

Научная статья

УДК 616.248-053.2-092: [612.6.05: 577.21

DOI: 10.17816/pmj41159-72

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ NNIP, ADRB2 И IL-33 С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Ю.С. Алиева^{1*}, Е.Г. Фурман¹, Е.И. Кондратьева², Е.В. Лошкова³, В.С. Шелудько¹, В.С. Соколовский⁴, М.С. Пономарева¹, Е.А. Хузина¹, Р.Р. Айшауова⁵

¹Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера,

²Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва,

³Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Российская Федерация,

⁴Университет Бен-Гуриона в Негеве, г. Беэр-Шева, Израиль,

⁵Медицинский университет Астана, г. Астана, Казахстан

© Алиева Ю.С., Фурман Е.Г., Кондратьева Е.И., Лошкова Е.В., Шелудько В.С., Соколовский В.С., Пономарева М.С., Хузина Е.А., Айшауова Р.Р., 2024

тел. +7 982 232 04 92

e-mail: dolgomiroyay@mail.ru

[Алиева Ю.С. (*контактное лицо) – ассистент кафедры факультетской и госпитальной педиатрии, ORCID: 0000-0002-0283-088X; Фурман Е.Г. – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой факультетской педиатрии и госпитальной педиатрии, ORCID: 0000-0002-1751-5532; Кондратьева Е.И. – доктор медицинских наук, профессор, врач высшей категории, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза, заведующая кафедрой генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования, заместитель директора по науке Научно-исследовательского клинического института детства Министерства здравоохранения Московской области, ORCID: 0000-0001-6395-0407; Лошкова Е.В. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной педиатрии, доцент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, ORCID: 0000-0002-3043-8674; Шелудько В.С. – кандидат медицинских наук, специалист отдела организационной поддержки научной деятельности управления по научно-исследовательской деятельности, ORCID: 0000-0002-7080-9142; Соколовский В.С. – доктор медицинских наук, профессор кафедры физики; Пономарева М.С. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры факультетской и госпитальной педиатрии, ORCID: 0000-0002-6700-532X; Хузина Е.А. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры факультетской и госпитальной педиатрии, ORCID: 0000-0003-0901-7944; Айшауова Р.Р. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры детских болезней с курсами кардиоревматологии и гастроэнтерологии, ORCID: 0000-0002-0573-5386].

© Alieva Yu. S., Furman E.G., Kondratyeva E.I., Loshkova E.V., Sheludko V.S., Sokolovsky V.S., Ponomareva M.S., Khuzina E.A., Aishauova R.R., 2024

tel. +7 982 232 04 92

e-mail: dolgomiroyay@mail.ru

[Alieva Yu.S. (*contact person) – Assistant of the Department of Faculty and Hospital Pediatrics, ORCID: 0000-0002-0283-088X; Furman E.G. – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Faculty and Hospital Pediatrics, ORCID: 0000-0002-1751-5532; Kondratyeva E.I. – MD, PhD, Professor, Doctor of the Highest Category, Head of the Department of Genetics of Respiratory Diseases, ORCID: 0000-0001-6395-0407; Loshkova E.V. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Hospital Pediatrics, Associate Professor of the Department of Faculty Pediatrics with the Course of Childhood Diseases, ORCID: 0000-0002-3043-8674; Sheludko V.S. – Candidate of Medical Sciences, ORCID: 0000-0002-7080-9142; Sokolovsky V.S. – MD, PhD, Professor, Department of Physics; Ponomareva M.S. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Faculty and Hospital Pediatrics, ORCID: 0000-0002-6700-532X; Khuzina E.A. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Faculty and Hospital Pediatrics, ORCID: 0000-0003-0901-7944; Aishauova R.R. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Childhood Diseases with the Courses of Cardiorheumatology and Gastroenterology, ORCID: 0000-0002-0573-5386].

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF HHIP, ADRB2 AND IL-33 GENES WITH CLINICAL MANIFESTATIONS OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Yu. S. Alieva^{1*}, E.G. Furman¹, E.I. Kondratyeva², E.V. Losbkova³, V.S. Sheludko¹, V.S. Sokolovsky⁴, M.S. Ponomareva¹, E.A. Khuzina¹, R.R. Aishbauova⁵

¹ E.A. Vagner Perm State Medical University,

² N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow,

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation,

⁴ Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel,

⁵ Astana Medical University, Kazakhstan

Цель. Изучение ассоциации полиморфных вариантов генов HHIP, ADRB2 и IL-33 с фенотипами клинического течения бронхиальной астмы (БА) у детей и эффективностью терапии заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 90 пациентов в возрасте от 5 до 17 лет с установленным диагнозом бронхиальной астмы. Всем пациентам были проведены диагностические процедуры, включающие исследование генетического полиморфизма генов HHIP, ADRB2 и IL-33 для установления связи с клиническими фенотипами, показателями лабораторных, инструментальных исследований, определяющими течение бронхиальной астмы и степень контроля заболевания.

Результаты. Проведенное исследование полиморфизмов генов HHIP, ADRB2 и IL-33 у детей, страдающих БА, с разными фенотипами заболевания выявило ассоциацию между полиморфизмами генов и тяжестью заболевания, а также с сопутствующими заболеваниями. Установлено, что аллель Т генетического варианта rs12504628 (Т > С) гена HHIP снижает риск реализации тяжелой БА, а также доказана его протективная роль в отношении реализации лекарственной аллергии. Генотипа АА гена ADRB2 ассоциирован со снижением риска реализации врожденных пороков развития трахеобронхиального дерева на фоне БА. Полиморфные варианты в 4-м и 6-м экзонах гена IL-33 чаще сочетаются со среднетяжелой и тяжелой астмой, а замены нуклеотидов в экзонах 4 и 6 ассоциированы с тяжелым течением БА.

Выводы. В данном исследовании установлены ассоциации полиморфных вариантов генов HHIP, ADRB2 и IL-33 с клиническими проявлениями бронхиальной астмы у детей, которые могут учитываться при персонализированном наблюдении за этими пациентами, и помочь в достижении полного контроля над заболеванием.

Ключевые слова. Полиморфизм генов, бронхиальная астма, дети, степень тяжести астмы, уровень контроля.

Objective. To study the association of polymorphic variants HHIP, ADRB2 and IL-33 genes with phenotypes of clinical course of bronchial asthma in children and effective treatment.

Materials and methods. 90 patients aged from 5 to 17 with the diagnosis of bronchial asthma were included in the investigation. Diagnostic procedures were carried out in all the patients. They included the study of genetic polymorphism of HHIP, ADRB2 and IL-33 genes to establish the association with the clinical phenotypes, findings of laboratory and instrumental study determining the course of bronchial asthma and the degree of its control.

Results. The study of polymorphism of HHIP, ADRB2 and IL-33 genes in children with bronchial asthma with different phenotypes of the disease revealed the association of genetic polymorphism with the severity of course of the disease as well as concomitant diseases. It was determined that allele T of genetic variant rs12504628 (T>C) of HHIP gene reduces the risk of a severe course of BA. Its protective role in the development of drug allergy was also proved. Genotype AA of ADRB2 gene is associated with reduced risks of the development of congenital defects of the tracheobronchial tree in BA. Polymorphic variants in the 4th and 6th

exon of IL-33 gene are more frequently associated with moderate and severe course of asthma and base substitution in the 4th and 6th exon are associated with the severe course.

Conclusions. Associations of polymorphic variants of HHIP, ADRB2 and IL-33 genes with clinical manifestations of BA in children are determined in this study. They can be considered in a personalized monitoring of the patients and can help to control the disease totally.

Keywords. Genetic polymorphism, bronchial asthma, children, severity of asthma, level of control.

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) – одна из важнейших проблем современной теоретической и практической медицины. Согласно отчету Глобальной сети Астмы (The Global Asthma Network), в настоящее время около 348 млн человек страдают данным заболеванием, не менее 14 % из них – дети¹. По имеющимся оценкам, в 2019 г. число больных БА составило 262 млн человек, и был зарегистрирован 461 000 случаев смерти от этой болезни [1].

БА – гетерогенное заболевание, в основе которого лежит хроническое воспаление дыхательных путей, характеризующееся обратимым бронхообструктивным синдромом, повторными эпизодами свистящих хрипов, одышки, заложенности в груди и кашля. Симптомы заболевания варьируются по времени и интенсивности [2; 3]. Основной целью лечения больных БА является достижение и поддержание оптимального контроля заболевания, предотвращение его обострений [4].

Несмотря на широкую доступность ингаляционных глюкокортикостероидов (иГКС) и наличие стандартизированных рекомендаций по лечению астмы, контроль болезни у большинства детей остается неоптимальным. Более 50 % всех детей с БА испытывают не менее одного обострения каждый год, в том числе дети с нетяжелой формой астмы. В России также весьма актуальна проблема контроля астмы, ведь только у 23 %

пациентов достигается полный контроль заболевания. Среди причин недостаточного контроля БА выделяют низкую приверженность терапии (43 %), отсутствие элиминации триггеров (29 %), наличие сопутствующих заболеваний (15 %), курение (15 %) и другое [5].

Однонуклеотидные замены в геноме могут обуславливать влияние генетического полиморфизма на фенотип заболевания, а также предопределять различия в клинических проявлениях заболевания, в том числе контроле над симптомами.

Характерной особенностью молекулярной медицины как науки, основанной на данных о молекулярной структуре генома человека, является ее направленность на коррекцию патологического процесса у конкретного человека с учетом его уникальных генетических особенностей. Другой особенностью является профилактическая направленность, когда полученные задолго до явных проявлений заболевания сведения о геноме могут предупредить его развитие. Генетическая предрасположенность может проявиться при взаимодействии с факторами среды, что формирует патологический фенотип. Наиболее распространенным методом изучения вклада генетических механизмов в развитие БА является поиск ассоциаций заболевания и его фенотипов с полиморфными маркерами генов-кандидатов.

За последнее десятилетие в ходе генетических исследований были выявлены многочисленные гены-кандидаты, обуславливающие предрасположенность к заболеванию БА. Однако нередко приведенные в литературе результаты носят противоречивый характер,

¹ Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2020, available at: <https://ginasthma.org>

что подтверждает необходимость дальнейшего изучения ассоциаций БА с полиморфными маркерами генов-кандидатов.

Некоторые полиморфные маркеры генов-кандидатов могут приводить к развитию обструкции дыхательных путей вследствие потери эластичности легких, в то время как другие вносят вклад в формирование хронического воспаления, приводящего к обструкции дыхательных путей или недостаточному ответу на лекарственные препараты, такие как β_2 -агонисты или ИГКС [6].

Генетические аспекты контроля над БА у детей продолжают изучаться. В частности известно, что полиморфизм гена β_2 -адренергических рецепторов (ген *ADRB2*) ассоциируется с терапевтическим ответом пациентов на бронхорасширяющие препараты – β_2 -агонисты. Стимуляция β_2 -адренорецепторов приводит к бронходилатации и улучшению бронхиальной проводимости, а также влияет на функционирование Т-клеток, эозинофильное воспаление и вызывает снижение секреции провоспалительных медиаторов из тучных клеток [7].

Продуктом гена *HHIP* (ген взаимодействия семейства Hedgehog) является эволюционно консервативный сигнальный белок, играющий важную роль в широком круге процессов. Есть данные о наличии ассоциации однонуклеотидного полиморфизма rs1828591 гена *HHIP* с предрасположенностью к развитию бронхиальной обструкции [8]. Указывается на связь однонуклеотидного полиморфизма rs1512288 гена *HHIP* с обратимостью бронхиальной обструкции, в то время как с гиперреактивностью бронхов такая связь не обнаружена [9].

Среди значительного количества генов-кандидатов БА особое место занимают гены цитокинов-аларминов, играющие ключевую роль на всех стадиях реализации аллергических реакций. В направлении молекулярно-генетических методов перспективным для

исследований является ген цитокина-алармина интерлейкина-33 (IL-33). IL-33 является одной из центральных сигнальных молекул иммунных реакций при БА [10]. Роль IL-33, подтверждена в патогенезе БА у детей [11; 12]. Установлено, что уровни IL-33 повышены в мокроте и биоптатах бронхов пациентов с астмой [13]. IL-33 представляет собой цитокин тканевого происхождения, который индуцирует и усиливает эозинофильное воспаление и стал многообещающей новой мишенью для лечения астмы и аллергических заболеваний [14].

Связывание IL-33 с его рецептором (ST2) усиливает экспрессию некоторых провоспалительных медиаторов (IL-5, IL-4 и IL-13), и тем самым влияет на опосредованное Th2-клетками эозинофильное воспаление дыхательных путей. Увеличение IL-33 было связано с наличием аллеля rs1342326 гена *IL-33*. Полиморфизм гена *IL-33* rs1342326 был связан с более низким риском астмы у детей в тунисской популяции и более высокой экспрессией цитокина IL-33 [15]. Сообщается, что однонуклеотидный полиморфизм rs992969 гена *IL-33* был связан с уровнем эозинофилов в крови, астмой и эозинофильной астмой. Полиморфизм rs4008366 гена *IL-33* показал слабую связь с эозинофильной астмой [16].

С помощью полногеномного секвенирования у исландского населения обнаружили редкий вариант гена *IL-33* (NM_001199640: exon7: c.487-1G > C (rs146597587-C), частота аллеля = 0,65 %), который нарушает канонический акцепторный сайт сплайсинга перед последним кодирующим экзоном гена [17]. Этот вариант также встречается с низкой частотой у европейского населения и ассоциируется с более низким количеством эозинофилов и сниженным риском развития астмы у европейцев (*OR* = 0,47; 95 %). У гетерозигот общая экспрессия мРНК IL-33 примерно на 40 % ниже, чем у носителей. Этот

полиморфизм приводит к образованию укороченной формы белка IL-33. Укороченный вариант не образует комплекс IL-33R/ST2 и не активирует клетки, экспрессирующие ST2. Эти данные демонстрируют, что rs146597587-С представляет собой мутацию с потерей функции цитокина [17].

Несмотря на ряд представленных исследований полиморфизмов генов *HHIP*, *ADRB2* и *IL-33* при БА, значение ассоциации полиморфизмов вышеупомянутых генов с клиническим течением БА у детей еще окончательно не определено. В связи с вышесказанным возникает потребность в совершенствовании комплексной оценки степени контроля БА и определения влияния на него клинических, лабораторных, функциональных и генетических характеристик.

Цель исследования – проанализировать ассоциацию полиморфных вариантов генов *HHIP*, *ADRB2* и *IL-33* с фенотипами клинического течения БА у детей и эффективностью терапии заболевания

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено когортное одноцентровое исследование 90 пациентов с бронхиальной астмой в возрасте от 5 до 17 лет с установленным диагнозом бронхиальной астмы различной степенью тяжести и контроля в период с ноября по 2019 г. по март 2021 г. Диагноз БА устанавливали на основании действующих клинических рекомендаций². Исследование проводилось на базе Краевой детской клинической больницы г. Перми и поликлиник Пермского края в рамках научного гранта Российского центра научной информации (РЦНИ) – ранее РФФИ.

² Бронхиальная астма: клинические рекомендации. 2021, available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/359_2

Критерии включения: дети с установленным диагнозом БА в возрасте от 5 до 17 лет; подписание информированного согласия.

Критерии исключения: любые острые респираторные инфекции на период обследования, возраст менее 5 лет (ввиду невозможности проведения спирографии в данной возрастной группе).

У всех участников проведено комплексное обследование клинического состояния и функции внешнего дыхания. В дальнейшем для них был реализован комплекс диагностических процедур, включающих исследование генетического полиморфизма генов *HHIP*, *ADRB2* и *IL-33* для установления связи с клиническими фенотипами, показателями лабораторных, инструментальных исследований, определяющими течение бронхиальной астмы и степень контроля заболевания. У всех пациентов собирали анамнез заболевания, включая аллергологический анамнез, определяли общий анализ крови, риноцитогرامму, уровень общего и специфического IgE, иммунограмму по показаниям. Проводили спирографическое исследование, пульсоксиметрию, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, показатели пиковой скорости выдоха (ПСВ). На основании клинических данных, показателей функции внешнего дыхания определяли степень тяжести обострения согласно клиническим рекомендациям. Степень тяжести обострений БА устанавливалась по следующим клиническим критериям – клинические симптомы, ПСВ, частота дыхания, пульс, частота использования препаратов скорой помощи, ночные пробуждения. Уровень контроля над БА определялся согласно (Asthma Control Test – АСТ и С-АСТ) и комплексного индекса тяжести бронхиальной астмы (The Composite Asthma Severity Index – CASI)

Материалом для молекулярно-генетического исследования явилась ДНК, выделенная из сухих пятен капиллярной крови,

у 90 детей. Проведено исследование частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов: rs12551256-A и rs146597587-G гена *IL-33* у 70 детей; rs12504628 гена *HHIP* и ARG16GLY rs1042713 гена *ADRB2* у 90 больных БА с учетом степени тяжести и контроля заболевания. С целью выявления мутантных аллелей генов применялся метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). У детей с тяжелой степенью БА, а также у детей с плохо контролируемой/неконтролируемой астмой ($n = 26$) дополнительно проведено секвенирование всей кодирующей последовательности гена *IL-33*, расположенного на 9-й хромосоме в области 9p24.1 (поиск мутаций в 9 экзонах).

Отбор случаев осуществляли методом сплошной выборки. Методика определения объема выборки основывалась на использовании специализированной формулы при неизвестном объеме генеральной совокупности:

$$n = t^2 \cdot p \cdot q / \Delta^2,$$

где n – объем выборки, t – коэффициент, зависящий от выбранного исследователем доверительного уровня, p – доля респондентов с наличием исследуемого признака, $q = 1 - p$ – доля респондентов, у которых исследуемый признак отсутствует, Δ – предельная ошибка выборки.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel 2010.

Гипотезу о нормальности распределения исследуемых показателей проверяли с использованием критерия Шапиро – Уилка. С целью распространения выводов на генеральные совокупности (95 % достоверность) некоторые показатели были представлены в виде $M \pm 2m$ ($\% \pm 2m$).

При сравнении зависимых и независимых групп признаков, характеризующих уровень контроля и/или степень тяжести

заболевания (в зависимости от типа распределений анализируемых показателей), использовали двухвыборочный t -критерий Стьюдента или его непараметрический аналог – U -критерий Манна – Уитни. Для анализа таблиц сопряженности признаков применялся критерий χ^2 Пирсона. Взаимосвязь переменных изучали с использованием корреляционного анализа. Уровень значимости для проверяемых гипотез был принят равным 0,05.

Ожидаемое распределение генотипов оценивалось по формуле Харди – Вайнберга:

$$(q + p)^2 = q^2 + 2pq + p^2,$$

где q – частота встречаемости рецессивного гена, p – частота встречаемости доминантного гена, q^2 – частота встречаемости генотипа aa , p^2 – частота встречаемости генотипа AA , $2pq$ – частота встречаемости генотипа Aa .

Для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди – Вайнберга, был использован критерий χ^2 .

Для статистически значимых параметров рассчитывался относительный риск (ОР) по формуле:

$$ОР = \frac{A \cdot (C + D)}{C \cdot (A + B)}.$$

Доверительный (95 %) интервал для ОР рассчитывался по формулам:

$$\text{верхняя граница } e^{\ln(ОР) + 1,96 \cdot \sqrt{\frac{B}{A \cdot (A+B)} + \frac{D}{C \cdot (C+D)}}},$$

$$\text{нижняя граница } e^{\ln(ОР) - 1,96 \cdot \sqrt{\frac{B}{A \cdot (A+B)} + \frac{D}{C \cdot (C+D)}}},$$

где A, B, C, D в формулах – количество наблюдений в клетках четырехпольной таблицы сопряженности.

Данное исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской

декларации Всемирной медицинской ассоциации. Перед включением ребенка в исследование было получено информированное согласие в письменном виде от его законного представителя в соответствии с локальными законами и регуляциями. Заключение локального этического комитета при ПГМУ № 5/20 от 4 августа 2020 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все дети обследуемой группы состояли на диспансерном учете у пульмонолога с диагнозом бронхиальной астмы. Медиана возраста пациентов была 13 лет [Q_1 – Q_3 : 9; 15] лет. Всего в исследовании приняли участие 100 детей, из них мальчиков 72 (72 %), девочек 28 (28 %). У 62 пациентов БА имела легкое течение, у 27 детей – БА средней степени тяжести и у 11 – тяжелая астма. Наибольшее число пациентов исследуемой когорты (67 пациентов) имели неполный контроль бронхиальной астмы, у 7 детей диагностировано отсутствие контроля и у 26 – полный контроль.

При сборе анамнестических данных у 87 % детей были выявлены факторы нарушения гипоаллергенного режима (наличие дома животных, ковров, цветущих комнатных растений, плесени, пассивного курения, загазованность места проживания выхлопными газами автомобилей или расположенных поблизости промышленных предприятий).

Амбулаторные медицинские карты детей, находящихся на диспансерном наблюдении у участкового врача-педиатра, были проанализированы для оценки коморбидного фона. Изучив сопутствующие заболевания обследуемых детей, выявили, что наибольшая доля приходилась на аллергический ринит – 80,0 %, атопический дерматит – 32,0 % и поллиноз – 40,4 % (табл. 1). У большинства детей наблюдалось по два сопутствующих заболевания и более.

Таблица 1

Сопутствующие заболевания у детей с БА

Сопутствующее заболевание	Количество детей с установленным диагнозом, абс.
Аллергический ринит	80
Атопический дерматит	32
Поллиноз	40
Пищевая аллергия	20
Заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический гастродуоденит/ дисфункция билиарного тракта/хронические запоры)	17
Избыток массы тела/ожирение	15
Врожденные пороки развития трахеобронхиального дерева (ТБД): добавочный бронх/транспозиция бронха	16
Крапивница	14

В структуре жалоб обследуемых детей преобладали одышка при физической нагрузке ($70,0 \pm 9,0$), одышка на улице в весенне-летний период ($34,0 \pm 9,3$), при респираторной инфекции ($42,0 \pm 9,7$), затрудненное дыхание со свистящими хрипами ($45,0 \pm 9,8$) и сухой приступообразный кашель ($48,0 \pm 9,8$).

В результате обследования функции внешнего дыхания с использованием метода спирографии у 29 детей выявлены нарушения по обструктивному типу, а по данным пикфлоуметрического контроля 18 % отмечали существенное ухудшение показателей и их смещение в «красную» зону, что еще раз подтверждает гипотезу об отсутствии контроля заболевания у больных БА на фоне базисной терапии.

Характеристика изучаемых генотипов. Распределение генотипов у пациентов с БА соответствовало равновесию Харди – Вайнберга, за исключением генетического варианта rs146597587 гена IL-33

($G > C$), где присутствовали лишь носители одного генотипа GG (табл. 2).

Поиск ассоциаций генетических маркеров генов *HHIP*, *ADRB2* и *IL-33* с клиническим течением бронхиальной астмы.

Сравнение генетических маркеров у пациентов с тяжелой БА (тБА) и легкой степени тяжести/среднетяжелой БА выявило тенденцию к снижению риска реализации тяжелого заболевания среди лиц с носительством генотипа ТТ ($OR = 0,221$ (95 % CI : 0,059–0,828; $\chi^2 = 5,759$; $p = 0,056$)) и аллеля Т ($OR = 0,491$

(95 % CI : 0,190–1,269; $\chi^2 = 4,270$; $p = 0,039$)) изучаемого генетического варианта rs12504628 ($T > C$) гена *HHIP*, частота генотипа CC при тяжелой БА составила 64 % против 28 % при нетяжелой БА, аллеля С 77 % против 52 % (табл. 3).

Сравнение генетических маркеров у пациентов с сочетанием атопического дерматита (АтД) и бронхиальной астмы (БА+АтД) и БА без АтД (БА без АтД) выявило увеличение риска сочетания астмы и дерматита среди лиц с носительством генотипа ТТ

Таблица 2

Распределение частот генотипов изучаемых полиморфизмов (rs12504628 ($T > C$), rs1042713 ($G > A$), rs12551256, rs146597587 ($G > C$)) в группе больных бронхиальной астмой

Ген/полиморфизм	Генотип	N.O.	N.E.	χ^2 $df = 1$	Частота аллеля	$b_{obs} \pm SE$ $b_{exp} \pm SE$	D
ген <i>HHIP</i> rs12504628 ($T > C$)	ТТ	21	18,68	0,254 $p = 0,614$	Т = 0,455 С = 0,544	$b_{obs} = 0,444 \pm 0,052$ $b_{exp} = 0,101 \pm 0,012$	-0,586
	ТС	40	44,64				
	СС	29	26,68				
	Т	82	45,56				
	С	98	54,44				
Ген <i>ADRB2</i> rs1042713 ($G > A$)	GG	40	39,34	0,004 $p = 0,952$	G = 0,661 A = 0,339	$b_{obs} = 0,433 \pm 0,052$ $b_{exp} = 0,685 \pm 0,049$	-0,368
	GA	39	40,33				
	AA	11	10,34				
	G	119	66,11				
	A	61	33,89				
Ген <i>IL-33</i> rs12551256 ($A > G$)	GG	24	22,56	0,095 $p = 0,758$	G = 0,593 A = 0,407	$b_{obs} = 0,438 \pm 0,062$ $b_{exp} = 0,825 \pm 0,047$	-0,470
	GA	28	30,88				
	AA	12	10,56				
	G	76	59,38				
	A	52	40,63				
Ген <i>IL-33</i> rs146597587 ($G > C$)	GG	40	100		G = 1,0 C = 0	$b_{obs} = 0$ $b_{exp} = 0$	0
	CG	0	0				
	CC	0	0				
	G	80	100				
	C	0	0				

Примечание: N.O. – наблюдаемая численность генотипов; N.E. – ожидаемая численность генотипов; критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому исходя из равновесия Харди – Вайнберга; df – число степеней свободы; $b_{obs} \pm s.e.$ и $b_{exp} \pm s.e.$ – соответственно наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность с ошибкой; D – относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой.

Таблица 3

**Анализ «случай – контроль» изучаемых генетических вариантов
при тяжелой и нетяжелой БА**

Ген/ полиморфизм	Генотипы/ аллели	БА тяжелая		БА нетяжелая		χ^2	<i>p</i>	OR
		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%			
Ген <i>HHIP</i> rs12504628 (Т > С) 1-Т/С, 2-Т/Т, 3-С/С	ТТ	1	9	20	25	5,759	0,056	0,221 (0,059 < OR < 0,828)
	ТС	3	27	37	47			
	СС	7	64	22	28			
	Т	5	23	77	48	4,270	0,039	0,309 (0,109 < OR < 0,880)
	С	17	77	81	52			
Ген <i>ADRB2</i> rs1042713 (G > A) 1-G/A, 2-G/G, 3-A/A	GG	5	45	35	44	1,898	0,387	1,048 (0,295 < OR < 3,720)
	GA	6	55	33	42			
	AA	0	0	11	14			
	G	16	73	103	65	0,211	0,646	1,424 (0,527 < OR < 3,847)
	A	6	27	55	35			
Ген <i>IL-33</i> rs12551256 (A > G) 1-A/G, 2-A/A, 3-G/G	GG	3	11	21	14	4,345	0,114	0,470 (0,190 < OR < 1,166)
	GA	с	45	28	40			
	AA	с	44	12	46			
	G	6	33	70	34	0,027	0,870	0,950 (0,646 < OR < 1,396)
	A	0	67	52	66			
Ген <i>IL-33</i> rs146597587 (G > C) 1-G/C, 2-G/G, 3-C/C	GG	8	11	22	14	4,345	0,114	0,470 (0,190 < OR < 1,166)
	GC	0	45	0	40			
	CC	0	44	0	46			
	G	16	33	44	34	0,027	0,870	0,950 (0,646 < OR < 1,396)
	C	0	67	0	66			

Примечание: *N* – абсолютное число наблюдаемых генотипов, *p* приведено для теста χ^2 , с – секвенирование.

(OR = 2,875 (95 % CI: 1,130–7,316; χ^2 = 5,751; *p* = 0,056) генетического варианта rs12504628 (Т > С) гена *HHIP*, но без статистически значимой разницы.

Анализ генетических маркеров у пациентов с сочетанием врожденных пороков развития трахеобронхиального дерева с астмой (БА+ВПР) и бронхиальной астмой без пороков развития (БА без ВПР) выявил ассоциации с сочетания астмы и ВПР с генотипом AA (OR = 0,182 (95 % CI: 0,051–0,646; χ^2 = 8,567; *p* = 0,014) генетического варианта rs1042713 (G > A) гена *ADRB2*, который имеет протективное значение в отношении ВПР, показано, что обладатели генотипа AA в 40 % случаев имеют ВПР бронхиального

дерева, против 11 % носителей генотипа AA без ВПР.

Анализ генетических маркеров у пациентов с БА и отягощенным аллергоанамнезом среди родственников первой степени родства (БА+ наследственный анамнез) и бронхиальной астмой без отягощенного наследственного аллергоанамнеза (БА без наследственного анамнеза) выявил, что носители генотипа AA (OR = 0,112 (95 % CI: 0,013–0,932; χ^2 = 5,554; *p* = 0,062)) и носители аллеля A (OR = 0,453 (95 % CI: 0,213–0,964; χ^2 = 3,537; *p* = 0,059) генетического варианта rs1042713 (G > A) гена *ADRB2*, имеют тенденцию к меньшей частоте встречаемости отягощенного аллергоанамнеза среди родст-

венников первой степени родства (4 против 26 % для генотипа АА и 26 против 44 % для аллеля А). Однако для подтверждения вышеизложенных утверждений требуется дальнейшее изучение генетических маркеров на большой когорте пациентов.

Анализ генетических маркеров у пациентов с БА и лекарственной аллергией (БА+ЛА) и бронхиальной астмой без лекарственной аллергии (БА без ЛА) выявил, что носители генотипа СС+ТС имеют тенденцию к сочетанию астмы с лекарственной аллергией ($OR = 2,917$ (95 % CI : 1,009–8,427; $\chi^2 = 4,984$; $p = 0,083$) генетического варианта rs12504628 (Т > С) гена *HNIP*, для аллеля Т была показана протективная роль в отношении реализации лекарственной аллергии (31 против 52 %) ($OR = 0,416$ (95 % CI : 0,190–0,909; $\chi^2 = 4,204$; $p = 0,040$).

Анализ генетических маркеров у пациентов с неконтролируемым течением БА и бронхиальной астмой с частичным и полным контролем над симптомами заболевания не выявил ассоциаций с изучаемыми генетическими вариантами.

Носительство генотипа АА гена *ADRB2* ассоциировано со снижением риска отяго-

щенного аллергоанамнеза среди родственников первой степени родства и снижением риска реализации врожденных пороков развития трахеобронхиального дерева на фоне БА (табл. 4).

Секвенирование и анализ экзона гена *IL-33* показали наличие статистически значимой положительной связи между частотой повреждений в экзонах 4 ($r = 0,417$; $p = 0,034$) и 6 ($r = 0,593$; $p = 0,001$), с одной стороны, и степенью тяжести БА – с другой. Установлено, что замены нуклеотидов в этих экзонах чаще ассоциируются с тяжелым течением бронхиальной астмы.

В исследовании [13] показано, что генотип Gly16Gly гена *ADRB2* ассоциирован с повышенным риском развития более тяжелой формы бронхиальной астмы, а также ее ночной формы, по сравнению с генотипом *ADRB2* Arg16Arg. Анализ 28 опубликованных исследований об ассоциации полиморфизмов гена бета-2-адренорецепторов с фенотипами БА подтвердил связь между полиморфизмом Gly16 и ночной астмой, но не обнаружена связь между вариантом Arg16Gly и бронхиальной гиперреактивностью [18].

Таблица 4

Ассоциации бронхиальной астмы с изучаемыми генетическими вариантами

Ген/ полиморфизм	Сравнение генотип/аллель	OR (95 % CI)	Клинические ассоциации
Ген <i>HNIP</i> rs12504628 (Т > С)	С vs Т	0,309 (0,109–0,880)	Снижение риска реализации тяжелой БА для носителей аллеля Т
	ТТ vs СС+ТС	2,875 (1,130–7,316)	Увеличение риска сочетания БА и атопического дерматита для носителей генотипа ТТ
	С vs Т	0,416 (0,190–0,909)	Снижение риска реализации лекарственной аллергии на фоне БА для носителей аллеля Т
Ген <i>ADRB2</i> rs1042713 (G > A)	АА vs GА+GG	0,182 (0,051–0,646)	Снижение риска реализации ВПР бронхиального дерева на фоне БА для носителей генотипа АА
	АА vs GА+GG	0,112 (0,013–0,932)	Снижение частоты отягощенного аллергоанамнеза на фоне БА для носителей генотипа АА
	А vs G	0,453 (0,213–0,964)	Снижение частоты отягощенного аллергоанамнеза на фоне БА для носителей аллеля А

Следует отметить, что дети с указанным генотипом AA гена *ADRB2* в нашей выборке не получали длительно действующие b_2 -агонисты в качестве монопрепаратов базисной терапии и не использовали монотерапию b_2 -агонистами короткого действия в качестве препаратов неотложной помощи за последние шесть месяцев. Следовательно, не представляется возможным оценить риск обострения заболевания у носителей генотипа Arg16, которые прибегают к использованию b_2 -агонистов.

В настоящее время установлено, что ген *HNIP* влияет на состояние как мелких, так и крупных дыхательных путей [19]. Наличие аллеля А полиморфизма rs13118928 гена *HNIP* может быть связано с фенотипом эмфизема-гиперинфляция у больных хронической обструктивной болезни легких [20]. Известно, что состояние функции внешнего дыхания – является важнейшим критерием тяжести бронхиальной астмы. Наличие генотипов CC+CT в 2,9 раза увеличивает риск реализации лекарственной аллергии на фоне БА.

С одной стороны, мы не выявили ассоциации генетических вариантов полиморфизма rs12551256 гена *IL-33* с особенностями клинического течения БА. При анализе генотипов полиморфизма rs146597587 (G > C) гена *IL-33* все дети были носителями генотипа одного генотипа. С другой стороны, было установлено, что замены нуклеотидов в экзонах 4 и 6 гена *IL-33* ассоциированы с тяжелым течением бронхиальной астмы. Это обосновывает целесообразность дальнейшего изучения полиморфизма экзонов гена *IL-33* и его ассоциаций с клиническим течением бронхиальной астмы у детей при увеличении объема выборки пациентов.

Ограничения исследования. Ассоциацию полиморфизмов генов *HNIP*, *ADRB2* и *IL-33* у детей невозможно экстраполиро-

вать на всю популяцию российских детей ввиду малочисленности исследуемой выборки. Возможно, при увеличении размера выборки распределения генотипов и аллелей указанных генов будут отличаться от приведенных в данной статье. Нами не проведен многофакторный анализ с поправкой на обнаруженные ассоциации генов с учетом носительства полиморфных вариантов других генов и факторов среды, что может повлиять на результаты оценки эффекта изучаемых генов.

Выводы

Проведенное исследование полиморфизмов генов *HNIP*, *ADRB2* и *IL-33* у детей, страдающих БА, с разными фенотипами заболевания выявило ассоциацию между полиморфизмами генов и тяжестью заболевания, а также с сопутствующими заболеваниями.

Показано, что генотип TT генетического варианта rs12504628 (T > C) гена *HNIP* снижает риск реализации тяжелой БА, однако увеличивает в 2,8 раза риск сочетанного с БА атопического дерматита. Генотип CC+CT гена *HNIP* в 2,9 раза увеличивает риск реализации лекарственной аллергии на фоне БА.

Генотип AA гена *ADRB2* ассоциирован с отсутствием отягощенного аллергоанамнеза среди родственников первой степени родства и снижением риска реализации врожденных пороков развития трахеобронхиального дерева на фоне БА. Замены нуклеотидов в экзонах 4 и 6 гена *IL-33* ассоциированы с тяжелым течением БА. Это дает основание полагать, что следует обращать внимание на экзоны 4 и 6 для прогнозирования течения заболевания и своевременной коррекции базисной терапии.

Таким образом, в данном исследовании установлены ассоциации полиморфных ва-

риантов генов *HHIP*, *ADRB2* и *IL-33* с клиническими проявлениями бронхиальной астмы у детей, которые могут учитываться при персонализированном наблюдении за этими пациентами и помочь в достижении полного контроля над заболеванием.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020; 396 (10258): 1204–1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9
2. Жмуров Д.В., Парфентева М.А., Семенова Ю.В. Бронхиальная астма. *Colloquium-journal* 2020; 14: 66–72. DOI: 10.24411/2520-6990-2020-11894 / *Zhmurov D.V., Parfenteva M.A., Semenova Ju.V.* Bronchial asthma. *Colloquium-journal* 2020; 14: 66–72. DOI: 10.24411/2520-6990-2020-11894 (in Russian).
3. Овсянников Д.Ю., Фурман Е.Г., Елисеева Т.И. Бронхиальная астма у детей. М.: Российский университет дружбы народов (РУДН) 2019; 211–217. / *Ovsjannikov D.Ju., Furman E.G., Eliseeva T.I.* Bronchial asthma in children. Moscow: RUDN University 2019; 211–217 (in Russian).
4. Bateman E.D., Hurd S.S., Barnes P.J., Bousquet J., Drazen J.M., FitzGerald J.M., Gibson P., Obata K., O'Byrne P., Pedersen S.E., Pizzichini E., Sullivan S.D., Wenzel S.E., Zar H.J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal* 2008; 31 (1): 143–178. DOI: 10.1183/09031936.00138707.
5. Allegra L., Cremonesi G., Girbino G., Ingrassia E., Marsico S., Nicolini G., Terzano C. Real-life prospective study on asthma control in Italy: cross-sectional phase results. *Respiratory Medicine* 2012; 106 (2): 205–214. DOI: 10.1016/j.rmed.2011.10.001
6. Черкашина И., Никулина С., Логвиненко Н., Максимов В., Либердовская Е. Клинико-генетический анализ больных бронхиальной астмой. *Пульмонология* 2009; 2: 77–81. DOI: 10.18093/0869-0189-2009-2-77-81. / *Cherkashina I., Nikulina S., Logvinenko N., Maksimov V., Liberdovskaja E.* Clinical and genetic analysis of patients with bronchial asthma. *Pulmonology* 2009; 2: 77–81. DOI: 10.18093/0869-0189-2009-2-77-81 (in Russian).
7. Пономарёва М.С., Фурман Е.Г., Хузина Е.А., Ярулина А.М. Семейный полиморфизм гена *ADRB2* при бронхиальной астме в детском возрасте. *Пермский медицинский журнал* 2015; 32 (5): 30–36. DOI: 10.17816/pmj32530-36 / *Ponomarjova M.S., Furman E.G., Huzina E.A., Jarulina A.M.* Family polymorphism of the *ADRB2* gene in bronchial asthma in childhood. *Perm Medical Journal* 2015; 32 (5): 30–36. DOI: 10.17816/pmj32530-36 (in Russian).
8. Черкашина И.И., Разводовская А.В., Никулина С.Ю., Шестовицкий В.А., Воевода М.И., Максимов В.Н., Аверьянов А.Б., Чернова А.А. Полиморфизмы некоторых генов у больных бронхиальной астмой жителей Красноярск. *Пульмонология* 2016; 26 (3): 293–302. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-3-293-302 / *Cherkashina I.I., Razvodovskaya A.V., Nikulina S.Yu., Sbestovitskiy V.A., Voevoda M.I., Maksimov V.N., Aver'yanov A.B., Chernova A.A.* Genetic polymorphisms in asthmatic patients living at Krasnoyarsk. *Pulmonologiya* 2016; 26 (3): 293–302. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-3-293-302 (in Russian).
9. Li X., Howard T.D., Moore W.C., Ampleford E.J., Li H., Busse W.W., Calhoun W.J., Castro M., Chung K.F., Erzurum S.C., Fitzpatrick A.M., Gaston B., Israel E., Jarjour N.N., Teague W.G., Wenzel S.E., Peters S.P., Hawkins G.A., Bleeker E.R., Meyers D.A. Importance of hedgehog interacting protein and other lung function genes in asthma. *The*

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2011; 127 (6): 1457–65.

10. Korppi M., Teräsjarvi J., Laubkonen E., Huhtala H., Nuolivilta K., He Q. IL-33 rs1342326 gene variation is associated with allergic rhinitis at school age after infant bronchiolitis. *Acta Paediatrica* 2020; 109 (10): 2112–2116. DOI: 10.1111/apa.15175. PMID: 31955459.

11. Wang Y., Wang L., Hua S. Interleukin-33 in children with asthma: A systematic review and meta-analysis. *Allergologia et Immunopathologia* 2017; 45 (4): 387–392. DOI: 10.1016/j.aller.2016.12.007

12. Saikumar Jayalatha A.K., Hesse L., Ketelaar M.E., Koppelman G.H., Nawijn M.C. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. *Pharmacology & Therapeutics* 2021; 225 (9): 107847. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107847

13. Теленнёва П.С., Евсеева Г.П., Наговицына Е.Б., Супрун С.В., Лебедько О.А. Полиморфизм гена ADRB2 у детей с бронхиальной астмой и ожирением. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания* 2020; 77 / *Telepnjova R.S., Evseeva G.P., Nagovicyna E.B., Suprun S.V., Lebed'ko O.A.* ADRB2 gene polymorphism in children with bronchial asthma and obesity. *Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration* 2020; 77 (in Russian).

14. Cayrol C., Girard J.P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunological Reviews* 2018; 281 (1): 154–168. DOI: 10.1111/imr.12619

15. Charrad R., Kaabachi W., Berraies A., Hamzaoui K., Hamzaoui A. IL-33 gene variants and protein expression in pediatric Tunisian asthmatic patients. *Cytokine* 2018; 104: 85–91.

16. Ketelaar M.E., Portelli M.A., Dijk F.N., Shrine N., Faiz A., Vermeulen C.J., Xu C.J., Hankinson J., Bhaker S., Henry A.P., Billington C.K., Shaw D.E., Johnson S.R., Benest A.V., Pang V., Bates D.O., Pogson Z.E.K., Fogarty A., McKeever T.M., Singapuri A., Heaney L.G., Mansur A.H., Chaudhuri R., Thomson N.C., Holloway J.W.,

Lockett G.A., Howarth P.H., Niven R., Simpson A., Tobin M.D., Hall I.P., Wain L.V., Blakey J.D., Brightling C.E., Obeidat M., Sin D.D., Nickle D.C., Bossé Y., Vonk J.M., van den Berge M., Koppelman G.H., Sayers I., Nawijn M.C. Phenotypic and functional translation of IL33 genetics in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021; 147 (1): 144–157.

17. Smith D., Helgason H., Sulem P., Bjornsdottir U.S., Lim A.C., Sveinbjornsson G., Hasegawa H., Brown M., Ketchem R.R., Gavala M., Garrett L., Jonasdottir A., Jonasdottir A., Sigurdsson A., Magnusson O.T., Eyjolfsson G.I., Olafsson I., Omundarson P.T., Sigurdardottir O., Gislason D., Gislason T., Ludviksson B.R., Ludviksdottir D., Boezen H.M., Heinzmann A., Krueger M., Porsbjerg C., Abulvalia T.S., Waage J., Backer V., Deichmann K.A., Koppelman G.H., Bonnelykke K., Bisgaard H., Masson G., Thorsteinsdottir U., Gudbjartsson D.F., Johnston J.A., Jonsdottir I., Stefansson K. A rare IL33 loss-of-function mutation reduces blood eosinophil counts and protects from asthma. *PLOS Genetics* 2017; 13 (3): e1006659

18. Contopoulos-Ioannidis D.G., Manoli E.N., Ioannidis J.P.A. Meta-analysis of the association of β 2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115 (5): 963–972.

19. Van der Plaats D.A., de Jong K., Labrousse L., Faiz A., Vonk J.M., van Diemen C.C., Nedeljkovic I., Amin N., Obeidat M., van Duijn C.M., Boezen H.M., Postma D.S. The Well-Known Gene HHIP and Novel Gene MECR Are Implicated in Small Airway Obstruction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2016; 194 (10): 1299–1302.

20. Bártholo T.P., Porto L.C., Pozzan R., Nascimento A., Da Costa C.H. Evaluation Of HHIP Polymorphisms And Their Relationship With Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2019; 3 (14): 2267–2272.

Финансирование. Исследование было поддержано совместным грантом Министерства науки и технологии Израиля (MOST, 3-16500), Российского центра научной информации (РЦНИ) – ранее РФФИ (совместный исследовательский проект 19-515-06001).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Вклад авторов равноценен.

Поступила: 30.12.2023

Одобрена: 11.01.2024

Принята к публикации: 15.01.2024

Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом: Ассоциация полиморфных вариантов генов HHIP, ADRB2 и IL-33 с клиническими проявлениями бронхиальной астмы у детей / Ю.С. Алиева, Е.Г. Фурман, Е.И. Кондратьева, Е.В. Лошкова, В.С. Шелудько, В.С. Соколовский, М.С. Пономарева, Е.А. Хузина, Р.Р. Айшауова // Пермский медицинский журнал. – 2024. – Т. 41, № 1. – С. 59–72. DOI: 10.17816/pmj41159-72

Please cite this article in English as: Alieva Yu.S., Furman E.G., Kondratyeva E.I., Loshkova E.V., Sheludko V.S., Sokolovsky V.S., Ponomareva M.S., Khuzina E.A., Aishauova R.R. Association of polymorphic variants of HHIP, ADRB2 and IL-33 genes with clinical manifestations of bronchial asthma in children. *Perm Medical Journal*, 2024, vol. 41, no. 1, pp. 59-72. DOI: 10.17816/pmj41159-72

Полный текст препринта на английском языке доступен на сайте medRxiv: <https://medrxiv.org/cgi/content/short/2023.12.14.23299853v1>.

The full text of the preprint in English is available at medRxiv website: <https://medrxiv.org/cgi/content/short/2023.12.14.23299853v1>.