculating confidence intervals for relative risks (odds ratios) and standardised ratios and rates // *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.).* — 1988. — Vol. 296. — P. 1313–1316.
36. Pillai S.G., Chiano M.N., White N.J. et al. A genome-wide search for linkage to asthma phenotypes in the genetics of asthma international network families: evidence for a major susceptibility locus on chromosome 2p // *Europ. J. Hum. Genet.* — 2006. — Vol. 14. — P. 307–316.
37. Ricciardolo F.L., Di Stefano A., Sabatini F., Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract // *Eur. J. Pharmacol.* — 2006. — Vol. 533. — P. 240–252.
38. Rosskopf D., Busch S., Manthey I. et al. G protein beta 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms // *Hypertension.* — 2000. — Vol. 36. — P. 33–41.
39. Schilders G., van Dijk E., Pruijn G.J.M. C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/Sc1-100 and are involved in pre-rRNA processing // *Nucleic Acids Research.* — 2007. — Vol. 35, №8. — P. 2564–2572.
40. Torgerson D.G., Ampleford E.J., Chiu G.Y. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations // *Nat. Genet.* — 2011. — Vol. 43. — P. 887–892.
41. Wilk J.B., Djousse L., Arnett D.K. et al. Evidence for major genes influencing pulmonary function in the NHLBI family heart study // *Genet. Epidemiol.* — 2000. — Vol. 19. — P. 81–94.
42. Yang M., Fu X., Zhang Y. et al. The +252A/G polymorphism in the Lymphotoxin- α gene increases the risk of asthma: A meta-analysis // *Respirology.* — 2012. — Vol. 17. — P. 1229–1236.
43. Zamir I., Dawson J., Lavinsky R.M. et al. Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1997. — Vol. 94. — P. 14400–14405.
44. Zhang Y., Zhang J., Tian C. et al. The -308 G/A polymorphism in *TNF- α* gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis // *J. Clin. Immunol.* — 2011. — Vol. 31. — P. 174–185.
45. <http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin>
46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer>

Association of polymorphic variants of susceptibility genes common diseases with bronchial asthma

Babushkina N.P.¹, Bragina E.Y.¹, Buikin S.V.¹, Saltykova I.V.², Nazarenko M.S.¹, Tarasenko N.V.¹, Kulish E.V.¹, Markova V.V.¹, Polovkova O.G.¹, Kucher A.N.¹

¹ — Federal State Budgetary Scientific Institution «The Research Institute for Medical Genetics», Ushanka Embankment, 10, Tomsk, 634050, Russia. E-mail: nad.babushkina@medgenetica.ru

² — Siberian State Medical University, Tomsk, Moscovski Trakt, 2, Tomsk 634050, Russia

Bronchial asthma is clinically heterogeneous multifactorial pathology with genetic component. Association of 23 polymorphic variants in 17 genes with asthma and asthma endophenotypes was studied. The association for the 9 genes (*IL12A*, *LTA*, *TNF*, *TNFRSF1B*, *IFNGR2*, *NOS3*, *AGTR1*, *GNB3*, *PPP3R1*) with asthma and asthma related phenotypes has been shown. Most gene products associated with bronchial asthma and asthma related phenotypes are involved in realization of two basic pathways of asthma pathogenesis, i.e. inflammation and bronchial spasm. We found that clinical phenotypes of the mild, intermediate and severe asthma have their own genetic features.

Key words: genetic polymorphism, bronchial asthma, endophenotypes