

Abstract

**Pruystupa L.N.,
Bondarkova A.M. *, Guyva T.O.**
*Sumy State University,
2 Rymskogo-Korsakova St., Sumy,
40007, Ukraine*

**POLYMORPHISM Gln27Glu GENE β 2-ADRENORECEPTOR
AND SEVERITY LEVEL OF BRONCHIAL ASTHMA**

According to the data of international authors it was proven, that there existed direct connection between severity level of bronchial asthma (BA) and polymorphism Gln27Glu gene β 2-adrenoceptor (ADRB2), but in Ukrainian population this connection wasn't investigated. Therefore, the purpose of our investigation was to study severity level of BA in dependence of Gln27Glu polymorphism ADRB2 gene in Ukrainian population.

Materials and methods. 186 patients with easy, average and severity persistent BA in ages from 18 till 70 had been investigated. The diagnosis had been determined on the base of GINA (2011) recommendations and Decree of Ukrainian Ministry of Public Health №128 19.03.2007. The control group involved 87 almost healthy humans without allergopatology and unencumbered with allergic history. Determination of the allelic polymorphism of 1st exon ADRB2 Gln27Glu (rs1042714) had been performed by polymerase chain reaction method with following analyze of the lengths of restrictions fragments. The statistic processing of results had been done with help of SPSS-17.

Results of investigation. Depends on severity level of BA patients which had been divided into 3 groups. 1st group involved 103 patients with easy course, 2 group – 52 with average severity course, and 3 group – 31 with severe course. After conducting investigation in first group results were such frequency of genotypes ADRB2: Gln27Gln – 80,6%; Gln27Glu – 15,6%; Glu27Glu – 3,8% respectively, in second group: 7,7%; 90,4%; 1,9% respectively, and in third group – 27,9%; 4,4%; 67,7% respectively.

Obtained results showed that genotype Gln27Gln likely more often met in patients with easy course of BA, genotype Gln27Glu – in patients with average severity course, and genotype Glu27Glu more likely detected in patients with severe course ($p=0,02$; $p<0,05$ by χ^2 – Pirson's criteria). Using genotype Gln27Gln as reference had been determined that existence of homozygotes by minor allele Glu27Glu genotype in patients regardless of the sex increased the risk of BA occurrence with severe course twice.

Thereby, there is a connection between polymorphism Gln27Glu ADRB2 gene and the severity of bronchial asthma course.

Key words: β 2-adrenoceptor, Gln27Glu allelic polymorphism, bronchial asthma, asthma severity.

Corresponding author: *BAN241088@mail.ru

Резюме

**Приступа Л.Н.,
Бондаркова А.М.***, Гуйва Т.О.
Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова, 2,
Суми, 40007, Україна

ПОЛІМОРФІЗМ Gln27Glu ГЕНА β2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРА ТА СТУПІНЬ ТЯЖКОСТІ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

Метою нашого дослідження було вивчення взаємозв'язку між ступенем тяжкості бронхіальної астми та Gln27Glu поліморфізмом гена β2-адренорецептора (ADRB2). Обстежено 186 хворих на бронхіальну астму у віці від 18 до 70 років. Діагноз був встановлений на основі рекомендацій GINA (2011) та Наказу МОЗ України №128 від 19.03.2007р. Контрольну групу склали 87 практично здорових осіб без алергопатології та необтяженим алергічним анамнезом.

Встановлено, що у хворих на бронхіальну астму співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за міноним алелем складає 52,7 %, 35,6 % і 11,7 %, а в контролі – 37,9 %, 39,1 %, 23,0 % відповідно (p=0,020 за χ²-критерієм Пірсона). Використовуючи Gln27Glu генотип як референтний, було визначено, що наявність гомозиготного за міноним алелем Glu27Glu генотипу у хворих незалежно від статі збільшує ризик виникнення БА з тяжким перебігом у 2 рази. Таким чином, існує зв'язок між поліморфізмом Gln27Glu гена ADRB2 і тяжкістю бронхіальної астми.

Ключові слова: β2-адренорецептор, Gln27Glu алельний поліморфізм, бронхіальна астма, ступінь тяжкості.

Резюме

**Приступа Л.Н.,
Бондаркова А.Н.***, Гуйва Т.А.
Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова, 2,
Суми, 40007, Україна

ПОЛІМОРФІЗМ GLN27GLU ГЕНА Β2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРА І СТЕПЕНЬ ТЯЖЕСТІ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

Целью нашего исследования было изучение взаимосвязи между степенью тяжести бронхиальной астмы и Gln27Glu полиморфизмом гена β2-адренорецептора (ADRB2). Обследовано 186 больных бронхиальной астмой в возрасте от 18 до 70 лет. Диагноз был установлен на основании рекомендаций GINA (2011) и Приказа МОЗ Украины №128 от 19.03.2007р. Контрольную группу составили 87 практически здоровых лиц без алергопатологии и отягощенного аллергического анамнеза.

Установлено, что у больных бронхиальной астмой соотношение гомозигот по основному алелю, гетерозигот и гомозигот по минорному алелю составляет 52,7%, 35,6% и 11,7%, а в контроле - 37,9%, 39,1%, 23,0% соответственно (p=0,020 по χ²-критерию Пирсона). Используя Gln27Glu генотип как референтный, было определено, что наличие гомозиготного по минорному алелю Glu27Glu генотипа у больных независимо от пола увеличивает риск возникновения БА с тяжелым течением в 2 раза. Таким образом, существует связь между полиморфизмом Gln27Glu гена ADRB2 и тяжестью бронхиальной астмы.

Ключевые слова: β2-адренорецептор, Gln27Glu алельный полиморфизм, бронхиальная астма, степень тяжести.

Автор, відповідальний за листування: * BAN241088@mail.ru

Вступ

Бронхіальна астма (БА) є поширеним захворюванням і в деяких країнах вона виступає час-

тою причиною інвалідизації та смертності, опереждає навіть серцево-судинні та онкологічні захворювання. Згідно з даними ВОЗ на БА в



усьому світі страждають приблизно 300 мільйонів людей [1,2]. БА відноситься до групи мультифакторіальних захворювань, етіологія та патогенез котрих визначається складною взаємодією факторів навколишнього середовища та генетичних факторів. БА є полігенним захворюванням зі складним типом успадкування, що доведено сімейним та близнюковим методами [3,4].

За останні роки велику увагу приділяють генетичному поліморфізму β_2 -адренорецепторів (ADBR2), заміна амінокислотної послідовності яких викликає зміну функціональних властивостей рецепторів [5,6,7].

Ідентифіковано декілька поліморфізмів в кодувальній частині гена ADBR2, чотири з котрих призводять до амінокислотних замін в білковій послідовності. Було показано, що один із цих поліморфізмів, Val34Met, не впливає на функціональні особливості рецептора, тому подальші дослідження були зосереджені на трьох замінах – Arg16Gly, Gln27Glu, Thr164Ile. Найбільш вивченим та поширеним є поліморфізм з амінокислотою заміною Gln27Glu, яка викликає зниження кількості рецепторів на поверхності клітин бронхів після взаємодії з β_2 -агоністами та сприяє розвитку бронхіальної гіперреактивності (БГР) [8,9,10].

Згідно даних іноземних авторів відомо, що існує зв'язок між ступенем тяжкості БА та Gln27Glu поліморфізмом гену ADRB2. Алей 27Glu відомий як маркер, асоційований не тільки із тяжким перебігом захворювання, але також із терапевтичною резистентністю, обумовленою порушенням функції ADRB2. У зв'язку з цим, закономірним було виявлення асоціації стероїдної залежності з алелем 27Glu гена ADRB2: по мірі збільшення внеску алеля 27Glu (27GlnGln - 27GlnGlu - 27GluGlu) доза внутрішньовенного введення глюкокортикостероїдів (ГКС) збільшувалась на фоні прийому β_2 -агоністів. Це вказує на збільшення потреби в системних ГКС при захворюванні внаслідок терапевтичної резистентності за рахунок зниження чутливості до ГКС та β_2 -агоністів [11,12,13,14,15].

Зважаючи на доведену асоціацію Gln27Glu поліморфізму гена ADRB2 із тяжкістю перебігу БА та наявність поодиноких суперечливих даних іноземних авторів, а також невивченість даної проблеми в Україні, **метою нашого дослідження** було вивчення ролі Gln27Glu полі-

морфізму гена ADRB2 у виникненні БА та зв'язку із тяжкістю її перебігу.

Матеріали та методи.

Було обстежено 186 хворих на БА, що перебували на стаціонарному лікуванні в пульмонологічну відділенні КЗ «Сумська клінічна лікарня № 1» та КЗ «Сумська обласна клінічна лікарня».

Залежно від ступеня тяжкості БА пацієнтів було поділено на 3 групи. До I групи увійшло 103 пацієнти з легким перебігом, до II групи – 52 пацієнти з перебігом середньої тяжкості, до III групи – 31 пацієнт із тяжким перебігом. Діагноз БА був встановлений на основі рекомендацій GINA (2011) та Наказу №128 МОЗ України від 19.03.2007р. [16]. Контрольну групу склали 87 практично здорових осіб без алергопатології та необтяженим алергічним анамнезом.

Визначення Gln27Glu (rs1042714) поліморфізму гена ADRB2 проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі. Венозну кров у хворих БА та практично здорових осіб набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11.7 мМ) в якості антикоагулянту (“Sarstedt”, Німеччина), заморожували та зберігали при температурі -20°C.

ДНК виділяли з цільної крові із використанням наборів D1Atom DNA Prep 100 («Isogene», Росія). Поліморфізм 1-го екзону гена ADRB2 визначали методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів. Для цього ампліфікували ділянку промотора вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'GACAAGCTGAGTGTG CAGGAC 3' і зворотного (antisense) – 5'TGAAGTAGTTGGTGACCGTCTG 3'. Праймери було синтезовано фірмою “Metabion” (Німеччина). Якщо в 79-й позиції гена ADRB2 містився цитозин, ампліфікат, який складався з 369 пар основ, розщеплювався рестриктазою *SatI* на два фрагменти – 231 і 138 пар основ. У разі заміни цитозину на гуанін сайт рестрикції для *SatI* втрачався і утворювався один фрагмент розміром 369 пар основ. Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13А; 200V) проводили протягом 20 хв. (рис. 1). Візуалізацію ДНК піс-

ля електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора "Біоком", (Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-21. Вірогідність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм Пірсона. Оцінку впливу варіантів генотипів поліморфізму на ризик розвитку БА та ступінь її тяжкості проводили за допомогою розрахунку відношення шансів (ВШ) із визначенням 95% довірчого інтервалу (ДІ). Значення $p < 0,05$ вважали вірогідним.

Результати дослідження.

Генотипування хворих на БА та осіб контрольної групи за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена. Аналіз частоти різних алельних варіантів Gln27Glu поліморфізму гена ADRB2 у хворих на БА і в контрольній групі представлено у табл. 1. Показник p , визначений за χ^2 -критерієм Пірсона, дорівнював 0,020 і свідчив про статистично вірогідну різницю у розподілі генотипів за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 у хворих на БА і практично здорових осіб. У хворих на БА вірогідно частіше зустрічався генотип 27GlnGln (C/C), а у контрольній групі – 27GlnGlu (C/G). Таким чином, існує зв'язок між Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 і наявністю БА.

Аналіз розподілу алелей за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 у хворих основної і контрольної груп показало, що частота алелів С та G у групі контролю становила 57,5% та 42,5% відповідно, а у хворих на БА – 70,5% та 29,5% відповідно. Показник P , визначений за χ^2 -критерієм Пірсона, дорівнював 0,003 і свідчив про статистично вірогідну різницю у розподілі алелів за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 у хворих на БА і практично здорових осіб.

Використовуючи генотип C/C як референтний, було визначено, що наявність гомозиготного за мінорним алелем G/G генотипу у хворих незалежно від статі статистично вірогідно збільшувала ризик виникнення БА (ВШ = 2,8, ДІ 95% 1,32 – 5,61, $p < 0,001$). Також доведено, що ризик виникнення БА у носіїв алелю Gln вищий, ніж у носіїв алелю Glu (ВШ = 1,77, ДІ 95% 1,22 – 2,57, $p = 0,003$). Порівняння даних про частоту генотипів за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 залежно від ступеня тяжкості БА у групах свідчить про наявність статистично значимої відмінності. Частота гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем (C/C, C/G, G/G) становила у I групі –

80,6 %, 15,6 %, 3,8% відповідно; II – 7,7 %, 90,4 %, 1,9 %; III – 27,9%, 4,4%, 67,7% відповідно ($p = 0,02$) (табл. 2).

Отримані результати вказують на те, що C/C генотип вірогідно частіше зустрічався у хворих на БА з легким перебігом БА, C/G генотип – із перебігом середньої тяжкості, а G/G генотип – із тяжким перебігом ($p = 0,02$).

Використовуючи генотип C/C як референтний, було визначено, що наявність гомозиготного за мінорним алелем G/G генотипу у хворих незалежно від статі збільшував ризик виникнення БА з тяжким перебігом у 2 рази (ВШ = 2,4, ДІ 95% 1,15 – 4,99, $p = 0,019$).

Таким чином, встановлено, що генотип G/G за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 підвищує як ризик виникнення БА, так і її тяжкого перебігу.

Обговорення результатів.

Зважаючи на отримані суперечливі результати, метою нашого дослідження було вивчення ролі Gln27Glu поліморфізму гена ADRB2 у виникненні БА та тяжкості її перебігу. На підставі популяційних досліджень на великій етнічній гомогенній вибірці M.I.D'Amato et al. (1998) було виявлено асоціацію гаплотипу Gly16/Gln27 із БГР. Ці дослідження дозволили зробити висновок про те, що Gln27Glu поліморфізм гена ADRB2 через виникнення БГР впливає на патогенез БА [9].

Згідно даних Santillan A.A. et. al. (2003) генотип G/G за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 не асоційований із БА середньої тяжкості, але присутність глутаміну в 27-й позиції амінокислоти посилює БГР [3]. Частота алеля 27Gln у російській популяції була вищою за частоту алеля 27Glu (0,547 та 0,453, відповідно), що співставимо із середніми значеннями в Європі (0,560) [6]. Частота генотипу Gln27Glu (37%) у хворих із тяжким перебігом БА була в 1,5 рази меншою порівняно із хворими із перебігом середньої тяжкості (57,4%) та легким (50%). Генотип Glu27Glu гена ADRB2 не виявлено у жодного пацієнта з легкою БА, у той же час він зустрічався у 20,8% групи контролю та у 22,2% хворих на тяжку БА. Отримані дані співпадають з результатами досліджень в європейській популяції, де була виявлена асоціація поліморфних варіантів Gln27Glu гена ADRB2 із тяжкістю перебігу БА [6]. Генотип Glu27Glu гена ADRB2 частіше зустрічався у пацієнтів з терапієрезистентною БА (26,2%) порівняно з БА чутливою до терапії (9,6%). Доведений нами



зв'язок G/G генотипу за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 із тяжкістю перебігу БА співставимий із результатами, отриманими в російській популяції.

Аналіз частоти варіантного алеля 27Glu показав, що у групі хворих на БА та у групі контролю вона склала 23,3 та 29,8% відповідно. Оцінка асоціації варіантів гена ADRB2 з БА показала, що алель Gln27 у групі хворих зустрічався частіше (86%), ніж у групі клінічно здорових осіб (70,2%). Генотип у гомозиготному варіанті Gln27Glu був частіше у групі хворих на алергічну БА порівняно з групою контролю

(73% та 46% відповідно). Частота гетерозигот Gln27Glu у групі клінічно здорових людей (51%) перевищувала їх частоту у групі хворих на алергічну БА (27%). Отже, визначена асоціація алеля Gln27 та генотипу Gln27Glu поліморфного локуса Gln27Glu ADRB2 пов'язана з ризиком розвитку алергічної БА [4].

Таким чином, отримані нами результати досліджень доводять взаємозв'язок поліморфізму Gln27Glu гена ADRB2 із БА та ступенем її тяжкості та співставимі із даними отриманими в італійській та російській популяціях.

Таблиця 1

Частота генотипів за Gln27Glu поліморфізмом гена β_2 -адренорецепторів

Генотип	Група контролю		Хворі на бронхіальну астму	
	n	%	n	%
Gln27Gln (C/C)	33	37,9%	99	52,7%
Gln27Glu (C/G)	34	39,1%	67	35,6%
Glu27Glu (G/G)	20	23,0%	22	11,7%

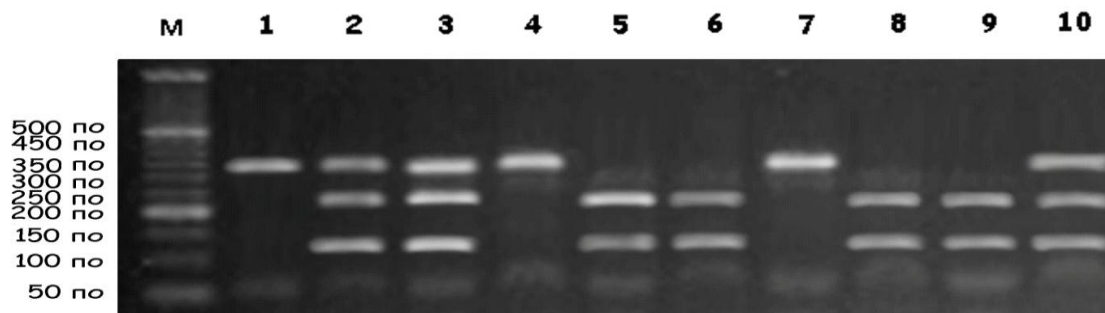
Таблиця 2

Частота генотипів за Gln27Glu поліморфізмом гена β_2 -адренорецепторів у хворих на бронхіальну астму залежно від ступеню тяжкості

Генотипи	Хворі на БА					
	Легкий перебіг		Перебіг середньої тяжкості		Тяжкий перебіг	
	n	%	n	%	n	%
Gln27Gln (C/C)	83	80,6%	4	7,7%	8	27,9%
Gln27Glu (C/G)	17	15,6%	47	90,4%	2	4,4%
Glu27Glu (G/G)	3	3,8%	1	1,9%	21	67,7%

Рис.1

Результати рестрикційного аналізу Gln27Glu поліморфізму гена β_2 -адренорецепторів.



Умовні позначення:

М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 5,6,8,9 відповідають C/C-генотипу; доріжки 2,3,10 – C/G-генотипу; 1,4,7 – G/G-генотипу.

Висновки

1. Доведено зв'язок між Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB2 і розвитком БА. У хворих на БА вірогідно частіше зустрічався C/C генотип, а у контрольній групі – C/G.

2. Встановлено, що у гомозигот за мінорним алелем G/G ризик розвитку БА утричі вищий, ніж у C/C гомозигот. Доведено, що ризик виникнення БА у носіїв алелю Gln вищий, ніж у носіїв алелю Glu.



3. Поліморфізм Gln27Glu гена ADRB2 асоційований зі ступенем тяжкості БА: генотип C/C частіше зустрічається у хворих з легким перебігом, генотип C/G - з перебігом середньої тяжкості, а генотип G/G - з тяжким перебігом БА. Гомозиготи за мінорним алелем G/G мають у 2 рази вищий ризик розвитку тяжкого перебігу БА, ніж гомозиготи за основним алелем C/C.

Перспективи подальших досліджень.

Враховуючи актуальність даної проблеми подальші дослідження будуть зосереджені на вивченні асоціацій даного поліморфізму з рівнем контролю БА та супутньою патологією.

References (список літератури)

1. The genetic basis of the etiopathogenesis of bronchial asthma. [Text] /Asanov AY, Namazova LS, Zhurkova NV. [The genetic basis of the etiopathogenesis of bronchial asthma]. *Sib. Med. J.* 2010;3(3):82-85.
2. Belevsky AS. [Global strategy for the treatment and prevention of asthma]. Moscow: Russian Respiratory Society, 2012. 108 p.
3. Santillan AA, Camargo CA, Ramires-Rivera AA. Association between b2-adrenoreceptor polymorphism and asthma diagnosis among Mexican adults. *J. of All. and Clin. Immunol.* 2003;112(112):1095-1100
4. Haitova NM. *Genetically caused forms of chronic nonspecific pulmonary diseases* [On the study of the prognostic value of biological markers of hereditary predisposition in patients with bronchial asthma]. Kiev, 2006, pp. 57-61
5. Trofimov VI. [Molecular genetic and pharmacogenetic aspects of steroid resistance in asthma]. *Rus. Med. Acad. J.* 2006;6(1):150-162.
6. Mironov JA, Trofimov VI, Dubin MV. *Pharmacogenetic aspects steroidorezistentnosti in patients with severe asthma* [Proceedings XVI National Congress on Respiratory Disease]. 2006, p. 23.
7. Trofimov VI, Mironov JA, Yanchina ED. *Pharmacogenetic aspects of severe asthma.* Pulmonology, 2008. pp. 111-116.
8. Martinez FD, Graves PE, Baldini MO. Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J. Clin. Invest.* 1997;100,(12):3184—3188.
9. D'Amato MI, Vitiani LR, Petrelli GA. Association of persistent bronchial hyper responsive-

ness with b2-adrenoceptor (ADRB2) haplotypes. *J. Respir. Crit. Med.* 1998;158:1968-1073.

10. Hizawa N. Beta-2 adrenergic receptor genetic polymorphisms and asthma. *J. Clin. Pharm.* 2009; 34(6):631-643
11. Magita O, Noguchi E., Jian Z. ADRB2 polymorphisms and asthma susceptibility: transmission disequilibrium test and meta-analysis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2004;134:150-157.
12. Hellstrom JM, Lin YG, Qiu CC. Association of polymorphism of human beta 2-adrenergic receptor gene and bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 1999; 6:626-631.
13. Mak JC, Nishikawa MT, Barnes PJ. Glucocorticosteroid increase beta 2-adrenergic receptor transcription in human lung. *J. Physiol.* 1995;268:141-146.
14. Limsuwan T, Thakkinstian A, Verasertniyom O. Possible protective effects of the Glu27 allele of beta2-adrenergic receptor polymorphism in Thai asthmatic patients. *J. Aller. Immunol.* 2010; 28(2-3):107-114.
15. Mandate of the Ministry of Health №128 from 19.03.20070 of Ukraine; IBC Code 10: J 45. *Protocols of care for patients with asthma*

(received 21.09.2014, published online 23.12.2014)

(отримано 21.09.2014, опубліковано 23.12.2014)

