Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, с развитием бронхиальной астмы у детей

© О.Н. Савельева¹, А.С. Карунас^{1,3}, Ю.Ю. Федорова², Э.И. Эткина³, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, улица Проспект Октября, 71.

³ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, улица Ленина, 3.

E-mail: olyasavelie@yandex.ru; carunas@list.ru

Гистамин – это важнейший биогенный амин, участвующий в регуляции деятельности клеток и систем, является одним из основных медиаторов аллергических реакций немедленного типа. Целью данной работы было исследование полиморфных вариантов генов секретогранина 3 SCG3 (rs17525472) и полипептида 1, активирующего аденилатциклазу ADCYAP1 (rs2231187), участвующих в метаболизме гистамина, у детей из Республики Башкортостан. Генотипирование выполнено с использованием метода РТ-ПЦР. Установлена ассоциация генотипа rs17525472*TC гена SCG3 с риском развития легкой формы БА у русских.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфный вариант, гистамин, ген секретогранина 3 SCG3, ген полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, ADCYAP1.

Бронхиальная астма (БА) – это гетерогенное заболевание, в основе которого лежит хроническое воспаление дыхательных путей. В настоящее время БА является одним из самых распространенных хронических заболеваний детского возраста [1]. Гистамин представляет собой центральный медиатор воспаления, уровень экспрессии которого находится под действием ключевых ферментов, участвующих в его метаболизме. Повышенный уровень свободного гистамина приводит к спазму гладкой мускулатуры бронхов, повышенной проницаемости сосудов, выработке слизи, последующему развитию обструкции и гиперчувствительности дыхательных путей [2].

В настоящее время известно более 200 генов, продукты которых вовлечены в метаболические пути гистамина. Выделяется несколько основных групп генов гистаминового метаболического пути: гены гистаминовых рецепторов (HRH1, HRH2, HRH3, HRH4), гены, участвующие в синтезе (HDC, PRG3), деградации (HNMT, AOC1, MAOB, ALDH7A1), секреции (SNAP23, ADA, ADCYAP1, ADA, CSF2) гистамина и др. (www.ebi.ac.uk/). В ряде полногеномных исследований БА обнаружены ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, с риском развития данного заболевания (ADCYAP1, SCG3, PSAP) (https://www.ebi.ac.uk/gwas/). К настоящему моменту выполнены немногочисленные исследования полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, у пациентов с БА, в связи с тем

представляется актуальным исследование полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина у детей с БА различной этнической принадлежности.

Целью данной работы явилось исследование полиморфных вариантов генов полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, *ADCYAP1* и секретогранина 3 *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, у больных БА и в контрольной группе индивидов.

Материалы и методы. В работе использованы образцы ДНК 430 неродственных индивидов, проживающих на территории РБ, в возрасте 2-17 лет. Группу пациентов составили 236 больных бронхиальной астмой (70 девочек, 166 мальчиков) различной этнической принадлежности (русские – 84, татары – 108, башкиры – 44). Пациенты находились на стационарном лечении или обследовании в детских отделениях Клиники ФГБОУ ВО «БГМУ» Минздрава России и аллергологическом отделении ГБУЗ «РДКБ» г. Уфы. Критерием включения детей в группу наблюдения явился установленный диагноз заболевания в соответствии с GINA (Global Initiative for Asthma) и отечественными программными документами по диагностике, лечению и профилактике БА [3,4].

Оценка функции внешнего дыхания у больных БА и индивидов контрольной группы проводилась на компьютерном спирографе («Erich Jaeger», Германия) с анализом кривой «поток-объем». Оценивались следующие показатели (в процентах от должных величин, заложенных в компьютерную базу спирометра): жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1 сек. (ОФВ1), максимальные объемные скорости потока кривой в точках, соответствующих объему легких 75%, 50%, 25% ФЖЕЛ (МОС75, МОС50, МОС25, соответственно). Градации нормы и снижение параметров спирограммы в % от должностной величины для детей до 18 лет оценивались по Клементу Р.Ф. и Зильберу Н.А. [5].

В качестве контроля исследована группа практически здоровых детей без бронхолегочных, аллергических и аутоиммунных заболеваний с неотягощенной наследственностью в отношении аллергических заболеваний, состоящая из 194 человек (119 девочек, 75 мальчиков) соответствующей этнической принадлежности (русские – 75, татары – 83, башкиры – 36). У детей, включенных в группу контроля, был низкий уровень иммуноглобулина Е (IgE) и не было отклонений от нормальных показателей функции внешнего дыхания по данным спирографии или пикфлоуметрии. 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 УФИЦ РАН (протокол № 7 от 10.02.2011 г.).

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ полиморфных вариантов rs17525472 (g.51677471T>C) гена секретогранина 3 *SCG3* и rs2231187 (c.456A>G, p.Lys152=) гена, полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, *ADCYAP1* проводили с использованием метода РТ-ПЦР согласно протоколу фирмы-производителя на приборе CFX96 («Bio-Rad», США).

Для проверки соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди-Вайнберга использовался критерий χ^2 . При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. В случае наличия достоверных отличий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95% доверительного интервала (CI95%).

Результаты и обсуждение. Выполнен анализ ассоциаций полиморфных вариантов rs17525472 гена *SCG3* и rs2231187 гена *ADCYAP1* с риском развития и клинико-

функциональными особенностями БА (течением заболевания, показателями спирогграфии и др.) у больных БА и в контрольной группе индивидов. При исследовании полиморфного локуса rs17525472 гена SCG3 выявлено, что менее распространенным является аллель rs17525472*С, обнаруженный в контрольной группе русских с частотой 8,67%, у татар – 11,59%, у башкир – 13,89% (табл.1). Обнаружено, что частота гетерозиготного генотипа rs17525472*ТС и аллеля rs17525472*С гена SCG3 у детей с легкой формой БА русской этнической принадлежности значительно выше (35,14% и 17,57%), чем в контрольной группе (17,33%, $p=0,04$, $OR=2,58$, 95%CI 1,05-6,36 и 8,67%, $p=0,05$, $OR=2,25$, 95%CI 0,98-5,13). Частота встречаемости генотипа rs17525472*ТТ и аллеля rs17525472*Т гена SCG3 у русских с легкой формой БА (64,86% и 82,43%) была более низкой, чем в группе контроля (82,67%, $p=0,04$, $OR=0,39$, 95%CI 0,16-0,95 и 91,33%, $p=0,05$, $OR=0,44$, 95%CI 0,19-1,02).

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов rs17525472 гена SCG3 и rs2231187 гена ADCYAP1 у больных БА и в контрольной группе.

Выборка		Генотипы / n (%)			Аллели / n (%)		N
rs17525472		ТТ	ТС	СС	Т	С	
Больные	Русские	63(75,9)	20(24,1)	-	146(87,95)	20(12,05)	83
	Татары	81(76,42)	21(19,81)	4(3,77)	183(86,32)	29(13,68)	106
	Башкиры	31(70,45)	10(22,73)	3(6,82)	72(81,82)	16(18,18)	44
Контроль	Русские	62(82,67)	13(17,33)	-	137(91,33)	13(8,67)	75
	Татары	63(76,83)	19(23,17)	-	145(88,41)	19(11,59)	82
	Башкиры	28(77,78)	6(16,67)	2(5,56)	62(86,11)	10(13,89)	36
rs2231187		АА	АG	GG	А	G	
Больные	Русские	40(48,19)	30(36,14)	13(15,66)	110(66,27)	56(33,73)	83
	Татары	57(53,77)	41(38,68)	8(7,55)	155(73,11)	57(26,89)	106
	Башкиры	29(65,91)	15(34,09)	-	73(82,95)	15(17,05)	44
Контроль	Русские	34(45,33)	36(48)	5(6,67)	104(69,33)	46(30,67)	75
	Татары	40(48,78)	30(36,599)	12(14,63)	110(67,07)	54(32,93)	82
	Башкиры	17(47,22)	18(50)	1(2,78)	52(72,22)	20(27,78)	36

Ген секретогранина 3 SCG3 кодирует белок, являющийся членом семейства нейроэндокринных секреторных белков хромогранинов/ секретогранинов. Гранины могут служить предшественниками биологически активных пептидов, однако точная функция данного белка на данный момент не установлена (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29106).

При GWAS исследовании пациентов европейского происхождения с тяжелой формой БА обнаружена выраженная тенденция к ассоциации полиморфного локуса rs17525472, расположенного вблизи гена SCG3, с риском развития БА [6], что частично согласуется с полученными нами данными. С использованием подхода GWAS установлена ассоциация другого полиморфного варианта rs35776517 гена SCG3 с развитием БА у индивидов афроамериканского происхождения [7].

При исследовании полиморфного варианта rs2231187 гена ADCYAP1 не выявлено статистически значимых различий частот аллелей и генотипов данного локуса между выборкой пациентов с БА и контрольной группой ($p > 0,05$). Частота редкого аллеля rs2231187*G гена ADCYAP1 в группе русских составила 30,67%, татар – 32,93%, башкир – 27,78% (табл.1).

Ген полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, ADCYAP1 (PACAP) расположен в хромосомной области 18p11.32, кодирует белки, стимулирующие аденилатциклазу и повышающие уровни циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что приводит к активации транскрипции целевых генов, участвует в секреции гистамина (www.ebi.ac.uk/). PACAP представляет собой нейропептид, гомологичный вазоактивному кишечному полипептиду (VIP), вызывающему высвобождение гистамина в тучных клетках кожи человека. Показано, что подкожная инъекция продуктов метаболизма PACAP вызывает значительное высвобождение гистамина [8]. Полиморфный вариант rs2231187 гена ADCYAP1 исследован при GWAS БА у детей европейского происхождения, однако полученные результаты не достигли уровня статистической значимости [9], в нашем исследовании также не обнаружено ассоциации данного полиморфного локуса с риском развития БА. По результатам GWAS исследований также обнаружены ассоциации полиморфных локусов гена ADCYAP1 с развитием других многофакторных заболеваний (www.ebi.ac.uk/gwas/variants/rs1893154).

Таким образом, проведено исследование полиморфных вариантов rs17525472 гена секретогранина 3 SCG3 и rs2231187 гена, полипептида 1, активирующего аденилатциклазу ADCYAP1 у детей с БА и в соответствующей контрольной группе из РБ. Установлено, что генотип rs17525472*TC гена SCG3 ассоциирован с риском развития БА у русских. Полученные в данной работе результаты вносят определенный вклад в понимание механизмов развития и патогенеза БА.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (АААА-А21-121011990119-1) и проекта ФЦП № 05.621.21.0033 «Создание и развитие научно-технологической платформы Уфимского Федерального исследовательского центра РАН на базе РЦКП "Агидель" для реализации приоритетов Российской Федерации в области медицины, сельского хозяйства, разработки катализаторов для реализации энергосберегающих технологий и получения новых материалов для молекулярной электроники», при частичной поддержке РФФИ (проект № 19-315-90055). Образцы ДНК для исследования использованы из «Коллекции биологических материалов человека» ИБГ УФИЦ РАН, поддержанной Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

Литература

1. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». Под ред. Чучалина А. Г. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-маркет; 2017. 161 с.

2. Yamauchi K., Ogasawara M. The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy *Int J Mol Sci.* 2019 Apr; 20(7): 1733. doi: 10.3390/ijms20071733
3. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2020. P. 1-209.
4. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». Под ред. Чучалина А. Г. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-маркет; 2012. 184 с.
5. Клемент Р.Ф., Зильбер Н.А. Функционально-диагностические исследования в пульмонологии: методические рекомендации. С-Пб.:1993. 43.
6. Li X., Howard T.D., Zheng S.L. et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions // *Multicenter Study J Allergy Clin Immunol.* 2010 ;125(2): 328-335.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.018.
7. Rafaels N.M., Johnston H.R., Huang L. et al. How well does whole genome sequencing improve ability to detect association with Asthma in candidate genes compared to existing GWAS platforms in African American populations? *J Allergy Clin Immunol*, 2015 (2): AB164 Abstracts.
8. Olesen I. J., Pedersen S. H. PACAP and its receptors in cranial arteries and mast cells // *The Journal of Headache and Pain.* 2018; 19 (16). DOI 10.1186/s10194-017-0822-2.
9. Litonjua A.A., Lasky-Su J., Schneiter K. et al. *ARG1* is a novel bronchodilator response gene: screening and replication in four asthma cohorts // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2008. Vol. 178 (7): 688-694. DOI: 10.1164/rccm.200709-1363oc.

Association analysis of polymorphic variants in genes involved in histamine metabolism with asthma development in children

*O.N. Savelieva¹, *A.S. Karunas^{2,3}, Yu.Yu. Fedorova^{2,4}, E.I. Etkina³, E.K. Khusnutdinova^{2,4}

1 - Bashkir State University

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

2 - Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences

71 Pr. Oktyabrya Street, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

3 - Bashkir State Medical University

3 Lenina Street, 3450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**e-mail: olyasavelie@yandex.ru; carunas@list.ru*

Histamine is one of the most important biogenic amine that is involved in the cell and system regulation and it is one of the main mediators of immediate-type allergic reactions. The aim of this work was to investigate the polymorphic variants of secretogranin 3 *SCG3* (rs17525472) and adenylate cyclase activating polypeptide 1 *ADCYAP1* (rs2231187) genes involved in the histamine metabolism in children from the Republic of Bashkortostan. Genotyping was performed using RT-PCR. The association of the rs17525472*TC genotype of the *SCG3* gene with the risk of mild BA in Russians was established.

Key words: bronchial asthma, polymorphic variant, histamine, secretogranin 3 *SCG3* gene, adenylate cyclase activating polypeptide 1 *ADCYAP1* gene.