

САВЕЛЬЕВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ
ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТЕРАПИИ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

1.5.7. генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре генетики и фундаментальной медицины
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Башкирский государственный университет» совместно с лабораторией
молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики – обособленного
структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного
учреждения Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук

Научный руководитель:

Карунас Александра Станиславовна Доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Пчелина Софья Николаевна
Доктор биологических наук

Руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий Научно-исследовательского центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Глотов Андрей Сергеевич
Доктор биологических наук

Руководитель отдела геномной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита диссертации состоится «27» апреля 2022 года в «__» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406).

С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ и ИБГ УФИЦ РАН (ibg.anrb.ru/dissov.html), e-mail: molgen@anrb.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Учёный секретарь диссертационного
совета 24.1.218.01
доктор биологических наук, доцент



Гульназ Фаритовна Коротина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Бронхиальная астма (БА) – это гетерогенное заболевание, характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей (GINA, 2021). В мире проживает более 300 млн больных БА, а распространенность этого заболевания в различных странах варьирует в пределах 1-18%, в России – 6,9-10% (Национальная программа БА, 2017; GINA, 2021). Наследуемость БА составляет от 55% до 74% у взрослых и достигает до 90% у детей (Willis-Owen et al., 2018; Hernandez-Pacheco et al., 2019). В развитии данного заболевания принимает участие множество генетических, эпигенетических и внешнесредовых факторов риска.

В последние годы проведен ряд масштабных генетических исследований БА с использованием современных методов исследований: полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=Asthma>), полноэкзомного секвенирования (Trueb et al., 2020; Bogari et al., 2021), полногеномного (Mak et al., 2018; Kachroo et al., 2019) и таргетного секвенирования с применением NGS-технологии (секвенирования нового поколения) (Gao et al., 2021), полнотранскриптомного анализа ассоциаций (TWAS) (Jiang et al., 2019; Valette et al., 2020; Forno et al., 2020). Наиболее статистически значимые ассоциации, неоднократно подтвержденные в исследованиях различных групп авторов на разных выборках, показали полиморфные варианты генов, расположенных в областях 17q12-21 (*ORMDL3*, *GSDMB*, *GSDMA*, *IKZF3*, *ZBP2*), 6p21.32 (*HLA-DQ*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQA2* и др.), 9p24.1 (*IL33*), 2q12 (*IL18R1*, *IL1RL1*, *IL1RL2*), 5q22.1 (*TSLP*). Функционирование большинства из ассоциированных с БА полиморфных локусов связано с иммунным ответом, дифференцировкой Th2-клеток, воспалительными процессами, барьерной функцией эпителия и др.

Фармакогенетические исследования БА являются одним из современных направлений изучения БА. Актуальность проведения подобных работ связана со сложностями контроля симптомов у больных с тяжелыми формами БА, резистентных к рекомендуемой терапии, и гетерогенностью ответа на лечение БА в целом. В России у 10-20% больных диагностируется тяжелое течение БА с признаками терапевтической резистентности (Национальная программа, 2017). Недостаточно эффективный контроль БА приводит к снижению качества жизни, развитию более тяжелых форм и увеличению частоты обострений заболевания, а также увеличению числа случаев инвалидизации пациентов (Caminati et al., 2021). Показано, что наследственность на 60-80% определяет чувствительность пациентов с БА к назначаемой терапии (Matera et al., 2017).

Фармакогенетические исследования проводятся как с помощью анализа полиморфных вариантов генов-кандидатов, так и с использованием GWAS исследований и других современных методов (Farzan et al., 2017; Keskin et al., 2019). В результате анализа генов-кандидатов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов, выявлены полиморфные варианты генов, ассоциированные с эффективностью ответа на терапию глюкокортикостероидами (ГКС), бета-2-агонистами, антилейкотриеновыми и антигистаминными препаратами и др. (*NR3C1*, *TBX21*, *CRHR1*, *ADRB2*, *ARG1*, *ARG2*, *HNMT*,

AOC1, *LTA4* и др.) (Isidoro-García et al., 2017; Farzan et al., 2017; Кучер, Черевко 2018). При GWAS обнаружены новые гены, участвующие в метаболизме ГКС (*GLCC11*, *TBXT*, *FBLX7*, *ALLC*), бета-2-агонистов (*SPATS2L*, *THRB*, *SLC22A15*), антилейкотриеновых (*MRPP3*) и антигистаминных препаратов (*PSAP*, *SCG3*, *ADCYAPI*), ассоциированные с развитием БА и ответом пациентов с БА на терапию (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/>).

Выполнен ряд эпигенетических исследований, в которых показана роль таких механизмов, как метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и экспрессия микроРНК, в развитии БА и формировании терапевтической резистентности пациентов к определенным группам препаратов (Menzella et al., 2016; Davidson et al., 2018; Reese et al., 2019). Опубликованы результаты масштабных эпигеномных анализов ассоциаций (EWAS) риска развития БА (<https://ngdc.cncb.ac.cn/ewas>), а также эпигеномных исследований ответа на терапию ИГКС (Wang (a) et al., 2019; Wang (b) et al., 2019).

В России выполнен ряд ассоциативных исследований генов, кодирующих бета-2-адренорецептор (Брянцева и др., 2007; Ненашева и др., 2008; Воропаев и др., 2018), глюкокортикостероидный рецептор (Жданова и др. 2007; Трофимов и др., 2013), генов аргиназ *ARG1* и *ARG2* (Батожаргалова и др., 2017), гена множественной лекарственной устойчивости *ABCB1* (Миронова и др., 2013; Воропаев и др., 2018; Застрожина, 2019). В Республике Башкортостан с 1998 г. проводятся клинико-генетические и молекулярно-генетические исследования БА, включавшие исследования полиморфных вариантов целого ряда генов-кандидатов данного заболевания, полногеномный анализ ассоциации БА (Эткина, 1999; Карунас и др., 2004, 2005, 2007, 2008, 2011 - 2015, 2021; Шалухина, 2006; Рамазанова, 2007; Федорова и др., 2009, 2010, 2011, 2013, 2016, 2019; Левашева и др. 2014, 2015; Мурзина и др. 2011, 2013, 2016; Гималова, 2017), однако комплексного генетического и эпигенетического исследования полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме препаратов, используемых для терапии БА, ранее не выполнялось.

Таким образом, в связи с наличием выраженной вариабельности терапевтического ответа пациентов на лечение БА, которая в значительной степени связана с генетической и эпигенетической изменчивостью, актуальным для раскрытия молекулярно-генетических основ индивидуальной чувствительности к терапии БА представляется исследование генов, участвующих в метаболизме бета-2-агонистов, глюкокортикостероидов, антигистаминных и антилейкотриеновых препаратов, у индивидов различной этнической принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан.

Цель исследования. Изучение роли генов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов, применяемых для лечения бронхиальной астмы, в развитии и течении данного заболевания у индивидов различной этнической принадлежности.

Задачи исследования

1. Провести исследование полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, бета-2-агонистов, антилейкотриеновых и антигистаминных препаратов, у больных БА и в контрольных группах индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

2. Провести анализ ассоциаций исследованных полиморфных вариантов генов с развитием и течением бронхиальной астмы у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

3. Провести мета-анализ ассоциаций исследованных полиморфных вариантов генов с развитием и течением бронхиальной астмы у индивидов различной этнической принадлежности.

4. Провести анализ метилирования промоторных областей генов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов, у больных бронхиальной астмой и в контрольной группе индивидов.

5. Провести оценку полигенного риска развития, ранней манифестации и тяжелого течения бронхиальной астмы.

Научная новизна. В рамках данной работы впервые проведено комплексное генетическое и эпигенетическое исследование полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, бета-2-агонистов, антилейкотриеновых и антигистаминных препаратов, у пациентов с БА и в соответствующих контрольных группах индивидов различной этнической принадлежности, проживающих в РБ, для раскрытия молекулярно-генетических основ индивидуальной чувствительности пациентов с БА к назначаемой терапии. Выполнен анализ ассоциации исследованных полиморфных локусов с развитием и течением БА, возрастом манифестации БА, показателями функции внешнего дыхания, уровнем общего IgE; проведен мета-анализ результатов исследования ассоциаций полиморфных локусов с развитием БА. Впервые проанализирован уровень метилирования промоторных регионов генов *HRH1*, *HRH2*, *GLCCII*, *ARG2*, *AOC1* у больных БА и в контрольной группе практически здоровых индивидов. Впервые проведена оценка полигенного риска развития БА, начала БА в детском возрасте и тяжелого течения заболевания у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты расширяют общее представление о формировании генетической предрасположенности к развитию БА, о роли генов, участвующих в метаболизме противоастматических препаратов, в вариативности течения данного заболевания на фоне проводимого лечения. Результаты исследования могут использоваться при разработке панели генетических маркеров для прогнозирования риска развития БА, оптимизации диагностики, профилактики и лечения пациентов, для изучения в вузах медико-биологического профиля, на курсах повышения квалификации у работников медицинских учреждений. Полигенные модели риска могут быть использованы для расчета индивидуального риска развития БА с целью профилактики возникновения заболевания.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с использованием комплексного методологического подхода, основанного на применении современных молекулярно-генетических, статистических и биоинформатических методов, а также анализа литературных данных ведущих отечественных и зарубежных авторов в области медицины, генетики и фармакогенетики БА. Исследование полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме противоастматических препаратов, и/или ассоциированных с

чувствительностью пациентов к терапии БА по данным GWAS, и анализ метилирования промоторных областей генов *HRH1*, *HRH2*, *GLCC11*, *ARG2*, *AOC1* выполнены на репрезентативной выборке случай (больные БА) – контроль из РБ. Молекулярно-генетические исследования проводились в лаборатории ПЦР-анализа Башкирского государственного университета и в лаборатории молекулярной генетики человека ИБГ УФИЦ РАН.

Положения, выносимые на защиту

1. Полиморфные варианты генов *FBXL7*, *CRHR1*, *ARG2*, *SPATS2L*, *SLC7A2* и *AOC1* ассоциированы с риском развития БА у русских; генов *FBXL7*, *ARG1*, *THRB* и *HRH1* – с риском развития БА у татар; генов *CRHR1*, *SPATS2L*, *CMTR1* и *TBXT* – с риском развития БА у башкир.

2. Полиморфные варианты гена *ARG2* ассоциированы с тяжелым и среднетяжелым течением БА у русских, генов *FBXL7*, *ARG1* и *HRH1* – у татар, генов *HNMT*, *ALDH7A1* – у башкир.

3. Манифестация БА в детском возрасте ассоциирована с аллелями и генотипами полиморфных вариантов генов *AOC1* и *ARG2* у русских; гена *GLCC11* – у татар; генов *CMTR1*, *HNMT* и *ADCYAP1* – у башкир.

4. Изменение количественных показателей спирографии – снижение МОС75 у больных БА, носителей генотипов rs37973*CT, rs37973*CC гена *GLCC11*, rs211589*CC гена *ALOX5*, и снижение ОФВ1 у носителей генотипа rs3787429*TT гена *HRH3* татарской этнической принадлежности; снижение МОС50 у больных БА, носителей генотипа rs11665084*CC гена *HRH4* башкирской этнической принадлежности.

5. Полиморфные варианты генов *FBXL7*, *CMTR1*, *CRHR1*, *SPATS2L*, *SLC7A2*, *HRH1* и *HRH3* ассоциированы с риском развития БА; генов *FBXL7*, *CMTR1* и *HRH3* - с манифестацией БА в детском возрасте; генов *CRHR1*, *HNMT* и *HRH1* – с тяжелым и среднетяжелым течением БА у индивидов различной этнической принадлежности по данным мета-анализа.

6. Статистически значимые различия уровней метилирования промоторных областей генов *HRH1*, *AOC1* и *GLCC11* обнаружены между больными БА и контрольной группой индивидов.

7. Модели полигенного риска ассоциированы с развитием БА, с манифестацией БА в детском возрасте, с неконтролируемым течением и тяжелой формой заболевания у индивидов различной этнической принадлежности

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Результаты исследования апробированы на всероссийских и международных конференциях: «Биология будущего» (Уфа, 2017), XXVIII Национальный конгресс по болезням органов дыхания (Москва, 2018), «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2019), «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров» (Санкт-Петербург, 2019), XXIX Национальный конгресс по болезням органов дыхания (Москва, 2019), «Биология будущего» (Уфа, 2019), «Фундаментальные и прикладные аспекты иммунологии, генетики и инфектологии» (Уфа, 2020), «European Human Genetics Conference 2020.2»

(онлайн-конференция, 2020), XXX Национальный конгресс по болезням органов дыхания (Москва, 2020), European Academy of Allergy and Clinical Immunology (онлайн-конференции, 2020, 2021), «Геномика 21 века» (Москва, 2021), Ломоносов-2021 (Москва, 2021), «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2021), Всероссийская конференция «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» (Саранск, 2021), Всероссийская конференция «Современные достижения молодых ученых в биологии и медицине» (Астрахань, 2021), III Всероссийская научная конференция «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии» (Уфа, 2021).

Личное участие автора в получении результатов. Автор работы лично участвовал в постановке цели и задач исследования, разработке дизайна исследования, анализе отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в проведении экспериментальной работы: сборе материала, выделении ДНК, генотипировании, анализе ассоциации полиморфных локусов с развитием БА, анализе метилирования промоторных областей генов. Автор лично выполнил комплексную статистическую обработку полученных данных, написал рукопись данной работы, участвовал в написании и подготовке публикаций. Суммарный вклад работы автора составляет более 80%.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности. Диссертационная работа «Исследование молекулярно-генетических основ индивидуальной чувствительности к терапии бронхиальной астмы» соответствует формуле специальности 1.5.7. генетика. В диссертационной работе исследованы генетические и эпигенетические аспекты БА на основании анализа генов, участвующих в ответе на лекарственную терапию данного заболевания, что относится к одной из областей исследований медицинской генетики человека.

Структура и объем работы. Работа включает в себя разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Текст работы иллюстрирован 71 рисунком, включает 61 таблицу, список литературы состоит из 345 источников.

Публикации. По теме работы опубликована 31 публикация, из них 9 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 4 статьи из которых индексируются в международных базах данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования. Группу пациентов составили 561 больной БА в возрасте от 3 до 62 лет (331 – мужского пола, 230 – женского пола) различной этнической принадлежности (русской – 174, татарской – 142, башкирской – 105, смешанной – 140). Все обследованные являлись пациентами детского отделения Клиники БГМУ, пульмонологического и аллергологического отделений ГКБ № 21 г. Уфы и аллергологического отделения ГБУЗ РДКБ (г. Уфа). Для проведения исследования общая выборка больных БА в зависимости от возраста манифестации заболевания была разделена на группу больных БА с началом заболевания в детском возрасте (до 18 лет, childhood - onset asthma) (376 человек) и группу

больных с поздним дебютом БА (18 лет и старше, adult - onset asthma) (185 человек). В зависимости от тяжести течения БА выборка больных в соответствии с поставленным клиническим диагнозом была разделена на группы: больные с тяжелым течением БА (91 человек), пациенты со среднетяжелым течением БА (260 человек), больные с легкой формой БА (210 человек). Неконтролируемое и частично-контролируемое течение заболевания наблюдалось у 92 человек, хорошо контролируемое течение БА – у 122 индивидов. Диагноз заболевания устанавливался квалифицированными врачами на основании данных клинического, общелабораторных и дополнительных методов исследования в соответствии с критериями отечественных программных документов по диагностике, лечению и профилактике данного заболевания.

В качестве контроля исследована группа практически здоровых индивидов без бронхолегочных, аллергических и аутоиммунных заболеваний с неотягощенной наследственностью в отношении аллергических заболеваний, состоящая из 504 человек в возрасте от 4 до 67 лет (213 – мужского пола, 291 – женского пола) различной этнической принадлежности (русской – 194, татарской – 145, башкирской – 86, смешанной – 79). Этническая принадлежность обследуемых лиц определена на основе информации об их национальности по обеим родительским линиям до трех поколений. Все дети с 15 лет, участвующие в исследовании, и родители детей младше 15 лет дали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальным биоэтическим комитетом ИБГ УНЦ РАН (протокол № 4 от 15.11.2012 г.).

Методы исследования. ДНК выделена из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984). Генотипирование полиморфных локусов выполнено методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени (Таблица 1). Анализ метилирования генов проводился с использованием таких методов как метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением (MS-NRM) и бисульфитное секвенирование. Работа частично выполнена на оборудовании РЦКП «Агидель» (<https://ckp-ufic.ru/>). Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ: MS Office Excel 2019, Plink 1.9 (Chang et al., 2015), WinPepi v.11.32 (Abramson, 2011). Парное сравнение частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля выполняли с помощью критерия (p) для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йэтса на непрерывность; анализ силы ассоциаций – с помощью значений показателя соотношения шансов Odds Ratio (OR). Вклад аллельных вариантов изучаемых генов-кандидатов в вариабельность количественных признаков определяли с помощью критериев Краскела-Уоллиса или Манна-Уитни (Graphpad Prism 9.1.0.). Полигенная оценка риска проводилась на основании результатов логистического регрессионного анализа (регрессионных коэффициентов β), а также данных суммарной статистики мета-анализа GWAS исследований БА (Demais et al., 2018) (PLINK 1.9, RStudio 1.4.1717).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов для терапии БА, с развитием заболевания

Проведено исследование 38 полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, бета-2-агонистов, антилейкотриеновых и антигистаминных препаратов и/или ассоциированных с ответом на противоастматическую терапию по данным GWAS, у индивидов различной этнической принадлежности из РБ (Таблица 1). Выполнен анализ ассоциаций исследованных полиморфных локусов с риском развития БА, с возрастом манифестации, тяжестью и уровнем контроля течения заболевания, количественными показателями функции внешнего дыхания и уровнем общего иммуноглобулина Е (IgE) у индивидов различной этнической принадлежности. Распределение частот генотипов всех исследованных полиморфных вариантов генов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Таблица 1 — Характеристика исследованных полиморфных локусов

SNP ID	Полиморфный вариант	Ген, локализация	Белковый продукт
Гены, участвующие в метаболизме ГКС			
rs37973	с.-1106G>A	<i>GLCCII</i> , 7p21.3	Глюкокортикоид-индуцированный транскрипт 1
rs2305089	р.Gly177Asp	<i>TBXT</i> , 6q27	Транскрипционный фактор Т
rs11123610	с. 84+1311G>A	<i>ALLC</i> , 2p25.3	Аллантоиказа
rs10044254	с. 128-144403A>G	<i>FBXL7</i> , 5p15.1	Белок, содержащий лейцин-богатые повторы и F-box домен
rs2691529	с. 128-144403A>G	<i>MAGI2</i> , 7q21.11	Мембраносвязанная гуанилаткиназа
rs2395692	с. 1096-748G>A	<i>CMTR1</i> , 6p21.2	Метилтрансфераза 1
rs41423247	с. 1184+646C>G	<i>NR3C1</i> , 5q31.3	Глюкокортикоидный рецептор
rs242828	с. 241+1631A>G	<i>CRHR1</i> , 17q21.31	Кортикотропин-рилизинг-гормон
rs1876828	с. 1107+111C>T		
rs242941	с. 122-1310A>C		
rs2240017	р.His33Gln	<i>TBX21</i> , 17q21.32	Транскрипционный фактор Т-box 21
Гены, участвующие в метаболизме бета-2-агонистов			
rs1042713	р. Gly16Arg	<i>ADRB2</i> , 5q32	Бета-2-адренергический рецептор
rs1042714	р. Gln27Glu		
rs1281744	g. 201150040C>T	<i>SLC22A15</i> , 1p13.1	Транспортер органических ионов
rs892940	н. 406-2185A>G	<i>THRB</i> , 3p24.2	Рецептор тиреоидного гормона В
rs2781667	с. 57+665C>T	<i>ARG1</i> , 6q23.2	Аргиназа 1
rs2781659	с. 77-8431A>G		
rs17249437	с. 185-8016T>C	<i>ARG2</i> , 14q24.1	Аргиназа 2
rs7140310	с. 363-1623T>G		
rs3742879	с. 859+101A>G		

rs219242	c. 311-2546G>T	<i>CRHR2</i> , 7p21-p15	Рецептор кортикотропин-рилизинг гормона 2
rs2720499	c.-22-8470C>A	<i>SLC7A2</i> , 8p22	Катионный транспортер аминокислот 2 типа
rs2230739	p.Ile772Met	<i>ADCY9</i> , 16p13.3	Аденилатциклаза 9
rs295137	g. 201150040C>T	вблизи <i>SPATS2L</i> , 2q33.1	Белок стрессовых гранул и ядрышка
Гены, участвующие в метаболизме антигистаминных препаратов			
rs1049793	p.His664Asp	<i>AOC1</i> , 7q36.1	Медьсодержащая аминоксидаза 1
rs11558538	p.Thr105Ile	<i>HNMT</i> , 2q22.1	Гистамин N-метилтрансфераза
rs1799836	c.1348-36A>G	<i>MAOB</i> , Xp11.3	Моноаминоксидаза B
rs901865	c.-17T>C	<i>HRH1</i> , 3p25.3	Гистаминовый рецептор 1 типа
rs2067474	c.-525-493G>A	<i>HRH2</i> , 5q35.2	Гистаминовый рецептор 2 типа
rs3787429	p.Arg196His	<i>HRH3</i> , 20q13.33	Гистаминовый рецептор 3 типа
rs11665084	p.Ala138Val	<i>HRH4</i> , 18q11.2	Гистаминовый рецептор 4 типа
rs13182402	c.517+395T>C	<i>ALDH7A1</i> , 5q23.2	Альдегиддегидрогеназа 7 семейства A1
rs2231187	p.Lys152=	<i>ADCYAP1</i> , 18p11.32	Полипептид 1, активирующий аденилатциклазу
rs11000016	g.71819460C>T	<i>PSAP</i> , 10q22.1	Просапозин
rs17525472	g.51677471T>C	вблизи <i>SCG3</i> , 15q21.2	Секретогранин 3
Гены, участвующие в метаболизме антилейкотриеновых препаратов			
rs730012	g.559214A>C	<i>LTC4S</i> , 5q35.3	Лейкотриен C4 синтетаза
rs2115819	g.45901089A>G	<i>ALOX5</i> , 10q11.21	Арахидонат-5-липооксигеназа
rs2660845	g.96044775G>A	<i>LTA4H</i> , 12q23.1	Лейкотриен-A4-гидролаза

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, с развитием и течением БА

В настоящее время ГКС являются наиболее эффективными противовоспалительными препаратами, используемыми для лечения БА. ГКС рекомендуются для подавления как острого, так и хронического воспаления дыхательных путей (GINA, 2021). В данной работе проведено исследование полиморфных вариантов 9 генов – *GLCC11* (rs37973), *TBX1* (rs2305089), *ALLC* (rs11123610), *FBXL7* (rs10044254), *MAGI2* (rs2691529), *CMTR1* (rs2395692), *NR3C1* (rs41423247), *CRHR1* (rs242828; rs1876828, rs242941), *TBX21* (rs2240017), участвующих в метаболизме ГКС и/или ассоциированных с ответом на терапию ГКС по данным GWAS, у больных БА и в контрольной группе индивидов.

Обнаружены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs10044254 гена *FBXL7* между больными БА и индивидами соответствующих контрольных групп русской и татарской этнической принадлежности. У русских выявлена ассоциация генотипа rs10044254**TT* и аллеля rs10044254**T* гена *FBXL7* с развитием БА ($\chi^2=5,56$; $p=0,02$; OR=1,67; 95% CI 1,09-2,55 и $\chi^2=6,85$; $p=0,009$; OR=1,58; 95% CI 1,12-2,22) и началом БА в детском возрасте ($\chi^2=4,83$;

$p=0,03$; $OR=1,77$; $95\%CI$ 1,06-2,97 и $\chi^2=4,8$; $p=0,03$; $OR=1,59$; $95\%CI$ 1,05-2,41) (Рисунок 1а). Установлена ассоциация аллеля rs10044254**T* гена *FBXL7* с тяжелым и среднетяжелым течением БА у татар ($\chi^2=4,58$; $p=0,03$; $OR=1,8$; $95\%CI$ 1,05-3,1), генотипа rs10044254**CC* – с пониженным риском развития БА у татар ($\chi^2=4,39$; $p=0,04$; $OR=0,34$; $95\%CI$ 0,12-0,99) (Рисунок 1б). Ранее при GWAS детей с БА европейского происхождения было показано, что полиморфный вариант rs10044254 гена *FBXL7* ассоциирован с чувствительностью к терапии ИГКС у больных БА (Park et al., 2014).

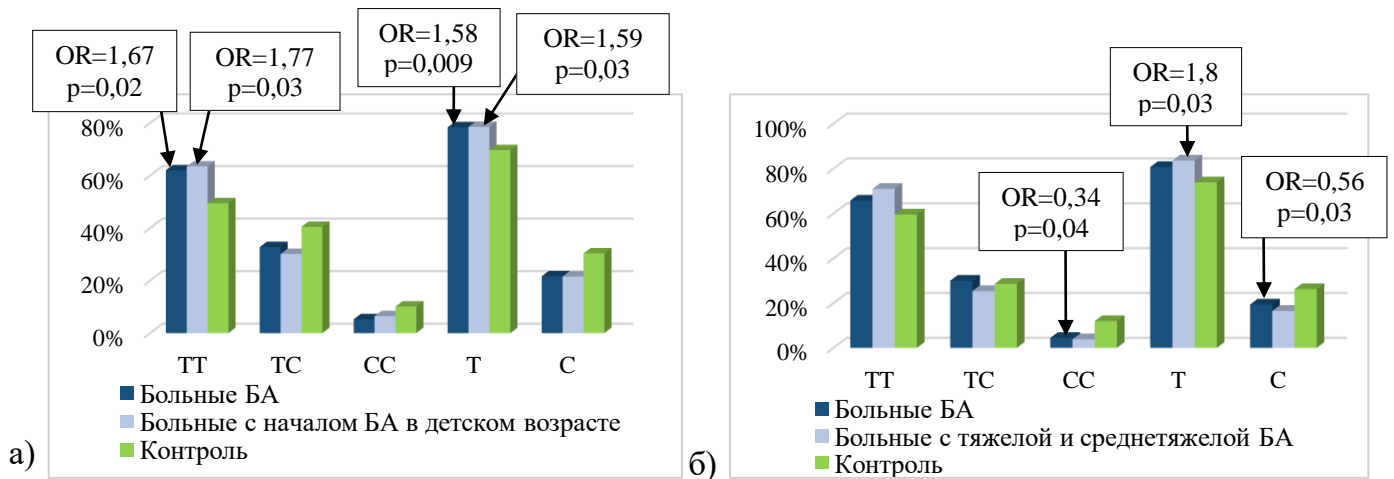


Рисунок 1 — Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs10044254 гена *FBXL7* у больных БА и в контрольных группах индивидов русской (а) и татарской (б) этнической принадлежности.

При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs242941 гена *CRHR1* в контрольных группах индивидов различной этнической принадлежности выявлено, что более распространенный аллель rs242941**C* гена *CRHR1* у русских встречается значительно реже (66,4%), чем у татар (75,69%; $\chi^2=6,78$; $p=0,009$) и башкир (83,14%; $\chi^2=16,30$; $p=0,00005$). У русских обнаружено значительное увеличение частоты аллеля rs242941**C* гена *CRHR1* в группе больных БА (73,85%) по сравнению с соответствующим контролем (66,4%; $\chi^2=4,78$; $p=0,028$; $OR=1,43$; $95\%CI$ 1,04-1,97). В выборке башкир, напротив, установлена более высокая частота аллеля rs242941**A* гена *CRHR1* у больных БА и пациентов с началом БА в детском возрасте (27,18% и 28,85%), по сравнению с контролем (16,86%; $\chi^2=5,73$; $p=0,02$; $OR=1,84$; $95\%CI$ 1,11-3,05 и $\chi^2=5,54$; $p=0,02$; $OR=2,0$; $95\%CI$ 1,12-3,58). Обнаруженные нами межэтнические различия согласуются с данными проекта 1000 Genomes, согласно которым частота аллеля rs242941**C* в различных популяциях значительно варьирует и изменяется с Запада на Восток: от 66,2% в европейских (CEU), до 85,6%-92,7% в азиатских популяциях (CHB, JPT) (<https://www.ensembl.org/>).

Установлено, что аллель rs2305089**T* гена *TBX1* ассоциирован с началом БА в детском возрасте у башкир ($\chi^2=5,59$; $p=0,02$; $OR=2,16$; $95\%CI$ 1,14-4,09). Ранее при GWAS индивидов европейского происхождения была выявлена тенденция к ассоциации полиморфного варианта rs2305089 гена *TBX1* с приростом ОФВ1 на фоне терапии ИГКС у больных БА (Tantisira et al., 2012). У башкир обнаружена ассоциация генотипа

rs2395672*GG и аллеля rs2395672*G гена *CMTR1* с развитием БА ($\chi^2=5,06$; $p=0,02$; OR=1,98; 95%CI 1,09-3,59 и $\chi^2=5,12$; $p=0,024$; OR=1,77; 95%CI 1,08-2,93) и манифестацией БА в детском возрасте ($\chi^2=6,62$; $p=0,01$; OR=2,67; 95%CI 1,25-5,69 и $\chi^2=7,65$; $p=0,006$; OR=2,54; 95%CI 1,29-4,98). При GWAS показано, что генотип rs2395672*AA гена *CMTR1* ассоциирован с повышенной частотой обострений БА в ответ на использование ИГКС у индивидов европейского происхождения (Dahlin et al., 2015).

Обнаружена более высокая частота аллеля rs37973*C гена *GLCCII* в группе пациентов татарской этнической принадлежности с началом БА в детском возрасте (52,73%), чем в соответствующей контрольной группе (41,57%; $\chi^2=4,72$; $p=0,03$; OR=1,57; 95%CI 1,04-2,36). Анализ вариабельности количественных показателей функции внешнего дыхания по данным спирографии в группе татар с БА выявил более низкие значения МОС75 у носителей генотипов rs37973*CT ($M\pm SE$; 74,24 \pm 5,02) и rs37973*CC (81,11 \pm 7,21) гена *GLCCII* по сравнению с пациентами, имеющими генотип rs37973*TT (103,8 \pm 9,53; $p=0,02$). При GWAS детей с БА европейского происхождения было обнаружено, что полиморфный локус rs37972 гена *GLCCII*, находящийся в тесном неравновесии по сцеплению с полиморфным вариантом rs37973, ассоциирован с низкой чувствительностью к терапии ИГКС (Tantisira et al., 2011). Показано, что аллель rs37973*C и генотип rs37973*CC гена *GLCCII* ассоциированы с развитием БА и низкими значениями показателей спирографии у пациентов с БА, использующих ИГКС (Izuhara et al., 2014; Hu et al., 2016; Huang et al., 2020).

Проведен мета-анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, с развитием и течением БА у индивидов русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности (Таблица 2).

Таблица 2 — Результаты мета-анализа ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме противоастматических препаратов, с развитием БА у индивидов русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности

Ген	SNP	A1	A2	N	Модель с фиксированным эффектом		Модель со случайным эффектом		Q	I ²
					P	OR	P(R)	OR(R)		
Развитие БА										
<i>FBXL7</i>	rs10044254	C	T	4	0,003	0,7003	0,003	0,7003	0,46	0,00
<i>CMTR1</i>	rs2395672	A	G	4	0,017	0,7653	0,0175	0,7650	0,39	1,09
<i>SPATS2L</i>	rs295137	T	C	4	0,0007	0,6241	0,0011	0,6214	0,35	8,74
<i>SLC7A2</i>	rs2720499	C	A	4	0,0259	1,5533	0,0259	1,5533	0,47	0,00
<i>HRH3</i>	rs3787429	T	C	4	0,0058	1,2873	0,0058	1,2873	0,66	0,00
Манифестация БА в детском возрасте										
<i>FBXL7</i>	rs10044254	C	T	4	0,0176	0,7311	0,0177	0,7311	0,49	0,00
<i>CMTR1</i>	rs2395672	A	G	4	0,0002	0,6065	0,0004	0,6021	0,34	11,24
<i>HRH3</i>	rs3787429	T	C	4	0,0032	1,3528	0,0032	1,3528	0,66	0,00

Примечания: N - число групп, включенных в исследование, P - p-value fixed, P(R) – p-value random, Q – критерий гетерогенности Кохрена, I² – оценка индекса статистической гетерогенности.

При мета-анализе обнаружены ассоциации аллелей rs10044254**T* гена *FBXL7* и rs2395672**G* гена *CMTR1* с риском развития БА ($p=0,003$; OR=1,43; 95%CI 1,13-1,80 и $p=0,017$; OR=1,31; 95%CI 1,05-1,63) и манифестацией БА в детском возрасте ($p=0,018$; OR=1,37; 95%CI 1,06-1,77 и $p=0,0002$; OR=1,66; 95%CI 1,28-2,15); rs1876828**T* гена *CRHR1* – со среднетяжелым и тяжелым течением БА ($p=0,045$; OR=1,38, 95%CI 1,0-1,87) (Таблица 2); rs2395672**G* гена *CMTR1* – с неконтролируемым и частично-контролируемым течением БА ($p=0,039$; OR=1,80; 95% CI 1,13-2,86).

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме бета-2-агонистов, с развитием и течением БА

Бета-2-агонисты представляют собой одну из основных групп препаратов, применяемых для лечения БА. Бета-2-агонисты короткого действия используются для снятия острых бронхоконстрикторных симптомов, тогда как бета-2-агонисты длительного действия назначаются для обеспечения длительной бронходилатации и купирования симптомов заболевания. Нами проведен анализ полиморфных вариантов 9 генов – *ADRB2* (rs1042713, rs1042714), *SLC22A15* (rs1281744), *THRB* (rs892940), *ARG1* (rs2781667, rs2781659), *ARG2* (rs17249437, rs7140310, rs3742879), *CRHR2* (rs219242), *SLC7A2* (rs2720499), *ADCY9* (rs2230739), rs295137 (*SPATS2L*), участвующих в метаболизме бета-2-агонистов и/или ассоциированных с ответом на терапию препаратами этой группы по данным GWAS, у больных БА и в контрольной группе индивидов.

Статистически значимые различия между группами сравнения больных БА и контроля выявлены по полиморфным локусам rs2781667 гена *ARG1* и rs3742879 гена *ARG2*. Обнаружена ассоциация аллеля rs2781667**C* гена *ARG1* с развитием БА, а также с тяжелым и среднетяжелым течением БА у татар ($\chi^2=5,37$; $p=0,02$; OR=1,62; 95%CI 1,08-2,44 и $\chi^2=5,89$; $p=0,015$; OR=1,8; 95%CI 1,12-2,89) (Рисунок 2а).

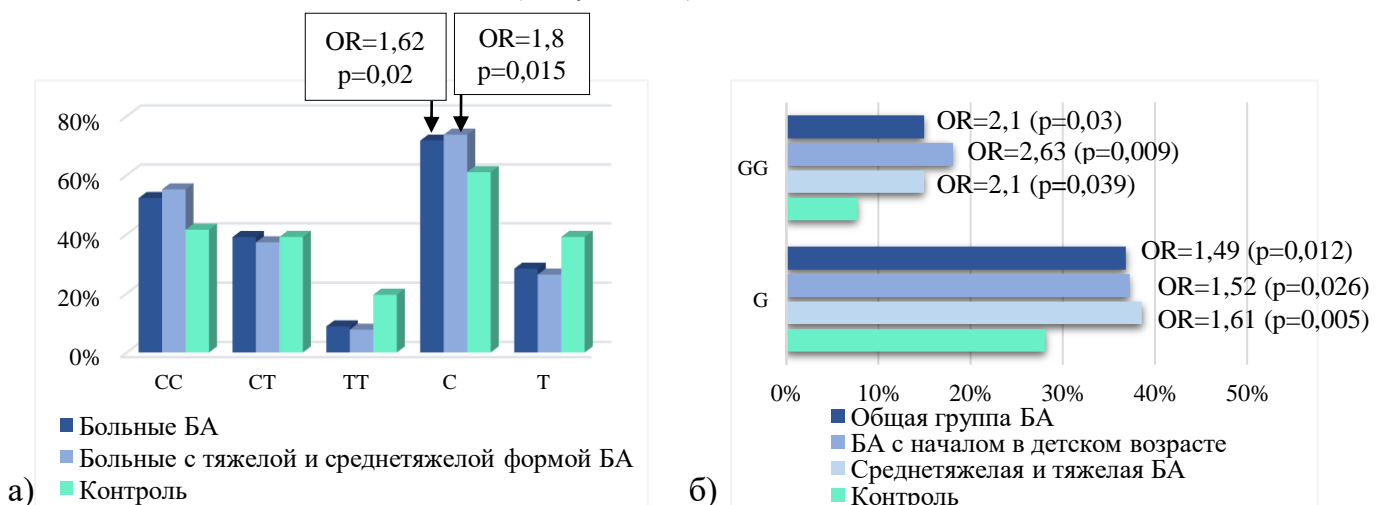


Рисунок 2 — Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *ARG1* и *ARG2* у больных БА и в контрольных группах: а) rs2781667 гена *ARG1* у татар; б) rs3742879 гена *ARG2* у русских.

Выявлена ассоциация генотипа rs3742879*GG и аллеля rs3742879*G гена *ARG2* с развитием БА ($\chi^2=4,82$; $p=0,03$; OR=2,1; 95% CI 1,07-4,1 и $\chi^2=6,34$; $p=0,012$; OR=1,49; 95% CI 1,09-2,03), с началом БА в детском возрасте ($\chi^2=6,87$; $p=0,009$; OR=2,63; 95% CI 1,25-5,54 и $\chi^2=4,94$; $p=0,026$; OR=1,52; 95% CI 1,05-2,2), со среднетяжелым и тяжелым течением БА ($\chi^2=4,24$; $p=0,039$; OR=2,1; 95% CI 1,02-4,3 и $\chi^2=7,73$; $p=0,005$; OR=1,61; 95% CI 1,15-2,25) у русских (Рисунок 2б).

При исследовании полиморфного локуса rs2720499 гена *SLC7A2* выявлено, что генотип rs2720499*AC и аллель rs2720499*C гена *SLC7A2* статистически значимо чаще встречаются у русских с БА (16,77% и 9,03%) по сравнению с контролем (8,0%; $\chi^2=5,94$; $p=0,015$; OR=2,32; 95% CI 1,16-4,62 и 4,0%; $\chi^2=6,99$; $p=0,008$; OR=2,38; 95% CI 1,23-4,61). Обнаружена ассоциация аллеля rs892940*T гена *THRB* с развитием БА у татар ($\chi^2=3,85$; $p=0,05$; OR=1,52; 95% CI 1-2,31). Duan Q. с коллегами при исследовании 1116 полиморфных вариантов генов у индивидов европейского происхождения показано, что аллель rs892940*T гена *THRB* с наибольшим уровнем значимости ассоциирован с более высокой чувствительностью пациентов с БА к использованию бета-2-агонистов (Duan et al., 2013).

Установлено, что генотип rs295137*CC и аллель rs295137*C полиморфного локуса rs295137, расположенного вблизи гена *SPATS2L*, ассоциированы с развитием БА у русских ($\chi^2=8,67$; $p=0,003$; OR=2,81; 95% CI 1,4-5,62 и $\chi^2=8,23$; $p=0,004$; OR=2,25; 95% CI 1,28-3,95), аллель rs295137*C – с риском развития БА у башкир ($\chi^2=4,5$; $p=0,03$; OR=2,1; 95% CI 1,05-4,19). Ассоциация полиморфного варианта rs295137 гена *SPATS2L* с ответом на терапию бронходилататорами была выявлена при GWAS БА у индивидов европейского происхождения (Himes et al., 2012).

Мета-анализ, проведенный нами в группах русских, татар, башкир и индивидов смешанной этнической принадлежности, показал наличие ассоциации аллеля rs295137*C с развитием БА ($p=0,0007$; OR=1,61; CI95% 1,23-2,10), аллеля rs2720499*C гена *SLC7A2* - с развитием и манифестацией БА в детском возрасте ($p=0,026$; OR=1,55; 95% CI 1,06-2,30 и $p=0,049$; OR=1,51, 95% CI 1-2,25 (Таблица 2).

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме антигистаминных препаратов, с развитием и течением БА

Антигистаминные препараты представляют собой лекарственные средства, осуществляющие конкурентную блокаду в организме рецепторов гистамина, являющегося одним из важнейших медиаторов аллергического воспаления. Выполнено исследование полиморфных вариантов 11 генов, участвующих в метаболизме антигистаминных препаратов, у больных БА и контрольной выборки из РБ: *AOC1* (rs1049793), *HNMT* (rs11558538), *MAOB* (rs1799836), *HRH1* (rs901865), *HRH2* (rs2067474), *HRH3* (rs3787429), *HRH4* (rs11665084), *ALDH7A1* (rs13182402), *ADCYAP1* (rs2231187), *PSAP* (rs11000016), полиморфного локуса rs17525472 (chr 15:51677471, локализованного вблизи *SCG3*).

Выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs1049793 гена *AOCI* между больными БА и контрольной группой русской этнической принадлежности. Обнаружена ассоциация генотипа rs1049793*CC и аллеля rs1049793*C гена *AOCI* с развитием БА ($\chi^2=6,65$; $p=0,01$; OR=1,73; 95%CI 1,14-2,62 и $\chi^2=4,5$; $p=0,034$; OR=1,4; 95%CI 1,03-1,91) и началом БА в детском возрасте ($\chi^2=7,28$; $p=0,007$; OR=1,99; 95%CI 1,2-3,3 и $\chi^2=7,46$; $p=0,006$; OR=1,72; 95%CI 1,16-2,54) у русских. Показано, что в группе русских с БА, имеющих генотип rs1049793*CC, уровень общего IgE в сыворотке крови значительно выше ($p=0,006$; 543,4±73,71), чем у носителей генотипов rs1049793*CG (M±SE; 306,9±40,65) и rs1049793*GG (158,5±31,73).

Установлена ассоциация аллеля rs11558538*T гена *HNMT* с развитием и началом БА в детском возрасте ($\chi^2=5,91$; $p=0,015$; OR=2,28; 95%CI 1,16-4,48 и $\chi^2=4,74$; $p=0,029$; OR=2,31; 95%CI 1,07-4,97), а также со среднетяжелым и тяжелым течением БА ($\chi^2=6,1$; $p=0,014$; OR=2,42; 95%CI 1,18-4,94) у башкир. Meza-Velázquez R. с коллегами показано, что у пациентов с аллергическими заболеваниями, являющихся носителями аллелей rs1049793*C гена *AOCI* и rs11558538*T гена *HNMT*, отмечается более высокий уровень гистамина в сыворотке крови, чем у носителей альтернативных аллелей (Meza-Velázquez et al., 2016).

Выявлено достоверное повышение частоты генотипа rs901865*GA и аллеля rs901865*A гена *HRH1* в группе больных БА татарской этнической принадлежности (36,45% и 20,09%), по сравнению с контролем (19,51%; $\chi^2=6,45$; $p=0,01$; OR=2,37; 95%CI 1,21-4,64 и 10,98%; $\chi^2=5,7$; $p=0,017$; OR=2,04; 95%CI 1,13-3,69). Обнаружена ассоциация генотипа rs901865*GA и аллеля rs901865*A гена *HRH1* со среднетяжелым и тяжелым течением БА у татар ($\chi^2=6,18$; $p=0,01$; OR=2,66; 95%CI 1,21-5,83 и $\chi^2=7,45$; $p=0,006$; OR=2,5; 95%CI 1,28-4,88). Выявлено статистически значимое снижение ОФВ1 у больных БА татарской этнической принадлежности, имеющих генотип rs3787429*TT гена *HRH3* (M±SE; 50,43±10,51), по сравнению с носителями генотипа rs3787429*CT (78,42±7,08; $p=0,039$). Обнаружено статистически значимое снижение МОС50 и МОС25 у пациентов башкирской этнической принадлежности с началом БА в детском возрасте, имеющих генотип rs11665084*CC гена *HRH4* (M±SE; 70,63±9,89 и 66±10,53), по сравнению с носителями генотипа rs11665084*CT (117,1±13,1; $p=0,006$ и 114,9±8,33; $p=0,009$, соответственно).

При исследовании полиморфного варианта rs2231187 гена *ADCYAP1* выявлена ассоциация генотипа rs2231187*AA и аллеля rs2231187*A с развитием БА ($\chi^2=4,19$; $p=0,04$; OR=1,83; 95%CI 1,02-3,26 и $\chi^2=4,71$; $p=0,03$; OR=1,66; 95%CI 1,05-2,63), аллеля rs2231187*A – с началом БА в детском возрасте ($\chi^2=5,53$; $p=0,019$; OR=2; 95%CI 1,12-3,59), генотипа rs2231187*AA гена *ADCYAP1* – с тяжелым и среднетяжелым течением БА у башкир ($\chi^2=4,03$; $p=0,05$; OR=1,92; 95%CI 1,01-3,63). Li X. с коллегами ранее при GWAS была установлена ассоциация полиморфного локуса rs1291183, расположенного вблизи гена *ADCYAP1*, с более низкими значениями показателей легочной функции у пациентов с БА (Li et al., 2013).

Обнаружено, что аллель rs13182402*G гена *ALDH7A1* у башкир со среднетяжелым и тяжелым течением БА встречается чаще (18,49%), чем в соответствующей контрольной группе (9,52%; $\chi^2=5,32$; $p=0,021$; OR=2,16; 95% CI 1,11-4,18). При GWAS у индивидов европейского происхождения было выявлено, что аллель rs77885874*G гена *ALDH7A1* ассоциирован с развитием БА, вызванной диизоционатом (Yucesoy et al., 2015),

Мета-анализ результатов исследования участвующих в метаболизме антигистаминных препаратов полиморфных локусов, проведенный в 4-х выборках (русских, татар, башкир и индивидов смешанной этнической принадлежности), обнаружил ассоциацию аллеля rs3787429*T гена *HRH3* с риском развития БА и началом заболевания в детском возрасте ($p=0,006$; OR=1,29; 95% CI 1,08-1,54; $p=0,003$; OR=1,35; 95% CI 1,11-1,65) (Таблица 2).

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме антилейкотриеновых препаратов, с развитием БА

Выполнено исследование полиморфных вариантов генов *LTC4S* (rs730012), *ALOX5* (rs2115819) и *LTA4H* (rs2660845), участвующих в метаболизме антилейкотриеновых препаратов, у больных БА и индивидов контрольной группы из РБ. Статистически значимых различий между группами больных БА и контроля русской, татарской и башкирской этнической принадлежности не обнаружено ($p>0,05$).

Анализ вариабельности количественных показателей спирографии выявил статистически значимое снижение ОФВ1 и МОС75 у татар с БА, имеющих генотип rs730012*AA гена *LTC4S* ($M\pm SE$; $64,69\pm 4,89$ и $73,83\pm 4,98$), по сравнению с носителями генотипа rs730012*AC ($84,27\pm 8,61$; $p=0,04$ и $90,45\pm 6,31$; $p=0,04$). Установлено статистически значимое снижение МОС75 у больных БА татарской этнической принадлежности, имеющих генотип rs211589*CC гена *ALOX5* ($M\pm SE$; $65,5\pm 6,497$), по сравнению с носителями генотипа rs211589*TT ($88,9\pm 7,68$; $p=0,042$). У русских обнаружены значительно более высокие показатели общего IgE у больных БА, носителей генотипов rs2660845*AG и rs2660845*GG ($M\pm SE$; $482,7\pm 63,52$ и $516,3\pm 84,17$ соответственно), по сравнению с пациентами, имеющими генотип rs2660845*AA ($384,9\pm 75,12$; $p=0,031$).

* * *

Таким образом, при исследовании 38 полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, бета-2-агонистов, антилейкотриеновых и антигистаминных препаратов и/или ассоциированных с чувствительностью пациентов к терапии БА по данным GWAS, обнаружено, что у русских развитие данного заболевания ассоциировано с полиморфными вариантами генов *FBXL7*, *CRHR1*, *ARG2*, *SPATS2L*, *SLC7A2* и *AOC1*, у татар – с полиморфными вариантами генов *FBXL7*, *ARG1*, *THRB* и *HRH1*, у башкир – с полиморфными вариантами генов *CRHR1*, *SPATS2L*, *CMTR1*, *TBXH*, *HNMT*, *ADCYAP1*. При мета-анализе ассоциаций исследованных полиморфных локусов генов с развитием БА у

индивидов русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности показано, что маркерами риска развития БА являются аллельные варианты генов *FBXL7*, *CMTR1*, *SPATS2L*, *SLC7A2* и *HRH3*.

Анализ метилирования промоторных областей генов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов для терапии БА

Проведен анализ метилирования промоторных областей генов *HRH1*, *AOC1*, *HRH2*, *ARG2*, *GLCC11* у 157 больных БА и 155 индивидов контрольной группы из РБ. Определение статуса метилирования промоторных областей генов выполнено с использованием таких методов, как метил-чувствительный анализ кривых плавления (MS-HRM) и последующее секвенирование обработанных бисульфитом натрия образцов ДНК.

Выполнен анализ метилирования 5 CpG сайтов промоторного региона (GRCh38:3:11137169-11137301) гена *HRH1* у больных БА и в контрольной группе индивидов из РБ. Обнаружен высокий уровень метилирования данной области в обеих группах, варьирующий от 75% до 100% (Рисунок 3). Установлено, что полное (100%) метилирование промоторной области гена *HRH1* у больных БА наблюдается значительно чаще (в 60,67% случаев), чем в группе контроля (47,86%, $\chi^2=4,79$; $p=0,029$; OR=1,68; 95% CI 1,05-2,68).

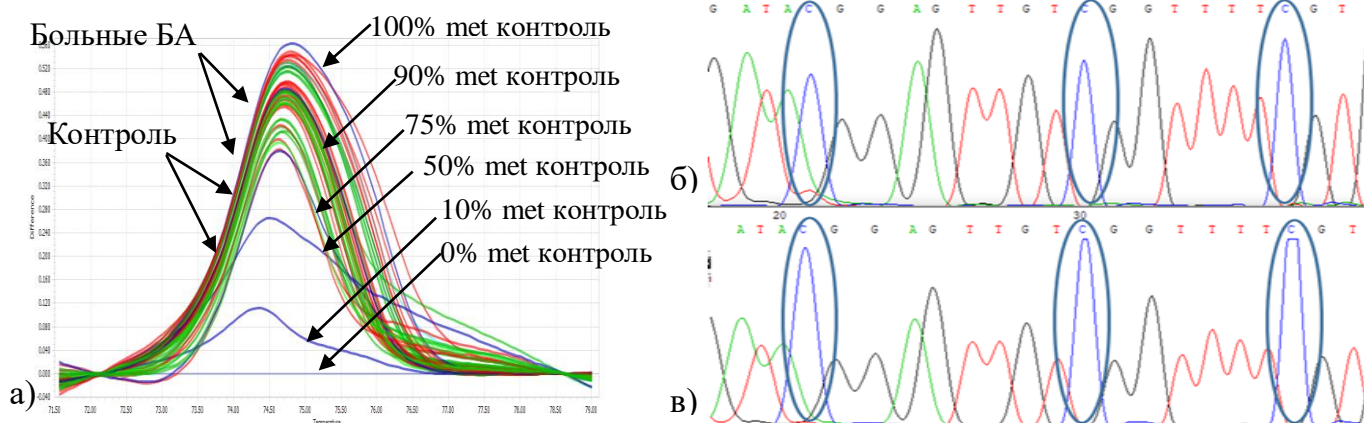


Рисунок 3 — Результаты MS-HRM анализа и секвенирования промоторной области гена *HRH1* у больных БА и в группе контроля: а – дифференциальный плот (difference plot); б – результаты секвенирования образца ДНК больного БА; в – результаты секвенирования стандартного контроля 100% метилированной ДНК.

При анализе метилирования 10 CpG сайтов промоторного региона гена *HRH2* (GRCh38:5:175658642-175658809) у больных БА и в контрольной группе обнаружен низкий уровень метилирования данной области (0-5%), но у 5-ти больных с тяжелым и среднетяжелым течением заболевания выявлен 10% уровень метилирования. Анализ метилирования 7 CpG сайтов, локализованных в промоторной области гена *ARG2* (GRCh38:14:67619480-67619620), также показал низкий уровень метилирования у больных БА и в группе контроля (0-2%).

Проведено исследование 7 CpG сайтов промоторного региона гена *AOC1* (GRCh38:7:150824654-150824801), в результате которого обнаружен высокий уровень метилирования данного региона у больных БА и в группе контроля (50-100%) (Рисунок 4). Установлена более высокая частота встречаемости полного метилирования промоторной области гена *AOC1* (100%) у больных с тяжелым и среднетяжелым течением БА (61,84%) по сравнению с контролем (38,61%; $\chi^2=9,37$; $p=0,002$; OR=2,58; 95% 1,4-4,75).

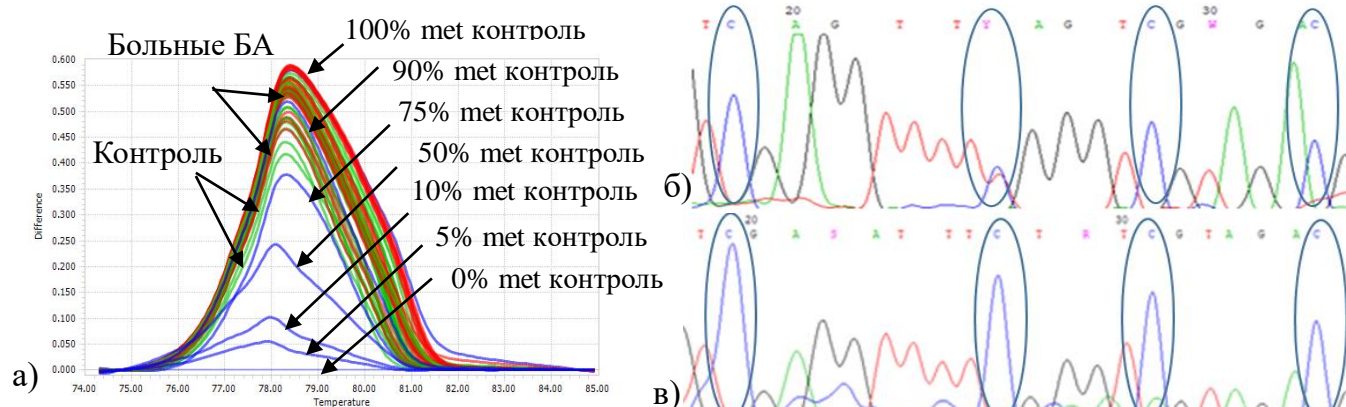


Рисунок 4 — Результаты MS-HRM анализа и секвенирования промоторной области гена *AOC1* у больных БА и в группе контроля: а – дифференциальный плот; б – результаты секвенирования образца ДНК больного БА; в – результаты секвенирования стандартного контроля 100% метилированной ДНК.

При анализе метилирования 7 CpG сайтов промоторной области гена *GLCCII* (GRCh38:7:7969920-7970072) установлено, что уровень метилирования данной области у больных БА и в контроле варьирует от 0 до 75%. Обнаружена более высокая частота встречаемости 50% уровня метилирования промоторной области гена *GLCCII* у пациентов с тяжелым и среднетяжелым течением БА (20,9%) по сравнению с группой контроля (7,84%; $\chi^2=6,08$; $p=0,013$; OR=3,1; 95% 1,22-7,88).

Таким образом, обнаружены значительные различия в уровне метилирования промоторных областей генов *HRH1*, *AOC1* и *GLCCII* у больных БА и индивидов из группы контроля, свидетельствующие о вовлечении эпигенетического механизма метилирования генов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов для лечения БА, в развитии и тяжести течения данного заболевания.

Полигенная оценка риска БА

Оценка полигенного риска (PRS) развития заболеваний является одним из актуальных направлений современных генетических исследований. Модели полигенного риска позволяют провести анализ генетической предрасположенности к развитию заболевания и его отдельных фенотипов на индивидуальном уровне (Choi et al., 2020).

Полигенная оценка риска развития БА включала 5 основных этапов: 1) выбор полиморфных вариантов генов для анализа из 38-ми исследованных в данной работе

полиморфных локусов при условии наличия по ним данных суммарной статистики GWAS БА (Demenaïs et al., 2018) и отсутствия тесного неравновесия по сцеплению между полиморфными вариантами, включенными в анализ; 2) подготовка данных GWAS для формирования 2-х независимых выборок, включающая коррекцию результатов мета-анализа GWAS исследований БА (Demenaïs et al., 2018); 3) логистический регрессионный анализ ассоциаций полиморфных локусов генов с развитием и течением БА с использованием аддитивной модели; 4) анализ полигенного риска; 5) ROC-анализ моделей полигенного риска.

Проведен логистический регрессионный анализ ассоциации 26-ти отобранных полиморфных локусов с развитием БА в объединенной группе индивидов различной этнической принадлежности (Таблица 3).

Таблица 3 — Результаты регрессионного анализа ассоциации полиморфных локусов с развитием БА у индивидов различной этнической принадлежности

Ген	Полиморфный вариант	Аллели A1/A2	Частота аллеля A1 у больных, %	Частота аллеля A1 в контроле, %	$\beta \pm SE$	p
<i>SLC22A15</i>	rs1281744	C/T	12,1	11,27	0,0807±0,1761	0,6469
<i>ALLC</i>	rs11123610	C/T	38,3	37,83	0,02±0,098	0,8386
<i>SPATS2L</i> , chr2: 200285317	rs295137	C/T	75,7	65,69	0,4707±0,1323	0,0004
<i>HRH1</i>	rs901865	A/G	18,73	15,26	0,2285±0,1464	0,1187
<i>THRB</i>	rs892940	C/T	56,37	56,07	0,0112±0,1169	0,9235
<i>FBXL7</i>	rs10044254	T/C	79,83	73,85	0,3198±0,1128	0,0046
<i>ALDH7A1</i>	rs13182402	G/A	11,94	10,35	0,1569± 0,135	0,2452
<i>NR3C1</i>	rs41423247	G/C	35,45	35,04	0,017±0,087	0,845
<i>ADRB2</i>	rs1042713	G/A	60,07	59,07	0,0403± 0,087	0,6436
<i>HRH2</i>	rs2067474	A/G	4,20	3,81	0,0995±0,215	0,6436
<i>LTC4S</i>	rs730012	A/C	76,08	75,51	0,0322±0,1019	0,7522
<i>CMTR1</i>	rs2395672	G/A	82,85	79,29	0,2347±0,1102	0,0332
<i>ARG1</i>	rs2781667	C/T	70,22	66,84	0,1524±0,1028	0,1383
<i>TFT</i>	rs2305089	T/C	47,25	45,32	0,0763±0,0945	0,4198
<i>GLCC11</i>	rs37973	C/T	50,11	46,73	0,1328±0,0968	0,1702
<i>CRHR2</i>	rs2190242	A/C	65,49	64,3	0,0489±0,0901	0,587
<i>MAGI2</i>	rs2691529	C/T	28,24	26,91	0,0698±0,0981	0,4768
<i>AOC1</i>	rs1049793	C/G	67,11	65,23	0,0808±0,0887	0,3625
<i>ALOX5</i>	rs2115819	T/C	53,04	52,04	0,0427±0,0882	0,6285
<i>PSAP</i>	rs11000016	C/T	85,84	84,08	0,1417±0,1216	0,2439
<i>LTA4</i>	rs2660845	A/G	71,26	71,19	0,0037±0,0975	0,9695
<i>ARG2</i>	rs7140310	C/A	16,76	15,16	0,1262±0,1587	0,4265
<i>ARG2</i>	rs3742879	A/G	70,47	70,33	0,0064±0,0929	0,9455
<i>SCG3</i> , chr15:51677471	rs17525472	T/C	87,54	87,08	0,042±0,1287	0,7441
<i>ADCY9</i>	rs2230739	T/C	66,46	65,4	0,0442±0,1236	0,7207
<i>HRH4</i>	rs11665084	C/T	88,29	87,8	0,0472±0,1335	0,7235

Построены модели полигенного риска развития БА, начала БА в детском возрасте, тяжелого, неконтролируемого и частично-контролируемого течения БА у индивидов различной этнической принадлежности из РБ с использованием в качестве весов: а) β -коэффициентов, полученных при логистической регрессии в данной группе; б) β -коэффициентов, полученных при логистической регрессии в объединенной группе БА-контроль из РБ; в) β -коэффициентов, полученных при перерасчете результатов крупнейшего мета-анализа GWAS исследований БА (Demerais et al., 2018).

При ассоциативном анализе модели взвешенного риска развития БА, построенной с использованием результатов логистической регрессии в объединенной группе из РБ обнаружено, что показатель отношения шансов риска развития заболевания у больных БА равен 1,48 ($p=6,85 \times 10^{-10}$; OR=1,48; 95% CI 1,31-1,68), площадь под ROC-кривой для данной модели составила 0,605 (95% CI 0,57-0,64), что указывает на ее «среднюю» предсказательную способность (Рисунок 5, б). Анализ полигенного риска с использованием в качестве весов значений, полученных в рамках мета-анализа GWAS БА (Demerais et al., 2018), не выявил статистически значимых различий между группами больных БА и контроля ($p=0,27$; OR=1,07; 95% CI 0,95-1,203), площадь под ROC-кривой равна 0,526.

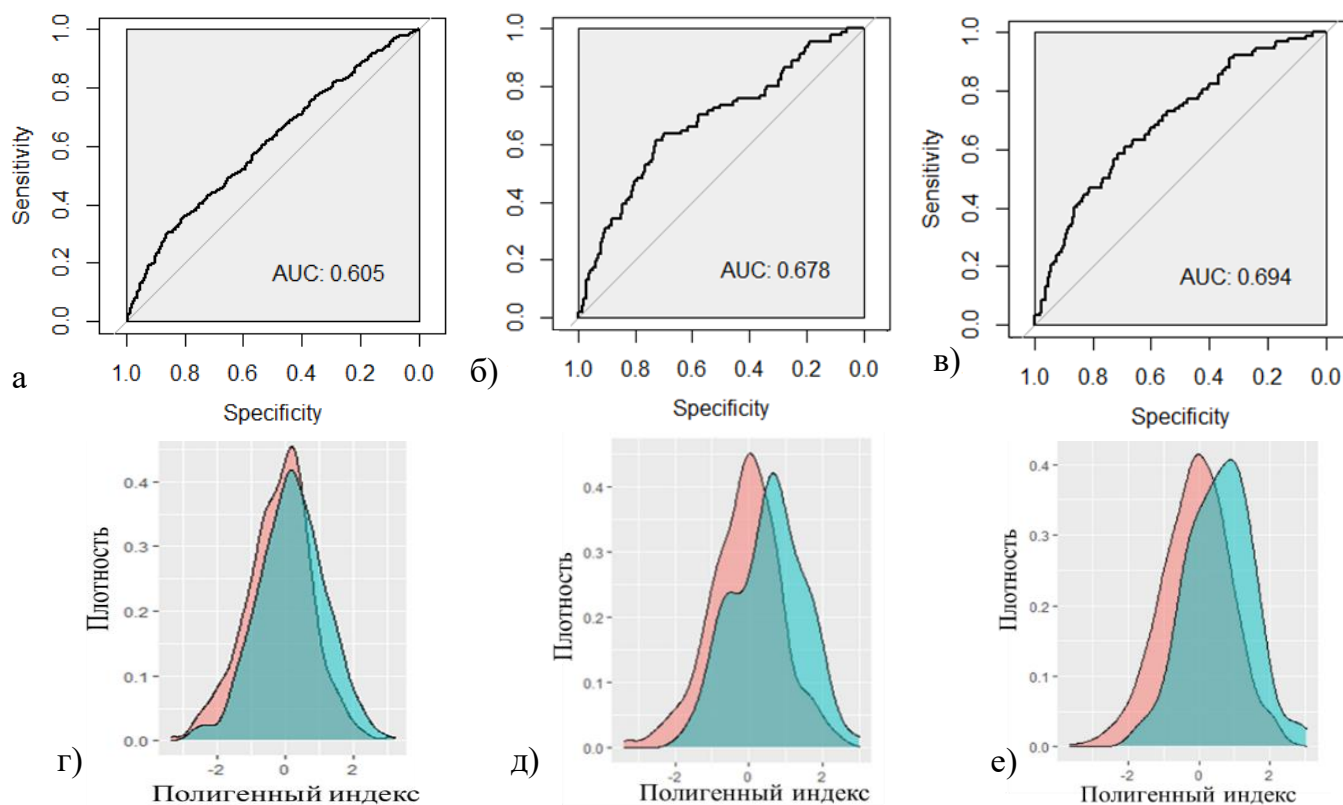


Рисунок 5 — ROC-кривые и графики распределения плотности индексов полигенного риска, полученные при PRS-анализе в общей группе больных БА и контроля: а, г – взвешенный анализ риска развития БА; б, д – взвешенный анализ риска тяжелого течения БА; в, е – взвешенный анализ риска неконтролируемого и частично-контролируемого течения БА.

Ассоциативный анализ модели полигенного риска развития тяжелого течения БА обнаружил наличие выраженных различий между пациентами с тяжелой БА и контрольной группой индивидов ($p=5,64 \times 10^{-08}$; OR=1,996; 95%CI 1,56-2,58; AUC=0,678 [95%CI 0,62-0,74]). Установлено, что при полигенной оценке риска неконтролируемого и частично-контролируемого течения БА показатель отношения шансов риска развития неконтролируемого и частично-контролируемого течения заболевания у больных БА равен 2,14 ($p=5,04 \times 10^{-09}$; OR=2,14; 95%CI 1,67-2,78; AUC=0,694 [95%CI 0,64-0,75]). Обе модели обладают «средней» прогностической значимостью (Рисунок 5).

При анализе полигенного риска развития БА с учетом этнической принадлежности индивидов обнаружены значительные различия между выборками больных БА и контроля во всех группах: у русских ($p=2,76 \times 10^{-08}$; OR=1,98; 95%CI 1,56-2,53; AUC=0,67 [95%CI 0,61-0,72]), татар ($p=7,44 \times 10^{-08}$; OR=2,15; 95%CI 1,64-2,88; AUC=0,701 [95%CI 0,64-0,76]) и башкир ($p=1,4 \times 10^{-5}$; OR=2,22; 95%CI 1,58-3,26; AUC=0,694 [95%CI 0,62-0,77]) (Рисунок 6). Построены модели полигенного риска начала БА в детском возрасте у индивидов различной этнической принадлежности ($p=2,41 \times 10^{-12}$; OR=1,67; 95%CI 1,45-1,94; AUC=0,632 [95%CI 0,596-0,67]), а также у русских ($p=8,03 \times 10^{-09}$; OR=2,45; 95%CI 1,83-3,37; AUC=0,718 [95%CI 0,65-0,78]), татар ($p=7,13 \times 10^{-08}$; OR=2,33; 95%CI 1,74-3,22; AUC=0,706 [95%CI 0,64-0,77]) и башкир ($p=4,23 \times 10^{-06}$; OR=2,896; 95%CI 1,89-4,7; AUC=0,753 [95%CI 0,67-0,84]).



Рисунок 6 — Форест-плот, построенный по результатам полигенных оценок риска развития БА на выборках больных и индивидов контрольных групп различной этнической принадлежности.

В целом, полученные модели полигенного риска ассоциированы с развитием БА, с манифестацией БА в детском возрасте, с неконтролируемым и частично-контролируемым течением и тяжелой формой заболевания в объединенной группе индивидов и в отдельных этнических группах русских, татар и башкир из РБ с небольшими различиями размера эффекта и показателей отношения шансов. Сконструированные модели полигенного риска могут быть использованы для расчета индивидуального риска развития и особенностей клинического течения БА у индивидов различной этнической принадлежности.

* * *

Таким образом, при исследовании полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов, используемых для терапии БА, у больных БА и индивидов контрольной группы из РБ показано, что полиморфные варианты генов *FBXL7*, *CRHR1*, *ARG2*, *SPATS2L*, *SLC7A2*, *AOC1*, *ARG1*, *THRB*, *HRH1*, *CMTR1*, *TBXT* ассоциированы с развитием БА, генов *AOC1*, *ARG2*, *GLCCII*, *CMTR1*, *HNMT*, *ADCYAP1* – с началом БА в детском возрасте, генов *ARG2*, *FBXL7*, *ARG1*, *HRH1*, *HNMT*, *ALDH7A1* – с тяжелым и среднетяжелым течением БА у индивидов русской, татарской или башкирской этнической принадлежности. Мета-анализ, проведенный в группах индивидов русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности, показал ассоциацию аллельных вариантов генов *FBXL7*, *CMTR1*, *SPATS2L*, *SLC7A2*, *HRH3* с развитием БА, генов *FBXL7*, *CMTR1*, *HRH3* – с началом БА в детском возрасте. При анализе метилирования обнаружен более высокий уровень метилирования промоторной области генов *HRH1*, *AOC1*, *GLCCII* у больных БА по сравнению с индивидами из группы контроля. Построены модели полигенного риска развития БА, начала БА в детском возрасте и тяжелого течения заболевания для индивидов различной этнической принадлежности, обладающие «средней» и «хорошей» прогностической значимостью.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена ассоциация аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *FBXL7* (rs10044254), *CRHR1* (rs242941), *ARG2* (rs3742879), *SPATS2L* (rs295137), *SLC7A2* (rs2720499) и *AOC1* (rs1049793) с риском развития БА у русских; генов *FBXL7* (rs10044254), *ARG1* (rs2781667), *THRB* (rs892940) и *HRH1* (rs901865) – с риском развития БА у татар; генов *CRHR1* (rs242941), *SPATS2L* (rs295137), *CMTR1* (rs2395672) и *TBXT* (rs2305089) – с риском развития БА у башкир.

2. Установлено, что маркерами риска тяжелого и среднетяжелого течения БА у русских является аллель rs3742879*G гена *ARG2*; у татар – аллели rs10044254*T гена *FBXL7*, rs2781667*C гена *ARG1* и rs901865*A гена *HRH1*; у башкир – аллели rs11558538*T гена *HNMT* и rs13182402*G гена *ALDH7A1*.

3. Выявлено, что манифестация БА в детском возрасте ассоциирована с аллелями и генотипами полиморфных вариантов генов *AOC1* (rs1049793) и *ARG2* (rs3742879) у русских; гена *GLCCII* (rs37973) – у татар; генов *CMTR1* (rs2395672), *HNMT* (rs11558538) и *ADCYAP1* (rs2231187) – у башкир.

4. При анализе вариабельности количественных показателей спирографии у больных БА татарской этнической принадлежности установлено статистически значимое снижение МОС75 у носителей генотипов rs37973*CT, rs37973*CC гена *GLCC11* и rs211589*CC гена *ALOX5*; снижение ОФВ1 – у носителей генотипа rs3787429*TT гена *HRH3*; у больных БА башкирской этнической принадлежности – статистически значимое снижение МОС50 у носителей генотипа rs11665084*CC гена *HRH4*.

5. При мета-анализе показано наличие ассоциации аллельных вариантов генов *FBXL7* (rs10044254), *CMTR1* (rs2395672), *CRHR1* (rs1876828), *SPATS2L* (rs295137), *SLC7A2* (rs2720499), *HRH1* (rs901865) и *HRH3* (rs3787429) с риском развития БА; аллельных вариантов генов *FBXL7* (rs10044254), *CMTR1* (rs2395672) и *HRH3* (rs3787429) – с манифестацией БА в детском возрасте; аллельных вариантов генов *CRHR1* (rs1876828), *HNMT* (rs11558538) и *HRH1* (rs901865) – с тяжелым и среднетяжелым течением БА у индивидов различной этнической принадлежности.

6. Выявлены статистически значимые различия уровней метилирования промоторных областей генов *HRH1*, *AOC1* и *GLCC11* между больными БА и контрольной группой индивидов.

7. При оценке полигенного риска развития БА по полиморфным вариантам генов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов, определены статистически значимые модели, ассоциированные с развитием БА, с манифестацией БА в детском возрасте, с неконтролируемым течением и тяжелой формой заболевания у индивидов различной этнической принадлежности.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Мурзина Р.Р., Савельева А.Н., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Роль полиморфных вариантов генов аргиназ (*ARG1*, *ARG2*), участвующих в метаболизме бета-2-агонистов, в развитии и течении бронхиальной астмы // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – № 4. – С. 391–398 (WoS, Scopus).
2. Федорова Ю.Ю., Карунас А.С., Мурзина Р.Р., Савельева О.Н., Гималова Г.Ф., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Ассоциация аллельных вариантов генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, с развитием бронхиальной астмы // Генетика. – 2019. – №.12. С. 1424-1432 (WoS, Scopus).
3. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов аминоксидазы 1 *AOC1* и гистамин-N-метилтрансферазы *HNMT* с развитием бронхиальной астмы у детей // Якутский медицинский журнал. – 2020. – №4 (72). – С. 20-23 (WoS).
4. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов гистаминовых рецепторов (*HRH1*, *HRH2*, *HRH3*, *HRH4*) с развитием бронхиальной астмы у детей // Пульмонология. – 2021. – № 31(6). – С. 729-738 (Scopus).

5. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Мухтарова Л.А., Загидуллин Ш.З., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена глюкокортикоидного рецептора (*NR3C1*) и гена кортикотропин-рилизинг-гормона (*CRHR1*) с развитием и течением бронхиальной астмы // Медицинский вестник Башкортостана. – 2020. – № 1 (85). – С. 37-40 (ВАК).
6. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Мурзина Р.Р., Савельева А.Н., Актаева Е.Е., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Загидуллин Ш.З., Хуснутдинова Э.К. Исследование полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме бета-2-агонистов и гистамина, в развитии и течении бронхиальной астмы // Медицинская генетика. – 2020. – № 8 (217). – С. 92-94 (ВАК).
7. Федорова Ю.Ю., Карунас А.С., Савельева О.Н., Гималова Г.Ф., Мурзина Р.Р., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Исследование полиморфных вариантов и уровня метилирования генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, у больных бронхиальной астмой и здоровых индивидов // Медицинская генетика. – 2020. – № 8 (217). – С. 95-97. – DOI: 10.25557/2073-7998.2020.08.95-97 (ВАК).
8. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Хуснутдинова Э.К. Фармакогенетика бронхиальной астмы // Медицинская генетика. – 2019. – № 4. – С. 3-23 (ВАК).
9. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Хуснутдинова Э.К. Роль полиморфных вариантов гена β 2-адренергического рецептора (*ADRB2*) в развитии и течении бронхиальной астмы // Медицинский вестник Башкортостана. – 2018. – Т.13. – № 5 (77). – С. 69-75 (ВАК).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БА – бронхиальная астма

ГКС – глюкокортикостероиды

ЖЕЛ – жизненная емкость легких

ГКС – глюкокортикостероиды

МОС25 – мгновенная объемная скорость после выдоха 25% ФЖЕЛ

МОС50 – мгновенная объемная скорость после выдоха 50% ФЖЕЛ

МОС75 – мгновенная объемная скорость после выдоха 75% ФЖЕЛ

ОФВ1 – объем форсированного выдоха за первую секунду

GWAS – (Genome-Wide Association Study) - полногеномный анализ ассоциаций

MS-HRM analysis (Methylation-Sensitive High Resolution Melting) – метил-чувствительный анализ кривых плавления

PRS (Polygenic risk score) – оценка полигенного риска