

Роль полиморфных вариантов генов NO-синтаз и аргиназы при бронхиальной астме у детей

Батожаргалова Б.Ц.^{1,3}, Мизерницкий Ю.Л.¹, Дьякова С.Э.¹, Петрова Н.В.², Зинченко Р.А.^{2,1}

¹ Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Москва

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», г.Москва

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г.Москвы

В статье представлены результаты исследования ассоциаций генов NO-синтаз и аргиназы у детей с бронхиальной астмой, проживающих на территории г.Москвы. Всего обследовано 207 детей и подростков (у 107 установлен диагноз «бронхиальная астма»; 100 составили группу контроля). Проведен анализ полиморфизма генов *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2*. Установлена ассоциация бронхиальной астмы в общей выборке, а также у мальчиков и девочек с полиморфными вариантами гена *NOS2A* (CCTTT)_n. Гендерных различий не выявлено. Определены значимые межгенные взаимодействия полиморфных локусов исследованных генов NO-синтаз и аргиназы, связанные с риском развития бронхиальной астмы у детей данной выборки. Выявлена ассоциация комбинации генотипов *NOS2A* (CCTTT)_n*SL x *ARG2* (rs3742879)*AA с повышенным риском развития бронхиальной астмы у девочек.

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

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №17-04-00288, РНФ 17-15-01051.

Role of polymorphic variants of NO synthase and arginase genes in child bronchial asthma

Batozhargalova B.T.^{1,3}, Mizernitski Y.L.¹, Diakova S.E.¹, Petrova N.V.², Zinchenko R.A.^{2,1}

¹ Academician Yu. E. Veltishchev Research Clinical Institute of Pediatrics, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² Federal state scientific budgetary Institution «Science Research Centre for Medical Genetics», Moscow

³ Morozov City Children's Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department

The results of associations study of NO-synthase and arginase genes and asthma of children living in Moscow are presented. 207 children and adolescents are examined (107 with asthma and 100 healthy controls). Analysis of polymorphism of *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2* genes was carried out. The association of asthma and polymorphic variants CCTTT_n of *NOS2A* gene was established in the total group and in the groups of boys and girls. Gender differences were revealed. Significant gene-gene interactions of polymorphic loci of the studied genes NO-synthase and arginase in the asthma development were determined. Associations of combinations of *NOS2A* (CCTTT)_n*SL x *ARG2* (rs3742879)*AA genotypes with the increased risk of asthma development in girls has been revealed.

Keywords: bronchial asthma, children, polymorphisms of genes *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2*, gene-gene interactions.

Введение

Оксид азота II (NO) играет важную роль в патогенезе аллергических заболеваний дыхательных путей. Уровень NO (FeNO) в выдыхаемом воздухе значительно повышается у детей с эозинофильным воспалением дыхательных путей, бронхиальной астмой (БА) [1–3].

NO синтезируется из L-аргинина при участии трех изоформ NO-синтаз (NOS): нейрональной NOS (*nNOS*, кодируемой геном *NOS1*); эндотелиальной NOS (*eNOS*, кодируемой геном *NOS3*); и индуцибельной NOS (*iNOS*, кодируемой геном *NOS2A*). Все три NOS-изоформы экспрессируются в эпителии дыхательных путей [1–4].

Аргиназа (ARG) конкурирует с NOS за общий субстрат L-аргинин. У человека определены две изоформы ARG (кодируемые генами *ARG1* и *ARG2*). Обе изоформы экспрессируются в эпителии дыхательных путей, гладких мышцах, перибронхиальной и периваскулярной соединительной ткани [5].

Таким образом, исследование полиморфизма генов ферментов, синтезирующих из L-аргинина NO и орнитин у детей, больных БА, позволит верифицировать аллели и генотипы, определяющие подверженность к развитию БА и различным особенностям течения этого заболевания.

Цель исследования — провести анализ ассоциаций БА с полиморфными вариантами генов *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *ARG1*, *ARG2* у детей, проживающих в г.Москве.

Материалы и методы

Обследовано 207 детей, проживающих в г. Москве. У 107 детей установлена БА: у 74 юношей (45,6%) и у 33 девушек (54,4%). У 84 (78,5%) подростков БА сочеталась с аллергическим ринитом. Сочетание БА с аллергическим ринитом и atopическим дерматитом отмечено у 16 чел. (15,0%). Средний возраст обследованных детей составил $12,1 \pm 3,1$ года. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями, изложенными в Национальной программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2012). Исследование одобрено Этическим комитетом НИКИ педиатрии. Пациенты и их родители, а также здоровые индивиды контрольной группы подписали письменное информированное согласие на добровольное проведение исследования и анализ ДНК. Больные госпитализировались в отделение хронических воспалительных и аллергических заболеваний легких (научный руководитель — д.м.н., профессор Мизерницкий Ю.Л.) Обособленного структурного подразделения «НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Контрольную группу составили 100 здоровых подростков (средний возраст $18,3 \pm 1,5$ года): 33 юноши и 62 девушки. Рассматриваемая выборка больных БА и контрольной группы на 91,6% представлена русскими.

Дизайн сравнительного исследования основывался на модели случай-контроль (по отношению к заболеванию БА).

Молекулярно-генетические исследования выполнены в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» (зав. — д.м.н. проф. Зинченко Р.А.). Материалом исследования являлась ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Полимеразную цепную реакцию ДНК проводили на амплификаторе фирмы «ДНК-технологии» (Россия). Для определения нуклеотидных замен проводили гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующими рестриктазами. Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции проводили методом электрофореза в 8% полиакриламидном геле («Helicon»). Идентификация фрагментов ДНК проводилась путем 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 *NOS1* и *NOS2* проводили методом ПЦР, генов *ARG1* (rs2781667), *ARG2* (rs3742879) — ПЦР с последующим ПДРФ анализом с использованием праймеров для генотипирования, разработанных в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» (табл. 1). Генотипирование полиморфизма гена *NOS3* проводили согласно общепринятым методикам.

Для каждого из изучаемых ДНК-маркеров проводили оценку соответствия распределения генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди—Вайнберга

Таблица 1

Праймеры

Ген (локус)	Последовательность праймера	Рестриктаза	Аллель (длина, п.н.)
<i>NOS1</i> (VNTR)	F 5'- TGCCTCTGAGTCTGAGCTGT -3' R 5'- TTACATCATGGAACCTGGCAAAC -3'	—	<i>nNOS</i> *9 — 113 <i>nNOS</i> *10 — 116 <i>nNOS</i> *11 — 119 <i>nNOS</i> *12 — 202 <i>nNOS</i> *13 — 205 <i>nNOS</i> *14 — 208 <i>nNOS</i> *15 — 211 <i>nNOS</i> *
<i>NOS2</i> (VNTR)	F 5'- ACC CCT GGA AGC CTA CAA CTG CAT-3' R 5'- GCC ACT GCA CCC TAG CCT GTC TCA-3'	—	<i>iNOS</i> *9 — 141 <i>iNOS</i> *10 — 146 <i>iNOS</i> *11 — 151 <i>iNOS</i> *12 — 156 <i>iNOS</i> *13 — 161 <i>iNOS</i> *14 — 166 <i>iNOS</i> *15 — 171 <i>iNOS</i> *16 — 176 <i>iNOS</i> *
<i>NOS3</i> (VNTR)	F 5'- AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3' R 5'- GAGACCAGGTGGCTTCTAAGT-3'	—	*A (4) — 393 п.н. *B (5) — 420 п.н.
<i>ARG1</i> (rs2781667)	F 5'- AAGGATTTTAATGGATTATGAAGC-3' R 5'- CAAATGCAGTTTGGGCCTCT-3'	AluI	*C — 50+318 п.н. *T — 24+26+318 п.н.
<i>ARG2</i> (rs3742879)	F 5'- CTGCTATTCCACATCATTGCCG -3' R 5'- TGGTAAGAGCCATGTCCAAGC -3'	MspI	*A — 122 п.н. *G — 21+201 п.н.

(PXB). Для сравнения распределений частот аллелей и генотипов в выборках больных и здоровых использовали критерий χ^2 . Силу ассоциаций оценивали с помощью показателя отношения шансов Odds Ratio (OR) и указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Для расчетов использовали программу «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль»» (http://test.tapotili.ru/calculator_or.php), Epi Info 7. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Анализ межгенных взаимодействий проводили методом редукции мультифакторных пространств — Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) ([mdr-2.0_beta_8.3](http://www.mdr-2.0_beta_8.3); <http://www.multifactor dimensionality reduction.org/>) и ее модифицированной версии GMDR (Generalized Multifactor Dimensionality Reduction) ([www.health-system.virginia.edu/internet/addictiongenomics/ software](http://www.health-system.virginia.edu/internet/addictiongenomics/software)).

Результаты и обсуждение

Нами проведен анализ частот аллелей и генотипов генов NO-синтаз (*NOS1* (ATT)_n, *NOS2A* (CCTTT)_n, *NOS3* (VNTR)) и аргиназы (*ARG2* (rs3742879) и *ARG1* (rs2781667)) у больных БА и здоровых индивидов г. Москвы (табл. 2).

Распределение частот генотипов исследуемых полиморфизмов *NOS1* (ATT)_n, *NOS2A* (CCTTT)_n, *ARG1* (rs2781667) соответствует равновесию Харди—Вайнберга ($p > 0,05$) (табл. 2).

При анализе распределения частот генотипов полиморфизма *NOS3* (VNTR) у больных БА и *ARG2*

(rs3742879) в контрольной группе выявлено отклонение от равновесия Харди—Вайнберга ($p = 0,04$, $p = 0,03$), связанное с недостатком гетерозигот.

Ген *NOS1* локализован регионе 12q24. Проведен анализ tandemных повторов (AAT)_n в интроне 20 гена *NOS1* [6].

Идентифицировано 7 аллелей с числом повторов AAT от 9* до 15* и 16 генотипов в гене *NOS1* (ATT)_n.

Нами не установлено ассоциации полиморфизма *NOS1* (ATT)_n с развитием БА. Частота аллелей SS гена *NOS1* (ATT)_n составила у больных БА — 0,682; в контрольной группе — 0,740 ($p < 0,05$) (табл. 2).

Полученные данные сопоставимы с исследованиями, выполненными американскими и китайскими учеными у детей с БА, и у больных БА из Санкт-Петербурга, в которых также не было выявлено ассоциации гена *NOS1* (ATT)_n с развитием этого заболевания [7–9].

Ген *NOS3* (*eNOS*) (163729 OMIM) локализован в регионе 7q36. В гене *NOS3* проведен анализ мини-сателлитного полиморфизма, обусловленного варьирующим числом tandemных 27 п.н. повторов (VNTR) в интроне 4; определялось два аллеля *4 и *5. Нами не установлено ассоциации данного полиморфизма с развитием БА. Частота аллеля 4 гена *NOS3* (VNTR) составила у больных БА — 0,164; в контрольной группе — 0,145 ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

Полученные результаты у больных БА согласуются с данными литературы, не выявившими ассоциации гена *NOS3* (VNTR) с развитием БА у жителей Санкт-Петербурга, Британии и Чехии [10–12].

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов генов-кандидатов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		χ^2 ; p	OR [95%ДИ]
	БА (n = 107)	Контроль (n = 100)		
NOS1 (ATT) _n				
Аллели	n = 214	n = 200		
S 9-11 повторов	146 (0,682)	148 (0,740)	1,68; p = 0,2	
L 12-15 повторов	68 (0,318)	52 (0,260)		
*9	6 (0,028)	2 (0,010)	p>0,05	
*10	134 (0,626)	142 (0,710)	p>0,05	
*11	6 (0,028)	4 (0,020)	p>0,05	
*12	30 (0,140)	28 (0,140)	p>0,05	
*13	28 (0,131)	16 (0,080)	p>0,05	
*14	9 (0,042)	6 (0,030)	p>0,05	
*15	1 (0,005)	2 (0,010)	p>0,05	
Генотипы	n = 107	n = 100		
SS	52 (0,486)	56 (0,560)	1,57; p = 0,46	
SL	42 (0,393)	36 (0,360)		
LL ≥ 12 повторов	13 (0,121)	8 (0,080)		
PXB (χ^2 , p)	0,96; p>0,05	0,42; p>0,05		

Таблица 2 (окончание)

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		χ^2 ; p	OR [95%ДИ]
	БА (n = 107)	Контроль (n = 100)		
NOS2A (CCTTT) _n				
Аллели	n = 214	n = 200		
S 9-11 повторов	68 (0,318)	29 (0,145)	17,20; p = 0,00003	2,75 [1,69 – 4,47]
L 12-16 повторов	146 (0,682)	171 (0,855)		0,36 [0,22 – 0,59]
*9	4 (0,019)	3 (0,015)	p>0,05	
*10	24 (0,112)	11 (0,055)	4,36 p = 0,037	2,17 [1,0-4,6]
*11	40 (0,187)	15 (0,075)	11,24 p = 0,0008	2,84 [1,51-5,32]
*12	75 (0,351)	138 (0,690)	47,71 p<0,0000001	0,24 [0,16-0,37]
*13	39 (0,182)	14 (0,070)	11,67 p = 0,00064	2,96 [1,55-5,64]
*14	17 (0,079)	14 (0,070)	p>0,05	
*15	13 (0,061)	2 (0,010)	6,24 p = 0,013	6,40 [1,43-28,74]
*16	2 (0,009)	3 (0,015)	p>0,05	
Генотипы	n = 107	n = 100		
S/S+S/L	56 (0,523)	27 (0,270)	13,81; p = 0,0002	2,97 [1,66 – 5,31]
LL ≥12 повторов	51 (0,477)	73 (0,730)		0,34 [0,19 – 0,60]
*12/*12	18 (0,168)	51 (0,510)	27,17 p = 0,0000004	0,19 [0,10 – 0,37]
PXB (χ^2 , p)	0,28; p>0,05	0,01; p>0,05		
NOS3 (VNTR 27 п.н. в интроне 4 гена eNOS)				
Аллели	n = 214	n = 200		
*4	35 (0,164)	29 (0,145)	0,27; p = 0,6	
*5	179 (0,836)	171 (0,855)		
Генотипы	n = 107	n = 100		
*4/*4	0	2 (0,020)	3,44; p = 0,18	
*4/*5	35 (0,327)	25 (0,250)		
*5/*5	72 (0,673)	73 (0,730)		
PXB (χ^2 , p)	4,09; p = 0,04	0,01; p>0,05		
ARG2 (rs3742879)				
Аллели	n = 214	n = 200		
A	132 (0,617)	133 (0,665)	1,04; p = 0,31	
G	82 (0,383)	67 (0,335)		
Генотипы	n = 107	n = 100		
AA	42 (0,393)	49 (0,490)	2,37; p = 0,31	
AG	48 (0,449)	35 (0,350)		
GG	17 (0,159)	16 (0,160)		
PXB (χ^2 , p)	0,28; p>0,05	4,60; p = 0,03		
ARG1 (rs2781667)				
Аллели	n = 214	n = 200		
T	212 (0,991)	200 (1,000)	1,88; p = 0,17	
C	2 (0,009)	0		
Генотипы	n = 107	n = 100		
TT	105 (0,991)	100 (1,000)	1,89; p = 0,39	
TC	2 (0,009)	0		
CC	0	0		
PXB (χ^2 , p)	0,01 p>0,05	0; p>0,05		
Примечание. аллели генов NOS1, NOS2 с числом повторов меньше одиннадцати — "короткие" аллели (S), аллели с числом повторов более двенадцати — "длинные" аллели (L) (выделены в таблице серым фоном).				

Ген *NOS2A* расположен на 17-й хромосоме (17q11.2-q12) в локусе, кодирующем хемокин СС. В промоторной области гена *iNOS* находится функционально значимый полиморфизм (CCTTT)_n, который влияет на транскрипцию гена. У европейцев обнаружено тринадцать различных аллелей. Аллели с восемью или девятью повторами CCTTT имеют более низкие уровни транскрипционной активности, чем аллели с 12–15 повторами [13].

Исследован полиморфизм *NOS2A* (CCTTT)_n у больных БА и здоровых индивидов контрольной группы. Идентифицировано 8 аллелей с числом повторов CCTTT от 9* до 16* и 26 генотипов.

Установлены различия в частоте встречаемости аллелей, содержащих короткие tandemные повторы (S9-11), и сочетаний генотипов SS или SL по гену *NOS2A* (CCTTT)_n в группах пациентов и здоровых индивидов.

Частота аллелей, содержащих короткие tandemные повторы S, выше у больных (0,318), чем в контрольной группе (0,145) ($p = 0,00003$; $OR = 2,75$ [1,69–4,47]).

При рассмотрении частот каждого аллеля гена *NOS2A* (CCTTT)_n в общей выборке выявлены значимые различия по четырем исследуемым аллелям. Частота аллеля 11* в группе больных БА оказалась выше по сравнению с контрольной группой (0,187 против 0,075; $p = 0,0008$; $OR = 2,84$; 95% ДИ [1,51–5,32]; то же в отношении аллеля 13* (0,182 против 0,070; $p = 0,00064$; $OR = 2,96$; 95% ДИ [1,55–5,64] и аллеля 15* (0,061 против 0,010; $p = 0,013$; $OR = 6,40$; 95% ДИ [1,43–28,74]. Частота аллеля 12* гена *NOS2A* (CCTTT)_n у больных БА была ниже, чем в контрольной группе (0,351 против 0,690; $p < 0,0000001$; $OR = 0,24$; 95% ДИ [0,16–0,37]) (табл. 2).

Генотипы распределены на три группы: SS, SL и LL. Частота генотипов SS или SL в выборке больных БА оказалась выше (0,523), чем в контроле (0,270; $p = 0,0002$; $OR = 2,97$; 95% ДИ [1,66–5,31]) (табл. 2).

Выявлены достоверные различия только по одному генотипу *12/*12 из 26 представленных генотипов гена *NOS2A* (CCTTT)_n в данной выборке. Частота генотипа *12/*12 в контрольной группе (0,510) была выше, чем среди больных БА (0,168) ($p = 0,0000004$; $OR = 0,19$; 95% CI [0,10–0,37]).

Полученные нами результаты согласуются с данными исследований, выявивших ассоциацию развития БА у русских подростков Забайкальского края с геном *NOS2A* (CCTTT)_n, а у жителей Испании с аллелем *NOS2A* (CCTTT)_n*15 [14,15].

Аргинин в организме является субстратом как для NO-синтаз, так и аргиназы. Экспрессия аргиназы усиливается при БА и варьирует в зависимости от типа иммунного ответа (Th2), уровней цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-13, оксидативного стресса. Оксид азота модулирует активность аргиназы, что обеспечивает адекватные уровни предшественников полиаминов и пролина, в свою очередь, стимулирующих рост клеток и синтез

коллагена. Поэтому активность аргиназы может определять выраженность воспаления и индуцированного ремоделирования в дыхательных путях при БА [16–18].

Аргиназа катализирует гидролиз аргинина в орнитин и мочевину. Две изоформы аргиназы различаются по их распределению в тканях, субклеточной локализации, иммунологической перекрестной реактивности и физиологическим функциям. Изоформа ARG1 является цитозольным ферментом, и экспрессируется преимущественно в печени в качестве компонента цикла мочевины. Унаследованный дефицит этого фермента приводит к аргининемии, аутосомно-рецессивному заболеванию, характеризующемуся гипераммониемией. Изоформа ARG2 расположена в митохондриях и экспрессируется во внепеченочных тканях. Физиологическая роль этой изоформы недостаточно исследована и, вероятно, в большей степени связана с развитием фиброза и ремоделированием дыхательных путей, чем ARG1 [16–18].

Гены аргиназы связаны с атопией, так как при сниженной активности кодируемого ими фермента, возрастает уровень свободного L-аргинина, который при участии NOS обуславливает повышенную выработку эндогенного бронходилататора NO. Изменения в гомеостазе L-аргинина могут влиять на такие особенности астмы, как гиперреактивность и выраженность воспаления дыхательных путей, их ремоделирование. Наоборот, высокая активность аргиназы истощает запасы L-аргинина, приводя к снижению синтеза NO при участии NOS, что соответствующим образом влияет на тонус бронхов [16–18].

Ген *ARG1* расположен в регионе 6q23, ген *ARG2* расположен в регионе 14q24. Нами не выявлено ассоциации развития БА с полиморфизмами генов *ARG1* (rs2781667) и *ARG2* (rs3742879) ($p < 0,05$) (табл. 2).

Наши результаты совпадают с сообщениями мексиканских исследователей об отсутствии ассоциации полиморфизма rs2781667 гена *ARG1* у детей с развитием БА [19].

При рассмотрении гендерных различий распределение частот генотипов исследуемых полиморфизмов *NOS1* (ATT)_n, *NOS2A* (CCTTT)_n, *NOS3* (VNTR), *ARG1* (rs2781667) *ARG2* (rs3742879) у больных БА и в контрольной группе соответствовало PXB ($p > 0,05$) (табл. 3).

Значимых гендерных различий в частоте аллелей и генотипов, исследуемых полиморфизмов генов *NOS1* (ATT)_n, *NOS3* (VNTR), *NOS2A* (CCTTT)_n, *ARG2* (rs3742879), *ARG1* (rs2781667) не установлено.

Установлена ассоциация БА как у мальчиков, так и у девочек с аллелями, содержащими короткие tandemные повторы (S9-11) гена *NOS2A* (CCTTT)_n по сравнению с контролем ($OR = 4,31$ [1,84–10,10]; $p = 0,0004$ и $OR = 2,48$ [1,25–4,92]; $p = 0,008$ соответственно). Определены различия в частоте встречаемости генотипов. Так сочетание генотипов SS или SL гена *NOS2A* (CCTTT)_n как у мальчиков, так и у девочек в группах больных БА обнаруживается достоверно чаще, чем у здоровых ($OR = 4,43$ [1,73–11,32]; $p = 0,001$ и $OR = 2,85$ [1,19–6,82]; $p = 0,02$ соответственно).

Частота аллеля 11* гена *NOS2A* (CCTTT)_n как у мальчиков, так и у девочек, больных БА, выше, чем в контроле. Частота аллеля 12* и генотипа *12/*12 исследуемого гена оказалась выше в контрольной группе, чем у больных. Достоверные различия в частоте аллеля 13* гена *NOS2A* (CCTTT)_n определены только у девочек ($p = 0,027$) (табл. 3).

У обследованных больных проведена оценка межгенных взаимодействий исследованных полиморфных локусов генов-кандидатов развития БА в детерминации риска развития бронхиальной астмы. Для выборки моделей использованы алгоритмы полного поиска (Exhaustive search algorithm), который оценивал все возможные сочетания генотипов в отношении риска развития бронхиальной астмы, и алгоритм принудительного поиска (Forced search algorithm), при котором генные локусы для исследования сочетаний генотипов в программе MDR и GMDR определялись по выбору исследователя [20].

Исследование межгенных взаимодействий у больных БА выявило по одной значимой двухлокусной модели

сочетаний генов, предрасполагающих к развитию БА в общей выборке и у девушек. У юношей значимых взаимодействий не выявлено.

Среди всех *n*-локусных моделей наиболее значимой оказалась двухлокусная модель взаимодействия полиморфных генов: *NOS3* (VNTR) х *NOS2A* (CCTTT)_n в общей выборке и *NOS2A* (CCTTT)_n х *ARG2* (rs3742879) в выборке девушек (табл. 4).

Для каждой модели межгенных взаимодействий сравнили частоты встречаемости генотипов взаимодействующих генов в выборках больных БА и здоровых. На рис. 1 показано распределение двухлокусных сочетаний генотипов полиморфизмов *NOS3* (VNTR) х *NOS2A* (CCTTT)_n в общей выборке (рис. 1А) и *NOS2A* (CCTTT)_n х *ARG2* (rs3742879) у девушек (рис. 1Б), ассоциированных с повышенным и пониженным риском БА у больных.

Характер распределения генотипов в ячейках повышенного и пониженного риска может свидетельствовать об эпистатических взаимодействиях данных генов.

Таблица 3

Значимые ассоциации гена *NOS2A* (CCTTT)_n с развитием бронхиальной астмы: гендерные различия

<i>NOS2A</i> (CCTTT) _n								
Аллели	Мальчики		χ^2 ; p	OR [95%ДИ]	Девочки		χ^2 ; p	OR [95%ДИ]
	БА ($n = 148$)	Контроль ($n = 66$)			БА ($n = 66$)	Контроль ($n = 124$)		
S 9-11 повторов	45 (0,304)	7 (0,092)	12,65; $p = 0,0004$	4,31 [1,84 – 10,10]	23 (0,348)	22 (0,177)	6,97; $p = 0,008$	2,48 [1,25 – 4,92]
L 12-16 повторов	103 (0,696)	69 (0,908)		0,23 [0,10 – 0,54]	43 (0,652)	102 (0,823)		0,40 [0,20 – 0,80]
*11	25 (0,169)	3 (0,046)	5,08; $p = 0,024$	4,27 [1,24 – 14,68]	15 (0,227)	12 (0,097)	6,01; $p = 0,014$	2,75 [1,20 – 6,28]
*12	52 (0,351)	56 (0,848)	45,13; $p < 0,0000001$	0,1 [0,05 – 0,21]	23 (0,349)	82 (0,661)	17,05; $p = 0,00004$	0,27 [0,15 – 0,51]
*13	28 (0,189)	7 (0,106)	$p > 0,05$		11 (0,167)	7 (0,056)	4,88; $p = 0,027$	3,34 [1,23 – 9,09]
Генотипы	$n = 74$	$n = 38$			$n = 33$	$n = 62$		
SS	8 (0,108)	—	11,60; $p = 0,003$	9,84 [0,55 – 175,28]	4 (0,121)	2 (0,032)	6,71; $p = 0,03$	4,14 [0,72 – 23,92]
SL	29 (0,392)	7 (0,184)		2,85 [1,11 – 7,33]	15 (0,455)	18 (0,290)		2,04 [0,85 – 4,90]
LL ≥ 12 повторов	37 (0,500)	31 (0,632)		0,23 [0,09 – 0,58]	14 (0,424)	42 (0,677)		0,35 [0,15 – 0,84]
*12/*12	11 (0,424)	22 (0,677)	22,37; $p = 0,000007$	0,13 [0,05 – 0,32]	7 (0,500)	29 (0,632)	4,94; $p = 0,026$	0,31 [0,12 – 0,81]
Генотипы	$n = 74$	$n = 33$			$n = 33$	$n = 62$		
S/S+S/L	37 (0,500)	7 (0,184)	10,50; $p = 0,001$	4,43 [1,73 – 11,32]	19 (0,576)	20 (0,323)	5,70; $p = 0,02$	2,85 [1,19 – 6,82]
LL ≥ 12 повторов	37 (0,500)	31 (0,816)		0,23 [0,09 – 0,58]	14 (0,424)	42 (0,677)		0,35 [0,15 – 0,84]
PXB (χ^2 , p)	0,41 $p > 0,05$	0,39; $p > 0,05$			0; $p > 0,05$	0; $p > 0,05$		

Модели взаимодействия изучаемых генов у больных БА

Оптимальные модели межгенных взаимодействий	Опытная взвешенная точность	Контрольная взвешенная точность	Тест на значимость (p)	Воспроизводимость модели (CV consistency)
Общая выборка				
<i>NOS3</i> (VNTR) x <i>NOS2A</i> (CCTTT) _n	0,6379	0,6131	10 (0,0010)	6/10
Девочки				
<i>NOS2A</i> (CCTTT) _n x <i>ARG2</i> (rs3742879)	0,6923	0,6613	9 (0,0107)	10/10
Мальчики				
<i>NOS2A</i> (CCTTT) _n x <i>NOS1</i> (ATT) _n <i>ARG2</i> (rs3742879)	0,7191	0,6253	8 (0,0547)	8/10

В нашей работе не выявлено ассоциации каждого из двух отмеченных полиморфизмов (*NOS3* (VNTR)) в отдельности с развитием БА у больных в общей выборке, и в выборке у девушек *ARG2* (rs3742879), но в сочетании друг с другом они детерминировали развитие данного заболевания.

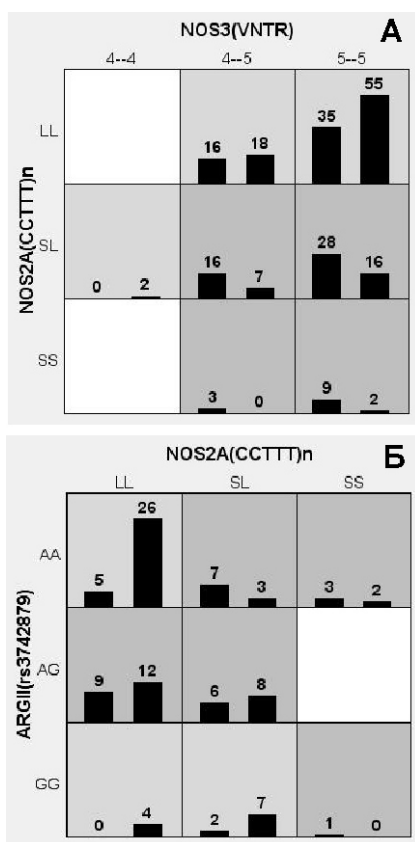


Рис. 1. Графическое представление моделей межгенных взаимодействий генов-кандидатов предрасположенности к развитию бронхиальной астмы (MDR). Двухлокусная (темно-серый цвет — генотипы повышенного риска; светло-серый цвет — генотипы пониженного риска; в каждой ячейке слева — группа больных, справа — контрольная группа): А — в общей выборке; Б — у девочек.

При попарном сравнении частот встречаемости определены наиболее значимые сочетания генотипов повышенного и пониженного риска развития БА (табл. 5).

У больных общей выборки установлен только генотип пониженного риска развития БА в двухлокусной модели *NOS3* (VNTR)*5/5 — *NOS2A* (CCTTT)_n*LL (OR = 0,4 [0,2—0,7]; p = 0,0012).

У девочек обнаружена ассоциация комбинации генотипов *NOS2A* (CCTTT)_n*SL x *ARG2* (rs3742879)*AA с повышенным риском развития бронхиальной астмы (OR = 5,30 [1,3—22,1]; p = 0,034) и с пониженным риском развития заболевания *NOS2A* (CCTTT)_n*LL x *ARG2* (rs3742879)*AA (OR = 0,36 [0,1—0,7]; p = 0,016).

С помощью программы MDR (forced algorithm — форсированный алгоритм) проведен кластерный анализ пятилокусной модели, результаты которого отражают характер взаимодействия и вклад полиморфизма каждого гена. На рисунке 2 показана дендрограмма, представляющая кластерную структуру взаимодействия изучаемых генов (5 локусов) у больных БА в общей выборке (2А), в группе девочек (2В) и мальчиков (2С).

Ведущую роль в развитии БА из числа изученных генов в общей выборке играет ген *NOS2A* (CCTTT)_n. Взаимодействие всех пяти полиморфных локусов характеризуется антагонизмом разной степени выраженности, более выраженным в отношении *NOS3* (VNTR) и *ARG1* (rs2781667). Менее выраженный антагонизм определен в отношении взаимодействия генов *ARG2* (rs3742879) и *NOS1* (ATT)_n (рис. 2А).

У девочек также ведущую роль в развитии БА играет ген *NOS2A* (CCTTT)_n. Однако взаимодействие трех генов является синергичным *NOS2A* (CCTTT)_n, *ARG2* (rs3742879) и менее синергичным для *NOS1* (ATT)_n. Антагонистический эффект предполагается для локусов *NOS3* (VNTR) (3,27%). Ген *ARG1* (rs2781667) не связан с исследуемыми генами (рис. 2В).

Основная роль в развитии БА у юношей также отводится гену *NOS2A* (CCTTT)_n. Ген *NOS2A* (CCTTT)_n взаимодействует синергично с генами *ARG1* (rs2781667) и *NOS1* (ATT)_n. Отсутствие связи или независимость

Таблица 5

Генотипы повышенного и пониженного риска бронхиальной астмы в общей выборке и у девушек

Комбинация генотипов, n (%)	БА	Контроль	χ^2 , p	OR [95%ДИ]
Двухлокусная модель в общей выборке				
Комбинация генотипов пониженного риска				
<i>NOS3</i> (VNTR)*5/5 x <i>NOS2A</i> (CCTTT) _n *LL	35 (32,7%)	55 (55%)	10,45; p = 0,0012	0,40 [0,2-0,7]
Двухлокусная модель у девочек				
Комбинация генотипов повышенного риска				
<i>NOS2A</i> (CCTTT) _n *SL x <i>ARG2</i> (rs3742879)*AA	7 (21,2%)	3 (4,8%)	4,51; p = 0,034	5,30 [1,3-22,1]
Комбинация генотипов пониженного риска				
<i>NOS2A</i> (CCTTT) _n *LL x <i>ARG2</i> (rs3742879)*AA	5 (15,2%)	26 (41,9%)	5,86; p = 0,016	0,25 [0,1-0,7]

эффектов отдельных локусов демонстрируют гены *ARG2* (rs3742879) и *NOS3* (VNTR).

Таким образом, проведенный анализ межгенных взаимодействий дал возможность установить ДНК-локусы исследованных генов, взаимодействующие при развитии наследственной предрасположенности к БА в общей выборке и у девушек, оценить вклад каждого из

исследуемых генов. Анализ межгенных взаимодействий позволил установить их сложный характер между генами NO-синтаз и аргиназы при БА и возможные патогенетические различия воздействия внешнесредовых факторов риска в развитии БА.

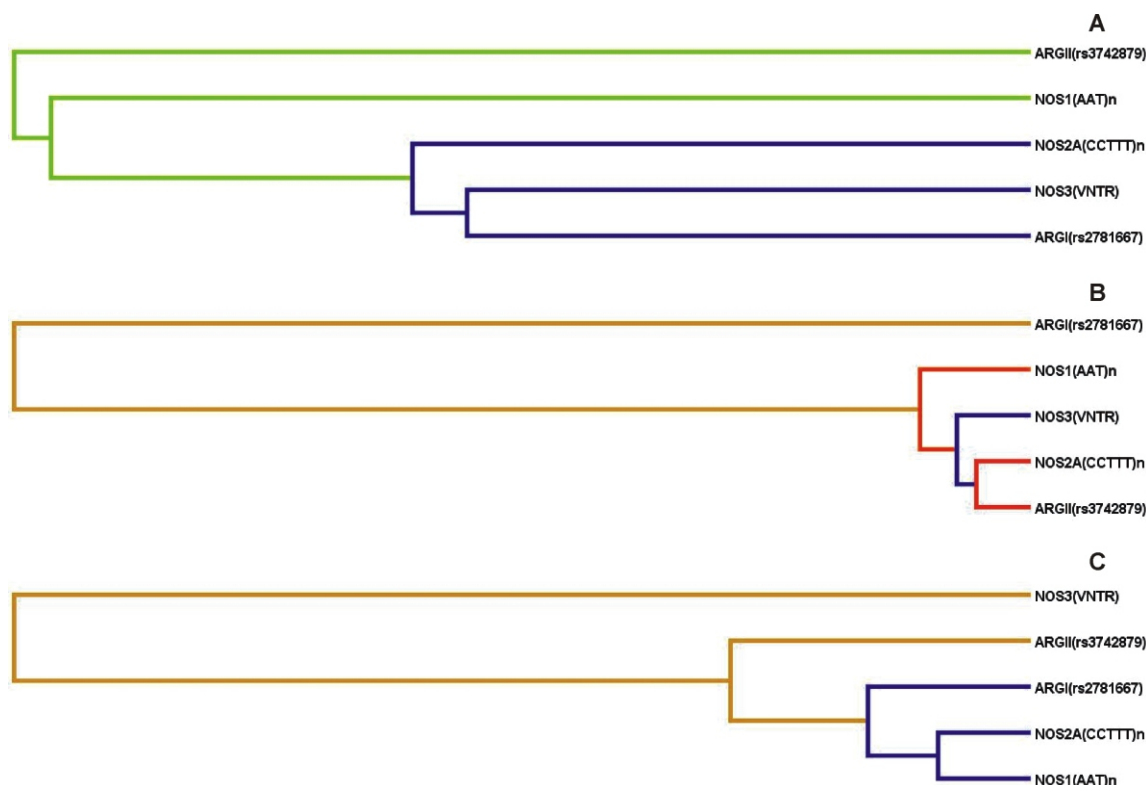


Рис. 2. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия исследованных генов у больных БА в общей выборке (2А), у девушек (2В) и у юношей (2С). Цвета в легенде: красный цвет обозначает высокую степень взаимодействия (синергизм), оранжевый — меньшую степень синергизма; синий — высокую степень антогонизма, зеленый — меньшую степень антогонизма, коричневый — отсутствие связи или независимость эффектов отдельных локусов.

Выводы

Выявлены генетические маркеры повышенного риска развития бронхиальной астмы у детей, проживающих в г. Москве (как в общей выборке, так и в выборке у девушек). Установлена ассоциация развития бронхиальной астмы в общей выборке с геном *NOS2* (CCTTT)_n. Гендерных различий в развитии БА при исследовании генов NO-синтаз и аргиназы не установлено. Выявлена ассоциация развития БА с полом, как у мальчиков, так и у девушек с локусами генов *NOS2A* (CCTTT)_n. Носительство аллелей, содержащих короткие tandemные повторы S и сочетание генотипов SS+SL гена *NOS2A* (CCTTT)_n является фактором риска развития бронхиальной астмы, как в общей выборке, так и в выборках у мальчиков и у девочек. Определена ассоциация частот аллелей *11, *13, 15* гена *NOS2A* (CCTTT)_n с повышенным риском развития БА, напротив аллель *12 и генотип *12/*12 обладали протективным эффектом.

Выявлены различия межгенных взаимодействий (в общей выборке и у девочек), predisposing к развитию БА.

Полученные результаты анализа межгенных взаимодействий свидетельствуют, что ключевая роль в predisposition к БА (из числа исследованных) у больных БА принадлежит генам индуцибельной синтазы оксида азота *NOS2A* (CCTTT)_n и *NOS3* (VNTR) в общей выборке, а у девочек — *NOS2A* (CCTTT)_n и полиморфизму rs 3742879 гена *ARG2*. У девочек установлена ассоциация комбинации генотипов *NOS2A* (CCTTT)_n*SL x *ARG2* (rs3742879)*AA — с повышенным риском, а *NOS2A* (CCTTT)_n*LL x *ARG2* (rs3742879)*AA — с пониженным риском развития бронхиальной астмы.

У больных общей выборки установлен только генотип пониженного риска развития БА в двухлокусной модели *NOS3* (VNTR)*5/5 — *NOS2A* (CCTTT)_n*LL.

Выявленные закономерности помогают лучше понять генетические механизмы наследственного predisposition к БА.

Список литературы

1. Bastain TM, Islam T, Berhane KT et al. Exhaled nitric oxide, susceptibility and new-onset asthma in the children's health study. *Eur. Respir. J.* 2010; 37: 523-531.
2. Fitzpatrick AM, Brown LA, Holguin F, Teague WG. Levels of nitric oxide oxidation products are increased in the epithelial lining fluid of children with persistent asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2009; 124: 990-996.
3. Pijnenburg MW, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review. *Clin. Exp. Allergy.* 2008; 38: 246-259.
4. Shef?eld M, Mabry S, Thibeault DW, Truog WE. Pulmonary nitric oxide synthases and nitrotyrosine: ?ndings during lung development and in chronic lung disease of prematurity. *Pediatrics.* 2006; 118: 1056-1064.
5. Morris SM. Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.* 2004; 134: 2743-2747S.
6. Grasemann H, Drazen JM, Elliot AD et al. Simple Tandem Repeat Polymorphisms in the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene in Different Ethnic Populations. *Hum. Hered.* 1999; 49: 139-141.
7. Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A et al. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 2043-2047.
8. Leung TF, Liu EKH, Tang NLS et al. Nitric oxide synthase polymorphisms and asthma phenotypes in Chinese children. *Clin. Exp. Allergy.* 2005; 35 (10): 1288-1294.
9. Келембет НА. Клинико-генетические особенности формирования бронхообструктивного синдрома при моногенных (муковисцидоз) и мультифакториальных (бронхиальная астма) заболеваниях легких. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2005; 17 с.
10. Сардарян ИС. Фенотипические особенности бронхиальной астмы у детей при различных аллельных полиморфизмах генов «predisposition» (GSTT1, GSTM1, ACE, eNOS). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2009; 22 с.
11. Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T et al. Variants of *NOS1*, *NOS2*, and *NOS3* genes in asthmatics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 267 (3): 761-763.
12. Holla LI, Stejskalova A, Znojil V et al. Analysis of the inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms in Czech patients with atopic diseases. *Clin. Exp. Allergy.* 2006; 36: 1592-1601.
13. Warpeha KM, Xu W, Liu L et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT) (n) repeat of *NOS2A* in diabetic retinopathy. *FASEB J.* 1999; 13: 1825-1832.
14. Батоjarгалова БЦ, Петрова НВ, Тимковская ЕЕ и др. Межполовые различия при анализе ассоциаций генов-кандидатов с риском развития бронхиальной астмы у подростков. *Вопросы практической педиатрии.* 2014; 9 (5): 14-19.
15. Pascual M, Sanz C, Isidoro-Garcia M et al. (CCTTT)_n polymorphism of *NOS2A* in nasal polyposis and asthma: a case-control study. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2008; 18 (4): 239-244.
16. Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 533: 253-262.
17. Benson RC, Hardy KA, Morris CR. Arginase and Arginine Dysregulation in Asthma. *Journal of Allergy.* 2011; 736319: 1-12.
18. Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *British Journal of Pharmacology.* 2009; 158: 652-664.
19. Li H, Romieu I, Sienra-Monge JJ et al. Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117 (1): 119-126.
20. Su MW, Tung KY, Liang PH et al. Gene-gene and gene-environmental interactions of childhood asthma: a multifactor dimension reduction approach. *PLoS One.* 2012; 7 (2): e30694.