

УДК 616.248-053.2:616-056.7:615.234

Л.А. Лівшиць<sup>1</sup>, П.Ф. Татарський<sup>1</sup>, О.В. Городна<sup>1</sup>, А.В. Маяковська<sup>1</sup>,  
Г.П. Волинець<sup>1</sup>, Н.Г. Чумаченко<sup>2</sup>, Т.Р. Уманець<sup>2</sup>, В.Ф. Лапшин<sup>2</sup>, Ю.Г. Антипкін<sup>2</sup>

## Поліморфізм гена *ADRB2* як чинник спадкової схильності до розвитку бронхіальної астми та відповіді на терапію салбутамолом

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ<sup>2</sup>ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ

PERINATOLOGIYA AND PEDIATRIYA.2019.2(78):38-45; doi 10.15574/PP.2019.78.38

**Мета** — дослідити асоціацію поліморфізму С79G гена *ADRB2* із ризиком розвитку бронхіальної астми (БА) у дітей, що мешкали в різних умовах забруднення навколишнього середовища, а також змодельувати 3D структури ізоформ білка β2-адренорецептора, що кодуються поліморфними варіантами гена *ADRB2* (A46G, C79G, та C491T) *in silico*, для передбачення структурно-функціональних властивостей, які можуть впливати на взаємодію із салбутамолом.

**Пацієнти та методи.** Обстежено 114 дітей віком від 3 до 18 років із БА середньої тяжкості, контрольованого перебігу, які методом рандомізації були розподілені на дві групи: групу I (діти з умовно чистого регіону Києва та Київської області) та групу II (діти з екологічно забрудненого регіону). До групи контролю увійшли 86 неспоріднених здорових дорослих із різних регіонів України.

Поліморфний варіант гена *ADRB2* (C79G) досліджено методом алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції. Комп'ютерне моделювання за гомологією 3D структури білка β2-адренорецептора проведено з використанням вебсерверів SWISS-MODEL та I-TASSER, молекулярний докінг здійснено за допомогою програми Auto Dock Vina.

**Результати.** Встановлено, що частота носіїв поліморфної алелі 79G гена *ADRB2* є статистично вірогідно вищою ( $p < 0,05$ ) у групі обстеження II (69,4%) порівняно з частотою (55,8%) у контрольній групі. За результатами аналізу змодельованої просторової структури білка *ADRB2*, заміни р.16Arg>Gly та р.27Gln>Glu знаходяться в N-кінцевій послідовності і можуть впливати на взаємодію з білками-партнерами, у свою чергу, амінокислотна заміна р.164Thr>Ile локалізована поблизу сайту зв'язування з лігандами і може знижувати афінність салбутамолу до відповідного мутантного рецептора.

**Висновки.** Поліморфний варіант 79G гена *ADRB2* можна розглядати як фактор спадкової схильності розвитку БА в умовах антропогенного навантаження навколишнього середовища. Мононуклеотидну заміну 491C>T гена *ADRB2* можна розглядати як фармакогенетичний маркер поганої відповіді пацієнта на лікування салбутамолом.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, діти, поліморфізм гена β2-адренорецептора, салбутамол.

### Polymorphism of the *ADRB2* gene as a factor of hereditary susceptibility to the development of asthma and response to salbutamol therapy

L.A. Livshits<sup>1</sup>, P.F. Tatarsky<sup>1</sup>, O.V. Gorodna<sup>1</sup>, A.V. Mayakovskaya<sup>1</sup>, G.P. Volynets<sup>1</sup>, N.G. Chumachenko<sup>2</sup>, T.R. Umanets<sup>2</sup>, V.F. Lapshin<sup>2</sup>, Yu.G. Antipkin<sup>2</sup><sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv<sup>2</sup>SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after acad. O.M. Lukyanova NAMS of Ukraine», Kyiv

**Purpose** — to investigate the association of the C79G polymorphism of the *ADRB2* gene with the risk of developing Bronchial asthma (BA) in children living under different environmental conditions and to generate *in silico* 3D structures of β2-adrenoreceptor isoforms encoded by polymorphic variants of the *ADRB2* gene (A46G, C79G, and C491T) in order to predict conformational changes which can impact the interaction with salbutamol.

**Patients and methods.** 114 children aged 3 to 18 years with BA of moderate to severe, controlled course, were randomized into two groups: group I (children from conditionally pure region of Kyiv and Kyiv region) and group II (children from ecologically polluted region). The control group climbed 86 unrelated healthy adults from different regions of Ukraine. The polymorphic variant of the *ADRB2* gene (C79G) was investigated by the allelic-specific polymerase chain reaction. The computer modeling of the 3D β2-adrenergic protein structure homology was performed using SWISS-MODEL and I-TASSER web servers, molecular docking was performed using the AutoDock Vina program.

**Results.** It was found that the frequency of the polymorphic variant 79G of the *ADRB2* gene carriers is statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the group II (69.4%) compared with the control group (55.8%). According to the analysis of the spatial structure of the *ADRB2* protein, it was determined that p.16Arg>Gly and p.27Gln>Glu substitutions localized on the N-terminal sequence, and can affect interaction with protein partners, in turn the amino acid substitution p.164Thr>Ile is localized near the ligand binding site and may reduce the affinity of salbutamol for the corresponding mutant receptor.

**Conclusions.** The polymorphic variant of 79G of the *ADRB2* gene can be considered as a factor of the hereditary susceptibility of BA development in conditions of environmental anthropogenic loading. The 491C>T *ADRB2* gene mononucleotide substitution can be considered as a pharmacogenetic marker of a poor patient response to treatment with salbutamol.

**Key words:** asthma, children, polymorphism of β2-adrenoreceptor gene, salbutamol.

### Полиморфизм гена *ADRB2* как фактор наследственной предрасположенности к развитию бронхиальной астмы и ответа на терапию салбутамолом

Л.А. Лившиц<sup>1</sup>, П.Ф. Татарский<sup>1</sup>, А.В. Городная<sup>1</sup>, А.В. Маяковская<sup>1</sup>, Г.П. Волинец<sup>1</sup>, Н.Г. Чумаченко<sup>2</sup>, Т.Р. Уманец<sup>2</sup>, В.Ф. Лапшин<sup>2</sup>, Ю.Г. Антипкин<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев<sup>2</sup>ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии имени академика Е.М. Лукьяновой НАМН Украины», г. Киев

**Цель** — исследовать ассоциацию полиморфизма С79G гена *ADRB2* с риском развития бронхиальной астмы (БА) у детей, проживающих в различных условиях загрязнения окружающей среды, а также смоделировать 3D структуры изоформ белка β2-адренорецептора, которые кодируются полиморфными вариантами гена *ADRB2* (A46G, C79G, и C491T) *in silico* для прогноза структурно-функциональных свойств, которые могут влиять на взаимодействие с салбутамолом.

**Пациенты и методы.** Обследовано 114 детей в возрасте от 3 до 18 лет с БА средней тяжести, контролируемого течения, которые методом рандомизации были разделены на две группы: группу I (дети из условно чистого региона Киева и Киевской области) и группу II (дети из экологически загрязненного региона). Группу контроля составили 86 неродственных здоровых взрослых из разных регионов Украины.

Полиморфный вариант гена *ADRB2* (C79G) исследован методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции. Компьютерное моделирование 3D структуры изоформ белка  $\beta_2$ -адренорецептора проведено с использованием веб-серверов SWISS-MODEL и I-TASSER, молекулярный докинг проведен с использованием программы Auto Dock Vina.

**Результаты.** Установлено, что частота носителей полиморфного варианта 79G гена *ADRB2* статистически достоверно выше ( $p < 0,05$ ) в группе обследования II (69,4%) по сравнению (55,8%) с частотой в контрольной группе. По результатам анализа смоделированной пространственной структуры белка *ADRB2*, замены p.16Arg>Gly и p.27Gln>Glu находятся в N-концевой последовательности и могут влиять на взаимодействие с белками-партнерами, в свою очередь, аминокислотная замена p.164Thr>Ile локализована вблизи сайта связывания с лигандами и может снижать аффинность сальбутамола к соответствующему мутантному рецептору.

**Выводы.** Полиморфный вариант 79G гена *ADRB2* может рассматриваться в качестве фактора наследственной предрасположенности развития БА в условиях антропогенной нагрузки окружающей среды. Мононуклеотидная замена 491C>T гена *ADRB2* может рассматриваться в качестве фармакогенетического маркера плохого ответа пациента на лечение сальбутамолом.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, дети, полиморфизм гена  $\beta_2$ -адренорецептора, сальбутамол.

## Вступ

Захворювання органів дихання посідають одне з провідних місць у структурі загальної захворюваності дитячого віку. Поряд із гострою патологією дихальних шляхів значну частку в структурі цих захворювань становлять рецидивні та хронічні хвороби, серед яких найбільш поширена бронхіальна астма (БА) [1].

Бронхіальна астма — хронічне рецидивне захворювання, в основі якого лежить підвищена реактивність бронхіального дерева імунного та неімунного генезу, основним клінічним проявом якого є напад задухи або астматичний стан. Ця патологія є однією з актуальних медико-соціальних проблем в Україні та світі, що обумовлено високою захворюваністю і смертністю, а також значними економічними втратами, пов'язаними з інвалідністю.

Нині БА — одне з найпоширеніших захворювань серед дітей. За даними епідеміологічних досліджень останніх років, від цього захворювання страждають від 5 до 10% дітей, і з кожним роком показник збільшується за рахунок забруднення навколишнього середовища та появи нових хімічних алергенів.

Сучасні дослідження молекулярно-генетичних основ спадкової схильності до БА в останні роки зосереджені на встановленні ролі різних генів-кандидатів та кодованих ними ферментів у патогенезі БА, а також в індивідуальних особливостях відповіді на терапію цього захворювання [2, 11].

$\beta_2$ -адренорецептори локалізовані практично на всіх клітинах, що беруть участь в імунній відповіді. Зокрема *ADRB2* локалізовані на клітинній поверхні та переважно експресуються у бронхах, судинах більшості органів: у матці, печінці, підшлунковій залозі, тромбоцитах, жировій тканині, на кардіоміоцитах і, окрім того, нещодавно описані в ендотеліальних клітинах, в аксонах нейронів, на огрядних клітинах, у нирках та в гепатоцитах [14, 21, 30].

Під час їхньої взаємодії з лігандом розширюються бронхи, розслаблюються гладенькі м'язи матки, посилюється гліколіз і ліполіз, зменшується здатність тромбоцитів до агрегації. Блокада *ADRB2* призводить до протилежних ефектів [6, 20]. З огляду на це *ADRB2*-рецептори є цільовою та клінічно важливою мішенню при БА та кардіоваскулярних захворюваннях. Ген, що кодує  $\beta_2$ -адренорецептор, локалізований на 5-й хромосомі (5q31-32), складається з одного екзону розміром 2015 пар основ, який кодує білок із 413 амінокислотних залишків, що являє собою 7 альфа-спіральний трансмембранний (7TM) рецептор [13]. На сьогодні відомо 281 мононуклеотидну заміну, локалізовану в різних ділянках гена *ADRB2*. Низка досліджень показує, що мононуклеотидні заміни в гені *ADRB2* (A46G, C79G, та C491T) [22] асоційовані з ризиком розвитку БА, тяжкістю перебігу та відповіддю на лікування  $\beta$ -агоністами [15] і, зокрема, сальбутамолом [17]. Проте слід зазначити, що дані отримані за результатами різних досліджень, є суперечливими і неоднозначними [10, 12, 19, 27].

**Мета** дослідження — дослідити асоціацію поліморфізму C79G гена *ADRB2* із ризиком розвитку БА в дітей, які проживали в різних умовах забруднення навколишнього середовища, а також змоделювати ізоформи білка  $\beta_2$ -адренорецептора, що кодуються поліморфними варіантами гена *ADRB2* (A46G, C79G, та C491T) *in silico* для передбачення структурно-функціональних властивостей, що можуть впливати на взаємодію із сальбутамолом.

## Матеріали та методи дослідження

Проаналізовано три групи індивідів. Дві досліджувані групи дітей, хворих на БА, представлені неспорідненими індивідами з двох регіонів України: міста Києва і Київської області (група обстеження I) та міста Горішні Плавні Дніпропетровської області (група обстеження II). Згідно з опублікованою на сайті Державного комітету статистики України

аналітичною доповіддю «Довкілля України у 2009 році», Кам'янське посідає 8-ме місце серед міст України за антропогенним навантаженням від стаціонарних джерел забруднення з 110,8 тис. т викидів шкідливих речовин [33]. Тоді як екологічний стан міста Києва і Київської області є суттєво кращим.

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської Декларації. Інформовану згоду на участь у дослідженні отримано від батьків кожного з учасників. Дане дослідження схвалено комітетами з біоетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та ДУ «Інститут педіатрії, акушерства та гінекології ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України». Групу обстеження I становили 52 пацієнти, серед яких 32 (61,5%) хлопчики та 20 (38,5%) дівчаток; а групу обстеження II – 62 пацієнти, серед яких 43 (69,4%) хлопчики та 19 (30,6%) дівчаток. Усього в цих групах із клінічним діагнозом БА обстежено 114 пацієнтів (75 (65,8%) хлопчиків та 39 (34,2%) дівчаток) віком від 3 до 18 років.

Протягом декількох років пацієнти з обох дослідних груп мали встановлений діагноз БА та перед включенням у дослідження проходили уніфікований медичний огляд згідно з рекомендаціями МОЗ України та Глобальною ініціативою щодо боротьби з БА (Global Initiative for Asthma). За результатами клінічних обстежень та відповідно до симптомів, у всіх хворих дітей встановлено персистуючу БА середньої тяжкості, контрольовану.

Контрольну групу становили 86 неспоріднених здорових дорослих індивідів із різних регіонів України (донори ооцитів, стан здоров'я і, зокрема, відсутність БА в анамнезі підтверджена результатами медогляду).

ДНК виділено з лейкоцитів периферійної крові за стандартним методом [25]. Поліморфний варіант гена *ADRB2* (C79G) досліджено методом алейспецифічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), як описано раніше [3].

Полімеразну ланцюгову реакцію проведено в автоматичному режимі на ампліфікаторі «2720 Thermal Cycler» фірми «Applied Biosystems». Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму 79C>G здійснено методом алейспецифічної ампліфікації. Суть методу полягає в паралельному проведенні двох ПЛР, для кожної з яких застосовується пара праймерів – один з яких загальний, інший – у першому варіанті реакції є комплементарний послідовності без заміни «нормальний» (79C), а в дру-

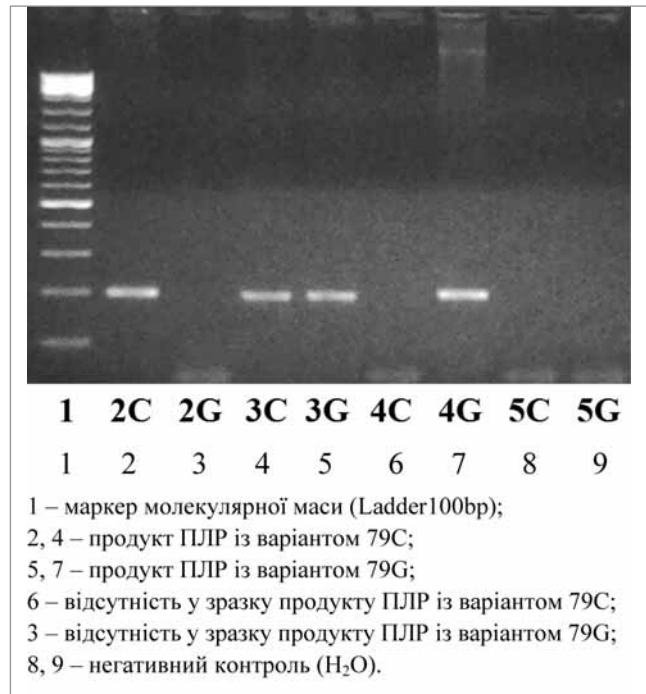


Рис. 1. Електрофореграма полімеразних ланцюгових реакцій продуктів гена *ADRB2* (2-процентний агарозний гель)

гому варіанті є комплементарний послідовності із заміною «мутантний» (79G). Наявність продуктів ампліфікації проаналізовано за допомогою електрофорезу у 2-процентному агарозному гелі (рис. 1).

У результаті, під час аналізу зразка з нормальним варіантом 79C спостерігають продукт ПЛР, що утворився внаслідок ампліфікації з використанням нормального праймеру, а індивід, в якого відмічається лише такий продукт ампліфікації, визначають як гомозиготу 79CC (рис. 1 (дор. 2, 3)).

У разі заміни 79C>G відбувається ампліфікація лише продукту, для якого в реакційній суміші міститься праймер із відповідною заміною на 3'-кінці (мутантний).

Індивід, в якого візуалізується лише такий амплікон, визначають як гомозиготу 79GG (рис. 1 (дор. 6, 7)).

У випадку гетерозиготи 79C/G спостерігають продукти ПЛР як із «нормальним» праймером (79C), так і з «мутантним» праймером (79G) (рис. 1 (дор. 4, 5)).

Статистичну обробку даних проведено з використанням критерію Фішера, розрахунок та оцінку показників якого здійснено за допомогою програмного забезпечення Open Epi [34].

Комп'ютерне моделювання за гомологією 3D структури білка  $\beta_2$ -адренорецептора проведено за допомогою вебсервера SWISS-MODEL [7, 8, 9, 16, 38]. За «матрицю» використано кри-

Таблиця 1

Розподіл генотипів та алельних варіантів rs1042714 гена *ADRB2* у досліджуваних групах

| Генотип/алель | Група обстеження I (n=52) |         | Група обстеження II (n=62) |         | Контрольна група (n=86) |         |
|---------------|---------------------------|---------|----------------------------|---------|-------------------------|---------|
|               | кількість                 | частота | кількість                  | частота | кількість               | частота |
| CC            | 21                        | 0,40    | 19                         | 0,31    | 38                      | 0,44    |
| CG            | 20                        | 0,39    | 36                         | 0,58    | 36                      | 0,42    |
| GG            | 11                        | 0,21    | 7                          | 0,11    | 12                      | 0,14    |
| CG + GG       | 31                        | 0,60    | 43                         | 0,70*   | 48                      | 0,56    |
| C             | 62                        | 0,60    | 74                         | 0,60    | 112                     | 0,65    |
| G             | 42                        | 0,40    | 50                         | 0,40    | 60                      | 0,35    |

Примітка: \* – статистично достовірна різниця ( $p < 0,05$ ).

сталічну структуру *ADRB2* людини (Protein Data Bank (PDB) ID: 2R4R) [29]. Також проведено моделювання *in silico* з використанням вебсервера I-TASSER [31, 39, 40]. Для виявлення формування стабільного комплексу між рецептором та лігандом – сальбутамолом – здійснено молекулярний докінг за допомогою програми Auto Dock Vina [36]. Візуалізацію комплексу сальбутамолу з ізоформами  $\beta_2$ -адренорецептора проведено з використанням програми Discovery Studio Visualizer 4.0.

### Результати дослідження та їх обговорення

За результатами генотипування в усіх досліджуваних групах виявили всі теоретично передбачувані генотипи 79CC, 79CG, 79GG.

Результати аналізу розподілу виявлених генотипів та алельних варіантів у групі пацієнтів I, групі пацієнтів II та в контрольній групі наведено в таблиці 1.

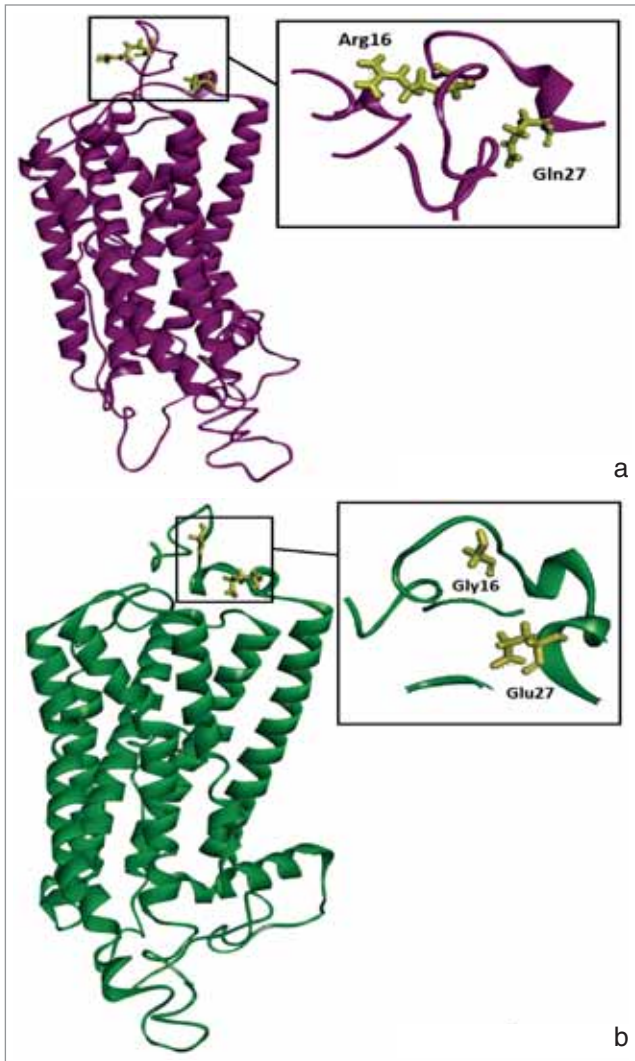
За результатами порівняльного аналізу частоти алелей в усіх досліджуваних групах найбільш поширеною виявилася алель C, частота якої становила 0,65 у контрольній групі та 0,60 – у групах I та II. Тоді як поліморфна алель G переважала за частотою в обох групах пацієнтів із БА (0,40) порівняно з контрольною групою (0,35). Саме тому в подальшому в досліджуваних групах пацієнтів провели порівняльний аналіз індивідів, які є носіями поліморфної алелі G.

За результатами аналізу встановили, що сумарна частота гетеро- та гомозиготних носіїв поліморфного варіанта 79G гена *ADRB2* є статистично вірогідно вищою ( $p < 0,05$ ) в групі обстеження II (69,4 %) порівняно з контрольною групою (55,8 %). Тенденцію до збільшення частоти таких генотипів також спостерігали в групі обстеження I (59,6 %) порівняно з контрольною групою (55,8%). Отже, носійство алелі G може бути фактором спадкової схильності до розвитку БА в дітей. А за раніше отриманими даними, ризик розвитку БА у дорослих

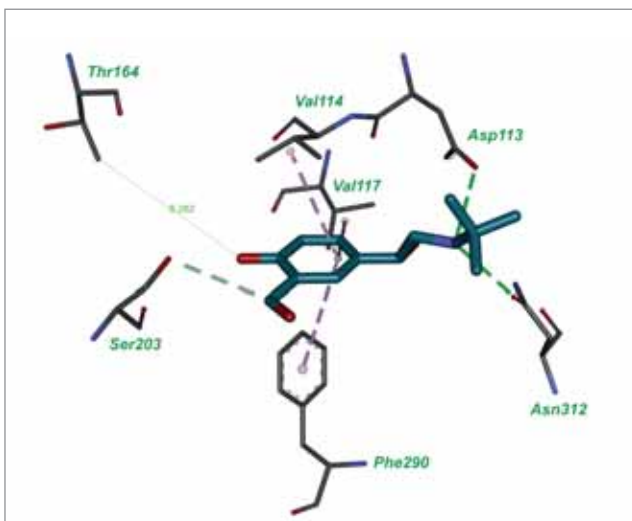
асоційований з поліморфізмом C79G, а також із поліморфізмом A46G [5, 10, 12, 19, 27]. У роботах деяких авторів також встановили асоціацію поліморфного варіанта C79G з ризиком розвитку БА [18, 24]. Хоча, з іншого боку, в низці досліджень таку закономірність не підтвердили, і це може віддзеркалювати суттєві відмінності у формуванні досліджуваних груп, ключовим фактором якого можна вважати антропогенне навантаження довкілля забруднювальними речовинами.

Для з'ясування молекулярно-генетичної природи асоціації алельного варіанта 79C>G гена *ADRB2*, з патогенезом БА у дітей, провели *in silico* моделювання білкового продукту, що кодується послідовністю з алельним варіантом 79C>G(rs1042714), а також поліморфним варіантом 46A>G(rs1042713), який, за літературними даними [35], є нерівноважно зчепленим із досліджуваним нами rs1042714. Дослідження інших авторів показали, що в індивідів із поліморфним варіантом rs1800888 491C>T (хворих на БА) спостерігається погана відповідь на лікування препаратами  $\beta_2$ -агоністів. Для з'ясування можливих молекулярних механізмів такої відповіді на лікування ми провели моделювання *in silico* процесу утворення комплексів між різними ізоформами  $\beta_2$ -адренорецептора з досліджуваним препаратом сальбутамолом, широко використовуваним у терапевтичній практиці для лікування БА в дітей. Необхідно зазначити, що при мононуклеотидній заміні 79C>G у кодованому білку відбувається амінокислота заміна p.27Gln>Glu, а за наявності в гені *ADRB2* мононуклеотидної заміни 46A>G – амінокислота заміна p.16Arg>Gly, а при 491C>T – амінокислота заміна p.164Thr>Ile.

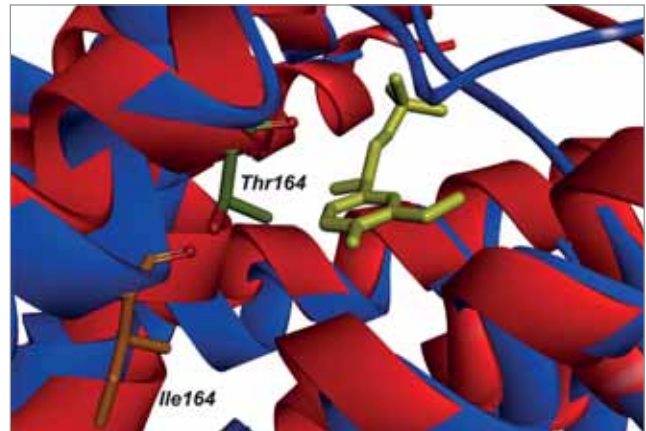
За результатами аналізу змодельованої просторової структури білка *ADRB2* визначили, що заміни p.16Arg>Gly та p.27Gln>Glu знаходяться в N-кінцевій послідовності білка. Оскільки в базі даних PDB представлена кристаліграфічна



**Рис. 2.** Просторові структури рецептора ADRB2 «дикого типу» та з амінокислотними замінами р.16Arg>Gly та р.27Gln>Glu: а) «дикий тип» ADRB2; б) ADRB2 з амінокислотними замінами р.16Arg>Gly та р.27Gln>Glu.



**Рис. 3.** Комплекс салбутамолу з амінокислотними залишками β<sub>2</sub>-адренорецептора людини, отриманий за допомогою молекулярного докінгу. Водневі зв'язки показано зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії — фіолетовими пунктирними лініями



**Рис. 4.** Суперпозиція кристалічної структури β<sub>2</sub>-адренорецептора дикого типу (позначено червоним кольором) із гомологічною моделлю β<sub>2</sub>-адренорецептора, що має амінокислотну заміну р.164Thr>Ile (позначено синім кольором) у комплексі із салбутамолем (позначено жовтим кольором)

3D структура рецептора ADRB2 без N-кінця, ми провели моделювання повнорозмірної 3D структури білка. За «матрицю» використали кристалографічну структуру «дикого типу» (PDBID: 2RH1), моделювання провели за допомогою вебресурсу SWISS-MODEL.

Отримали п'ять моделей білка ADRB2 із N-кінцем «дикого типу» з наступними значеннями C-score (-0.56, -1.55, -1.52, -3.65, -1.03). Для подальшої роботи обрали модель із найбільшим значенням C-score -0.56 (рис. 2,а).

Наступним кроком було моделювання структури білка з амінокислотними замінами р.16Arg>Gly та р.27Gln>Glu, яке провели з використанням вебресурсу I-TASSER. У результаті отримали п'ять варіантів просторової структури даних ізоформ білка ADRB2 з амінокислотними замінами з наступним значенням C-score (-0.55; -0,79; -3,41; -1,48; -3,77). Для подальшого аналізу обрали модель із найвищим значенням C-score -0.55 (рис. 2,б).

При поліморфізмі 46A>G гена ADRB2, що кодує амінокислотну заміну р.16Arg>Gly однойменного білка, відбувається заміна позитивно зарядженого амінокислотного залишку аргініну в 16 положенні на неполярну амінокислоту гліцин. При поліморфізмі 79C>G гена ADRB2 відбувається заміна р.27Gln>Glu гідрофільного незарядженого амінокислотного залишку глутаміну в 27 положенні на негативно заряджений амінокислотний залишок глутамінову кислоту (рис. 2).

За результатами дослідження структурних особливостей білка, що кодуються зазначеними мононуклеотидними замінами, можна зробити висновок, що за наявності відповідних

амінокислотних замін, N-кінцева петля білка *ADRB2* притягується до рецептора. Така зміна структури може впливати на характер взаємодії рецептора *ADRB2* з білками партнерами, залученими до процесів гідроксилювання, у бік вітилювання та деградації білкових молекул рецептора *ADRB2* [26, 28, 32], а також білками сигнального шляху, до якого задіяний *ADRB2*.

З огляду на те, що  $\beta_2$ -адренорецептори локалізовані практично на всіх клітинах імунної відповіді, індивіди з такими поліморфними алелями, можливо, є більш чутливими до алергенів і, як наслідок, — до розвитку алергії і запалень різного характеру. На користь цього свідчать отримані нами дані стосовно підвищення частоти носіїв поліморфного варіанта 79G гена *ADRB2* у групі пацієнтів, що мешкають в антропогенно більш забрудненому місті Кам'янське, порівняно з контрольною групою і групою пацієнтів із Києва.

Саме в цій групі пацієнтів виявили неконтрольований перебіг захворювання, для якого визначили суттєву спадкову обтяженість за алергічними захворюваннями, яка відзначалася у 84% пацієнтів і суттєво перевищувала ( $p < 0,05$ ) цей показник у групі обстеження І. При цьому найчастіше БА поєднувалася з алергічним ринітом (64,8 %,  $p < 0,05$ ).

Таким чином, ці мононуклеотидні заміни можна розглядати як генетичні маркери тяжкості перебігу БА [18, 24].

Слід зазначити, що інший поліморфний варіант rs1800888 у багатьох дослідженнях визначили як маркер поганої відповіді лікування БА з використанням  $\beta$ -агоністів і, зокрема, салбутамолом [4, 18]. Для оцінки молекулярної природи відмінності в ефективності лікування пацієнтів із різними генотипами за поліморфізмами гена *ADRB2* ми провели моделювання просторової структури білка  $\beta$ -адренорецептора з амінокислотною заміною 164Thr>Ile, що кодується мононуклеотидною заміною 491C>T (rs1800888).

Амінокислотна заміна p.164Thr>Ile знаходиться у четвертій трансмембранній альфа-спіралі білка *ADRB2*, де також розміщений сайт зв'язування з  $\beta_2$ -агоністами. Заміна гідрофільного амінокислотного залишку треоніну в 164 положенні на гідрофобний залишок ізолейцин може призводити до зміни просторової структури білка *ADRB2*.

Для визначення того, як заміна амінокислотного залишку Thr164 в  $\beta_2$ -адренорецепторі (*ADRB2*) людини на Ile164 впливає на

афінність зв'язування із салбутамолом, ми провели дослідження комплексів дикого типу та мутантної форми *ADRB2* із досліджуванним агоністом.

Для побудови комплексу *ADRB2* із салбутамолом використали кристалічну структуру, одержану з Protein Data Bank (PDBID: 5X7D) [23]. Спочатку зробили суперпозицію цієї кристалічної структури зі структурою  $\beta_1$ -адренорецептора із салбутамолом (PDBID: 2Y04) [37], для ідентифікації місця знаходження сайту зв'язування цього агоніста. За допомогою програми Auto Dock Vina [36] здійснили молекулярний докінг салбутамолу в знайдений сайт кристалічної структури *ADRB2*. З використанням програми Discovery Studio Visualizer 4.0 провели візуалізацію комплексу салбутамолу з амінокислотними залишками *ADRB2*. Комплекс салбутамолу з амінокислотними залишками  $\beta_2$ -адренорецептора людини, отриманий за допомогою молекулярного докінгу, наведено на рис. 3.

На основі кристалічної структури *ADRB2* із салбутамолом (PDBID: 5X7D) провели гомологічне моделювання *ADRB2* з амінокислотною заміною p.164Thr>Ile за допомогою вебсервера Swiss-Model [38]. Зробили суперпозицію кристалічної структури *ADRB2* (дикий тип) із гомологічною моделлю *ADRB2* та порівняли їх взаємодію із салбутамолом за результатами молекулярного докінгу (рис. 4).

У процесі дослідження комплексів *ADRB2* дикого типу та з амінокислотною заміною p.164Thr>Ile із салбутамолом, одержаних у результаті молекулярного докінгу, виявили, що Thr164 безпосередньо не залучений до взаємодії з агоністом. Thr164 знаходиться на відстані 6,282 Å від ліганди — відстань між найближчими атомами в досліджуваному комплексі. Однак заміна Thr164 на Ile164 призводить до конформаційних змін  $\beta_2$ -адренорецептора поблизу сайту зв'язування із салбутамолом, що може впливати на афінність взаємодії з цим агоністом. Таким чином, цю мононуклеотидну заміну можна розглядати як фармакогенетичний маркер поганої відповіді пацієнта на лікування салбутамолом. Отримані результати можуть бути актуальними для оптимізації лікарських засобів (хімічних модифікацій  $\beta_2$ -агоністів).

## Висновки

За результатами порівняльного аналізу частоти носіїв поліморфного варіанта 79G гена *ADRB2* встановлено, що носійство цього алельного варіанта є фактором спадкової схильності

розвитку БА в умовах антропогенного навантаження навколишнього середовища.

За результатами комп'ютерного моделювання просторової структури білка, що кодується проаналізованою нами мононуклеотидною заміною 79C>G(rs1042714), а також нерівноважно зчепленою з нею заміною 46A>G(rs1042713) можна зробити висновок, що за наявності відповідних амінокислотних замін р.27Gln>Glu та р.16Arg>GlyN-кінцева петля білка *ADRB2* притягується до рецептора. Така зміна структури може впливати на характер взаємодії рецептора *ADRB2* з білками партнерами, включаючи білки сигнального шляху, до якого задіяний *ADRB2*. Таким чином, ці мононуклеотидні заміни можна

розглядати як генетичні маркери ризику розвитку БА.

За наявності мононуклеотидної заміни 491C>T гена *ADRB2* відбувається амінокислотна заміна р.164Thr>Ile у кодованому білку. Заміна Thr164 на Ile164 призводить до конформаційних змін  $\beta_2$ -адренорецептора поблизу сайту зв'язування із сальбутамолом, що може знижувати афінність взаємодії з цим агоністом. Таким чином, таку мононуклеотидну заміну можна розглядати як фармакогенетичний маркер поганої відповіді пацієнта на лікування сальбутамолом.

*Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. Антипкін ЮГ, Чумаченко НГ, Уманець ТР, Лапшин ВФ. (2016). Аналіз захворюваності та поширеності бронхіальної астми в дітей різних вікових груп по регіонах України. *Перинатологія і педіатрія*. 1 (65): 95–99.
2. Полонников АВ, Иванов ВП, Богомазов АД. (2015). Генетико-біохімічні механізми вовлеченості ферментів антиоксидантної системи в розвитку бронхіальної астми. *Біомедицинська хімія*. 61, 4: 427–439.
3. Татарський ПФ, Чумаченко НГ, Кучеренко АМ, Гулковський РВ, Арабська ЛП, Смірнова ОА, Толкач СІ, Антипкін ЮГ, Лівшиць ЛА. (2011). Дослідження можливої ролі поліморфізму генів *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *NAT2* і *ADRB2* у розвитку бронхіальної астми у дітей. *Biopolymers and Cell*. 27, 1: 66–73.
4. Bandaru S, Tarigopula P, Akka J et al. (2016). Association of Beta 2 adrenergic receptor (Thr164Ile) polymorphisms with Sulbutamol refractoriness in severe asthmatics from Indian population. *Gene*. 592 (1): 15–22.
5. Baranov VS, Baranova EV, Ivaschenko TE, Aseev MV. (2002). Human genome and «predisposition» genes. Introduction into predictive medicine. St. Petersburg: Intermedika: 272.
6. Barnes PJ, Dollery C, MacDermot J. (1980). Increased pulmonary  $\beta$ -adrenergic and decreased  $\beta$ -adrenergic receptors in experimental asthma. *Nature*. 285: 569–571.
7. Benkert P, Biasini M, Schwede T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27: 343–350.
8. Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, Bordoli L, Schwede T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*: 7.
9. Bienert S, Waterhouse A, de Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T. (2017). The SWISS-MODEL Repository — new features and functionality. *Nucleic Acids Res*. 45: D313–D319.
10. Birbian N, Singh J, Jindal SK, Singla N. (2012). Association of  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphisms with asthma in a North Indian population. *Lung*. 190 (5): 497–504.
11. Ober C, Yao TC. (2011). The Genetics of Asthma and Allergic Disease: A 21st Century Perspective. *Immunol Rev*. 242 (1): 10–30. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682736>.
12. Chung LP, Waterer G, Thompson PJ. (2011). Pharmacogenetics of  $\beta_2$  adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting  $\beta$ -agonists and asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 41 (3): 312–326.
13. Danielewicz H. (2014). What the Genetic Background of Individuals with Asthma and Obesity Can Reveal: Is  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Gene Polymorphism Important? *Pediatric allergy, Immunology, and Pulmonology*. 27; 3: 23–24.
14. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB et al. (2000). Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 97: 83–88.
15. Finkelstein Y, Bournissen FG, Hutson JR, Shannon M. (2009). Polymorphism of the *ADRB2* gene and response to inhaled  $\beta$ -agonists in children with asthma: A metaanalysis. *J Asthma*. 46 (9): 900–905.
16. Guex N, Peitsch MC, Schwede T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*. 30: S162–S173.
17. Jovicic N, Babic T, Dragicevic S, Nestorovic B, Nikolic A. (2018). *ADRB2* Gene Polymorphisms and salbutamol and responsiveness in serbian children with asthma. *BJMG*. 21 (1): 33–38. Doi: 10.2478/bjmg-2018–0007.
18. Jovicic N, Babic T, Dragicevic S, Nestorovic B, Nikolic A. (2018). *ADRB2* gene polymorphisms and salbutamol responsiveness in Serbian children with asthma. *BJMG*. 21 (1): 33–38. Doi: 10.2478/bjmg-2018–0007.
19. Karam RA, Sabbah NA, Zidan HE, Rahman HM. (2013). Association between genetic polymorphisms of  $\beta_2$ -adrenergic receptors and nocturnal asthma in Egyptian children. *J. Investig Allergol. Clin. Immunol*. 23 (4): 262–266.
20. Liggett SB. (1997). Polymorphisms of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 156: 156–162.
21. Liggett SB. (2000). Beta2-adrenergic receptor pharmacogenetics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 161: 197–201.
22. Littlejohn MD, Taylor DR, Miller AL, Kennedy MA. (2002). Determination of beta2-adrenergic receptor (*ADRB2*) haplotypes by a multiplexed polymerase chain reaction assay. *Hum. Mutat*. 20 (6): 479.
23. Liu X, Ahn S, Kahsai AW, Meng KC, Latorraca NR, Pani B, Venkatarishnan AJ, Masoudi A, Weis WI, Dror RO, Chen X, Lefkowitz RJ, Koblika BK. (2017). Mechanism of intracellular allosteric beta 2AR antagonist revealed by X-ray crystal structure. *Nature*. 548: 480–484.
24. Man Tian, Hui Liang, Qiao-Zhi Qin, Wen-xin Zhang and Shan-shan Zhang (2016). *ADRB2* polymorphisms in allergic asthma in Han Chinese children. *Int. Forum of Allergy & Rhinology*. 6 (4): 367–372. Doi: 10.1002/alr.21673.
25. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Publ: 545.
26. Nabhan JF, Pan H, Lu Q. (2010). Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO Rep*. 11: 605–611.
27. Petrovic-Stanojevic N, Topic A, Nikolic A, Stan-Kovic M, Dopudja-Pantic V, Milenkovic B et al. (2014). Polymorphisms of  $\beta_2$ -adrenergic receptor gene in Serbian asthmatic adults: Effects on response to  $\beta$ -agonists. *Mol Diagn Ther*. 18 (6): 639–646.

28. Qi S, O'Hayre M, Gutkind JS, Hurley JH. (2014). Insights into beta2-adrenergic receptor binding from structures of the N-terminal lobe of ARRDC3. *Protein Sci.* 23: 1708–1716.
29. Rasmussen SGF, Choi HJ, Rosenbaum DM et al. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 450: 383–387.
30. Reihnsaus E, Innis M, MacIntyre N et al. (1993). Mutations in gene encoding for the  $\beta_2$ -adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8: 334–339.
31. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols.* 5: 725–738.
32. Sauvageau E, Rochdi MD, Oueslati M, Hamdan FF, Percherancier Y, Simpson JC, Pepperkok R, Bouvier M. (2014). CNH4 interacts with newly synthesized GPCR and controls their export from the endoplasmic reticulum. *Traffic.* 15: 383–400.
33. Statistical publication Environment of Ukraine. (2009). SSC of Ukraine. Kyiv: 270.
34. Sullivan KM, Dean A, Soe MM. (2009). OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep.* 124; 3: 471–474.
35. Thakkestian A, McEvoy M, Minelli C. et al. (2005). Systematic review and meta-analysis of the association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 162: 201–211.
36. Trott O, Olson AJ. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry.* 31: 455–461.
37. Warne A, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehme R, Edwards PC, Leslie AGW, Schertler GFX, Tate CG. (2011). The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta1-adrenergic receptor. *Nature.* 469: 241–244.
38. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46 (W1): W296-W303.
39. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods.* 12: 7–8.
40. Zhang Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9:

### Сведения об авторах:

**Лившиц Людмила Аврамовна** — д.биол.н., проф., зав. лаборатории геномики человека Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Адрес: г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; тел. (044) 200-03-56.

**Татарский П.Ф.** — к.биол.н., н.с. лаборатории геномики человека Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Адрес: г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; тел. (044) 200-03-56.

**Городна О.В.** — к.биол.н., н.с. лаборатории геномики человека Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Адрес: г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; тел. (044) 200-03-56.

**Маяковская А.В.** — сотр. лаборатории геномики человека Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Адрес: г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; тел. (044) 200-03-56.

**Волинець Г.П.** — к.биол.н., ст.н.с. отдела биомедицинской химии Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Адрес: г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; тел. (044) 200-03-56.

**Чумаченко Нина Григорьевна** — к.мед.н., ст.н.с. отделения заболеваний органов дыхания и респираторных аллергозов у детей ГУ «ИПАГ имени академика Е.М. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-90-94.

**Уманец Татьяна Рудольфовна** — д.мед.н., гл.н.с. отделения заболеваний органов дыхания и респираторных аллергозов у детей ГУ «ИПАГ имени академика Е.М. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-90-94. <https://orcid.org/0000-0001-9058-7383>

**Лапшин Владимир Федорович** — д.мед.н., проф., зам. директора по научно-организационной работе ГУ «ИПАГ имени академика Е.М. Лукьяновой НАМН Украины».

Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-62-16. <http://orcid.org/0000-0003-1896-1865>

**Антипкин Юрий Геннадиевич** — д.мед.н., проф., акад. НАМН Украины, директор, зав. отделения заболеваний органов дыхания и респираторных аллергозов у детей ГУ «ИПАГ имени академика Е.М. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-80-67.

Статья поступила в редакцию 02.02.2019 г.; принята в печать 25.05.2019 г.



The annual ESPNIC Summer School will happen once again in sunny Bilbao, Spain from 2nd to 4th September. The programme will cover mainly topics in the area of Nutrition, Respiratory Support, and Analgesation.

*More information about how to register can be found on the event website*  
<https://www.symporg-registrations.com/symporg/frontend/reg/thome.csp?pageID=78983&eventID=158>