

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 575.167-616.248+ 613.84

АНАЛИЗ МЕЖГЕННЫХ И ГЕН-СРЕДОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ПРЕДРАСПОЛАГАЮЩИХ К БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

**Б. Ц. Батожаргалова¹, Н. В. Петрова¹, Е. Е. Тимковская¹, Ю. Л. Мизерницкий^{2*},
Р. А. Зинченко¹**

¹Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук,

²Научно-исследовательский клинический институт педиатрии Российского научно-исследовательского медицинского университета им. Н. И. Пирогова, г. Москва, Россия

ANALYSIS OF BRONCHIAL ASTHMA-PREDISPOSING INTERGENIC AND GENE-ENVIRONMENTAL CORRELATIONS

**B. C. Batozhargalova¹, N. V. Petrova¹, E. E. Timkovskaya¹, Yu. L. Mizernitsky^{2*},
R. A. Zinchenko¹**

¹Medicogenetic Scientific Center of the Russia Academy of Medical Sciences,

²Scientific-Research Clinical Institute of Pediatrics of Russian Scientific-Research University of Medicine named after N. I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

Цель. Оценка вклада сочетанного воздействия генетических и внешнесредового (экспозиция к табачному дыму) факторов на развитие бронхиальной астмы.

Материалы и методы. Обследовано 104 подростка в возрасте 12–18 лет, больных БА, из них 49 курящих (45 – с легкой степенью тяжести и 4 – со среднетяжелой) и 55 некурящих. Молекулярно-генетические исследования выполнены в лаборатории эпидемиологической генетики Медико-генетического научного центра РАМН (МГНЦ).

Результаты. Бронхиальная астма у курящих больных ассоциирована с генами *GSDMB* (rs7216389), *NOS3* (VNTR) и *ADRB2* (Gln27Glu), у некурящих – с *GSDMB* (rs7216389), *CHRNA5* (rs16969968), *ADRB2* (Gln27Glu) и *THO1* (STR). Выявлены аллели и генотипы повышенного риска формирования БА, определен дополнительный генетический атрибутивный риск, доказывающий и объективизирующий вклад табакокурения в развитие БА. В структуре и характере взаимодействий между локусами генов, предрасполагающих к развитию БА, у курящих и некурящих выявлены различия.

Выводы. Анализ межгенных взаимодействий позволил установить их сложный характер между генами-кандидатами развития БА и генами-кандидатами предрасположенности к табакокурению,

© Батожаргалова Б. Ц., Петрова Н. В., Тимковская Е. Е., Мизерницкий Ю. Л., Зинченко Р. А., 2014

e-mail: yulmiz@mail.ru

тел. 8 916 145 32 82

[Батожаргалова Б. Ц. – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии; Петрова Н. В. – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии; Тимковская Е. Е. – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии; Мизерницкий Ю. Л. (*контактное лицо) – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением хронических воспалительных и аллергических болезней легких; Зинченко Р. А. – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией генетической эпидемиологии].

обуславливающий возможные патогенетические различия воздействия внешнесредового фактора риска (табакокурения).

Ключевые слова. Полиморфизмы генов *FCER2*, *ADRB2*, *NOS2*, *NOS3*, *GSTM1*, *TNFA*, *GSDMB*, *THOI* и *CHRNA5*, бронхиальная астма, табакокурение, ген-средовые и межгенные взаимодействия.

Aim. The objective of the study was to assess the contribution of associated exposure of genetic and environmental (tobacco smoke) factors on the development of bronchial asthma.

Materials and methods. 104 adolescents aged 12–18, ill with bronchial asthma including 49 smokers (45 – with mild degree of severity and 4 – with moderate one) and 55 nonsmokers were examined. Molecular-genetic studies were carried out at the Laboratory of Epidemiological Genetics of Medicogenetic Scientific Center of RAMS (MGSC).

Results. Bronchial asthma in smoking patients is associated with *GSDMB* (rs7216389), *NOS3* (VNTR) and *ADRB2* (Gln27Glu) genes, in nonsmoking patients – with *GSDMB* (rs7216389), *CHRNA5* (rs16969968), *ADRB2* (Gln27Glu) and *THOI* (STR) genes. Alleles and genotypes of increased BA-forming risk were detected, additional genetic attributive risk confirming and objectivizing the role of tobacco-smoking in BA development was determined. Differences were revealed in the structure and character of correlations between gene locuses predisposing to BA development in smokers and non-smokers.

Conclusion. Analysis of intergenic correlations permitted to state a complicated character of correlations between genes-candidates of BA development and genes-candidates of predisposition to tobacco-smoking, conditioning the possible pathogenetic differences in the exposure of environmental risk factor (tobacco-smoking).

Key words. *FCER2*, *ADRB2*, *NOS2*, *NOS3*, *GSTM1*, *TNFA*, *GSDMB*, *THOI* and *CHRNA5* gene polymorphisms, bronchial asthma, tobacco-smoking, gene-environmental and intergenic correlations.

ВВЕДЕНИЕ

Учитывая мультифакториальную природу бронхиальной астмы (БА), важное значение для оценки ген-средовых взаимодействий имеет сочетанный анализ генетических и внешнесредовых факторов, провоцирующих развитие заболевания у генетически предрасположенных индивидов [1, 4, 6, 8].

Межгенные взаимодействия обусловлены взаимным влиянием генетических вариантов в контексте одного физиологического пути. При БА как мультифакториальном заболевании отдельный генетический вариант имеет слабый индивидуальный эффект в отношении фенотипа, однако в сочетании с другими вариантами этот эффект может значимо увеличиваться. При анализе генетической компоненты подверженности БА получено несколько убедительных примеров важности генетических взаимодействий в развитии заболевания [3].

Ген-средовые взаимодействия могут быть критическим фактором, модифици-

рующим фенотипическое проявление генов. Это в первую очередь согласуется с многочисленными эпидемиологическими исследованиями, показывающими значительный вклад факторов внешней среды в развитие БА. Биологические механизмы внешнесредовых модификаций генетической программы при развитии БА пока не ясны. Тем не менее анализ ген-средовых взаимоотношений показывает, что один и тот же полиморфизм может обладать как протективным эффектом, так и быть фактором риска в отношении развития БА и родственных фенотипов под влиянием факторов внешней среды [3]. К внешним факторам риска развития БА относят воздействие аллергенов, ОРВИ, характер питания, курение, промышленные химические вещества, социально-экономический статус семьи [1, 6].

Целью нашего исследования явилась оценка вклада сочетанного воздействия генетических и внешнесредового (экспозиция к табачному дыму) факторов на развитие бронхиальной астмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 104 подростка в возрасте 12–18 лет, больных БА, из них 49 курящих (45 – с легкой степенью тяжести и 4 – со среднетяжелой) и 55 некурящих (46 – с легкой и 9 – со среднетяжелой), проживающих на территории Агинского района Бурятского округа Забайкальского края. Диагноз верифицировали в соответствии с критериями Национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2012). Контрольную группу составили 150 здоровых подростков, из них 75 курящих и 75 некурящих.

Анализ взаимодействий генов-кандидатов предрасположенности к БА (*FCER2* (T2206C), *TNFA* (–308G>A), *GSTM1* del, *NOS2A* (CCTTT)_n, *NOS3* (VNTR), *ADRB2* (Arg16Gly) и *ADRB2* (Gln27Glu), rs7216389 и rs2305480 *GSDMB*) и к табакокурению (*THOI* (STR), rs16969968 *CHRNA5*) с внешнесредовой экспозицией к табачному дыму проводился методом сопоставления величин отношения шансов (ОШ) по наличию (ОШ *f*+) или отсутствию (ОШ *f*–) фактора риска. Отношение шансов для генотипов рассчитывалось в двух группах (49/75 – курящие больные БА и курящие здоровые и 55/75 – некурящие больные БА и некурящие здоровые), сформированных по принципу «случай–контроль».

Исследование выполнено при информированном согласии подростков и их родителей, проводилось под патронатом Детского научно-практического пульмонологического центра Минздрава РФ и Администрации округа и одобрено Этическим комитетом.

Молекулярно-генетические исследования выполнены в лаборатории эпидемиологической генетики Медико-генетического научного центра РАМН (МГНЦ), материалом исследования являлась ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, стандартным методом фенольно-хлороформной

экстракции. Полимеразную цепную реакцию ДНК проводили на амплификаторе («ДНК-технология», Россия). Для определения нуклеотидных замен осуществляли гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующими рестриктазами. Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции проводили при помощи электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК идентифицировались с помощью окрашивания геля раствором бромистого этидия (5 мкг/л) с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете и использованием системы фотодокументации (Vilber-Lourmat, Франция).

Изучение полиморфизма генов *FCER2* (T2206C), *NOS2*, *GSDMB* (rs7216389) и *CHRNA5* (rs16969968) проводили методом ПЦР с последующим ПДРФ анализом с использованием праймеров для генотипирования, разработанных в лаборатории генетической эпидемиологии МГНЦ. Генотипирование полиморфизма генов *GSTM1*, *TNFA* (–308G>A), *ADRB2* (Arg16Gly) и (Gln27Glu), *NOS3* и *GSDMB* (rs2305480) осуществляли согласно общепринятым методикам.

С целью определения факторов риска оценивали показатель отношения шансов (ОШ), относительный риск (ОР) с оценкой 95%-ного доверительного интервала (95%-ный ДИ). Значение ОШ, ОР=1 показывало отсутствие ассоциации; ОШ, ОР>1 рассматривали как положительную ассоциацию заболевания с признаком (фактор повышенного риска); ОШ, ОР<1 – как отрицательную ассоциацию (фактор пониженного риска) [2]. Дополнительно оценивали атрибутивный риск (АР) для оценки вклада табакокурения в развитие заболевания. При сравнении распределений частот аллелей и генотипов в выборках больных и здоровых использовали критерий χ^2 с использованием программы «Калькулятор для расчета статистики

в исследованиях «случай–контроль». Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$. Анализ межгенных взаимодействий проводили методом редукции мультифакторных пространств (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) и с использованием ее модифицированной версии GMDR (Generalized Multifactor Dimensionality Reduction). Метод позволяет оценить все возможные n -факторные модели ($n < m$; m – число изучаемых ДНК-локусов), выбирая наилучшую модель ген-гена или ген-средового взаимодействия, позволяющую с высокой точностью предсказать наличие или отсутствие предрасположенности к определенному заболеванию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении рисковой значимости средовых и генетических факторов установлено, что носительство гомозиготного генотипа rs7216389*ТТ гена *GSDMB* как у курящих, так и у некурящих являлось маркером риска формирования БА (ОШ=8,2; 95%-ный ДИ [3,6–18,8]; $p < 0,0001$ и ОШ=3,26; 95%-ный ДИ [1,6–6,8]; $p = 0,001$ соответственно) (табл. 1). Соотношение шансов для носителей генотипов 4/4 или 4/5 гена *NOS3* (VNTR) оказалось равным 2,55 (95%-ный ДИ [1,1–6,0]; $p = 0,03$), т.е. носительство данных генотипов является маркером повышенного риска развития БА у курящих у подростков.

Таблица 1

Влияние табакокурения на риск развития БА

Ген, генотипы, n (частота)	Курящие (49/75)				Некурящие (55/75)			
	БА ($n=49$)	Здоровые ($n=75$)	χ^2, p	ОШ _г	БА ($n=55$)	Здоровые ($n=75$)	χ^2, p	ОШ _г
rs7216389 <i>GSDMB</i>								
T/T	32 (0,653)	14 (0,187)	$\chi^2=27,63$; $p < 0,0001$	8,20 [3,6–18,8]	37 (0,673)	29 (0,387)	$\chi^2=10,39$; $p = 0,001$	3,26 [1,6–6,8]
T/C+C/C	17 (0,347)	61 (0,813)		0,12 [0,05–0,3]	18 (0,327)	46 (0,613)		0,31 [0,2–0,6]
<i>ADRB2</i> (Gln27Glu)								
C/C	17 (0,347)	41 (0,547)	$\chi^2=4,75$; $p = 0,03$	0,44 [0,2–0,9]	28 (0,509)	21 (0,280)	$\chi^2=7,09$; $p = 0,008$	2,67 [1,3–5,5]
C/G+G/G	32 (0,653)	34 (0,453)		2,27 [1,1–4,8]	27 (0,491)	54 (0,720)		0,38 [0,2–0,8]
<i>NOS3</i> (VNTR)								
4/4+4/5	16 (0,327)	12 (0,160)	$\chi^2=4,70$; $p = 0,03$	2,55* [1,1–6,0]	14 (0,255)	10 (0,133)	$\chi^2=3,10$; $p = 0,08$	2,22
5/5	33 (0,673)	63 (0,840)		0,39* [0,2–0,9]	41 (0,745)	65 (0,867)		0,45
rs16969968 <i>CHRNA5</i>								
A/A+A/G	15 (0,306)	28 (0,373)	$\chi^2=0,59$; $p = 0,44$	0,74	11 (0,200)	36 (0,480)	$\chi^2=10,78$; $p = 0,001$	0,27 [0,1–0,6]
G/G	34 (0,694)	47 (0,627)		1,35 (0,800)	44 (0,520)	39 (0,520)		3,69 [1,7–8,2]
<i>THOI</i> (STR)								
S/S	36 (0,735)	62 (0,827)	$\chi^2=1,51$; $p = 0,22$	0,58	48 (0,873)	51 (0,680)	$\chi^2=6,49$; $p = 0,01$	3,23 [1,3–8,2]
S/L+L/L	13 (0,265)	13 (0,173)		1,72 (0,127)	7 (0,127)	24 (0,320)		0,31 [0,1–0,8]

Примечание: аллели гена *THOI* с числом повторов девять – «короткие» аллели (S), аллели с числом повторов десять – «длинные» аллели (L).

Разнонаправленные взаимодействия генотипов выявлены при рассмотрении гена *ADRB2* (Gln27Glu): так, гомозиготный генотип *CC являлся маркером повышенного риска формирования БА у некурящих (ОШ=4,0; 95%-ный ДИ [1,3–12,2]; $p=0,01$), тогда как у курящих он обладал протективным действием (ОШ=0,44; 95%-ный ДИ [0,2–0,9]; $p=0,03$). У курящих отношение шансов для носителей генотипов *C/G или *G/G по гену *ADRB2* (Gln27Glu) равно 2,27 (95%-ный ДИ [1,1–4,8]; $p=0,03$), т.е. носительство этих генотипов можно считать маркером повышенного риска развития БА.

У некурящих носительство гомозиготного генотипа rs16969968*G/G гена *CHRNA5* (ОШ=3,69; 95%-ный ДИ [1,7–8,2]; $p=0,001$) и носительство двух коротких аллелей (с числом повторов коровой единицы 9) микросателлитного полиморфизма гена *TH01* (ОШ=3,23; 95%-ный ДИ [1,3–8,2]; $p=0,01$) являлись маркерами повышенного риска развития БА.

При анализе полиморфизма генов *FCER2* (T2206C), *TNFA* (–308G>A), *GSTM1* del, *NOS2A* (CCTTT)_n, *ADRB2* (Arg16Gly) и rs2305480 *GSDMB* ассоциации с формированием заболевания у курящих и некурящих не установлено.

Далее проведен анализ межгенных взаимодействий с помощью программы MDRи GMDR (с их помощью можно выявлять наиболее значимые мультилокусные модели). Исследование межгенных взаимодействий у курящих подростков выявило три модели, предрасполагающие к развитию БА. Среди всех *n*-локусных моделей наиболее значимыми оказались двухлокусная модель взаимодействия полиморфных генов *GSDMB* rs7216389 x *NOS3* (VNTR); трехлокусная модель *GSDMB*rs7216389 x *ADRB* (Gln27Glu) x *NOS3* (VNTR) и четырехлокусная модель *GSDMB*rs7216389 x *ADRB* (Gln27Glu) x *NOS3* (VNTR) x *TH01* (STR) у курящих больных БА, о чем свидетельствует сочетание максимальных показателей каждого критерия выбора (табл. 2).

Таблица 2

Значимые модели взаимодействия изучаемых генов у курящих и некурящих

Оптимальные модели межгенных взаимодействий	Опытная взвешенная точность	Контрольная взвешенная точность	Тест на значимость (p)	Воспроизводимость модели (CV consistency)
Курящие				
<i>GSDMB</i> rs7216389 <i>NOS3</i> (VNTR)	0,7763	0,7596	10 (0,0010)	10 / 10
<i>GSDMB</i> rs7216389 <i>ADRB</i> (Gln27Glu) x <i>NOS3</i> (VNTR)	0,8085	0,7298	10 (0,0010)	6 / 10
<i>GSDMB</i> rs7216389 <i>ADRB</i> (Gln27Glu) x <i>NOS2A</i> (CCTTT) _n x <i>TH01</i> (STR)	0,8577	0,6893	10 (0,0010)	5 / 10
Некурящие				
<i>GSDMB</i> rs7216389 <i>CHRNA5</i> rs16969968	0,7402	0,6964	9 (0,0107)	9 / 10
<i>GSDMB</i> rs7216389 <i>ADRB</i> (Arg16Gly) x <i>ADRB</i> (Gln27Glu)	0,7870	0,6790	10 (0,0010)	10 / 10
<i>GSDMB</i> rs7216389 <i>ADRB</i> (Arg16Gly) x <i>ADRB</i> (Gln27Glu) x <i>CHRNA5</i> rs16969968	0,8591	0,7209	10 (0,0010)	9 / 10
<i>GSDMB</i> rs2305480 x <i>GSDMB</i> rs7216389 <i>ADRB</i> (Arg16Gly) x <i>ADRB</i> (Gln27Glu) x <i>CHRNA5</i> rs16969968	0,9155	0,8100	10 (0,0010)	10 / 10

Таблица 3

Генотипы повышенного риска БА в моделях ген-генного взаимодействия у курящих и некурящих

Комбинация генотипов	БА (n=49)		Контроль (n=75)		χ^2, p	ОР [95% ДИ]	АР%
	абс.	%	абс.	%			
Курящие							
<i>Двухлокусная модель</i>							
<i>GSDMB</i> rs7216389*TT – <i>NOS3</i> (VNTR)*5/4	8	16,3	3	4,0	4,15; $p=0,04$	4,08 [1,1–14,6]	12,3
<i>GSDMB</i> rs7216389*TT – <i>NOS3</i> (VNTR)*5/5	24	49	10	13,3	18,92; $p<0,0001$	3,67 [1,9–7,0]	35,7
<i>Трехлокусная модель</i>							
<i>GSDMB</i> rs7216389*TT – <i>ADRB</i> (Gln27Glu)*CG – <i>NOS3</i> (VNTR)*5/5	11	22,5	2	2,7	10,34; $p=0,0013$	8,42 [2,0–36,4]	19,8
<i>Четырехлокусная модель</i>							
<i>GSDMB</i> rs7216389*TT – <i>ADRB</i> (Gln27Glu)*CG – <i>NOS2A</i> (CCTTT) _n *LL – <i>THO1</i> (STR)*SS	8	16,3	3	4,0	4,15; $p=0,04$	4,08 [1,1–14,6]	12,3
<i>GSDMB</i> rs7216389*TT – <i>ADRB</i> (Gln27Glu)*CC – <i>NOS2A</i> (CCTTT) _n *SL – <i>THO1</i> (STR)*SS	6	12,2	1	1,3	4,74; $p=0,03$	9,18 [1,1–74]	10,9
Некурящие							
<i>Двухлокусная модель</i>							
<i>GSDMB</i> rs7216389*TT – <i>CHRNA5</i> rs16969968*GG	31	56,4	12	16	23,35; $p<0,0001$	3,52 [2,0–6,2]	–
<i>Трехлокусная модель</i>							
<i>GSDMB</i> rs7216389*TT – <i>ADRB</i> (Arg16Gly)*AG – <i>ADRB</i> (Gln27Glu)*CC	13	23,6	1	1,3	14,19; $p=0,0002$	17,73 [2,4–131,5]	–

Опытная взвешенная точность наилучшей двухлокусной модели у курящих *GSDMB* rs7216389 x *NOS3* (VNTR) составила 0,7763, контрольная взвешенная точность – 0,7596; воспроизводимость модели 10/10; значимость 10 (0,0010).

Определены генотипы повышенного и пониженного риска, атрибутивный риск развития БА для каждой мультилокусной модели.

Наибольший добавочный генетический атрибутивный риск у курящих в двухлокусной модели взаимодействия генов определен для генотипа *GSDMB*rs7216389*TT – *NOS3* (VNTR)*5/5 и составляет 35,7%; в трехлокусной модели: *GSDMB* rs7216389*TT – *ADRB* (Gln27Glu)*CG – *NOS3* (VNTR)*5/5 – 19,8%; в четырехлокусной модели: *GSDMB* rs7216389*TT – *ADRB* (Gln27Glu)*CG – *NOS2* (CCTTT)_n*LL – *THO1* (STR)*SS – 12,3% (табл. 3).

Следующим этапом установили значимые модели взаимодействий в формировании БА у некурящих.

Выявлено четыре значимых модели взаимодействий у некурящих больных БА: двухлокусная модель *GSDMB*rs7216389 x *CHRNA5* rs16969968; трехлокусная – *GSDMB*rs7216389 x *ADRB* (Arg16Gly) x *ADRB* (Gln27Glu); четырехлокусная – *GSDMB*rs7216389 x *ADRB* (Arg16Gly) x *ADRB* (Gln27Glu) – *CHRNA5* rs16969968 и пятилокусная – *GSDMB*rs2305480 x *GSDMB*rs7216389 x *ADRB* (Arg16Gly) x *ADRB* (Gln27Glu) x *CHRNA5* rs16969968. По данным табл. 2, наилучшей моделью взаимодействий генов является пятилокусная модель *GSDMB*rs2305480 x *GSDMB*rs7216389 x *ADRB* (Arg16Gly) x *ADRB* (Gln27Glu) x *CHRNA5* rs16969968: опытная взвешенная точность у некурящих с БА составила 0,9155; контрольная взвешенная точность – 0,8100;

воспроизводимость модели 10/10; значимость 10 (0,0010).

Анализ распределения генотипов в группах больных и здоровых у некурящих выявил генотипы повышенного риска развития БА для двухлокусной модели: *GSDMB* rs7216389*TT-*CHRNA5* rs16969968*GG (OR=3,52 [2,0–6,2], $p < 0,0001$); для трехлокусной модели: *GSDMB* rs7216389*TT – *ADRB* (Arg16Gly)*AG – *ADRB* (Gln27Glu)*CC (OR=17,73 [2,4–131,5]; $p = 0,0002$) (табл. 3).

Для четырехлокусной и пятилокусной моделей достоверно значимых комбинаций не установлено.

Далее для выборки моделей использован алгоритм принудительного поиска (Forced search algorithm), который оценивал значимость выявленных в моделях сочетаний генотипов в отношении риска развития бронхиальной астмы у курящих и некурящих.

В обеих группах, как курящих, так и некурящих, значительный вклад в формирование риска развития БА вносят локусы *GSDMB* (rs7216389) и *ADRB2* (Gln27Glu), причём действие их носит антагонистический характер. В группе курящих важен также ген *NOS3* (VNTR), взаимодействие которого с генами *GSDMB* (rs7216389) и *ADRB2* (Gln27Glu) разнонаправлено: антагонистическое с *ADRB2* (Gln27Glu) и синергетическое с *GSDMB* (rs7216389). В группе некурящих важен генотип по гену *CHRNA5* (rs16969968), взаимодействие которого с локусом *GSDMB* (rs7216389) характеризуется синергизмом, а с локусом *ADRB2* (Gln27Glu) – антагонизмом.

Бронхиальная астма у курящих больных ассоциирована с генами *GSDMB* (rs7216389), *NOS3* (VNTR) и *ADRB2* (Gln27Glu), у некурящих – с *GSDMB* (rs7216389), *ADRB2* (Gln27Glu), *CHRNA5* (rs16969968) и *THOI* (STR). На первый взгляд кажется, что у некурящих больше генов ассоциировано с заболеванием, в том числе и с двумя генами-кандидатами предрасположенности к табачной зависимости. У курящих выявлена ассоциация мутантных

(минорных) генотипов 4/4 или 4/5 гена *NOS3* (VNTR), генотипов GG или CG гена *ADRB2* (Gln27Glu) и Т/Т полиморфизма rs7216389 *GSDMB* с повышенным риском развития заболевания. У некурящих обнаружена ассоциация носительства минорного генотипа Т/Т полиморфизма rs7216389 *GSDMB*, аллелей и генотипов, содержащих короткие повторы (6–9) гена *THOI* (STR), а также носительства генотипа CC гена *ADRB2* (Gln27Glu), аллеля G и генотипа G/G гена *CHRNA5* (rs16969968) с повышенным риском развития БА.

Следует отметить различия генов, формирующих значимые модели межгенных взаимодействий, связанных с риском развития БА, в группах курящих (*GSDMB* (rs7216389), *ADRB* (Gln27Glu), *NOS2A* (CCTTT) n, *NOS3* (VNTR) и *THOI* (STR)) и некурящих (*GSDMB* (rs7216389), *GSDMB* (rs2305480), *CHRNA5* (rs16969968), *ADRB* (Gln27Glu) и *ADRB* (Arg16Gly)) подростков.

Пока до конца не ясен патогенез БА с включением изучаемых генов и можно предположить, что из генов предрасположенности к никотиновой зависимости у курящих больных в ген-средовых взаимодействиях участвовал ген тирозингидроксилазы (*THOI*), причём он синергично связан с геном *ADRB* (Gln27Glu). Роль гена *THOI* не случайна, так как тирозингидроксилаза является основным ферментом синтеза катехоламинов, который переводит тирозин в ДОФА (тирозин → ДОФА → дофамин → норадреналин → адреналин). Транскрипция фермента тирозингидроксилазы активируется ацетилхолином, действующим через никотиновые холинергические рецепторы, которые имеются также в эпителиальных клетках легкого и в свою очередь (через цАМФ) активируют протеинкиназу А. β-адренорецепторы активируют аденилатциклазу, которая участвует в синтезе цАМФ. У курящих носительство мутантного (минорного) аллеля G (генотипы GG или CG) гена *ADRB2* (Gln27Glu)

можно рассматривать как маркер повышенного риска БА. Предполагают, что аллель G понижает синтез цАМФ. В результате чего меняется соотношение цАМФ и цГМФ в тучных клетках в сторону цГМФ, что приводит к выбросу медиаторов аллергического воспаления (гистамина, нейтрофильных протеаз, лейкотриенов B₄, C₄, E₄ D₄, простагландинов D₂, F_{2a}, тромбксана A₂, фактора активации тромбоцитов и интерлейкинов ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13 и TNF- α) и к бронхоконстрикции. Как известно, при курении выбрасывается в больших концентрациях дофамин, который также стимулирует α - и β -адренорецепторы. Влияние на адренорецепторы связано не столько с прямой их стимуляцией, сколько со способностью дофамина высвобождать норадреналин из гранулярных пресинаптических депо, то есть оказывать не прямое адреномиметическое действие. Скорее всего, β -адренорецепторы, находящиеся в гладкомышечных клетках бронхов и сосудов, эпителиальных клетках воздухоносных путей опосредованно влияют на экспрессию генов NOS3 (VNTR). В норме оксид азота, синтезируемый eNOS, ведет к цГМФ-зависимой релаксации гладкой мускулатуры бронхов. Наличие минорного генотипа *4/4 увеличивает экспрессию гена NOS3 в эндотелии сосудов легких, приводит к подавлению синтеза NO, нарушается активность фермента, снижается мукоцилиарный клиренс и, как следствие, под действием ацетилхолина развивается бронхоконстрикция. Под воздействием TNF- α активируется экспрессия гена индуцибельной синтазы оксида азота (NOS2A), который усиливает аллергическое воспаление в бронхах.

Роль гена гасдермина в развитии БА также пока до конца не ясна, он участвует в регуляции клеточной дифференциации, клеточного цикла и экспрессии генов цитокинов, в том числе провоспалительных, играющих важную роль в патогенезе БА.

Табачный дым также вызывает активацию альвеолярных макрофагов, которые экспрессируют ген низкоафинного рецептора IgE (*FCER1*), в результате чего высвобождаются лейкотриены B₄, C₄, вазоактивные простагландины D₂, F₂, тромбксан A₂, фактор активации тромбоцитов, интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8), TNF- α , гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Все эти вещества усиливают дегрануляцию тучных клеток, нейтрофильное воспаление и оксидативный стресс [1].

Снижение ответа на противовоспалительное действие ИГКС является основным препятствием для эффективной борьбы с астмой у курильщиков, пациентов с тяжелой астмой и у большинства пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [4]. У больных тяжелой астмой прослеживается участие нескольких молекулярных механизмов, которые объясняют снижение ответа на ИГКС:

- уменьшение ядерной транслокации глюкокортикоидных рецепторов α (GR) после связывания глюкокортикостероидов. Это объясняется модификацией GR с помощью фосфорилирования в результате активации нескольких киназ (p38 митоген-активированной протеинкиназы α , p38 митоген-активированной протеинкиназы γ и C-Jun N-терминальной киназы 1). Они понижают активность фосфатаз (митоген-активированной протеинкиназы фосфатазы 1 и протеинфосфатазы A2);

- повышенная экспрессия GR- β , который конкурирует с GR- α и тем самым тормозит активированный GR- α ;

- повышенная секреция фактора ингибирования миграции макрофагов, который конкурирует с фактором транскрипции активатора протеина 1 и уменьшает экспрессию гистон деацетилазы (HDAC) 2. HDAC2 выступает в качестве посредника действия стероидов, чтобы выключить активированные воспалительные гены. Но у пациентов

с ХОБЛ, с тяжелой астмой и курильщиков, страдающих астмой, HDAC2 активируется окислительным стрессом через посредство фосфоинозитидной 3-киназы δ [4];

– увеличение активации провоспалительных факторов транскрипции (ядерного фактора-карра В), цитокинов (ИЛ-2, -4, -8, TNF- α);

– неаллергическое воспаление дыхательных путей (снижение выработки эозинофилов, увеличение количества и активация нейтрофилов) [1, 7, 9, 10].

Холинергические рецепторы ответственны также за активацию гуанилциклазы, участвующей в синтезе цГМФ. Преобладание холинергической системы над адренергической у некурящих больных БА потенцирует проявления патохимической и патофизиологической фаз иммунологической реакции.

Выводы

Бронхиальная астма у курящих больных ассоциирована с генами *GSDMB* (rs7216389), *NOS3* (VNTR) и *ADRB2* (Gln27Glu), у некурящих – с *GSDMB* (rs7216389), *CHRNA5* (rs16969968), *ADRB2* (Gln27Glu) и *THO1* (STR).

Выявлены аллели и генотипы повышенного риска формирования БА, одинаковые для курящих и некурящих больных, – носительство аллеля Т и гомозиготного генотипа Т/Т полиморфизма rs7216389 *GSDMB*. В то же время установлены различия: так, у курящих носительство генотипов *4/4 или *4/5 гена *NOS3* (VNTR), генотипов GG или CG гена *ADRB2* (Gln27Glu) являлось маркером повышенного риска заболевания; тогда как у некурящих больных маркерами повышенного риска БА оказались носительство генотипа *CC гена *ADRB2* (Gln27Glu), носительство аллеля G и генотипа *G/G гена *CHRNA5* (rs16969968), носительство аллелей и генотипов, содержащих короткие повторы с числом 6–9 гена *THO1* (STR).

Определен дополнительный генетический атрибутивный риск, доказывающий

вклад табакокурения в развитие БА. При анализе мультилокусных моделей выявлено: в двухлокусной модели – 2 сочетания с AP 35,7% и 12,3%; в трехлокусной модели одно сочетание с AP 19,8%; в четырехлокусной модели 2 сочетания с AP 12,3% и 10,9%.

Полученные результаты анализа межгенных взаимодействий свидетельствуют, что ключевая роль в формировании предрасположенности к БА у курящих и некурящих принадлежит полиморфным вариантам rs7216389 гена гасдермина В, третьим по значимости в обеих моделях определялся ген *ADRB* (Gln27Glu). Выявлены различия в структуре и характере взаимодействий между локусами, предрасполагающими к развитию БА у курящих и некурящих. Так, у курящих в формировании моделей межгенных взаимодействий участвуют гены эндотелиальной и индуцибельной синтазы оксида азота *NOS3* (VNTR), *NOS2A* (CCTTT)*n* и ген тирозингидроксилазы *THO1* (STR); у некурящих – локусы ацетилхолинового никотинового рецептора rs16969968 *CHRNA5*, полиморфизм rs2305480 гена гасдермина *GSDMB* и ген β_2 -адренергического рецептора *ADRB* (Arg16Gly).

Анализ позволил установить сложный характер взаимодействий между генами-кандидатами развития БА и генами-кандидатами предрасположенности к табакокурению и возможные патогенетические различия воздействия внешнесредового фактора риска (табакокурения). Определен вклад табакокурения в развитие БА.

Библиографический список

1. Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика: национальная программа. 4-е изд., испр. и доп. М.: Оригинал-макет 2012; 184.
2. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета

- прикладных программ Statistics. М.: Медиа Сфера 2002; 312.
3. *Фрейдлин М.Б., Огородова Л.М., Цой А.Н., Бердникова Н.Г.* Генетика бронхиальной астмы // Генетика бронхолегочных заболеваний / под ред. В.П. Пузырева, Л.М. Огородовой. М.: Атмосфера 2010; 160.
 4. *Barnes P.J.* Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy. Clin. Immunol* 2013; 131 (3): 636–645.
 5. *Daubner S.C., Le T., Wang S.* Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011; 508 (1): 1–12.
 6. *Gallagher J., Hudgens E., Williams A.* Mechanistic indicators of children asthma (MICA) study: piloting an integrative design for evaluating environmental health. *BMC Public Health* 2011; 19 (11): 344.
 7. *Girodet P.O.* What is the therapeutic response to corticosteroid in smokers with asthma? *Rev Mal Respir* 2008; 25 (2): 185–192.
 8. *Hunter D.J.* Gene-environment interactions in human diseases. *Nat. Rev. Genet.* 2005; 6: 287–298.
 9. *Tamimi A., Serdarevic D., Hanania N.A.* The effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: therapeutic implications. *Respir. Med.* 2012; 106 (3): 319–328.
 10. *Thomson N.C., Chaudhuri R.* Asthma in smokers: challenges and opportunities. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2009; 15 (1): 39–45.

Материал поступил в редакцию 20.01.2014