

На правах рукописи

Котова Олеся Олеговна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ
ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

3.1.29. – пульмонология (медицинские науки)

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Благовещенск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания».

Научный руководитель: член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Перельман Юлий Михайлович.

Официальные оппоненты:

Гельцер Борис Израйлевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», Школа медицины, заместитель директора по научной работе;

Лучникова Татьяна Андреевна, кандидат медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра госпитальной терапии с курсом фармакологии, доцент.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится **23 декабря 2021 г. в 12:00 ч.** на заседании объединённого диссертационного совета 99.0.062.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 675006, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, д. 95.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», <https://cfpd.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Приходько Анна Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Бронхиальная астма (БА) представляет собой широко распространённое хроническое респираторное заболевание, поражающее людей всех возрастов (S.S. Braman, 2017; G. Ferrante et al., 2018). Данная патология приводит не только к ухудшению качества жизни больных, но и к их преждевременной смерти (GBD 2019 diseases and injuries collaborators, 2020). Несмотря на успехи в усовершенствовании диагностических и лечебных мероприятий, БА сопровождается существенным социальным и экономическим ущербом (J.R. Castillo et al., 2017; D. de Benedictis et al., 2017; GBD 2019 diseases and injuries collaborators, 2020).

БА рассматривается как результат сложных взаимодействий этиопатогенетических механизмов, в основе которых лежат как триггеры окружающей среды, так и внутренние факторы самого организма (К. Vønnelykke et al., 2016; I.V. Yang et al., 2017; A. Papi et al., 2018). В последние годы большой интерес представляет изучение осмотической гиперреактивности дыхательных путей (ГРДП), как одного из ярких фенотипов заболевания. Данное явление достаточно широко распространено среди пациентов с БА (А.Г. Приходько, 2006; Ю.М. Перельман и др., 2016; Е.Ю. Афанасьева и др., 2020; A. Côté et al., 2018). Предполагается, что возможную роль в возникновении осмотической ГРДП могут играть каналы с транзиторным рецепторным потенциалом ваниллоидного подсемейства TRPV, являющиеся рецепторами осмотического давления и экспрессирующиеся в различных клетках респираторного тракта. В данном аспекте наибольший интерес представляют TRPV1, TRPV2 и TRPV4.

Исследования последних лет демонстрируют вовлечённость данных каналов при их активации в сигнальные пути, опосредующие воспаление, гиперсекрецию, ремоделирование и ГРДП. Кроме того, некоторые генетические особенности *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4*, такие как однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) и экспрессия, могут обуславливать патологические изменения работы самих рецепторов, приводя к нарушению со стороны отдельных клеток и, соответственно, респираторной системы в целом при БА (G. Cantero-Recasens et al., 2010; C.L. Chen et al., 2015; D.L. Wiesner et al., 2020).

Таким образом, актуальным и перспективным является изучение влияния генетических детерминант *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4* на формирование осмотической ГРДП и соответствующих клинико-функциональных особенностей БА, что расширяет возможность прогнозирования неконтролируемого течения заболева-

ния и совершенствования персонифицированной вторичной профилактики БА с учётом смены сезонов с различной влажностью атмосферного воздуха.

Степень разработанности темы исследования

В ходе подготовки темы диссертационного исследования проработано более 200 источников отечественной и зарубежной литературы. На основании уже имеющихся в мировой науке данных сформировано представление о месте осмотической ГРДП в фенотипе БА. В рамках темы диссертационного исследования изучены работы по экспериментам с TRP, а также возможному влиянию генетических ОНП данных рецепторов на развитие ГРДП и бронхообструктивных заболеваний. На сегодняшний день другие исследования о комплексном вкладе TRPV рецепторов в формирование осмотической ГРДП отсутствуют.

Цель исследования – изучить влияние ОНП генов *TRPV* рецепторов на осмотическую ГРДП у больных БА, а также разработать способы прогнозирования клинического течения БА и формирования ГРДП в ответ на воздействие осмотических стимулов с учётом найденных генетических предикторов.

Задачи исследования

1. Установить взаимосвязь ОНП генов *TRPV1* (rs222747, rs224534, rs8065080), *TRPV2* (rs3813769, rs1129235, rs7217735) и *TRPV4* (rs6606743, rs7971845) с формированием ГРДП на гипо- и гиперосмотические стимулы.

2. Оценить влияние ОНП генов *TRPV1* (rs222747, rs224534, rs8065080), *TRPV2* (rs3813769, rs1129235, rs7217735) и *TRPV4* (rs6606743, rs7971845) на клиничко-функциональные особенности течения БА.

3. Исследовать уровни экспрессии *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4* в клетках респираторного эпителия у больных БА с осмотической ГРДП.

4. Разработать способы прогнозирования формирования осмотической ГРДП, а также степени контроля БА с использованием генетических и клиничко-функциональных предикторов.

Научная новизна

Впервые описаны особенности клиничко-функциональных проявлений и течения БА у лиц с генетически детерминированной осмотической ГРДП. Пациенты с бронхоспазмом в ответ на воздействие гипо- и гиперосмотических аэрозольных стимулов имеют более тяжёлое течение заболевания и демонстрируют тенденцию к более частой потере контроля над БА.

Впервые получены комплексные данные о влиянии ОНП генов *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4* на формирование осмотической ГРДП. Обнаружено, что СС

генотип rs1129235 *TRPV2* повышает шанс развития ГРДП на гипоосмотический стимул в 3,54 раза ($p=0,002$). В то же время генотип GG по ОНП rs3813769 и наличие аллеля G по ОНП rs7217735 гена *TRPV2* в гомо- или гетерозиготном состоянии обладают протективным действием в отношении формирования гипоосмотической ГРДП ($p=0,001$ и $p=0,013$, соответственно). Установлено, что носительство AA генотипа rs6606743 гена *TRPV4* снижает вероятность возникновения ГРДП в ответ на вдыхание влажного воздуха (ОШ 0,43 95%ДИ (0,19; 0,94), $p=0,027$). Впервые продемонстрирована роль ОНП rs7217735 гена *TRPV2* в снижении контроля над БА. Пациенты с AA генотипом по данному ОНП обладают в 2,46 раза более высоким риском потери контроля над БА, чем лица с GG и AG генотипами.

Получены новые данные о взаимосвязи уровней экспрессии *TRPV* в клетках респираторного эпителия с реакцией бронхов на гипо- и гиперосмотические стимулы. Повышение уровня экспрессии *TRPV1* и *TRPV2* в бронхиальном эпителии у больных БА связано с развитием ГРДП на гипо- и гиперосмотические стимулы.

Впервые разработан способ прогнозирования потери контроля БА при воздействии на дыхательные пути влажного атмосферного воздуха на основании комплексного подхода с учётом клинко-функциональных (тяжесть БА, выраженность гипоосмотической ГРДП) и генетических параметров (ОНП rs7217735 *TRPV2*). Разработаны математические модели прогнозирования риска возникновения осмотической ГРДП у больных БА в ответ на воздействие повышенного уровня относительной влажности вдыхаемого воздуха с учётом генетических (rs1129235 или rs7217735 гена *TRPV2*) и клинко-функциональных параметров (тяжесть БА, степень бронходилатационного эффекта после ингаляции салбутамола, индекс курения).

Теоретическая и практическая значимость работы

Определена роль ОНП генов *TRPV* рецепторов в рамках проявления ГРДП на различные осмотические стимулы у больных БА. Установлено, что у лиц с бронхоконстрикторной реакцией на гипо- и гиперосмотические аэрозоли более высокая экспрессии *TRPV1* и *TRPV2* на уровне матричной РНК (м-РНК) в бронхиальном эпителии по сравнению с пациентами без ГРДП. На основании полученных результатов можно рассматривать рецепторы *TRPV* в качестве мишеней для разработки таргетной терапии пациентов с БА, имеющих гиперчувствительность бронхов к повышенной влажности вдыхаемого воздуха.

Разработан способ прогнозирования гипоосмотической ГРДП с учётом функциональных и молекулярно-генетических предикторов у больных БА, а также способ прогнозирования потери контроля над БА у пациентов с генетически детерминированной гипоосмотической ГРДП, которые обеспечивают возможность в реальной клинической практике проводить коррекцию базисной терапии у таких пациентов в сезоны с повышенной влажностью воздуха.

Методология и методы диссертационного исследования

Работа выполнена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2013 г. и «Правилами надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом №200н от 01.04.2016 МЗ РФ. Предметом исследования явилось изучение осмотической ГРДП у больных БА и вклада в её формирование генетических особенностей некоторых TRPV каналов. Объектом исследования послужили 300 больных БА лёгкой и средней степени тяжести. Использованы методы общеклинические, функциональные, инструментальные, генетические и статистического анализа. Все пациенты давали письменное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом №114-Д/1 от 22.11.2016, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике ДНЦ ФПД. Работа выполнена в рамках Государственного задания для ДНЦ ФПД по теме «Молекулярные механизмы патологических реакций респираторного тракта на климатические факторы у больных хроническими воспалительными заболеваниями органов дыхания» (№ гос. регистрации: АААА-А19-119012290114-5), гранта РФФИ №14-25-00019 (№ гос. регистрации: АААА-А16-116062710039-8).

Основные положения, выносимые на защиту

1. В основе осмотической ГРДП лежат генетические детерминанты. ОНП rs1129235, rs3813769, rs7217735 гена *TRPV2* и rs6606743 гена *TRPV4* непосредственно ассоциированы с ГРДП на гипоосмотический стимул.
2. Генетически детерминированная осмотическая ГРДП оказывает влияние на контроль БА и особенности её клинико-функциональных проявлений.
3. Измененный уровень экспрессии генов *TRPV1* и *TRPV2* в бронхиальном эпителии способен провоцировать возникновение ГРДП на гипо- и гиперосмотические стимулы.
4. Развитие гипоосмотической ГРДП у больных БА возможно прогнозировать с использованием разработанной математической модели, включающей

в себя клинико-функциональные (тяжесть БА, изменение $ОФВ_1$ после ингаляции сальбутамола в %) и генетические (ОНП rs1129235 гена *TRPV2*) параметры.

5. Предикторами потери контроля БА при воздействии на дыхательные пути атмосферного воздуха повышенной влажности могут служить тяжесть БА, степень гипоосмотической ГРДП, выраженная в снижении $ОФВ_1$ в ответ на бронхопровокационную пробу с ИДВ, а также наличие генотипа АА по ОНП rs7217735 *TRPV2*. Развитие неконтролируемого течения БА можно прогнозировать, используя способ, разработанный на основании комплексного подхода с учётом данных клинико-функциональных и генетических параметров.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Достоверность результатов научной работы подтверждается достаточным количеством наблюдений в сравниваемых группах, а также применяемыми современными методами и подходами для расчета данных. Для статистической обработки использовались прикладные программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2011), REST 2009 V2.0.13 (Qiagen GmbH, 2009), а также web-программы RefFinder и SNPStats (Institut Català d'Oncologia, 2018). Анализ данных производился с проверкой нормальности распределения значений переменных и, в соответствии с этим, применялись параметрические и непараметрические методы вариационной статистики. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Материалы диссертационного исследования доложены на VII Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока с международным участием (Благовещенск, 2017), научной конференции «Молодые учёные – науке» (Благовещенск, 2017), XV Международной научной конференции "Системный анализ в медицине" (Благовещенск, 2021), Международном конгрессе Европейского респираторного общества (Милан, 2017), Международной конференции Американского торакального общества (Вашингтон, 2017; Сан-Диего, 2021).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, 4 из них – в зарубежных журналах 1 квартиля, индексированных в реферативной базе Web of Science, 3 – в отечественных, из списка ведущих рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание учёных степеней.

Личный вклад автора

Автор диссертационной работы самостоятельно провела поиск и анализ литературных данных по теме, сформулировала цели и задачи научной работы,

участвовала в отборе и обследовании пациентов для включения в исследование, сборе и обработке материала больных для генетических исследований. Соискатель единолично проводила генотипирование и анализ экспрессии, освоила и лично использовала методики по проведению бронхопровокационных проб, а также составила базу данных и выполнила статистические расчеты, результаты которых отражены в выводах и оформлены в виде публикаций и докладов.

Объём и структура диссертации

Диссертация представлена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования и три главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст диссертации содержит 23 таблицы и 39 рисунков, 5 формул. Список использованной литературы включает 235 источников литературы отечественных и зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Набор и обследование пациентов проводились в клинике Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (ДНЦ ФПД) в период с 2016 по 2020 год. Критерии включения: наличие подтвержденного диагноза БА легкой или средней степени тяжести, выставленного на основании Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) согласно критериям GINA (2020) и Федеральных клинических рекомендаций по бронхиальной астме 2019 г.; возраст от 18 до 70 лет, независимо от пола; наличие подписанного информированного согласия. Критерии исключения: возраст менее 18 и более 70 лет; тяжёлая БА; обострение БА; значение ОФВ₁ менее 60% от должного; наличие острого или обострение хронического заболевания; наличие сопутствующей декомпенсированной соматической патологии; наличие новообразований; беременность и период лактации; отказ от участия в исследовании.

Обследование больных БА включало общеклинические, функциональные, инструментальные и генетические методы. Уровень контроля над БА определяли путём подсчёта баллов АСТ (Asthma Control Test, Quality Metric Inc., 2002). Исследование вентиляционной функции лёгких (ВФЛ) проводили методом спирометрии на аппарате «Easy on-PC» (ndd Medizintechnik AG, Швейцария). Для установления обратимости бронхиальной обструкции выполняли бронхо-

дилатационную пробу с ингаляцией 200 мкг короткодействующего β_2 -агониста (КДБА) сальбутамола. С целью выявления гипоосмотической ГРДП использовали бронхопровокационную пробу с ингаляцией дистиллированной воды (ИДВ), для определения гиперосмотической ГРДП – пробу с ингаляцией гипертонического (4,5%) раствора NaCl (ИГР) и дозированной физической нагрузкой (ДФН). Для генерации аэрозолей использовали ультразвуковые ингаляторы «Thomex L-2» (Польша). ДФН выполнялась с использованием тредмила (LE 200С, Германия). Бронхопровокационные пробы считали положительными при снижении $ОФВ_1$ на 10% и более по сравнению с исходным уровнем.

У всех пациентов производили забор периферической венозной крови для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из лейкоцитов и последующего генетического анализа. Определение генотипов для семи ОНП (кроме rs7217735) проводили методом полимеразной цепной реакции с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Генотипирование ОНП rs7217735 гена *TRPV2* осуществляли методом асимметричной ПЦР с анализом плавления немеченого олигонуклеотидного зонда.

В качестве материала для анализа экспрессии *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4* использовали клетки из полости носа и бронхов, полученные методом браш-биопсии перед проведением бронхопровокационных проб. Оценку экспрессии производили с помощью ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen (Синтол, Россия). Анализ уровней экспрессии генов проводили в программном обеспечении REST 2009 V2.0.13, (Qiagen GmbH, 2009).

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2011). Использовали параметрические (для величин с нормальным распределением) и непараметрические (для величин с распределением, отличным от нормального) методы статистики. В качестве достоверного критерия значимости считали значение $p < 0,05$.

В исследовании приняло участие 300 человек европеоидной расы в возрасте от 18 до 64 лет с подтвержденным диагнозом БА. Средний возраст обследованного контингента составил $37,0 \pm 0,63$ лет. Из них 116 человек (38,7%) – мужчины и 184 (61,3%) – женщины. Среди пациентов превалировала смешанная форма (J45.8) БА (209 человек – 69,7%), в то время как БА с преобладанием аллергического компонента (J45.0) и неаллергическая БА (J45.1) встречались у 73 (24,3%) и 18 (6,0%) больных, соответственно. У большинства обследованных установлено среднетяжёлое течение БА (191 человек – 63,6%) и в 109 слу-

чаях – лёгкое течение (36,5%). Подавляющее большинство пациентов имели неконтролируемое (54,7%) или частично контролируемое (34,5%) заболевание.

Основными препаратами для базисного лечения выступали ингаляционные глюкокортикостероиды в низких или средних дозах в комбинации с КДБА (беклометазон/сальбутамол) либо с ДДБА (будесонид/формотерол; беклометазон дипропионат/формотерол; салметерол/флутиказон). Приверженность терапии наблюдалась у 62% обследованных.

По результатам бронхопровокационных проб пациенты были поделены на соответствующие группы: в I группу включены пациенты, которым выполнена проба с ИДВ, во II группу – с ИГР и в III – с ДФН. В каждой группе выделены по две подгруппы – лица с положительным (а) и отрицательным (b) ответом на бронхопровокационную пробу (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение больных в группах исследования

Исследуемая группа	Общее количество обследованных, n	а – с положительной пробой, n (%)	б – с отрицательной пробой, n (%)
I группа (ИДВ)	298	100 (33,6)	198 (66,4)
II группа (ИГР)	141	42 (29,8)	99 (70,2)
III группа (ДФН)	112	22 (19,6)	90 (80,4)

Примечание: n – количество пациентов, % – процентное отношение количества пациентов к общему числу обследованных в группе.

Среди обследованных курильщики составили около 26% со средним стажем курения $3,97 \pm 0,64$ пачка/лет. Из них 50% — это пациенты, бросившие курить. При ассоциативном анализе не выявлено прямых взаимосвязей ГРДП со статусом курения. Однако, установлено, что, чем выше значение индекса курения (ИК), тем тяжелее протекает БА ($p=0,004$) и ниже уровень контроля над заболеванием ($p=0,057$).

Результаты собственных исследований

1 Общая характеристика исследованных полиморфизмов

В ходе исследования были проанализированы 8 ОНП генов *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4*, которые, как предполагается, могут играть роль в формировании осмотической ГРДП человека в условиях уже имеющейся респираторной патологии. Оценка встречаемости аллельных вариаций данных генов произведена среди больных БА с различным ответом бронхов на ингаляционное осмотическое воздействие, а также некоторыми клинико-функциональными параметра-

ми пациентов. Определены генотипы ОНП *TRPV1* и *TRPV2* у 168 человек, *TRPV4* – у 186. Частоты генотипов всех исследованных ОНП находились в равновесии Харди-Вайнберга и не отличались от ожидаемых ($p > 0,05$). При статистическом анализе взаимосвязей исследуемых ОНП с формированием гипоосмотической ГРДП были обнаружены значимые результаты для генов *TRPV2* и *TRPV4*. Один из ОНП-кандидатов *TRPV1* продемонстрировал возможную роль в развитии бронхоспазма в ответ на физическую нагрузку.

2 Взаимосвязь полиморфизмов *TRPV* с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмотический стимул

Результаты статистических расчетов демонстрируют патогенное влияние аллеля С синонимичного ОНП rs1129235 *TRPV2* в кодоминантной ($p=0,009$), рецессивной (ОШ 3,54 95%ДИ (1,55; 8,07), $p=0,002$) и Log-аддитивной (ОШ 2,00 95%ДИ (1,20; 3,32), $p=0,006$) моделях наследования (рисунок 1). Ассоциация оказалась значимой независимо от пола и возраста (скорректированное p для рецессивной модели составило 0,002). Аналогичным образом у пациентов с СС генотипом наблюдалось более выраженное падение $ОФВ_1$ в отличие от носителей АА и АС генотипов, средние значения $\Delta ОФВ_1$ -10,0 (-19,0; -1,5)%, -3,8 (-7,7; -1,0)% и -4,5 (-10,0; 0,01)%, $p=0,018$ и $p=0,019$, соответственно. При среднетяжёлой БА в сочетании с носительством генотипа СС взаимосвязь оказалась более выражена, при этом шанс развития гипоосмотической ГРДП увеличился почти вдвое и составил 7,50 95%ДИ (2,17; 25,91), $p=0,002$.

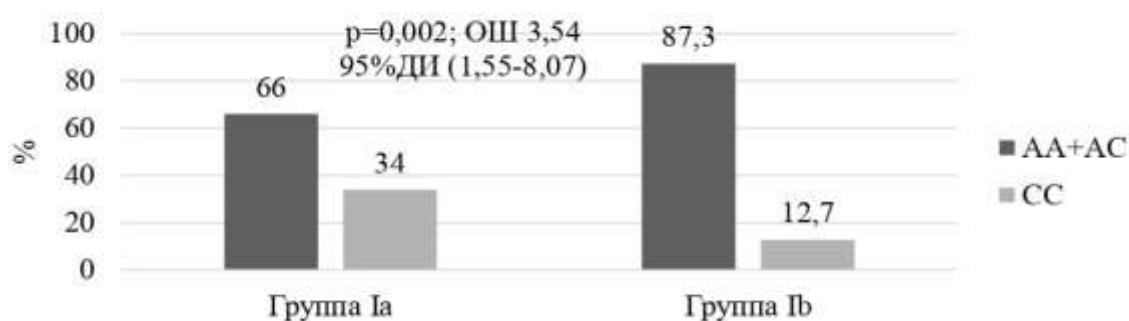


Рисунок 1 – Распределение генотипов ОНП rs1129235 *TRPV2* среди обследованных пациентов в зависимости от наличия или отсутствия гипоосмотической ГРДП в рецессивной модели наследования.

Для ОНП rs3813769 гена *TRPV2*, расположенного в 5'-нетранслируемом регионе, обнаружено, что мутантный аллель G в гомозиготном состоянии, напротив, оказывает протективное влияние в отношении проявления ГРДП. Ассоциация подтвердилась в кодоминантной ($p=0,001$), рецессивной ($p < 0,001$) и

Log-аддитивной (ОШ 0,47 95%ДИ (0,26; 0,84), $p=0,007$) моделях наследования (рисунок 2).

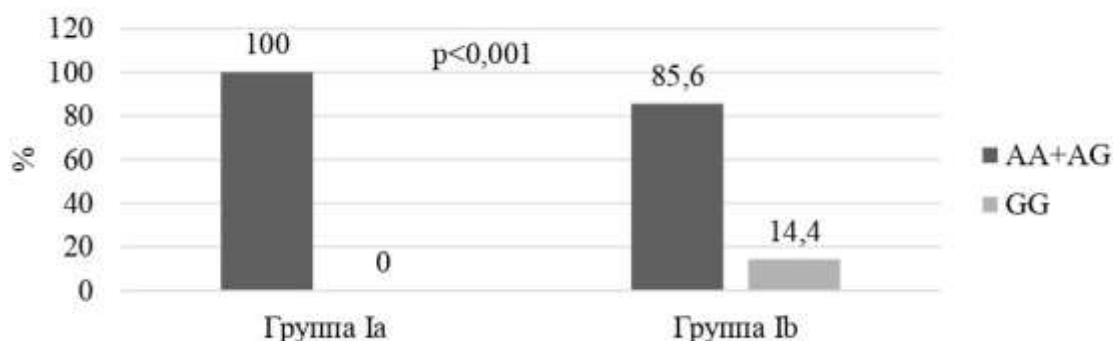


Рисунок 2 – Распределение генотипов ОНП rs3813769 *TRPV2* среди обследованных лиц в зависимости от наличия или отсутствия гипоосмотической ГРДП в рецессивной модели наследования.

Пациенты с GG генотипом rs3813769 имели менее выраженное снижение ОФВ_1 в ответ на ИДВ по сравнению с носителями AA и AG генотипов (-2,4 (-4,6; 1,8)% против -6,1 (-11,8; -1,2)% и -4,9 (-11,3; -0,2), $p=0,01$ и $p=0,06$, соответственно). Аналогичная ситуация наблюдалась и для ОНП rs7217735 *TRPV2*. Для него характерна была также протективная роль аллеля G в формировании осмотической ГРДП в ответ на бронхопровокационную пробу с ИДВ. Значимость ассоциации подтверждена в кодоминантной ($p=0,013$), доминантной (ОШ 0,45 95%ДИ (0,22; 0,95), $p=0,032$) и Log-аддитивной ($p=0,01$) моделях наследования (рисунок 3). Ассоциация сохранила свою значимость после корректировки по полу и возрасту ($p=0,028$). Среднее значение $\Delta\text{ОФВ}_1$ после пробы среди пациентов, носителей частого генотипа AA, составляло -6,2 (-11,7; -1,0)%, а среди пациентов AG и GG генотипов -3,8 (-7,1; 0,01)% ($p=0,065$).

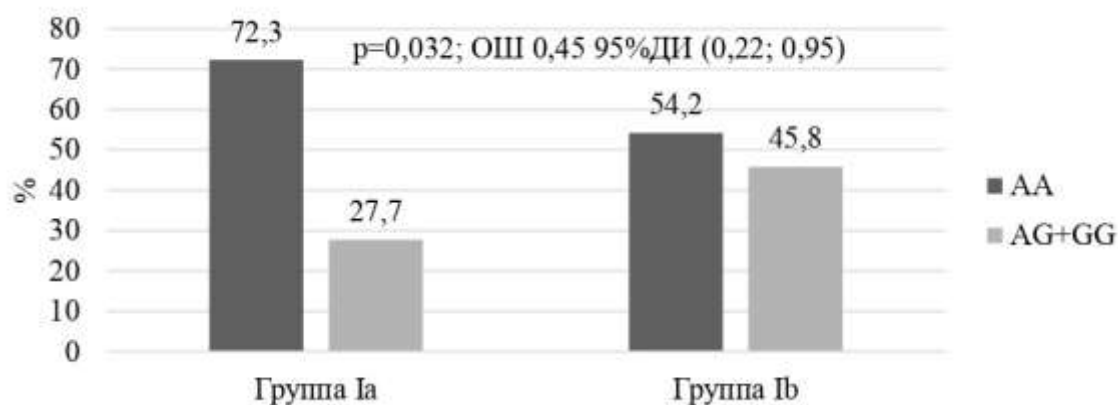


Рисунок 3 – Распределение генотипов ОНП rs7217735 *TRPV2* среди обследованных лиц в зависимости от наличия или отсутствия гипоосмотической ГРДП в доминантной модели наследования.

Дополнительно выявлена взаимосвязь ОНП rs7217735 с контролем течения БА. У пациентов, носителей гомозиготного генотипа AA отмечалась тенденция к ухудшению контроля, по сравнению с носителями AG+GG. Среднее значение АСТ у носителей AA генотипа 17 (13,5; 21,0) баллов, а у лиц с аллелем G в генотипе – 20 (13,0; 23,0) баллов ($p=0,18$). Шанс ухудшения контроля над БА в 2,46 (1,27; 4,75) раза выше у больных-гомозигот AA ($p=0,007$).

ОНП rs6606743 из 5'-фланкирующего региона *TRPV4* оказался ассоциирован с гипоосмотической ГРДП. Наличие мутантного генотипа AA может являться фактором защиты в отношении возникновения ГРДП на гипоосмотический стимул. Эффект AA подтвержден в рецессивной (ОШ 0,43 95%ДИ (0,19; 0,94), $p=0,027$) и Log-аддитивной (ОШ 0,62 95%ДИ (0,40-0,96), $p=0,03$) моделях (рисунок 4), в кодоминантной модели ассоциация была незначимой ($p=0,053$). Скорректированная по полу и возрасту значимость в рецессивной модели составила $p=0,034$. Кроме этого, у пациентов с генотипами GG и AG отмечалось более выраженное снижение всех показателей ВФЛ в ответ на пробу с ИДВ по сравнению с гомозиготами AA.

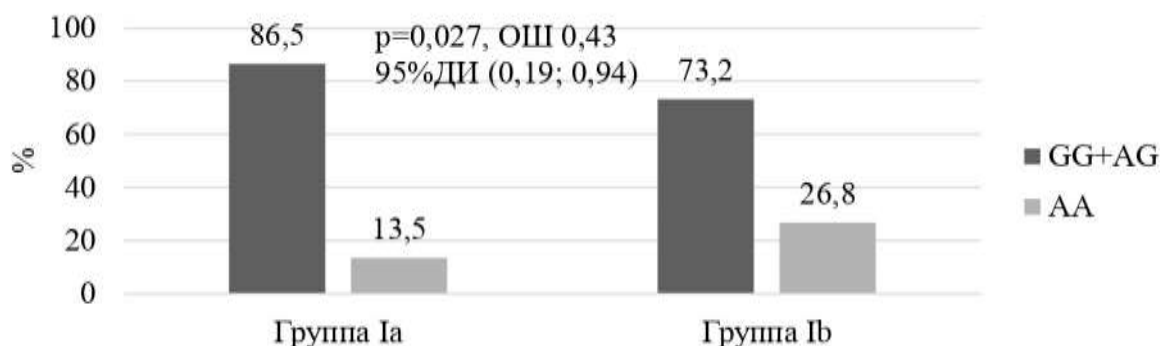


Рисунок 4 – Распределение генотипов ОНП rs6606743 *TRPV4* среди обследованных лиц группы I в рецессивной модели наследования.

В ходе ассоциативного анализа взаимосвязи ОНП гена *TRPV1* с гипоосмотической ГРДП ни один из трёх ОНП-кандидатов не продемонстрировал статистически значимых эффектов в рамках обследованной выборки пациентов. Вероятнее всего, это связано с функциональной особенностью самих рецепторов *TRPV1* и их ролью в восприятии гиперосмотических, но не гипоосмотических стимулов.

Дополнительно для ОНП из 5'-фланкирующей областей (rs7217735 и rs6606743) и 5'-нетранслируемого региона (rs3813769) генов *TRPV4* и *TRPV2* произведена оценка предполагаемой функции в программе RegulomeDB. Для

всех трёх ОНП удалось установить классификацию Rank – 1f (Score для rs7217735 - 0.22271; для rs6606743 - 0.55436; для rs3813769 – 0.55436). Это свидетельствует о том, что данные ОНП являются сайтами связывания транскрипционных факторов и вовлечены в процессы регуляции экспрессии соответствующих генов. Это объясняет их роль в функционировании TRPV2 и TRPV4 и развитии соответствующих нарушений на молекулярно-генетическом уровне, что в конечном итоге приводит к появлению клинических симптомокомплексов.

3 Взаимосвязь полиморфизмов TRPV с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмотические стимулы

При статистическом анализе результатов не удалось установить взаимосвязь ГРДП в ответ на бронхопровокационную пробу с ИГР ни с одним из ОНП исследуемых генов *TRPV*. Наибольший интерес представляли ОНП гена *TRPV1*, кодирующего одноименный рецептор повышенного осмотического давления. Относительно пробы с ДФН, как бронхопровокационного фактора, выступающего в качестве другого гиперосмотического стимула, прослеживалась взаимосвязь миссенс ОНП rs222747 гена *TRPV1* в гомозиготном состоянии GG с постнагрузочным бронхоспазмом. В кодоминантной и рецессивной моделях наследования уровень значимости составил $p=0,07$ и $p=0,04$ (ОШ 4,07 95%ДИ (1,11; 14,88)), соответственно (рисунок 5). Ассоциация оказалась независимой от пола и возраста (скорректированное $p=0,04$).

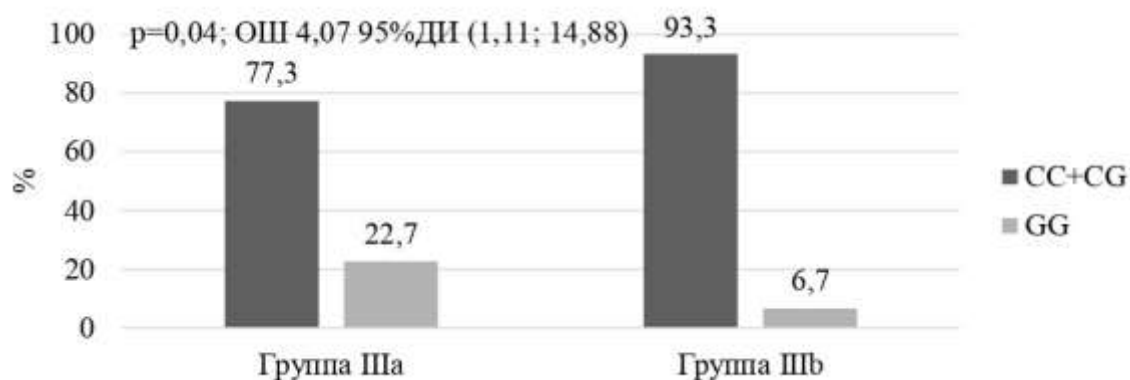


Рисунок 5 – Распределение генотипов ОНП rs222747 *TRPV1* среди обследованных лиц группы III в рецессивной модели наследования.

На основании полученных результатов удалось обнаружить вероятную ассоциацию миссенс ОНП rs222747 гена *TRPV1* с развитием ГРДП в ответ на ДФН. При этом GG увеличивает шанс возникновения ГРДП при физической нагрузке в 4,07 раза (95%ДИ (1,11; 14,88), $p=0,04$).

4 Клинико-функциональные особенности бронхиальной астмы у больных с генетически детерминированной ГРДП

В каждой из исследуемых выборок в группах с осмотической ГРДП независимо от стимула преобладали лица, имевшие среднюю степень тяжести БА по сравнению с больными без ГРДП. Данная закономерность была статистически значимой в группах с пробами ИДВ и ИГР ($p < 0,001$). При сравнении средних величин АСТ между подгруппами среди пациентов II (ИГР) и III (ДФН) групп была обнаружена зависимость между ГРДП и количеством баллов ($p < 0,05$), свидетельствующая о том, что наличие гиперосмотической ГРДП является фактором, негативно влияющим на уровень контроля БА (таблица 2).

Таблица 2 – Средние значения АСТ в группах сравнения (Me (q1; q3))

Клиническая группа	Среднее значение АСТ, баллы	Значимость
Группа Ia	16,0 (12,5; 20,0)	$p > 0,05$
Группа Ib	18,0 (13,0; 21,0)	
Группа II a	17,0 (13,0; 20,0)	$p < 0,05$
Группа II b	20,0 (14,0; 23,0)	
Группа III a	15,5 (13,0; 20,0)	$p < 0,05$
Группа III b	19,0 (14,0; 23,0)	

Примечание: p – статистическая значимость различий показателей в сравниваемых подгруппах а и b в пределах одной группы.

Установлена зависимость уровня контроля БА от степени осмотической ГРДП. У пациентов с неконтролируемым течением БА (АСТ < 20, Δ ОФВ₁ -6,9 (-13,7; -1,95)%) наблюдалось более выраженное снижение ОФВ₁ после пробы с ИДВ, чем у пациентов с полным (Δ ОФВ₁ -2,9 (-6,9; 0,9)%) или частичным (Δ ОФВ₁ -4,6 (-11,0; 1,0)%) контролем заболевания ($p = 0,03$). Вместе с этим для групп I и III оказалась характерной прямая корреляционная зависимость между АСТ и амплитудой падения ОФВ₁ в ответ на бронхопровокационную пробу. Чем сильнее происходило снижение ОФВ₁ в ответ на пробы с ИДВ или ДФН, тем ниже уровень контроля БА: коэффициенты корреляции Спирмена $R = 0,17$ ($p = 0,008$) и $R = 0,2$ ($p = 0,04$), соответственно.

При сравнении выборок а и b в отношении основных параметров ВФЛ были обнаружены следующие особенности. В I группе среди пациентов с гипоосмотической ГРДП исходные показатели спирометрии форсированного выдоха были значительно ниже, чем у пациентов с отрицательной реакцией бронхов на провокационную пробу с ИДВ (таблица 4).

Таблица 4 – Исходные параметры ВФЛ у пациентов с наличием (подгруппа а) и отсутствием (подгруппа б) ГРДП на ИДВ (Me (q1; q3))

Показатель спирометрии	Группа I		Значимость
	Подгруппа а	Подгруппа б	
ФЖЕЛ, %	103,5 (93,0; 117,5)	105,0 (91,0; 118,0)	p>0,05
ОФВ ₁ , %	89,6 (75,8; 99,4)	97,0 (84,0; 112,0)	p<0,01
ИТ, %	85,8 (77,6; 93,1)	92,3 (86,5; 97,9)	p<0,001
ПОС, %	91,9 (74,1; 113,5)	98,0 (85,0; 115,0)	p<0,05
МОС ₅₀ , %	54,6 (40,6; 68,4)	67,7 (53,0; 93,8)	p<0,001
МОС ₇₅ , %	44,7 (31,9; 59,8)	56,8 (43,0; 78,0)	p<0,001
СОС ₂₅₋₇₅ , %	53,4 (38,8; 69,0)	65,5 (50,6; 89,5)	p<0,01

Примечание: здесь и далее % – процентное отношение к должной величине, p – статистическая значимость различий показателей в подгруппах а и б.

Данный факт согласуется с представленными результатами по отношению степени тяжести БА к факту наличия ГРДП. В группах II и III подобная тенденция также прослеживалась, но являлась статистически значимой лишь для отдельных показателей спирометрии (таблицы 5 и 6). Аналогичным образом данные результаты подтверждаются корреляционными взаимосвязями исходных показателей спирометрии с их изменением после пробы с ИДВ и ИГР (группа I и II).

Таблица 5 – Исходные параметры ВФЛ у пациентов с наличием (подгруппа а) и отсутствием (подгруппа б) ГРДП на ИГР (Me (q1; q3))

Показатель спирометрии	Группа II		Значимость
	Подгруппа а	Подгруппа б	
ФЖЕЛ, %	102,5 (91,7; 117,0)	105,0 (92,9; 118,0)	p>0,05
ОФВ ₁ , %	89,3 (74,5; 103,0)	97,0 (80,0; 111,0)	p>0,05
ИТ, %	89,9 (80,5; 96,0)	92,0 (85,0; 97,9)	p=0,05
ПОС, %	90,9 (83,0; 115,0)	98,1 (85,0; 115,0)	p>0,05
МОС ₅₀ , %	57,7 (46,0; 75,0)	67,0 (50,5; 95,0)	p>0,05
МОС ₇₅ , %	48,0 (34,0; 60,4)	54,7 (40,4; 76,0)	p>0,05
СОС ₂₅₋₇₅ , %	53,4 (39,2; 65,0)	66,1 (49,2; 89,0)	p<0,01

У пациентов с БА положительная проба с β_2 -агонистом чаще сочеталась с положительной пробой с ИДВ (p=0,04) и ДФН (p=0,02). Полученные данные подтверждаются для гипоосмотической пробы критерием Манна-Уитни (p=0,002) и корреляционной зависимостью между степенью тяжести осмотической ГРДП в ответ на ИДВ, выраженной в изменении уровня Δ ОФВ₁, и ответом дыхательных путей на бронхолитик (R=-0,24, p<0,001). Обратная корреляционная зависимость распространялась и на другие показатели ВФЛ (ФЖЕЛ, ИТ,

ПОС, МОС₅₀, МОС₇₅) и была также высоко значимой относительно всех параметров спирометрии (для ФЖЕЛ $p=0,02$, для остальных $p<0,001$). Для пробы с ДФН также была характерна обратная корреляционная зависимость $\Delta\text{ОФВ}_1$ от эффекта бронхолитического препарата ($R=-0,22$, $p=0,02$).

Таблица 6 – Исходные параметры ВФЛ у пациентов с наличием (подгруппа а) и отсутствием (подгруппа б) ГРДП на ДФН (Ме (q1; q3))

Показатель спирометрии	Группа III		Значимость
	Подгруппа а	Подгруппа б	
ФЖЕЛ, %	95,3 (89,0; 111,0)	105 (93,5; 117,0)	$p>0,05$
ОФВ ₁ , %	88,9 (80,0; 102,0)	94,5 (85,0; 106,0)	$p>0,05$
ИТ, %	91,0 (76,0; 100,0)	92,0 (84,0; 97,0)	$p>0,05$
ПОС, %	86,5 (72,7; 104,0)	97,5 (86,2; 114,0)	$p<0,05$
МОС ₅₀ , %	62,8 (47,8; 72,0)	65,7 (52,0; 86,3)	$p<0,05$
МОС ₇₅ , %	54,2 (35,4; 71,0)	55,5 (41,0; 70,0)	$p>0,05$
СОС ₂₅₋₇₅ , %	61,8 (42,7; 73,6)	62,5 (49,7; 79,2)	$p>0,05$

Полученные данные позволили использовать некоторые клинико-функциональные и генетические параметры для дальнейшей разработки способов прогнозирования как осмотической ГРДП, так и уровня контроля БА.

5 Взаимосвязь осмотической гиперреактивности бронхов с уровнем экспрессии генов TRPV рецепторов на респираторном эпителии

В эксперимент по исследованию взаимосвязи осмотической ГРДП с экспрессией генов *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4* в назальном и бронхиальном эпителии было включено 35 пациентов с диагнозом БА легкой и средней степени тяжести, средний возраст $40,0\pm 1,96$ лет. Доля лиц женского пола преобладала и составила 65%. Группу Ia составили больные БА с установленной ГРДП на бронхопровокационную пробу с ИДВ, группу Ib – без гипоосмотической реактивности бронхов, соответственно этому группа IIa – лица с ГРДП на ИГР и IIb – без ГРДП. В 25,7% случаев среди испытуемых проба с ИДВ была положительной, в то время как во II группе испытуемых снижением ОФВ₁ ниже критического порога (-10% от исходного и ниже) реагировали 48,6% больных БА. Бронхоконстрикторная реакция на оба стимула наблюдалась у 23% пациентов всей выборки.

Для дальнейших расчетов относительных уровней экспрессии с помощью программы RefFinder из трёх кандидатов на референсный ген был выбран один – *PP1A*, который продемонстрировал наибольшую стабильность как в бронхиальном, так и назальном эпителии. В дальнейшем анализ относительных уров-

ней экспрессии генов *TRPV* рецепторов производился непосредственно по референсному гену *PPIA*.

При сравнительном анализе не было выявлено достоверных отличий экспрессии таргетных генов *TRPV* между образцами назального и бронхиального эпителия. Несмотря на это, обнаружено, что экспрессия *TRPV4* преобладала над *TRPV1* и *TRPV2* вне зависимости от локализации – слизистая носовой полости (в 9,1 и 6,5 раз ($p=0,001$), соответственно) или бронхов (в 35,5 и 37,4 раз ($p<0,001$), соответственно). *TRPV1* и *TRPV2* экспрессировались приблизительно одинаково.

При ассоциативном анализе уровней экспрессии таргетных генов в образцах назального эпителия с наличием или отсутствием осмотической ГРДП достоверных изменений не выявлено. Между пациентами в сравниваемых группах Ia и Ib, IIa и IIb экспрессия *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4* статистически не отличалась и была на одинаковом уровне у лиц с ГРДП на любой осмотический стимул и без ГРДП.

Другая ситуация обнаружена в браш-биоптатах эпителия бронхов. Экспрессия *TRPV1* и *TRPV2* была значительно выше у пациентов Ia и IIa групп, то есть у лиц с ГРДП как на гипоосмотический, так и на гиперосмотический стимулы по сравнению с больными без ГРДП. В Ia группе относительное количество *TRPV1* и *TRPV2* на уровне мРНК было в 7,4 95%ДИ (1,4-35,7) ($p=0,004$) и 18,5 95%ДИ (2,1-236,7) ($p=0,014$) раз больше, чем в группе Ib. *TRPV4* также имел тенденцию к повышению экспрессии, однако, это не было статистически значимым в связи с большим разбросом в 95%ДИ (2,7 95%ДИ (0,3-718,8), $p=0,4$).

Данная ассоциация наблюдалась и у пациентов с ГРДП на ИГР. В группе IIa уровни экспрессии *TRPV1* и *TRPV2* были, соответственно, в 4,7 95%ДИ (1,8-11,6) ($p=0,013$) и 7,6 95%ДИ (1,6-38,9) ($p=0,024$) раз выше, чем в группе IIb. Для *TRPV4* сохранялась та же тенденция, что и в группе с пробой ИДВ, экспрессия была выше почти в 2 раза, но в связи с разнородными показателями 95%ДИ, связь с ГРДП в ответ на ИГР была незначимой (2,0 95%ДИ (0,3-10,9), $p=0,1$).

Для генов *TRPV1* и *TRPV2* прослеживалась взаимосвязь с исходным значением ОФВ₁. Учитывая показатели спирометрии до проведения бронхопровокационных проб с осмотическими стимулами, больные были разделены на две подгруппы – с ОФВ₁ ниже и выше 82% от должного. В образцах респираторного эпителия лиц с более низким показателем ОФВ₁ экспрессия *TRPV1* была в 3,2 ($p=0,05$), а *TRPV2* в 6,2 ($p=0,013$) раза выше, по сравнению с образцами от пациентов с исходным ОФВ₁ больше 82%.

Несмотря на то, что в респираторном эпителии отмечалась гиперэкспрессия гена *TRPV4* на уровне м-РНК, полученные результаты позволяют выделять именно *TRPV1* и *TRPV2*, как вносящие вклад в патогенез осмотической ГРДП. Полученные данные демонстрируют взаимосвязь генов изучаемых рецепторов с реакцией бронхов как на гипо-, так и на гиперосмотический стимул. Эта особенность связана с большим процентом сочетанной осмотической ГРДП, присутствующей у одних и тех же лиц. Учитывая тот факт, что рецепторы *TRPV1* являются чувствительными к растворам с высокой осмолярностью, а *TRPV2*, напротив, активируются стимулами с низкой осмолярностью, можно предположить, что данные каналы способны опосредовать схожие механизмы бронхоспазма.

Интересно, что особенности экспрессии *TRPV1* и *TRPV2* именно в бронхиальном эпителии оказались связаны с осмотической ГРДП. При БА изменение экспрессии данных каналов является критическим и приводит к соответствующим фенотипическим проявлениям.

6 Способы прогнозирования осмотической гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой при воздействии воздуха с высоким уровнем относительной влажности

С учётом найденных особенностей и закономерностей с целью прогнозирования развития ГРДП на гипоосмотический стимул у больных БА при помощи биномиальной логистической регрессии была разработана математическая модель, отражающая зависимость вероятности возникновения гипоосмотического бронхоспазма от тяжести БА, выраженности бронхолитического эффекта ($\Delta\text{ОФВ}_1$) на ингаляцию β_2 -агониста (сальбутамола), а также генотипа по ОНП rs1129235 гена *TRPV2*.

Разработанное уравнение регрессии имеет вид:

$$F = -1,90584 + 1,06002 \times rs1129235TRPV2 + 0,06968 \times \Delta\text{ОФВ}_1\text{БЛ} + 0,84281 \times \text{БА} \quad (1)$$

где *rs1129235TRPV2* – переменная, принимающая значение «1» – при генотипе СС по ОНП rs1129235, «0» – при генотипах АА или АС; $\Delta\text{ОФВ}_1\text{БЛ}$ – количественная переменная, отражающая изменение (Δ) показателя ОФВ_1 после ингаляции сальбутамола в %; *БА* – переменная, отражающая степень тяжести заболевания и принимающая значение «1» – при средней тяжести, «0» – лёгкой тяжести.

Вычисление вероятности возникновения гипоосмотической ГРДП производится по формуле:

$$P=1/(1+e^{-F}), \quad (2)$$

где e – основание натурального логарифма (2,718), F – значение, полученное вычислением по формуле.

Полученную вероятность P соотносят с граничным значением 0,46. В случае $P>0,46$ можно говорить о повышенном риске развития ГРДП на гипоосмотический стимул. По данным ROC-анализа, значение площади под кривой (AUC) составило 0,74 95%ДИ (0,64; 0,82). Рассчитаны такие операционные характеристики, как чувствительность (68%), специфичность (68%) и точность (68%).

Вторая математическая модель дополнительно учитывает уровень контроля БА, выраженный в количестве баллов АСТ, и демонстрирует взаимовлияние клинично-функциональных (тяжесть БА, уровень контроля БА, $\Delta\text{ОФВ}_1$ в ответ на ингаляцию КДБА) и генетической (rs1129235 *TRPV2*) переменных.

Разработанное уравнение регрессии имеет вид:

$$F=-3,71022+1,16317\times TRPV2+0,07939\times d\text{ОФВ}_{1\text{БЛ}}+0,89901\times \text{БА}+0,09494\times \text{АСТ} \quad (3)$$

где *TRPV2* – переменная, принимающая значение «1» – при генотипе СС по ОНП rs1129235, «0» – при генотипах АА или АС; *dОФВ*_{1БЛ} – $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ингаляции сальбутамола в %; *БА* – степень тяжести заболевания; *АСТ* – количество баллов.

Вычисление вероятности возникновения гипоосмотической ГРДП (P) производится по формуле (2). Полученную вероятность P соотносят с граничным значением 0,53. В случае $P\geq 0,53$ можно говорить о повышенном риске развития ГРДП на гипоосмотический стимул. По данным ROC-анализа, значение площади под кривой (AUC) составило 0,74 95%ДИ (0,64; 0,82). При выбранном пороге 0,53 рассчитаны чувствительность (63%), специфичность (72%) и точность (69%). Переменная уровня контроля БА значима в уравнении, что говорит о независимой взаимосвязи между гипоосмотической ГРДП и контролем.

При прогнозировании гипоосмотической ГРДП также удалось установить комплексное влияние таких показателей как тяжесть БА, ИК, прирост показателя ОФВ_1 после ингаляции сальбутамола вместе с ещё одним ОНП гена *TRPV2* – rs7217735. Разработанное уравнение регрессии имеет вид:

$$F=-2,71806+0,05043\times d\text{ОФВ}_{1\text{БЛ}}+0,90045\times \text{БА}+0,46678\times TRPV2-0,56250\times \text{ИК} \quad (4)$$

где *dОФВ*_{1БЛ} – $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ингаляции сальбутамола в %; *БА* – степень тяжести заболевания; *TRPV2* – переменная, принимающая значение «1» – при

генотипе АА по ОНП rs7217735, «0» – при генотипе АG или GГ; ИК – переменная индекса курения, принимающая значение «1» - при ИК \geq 5 пачка/лет, «0» - при ИК $<$ 5 пачка/лет.

Вычисление вероятности возникновения гипоосмотической ГРДП (Р) производится по формуле (2). Полученную вероятность Р соотносят с граничным значением 0,25. В случае Р \geq 0,25 можно говорить о повышенном риске развития гипоосмотической ГРДП. По данным ROC-анализа значение AUC составило 0,73 95%ДИ (0,61; 0,82). При выбранном пороге 0,25 рассчитаны чувствительность (64%), специфичность (69%) и точность (67%).

7 Прогнозирование риска неконтролируемого течения бронхиальной астмы в период повышенной относительной влажности воздуха

На основании проведенного анализа было установлено, что пациенты с гипо- или гиперосмотической ГРДП чаще имеют неконтролируемое и более тяжёлое течение заболевания. Чем сильнее бронхоспазм в ответ на ИДВ, выраженный в Δ ОФВ₁, тем ниже АСТ, отражающий контроль БА. В ходе статистических расчетов был установлен генетический предиктор как самой гипоосмотической ГРДП, так и неконтролируемого течения заболевания – ОНП rs7217735 TRPV2.

В результате определены три переменные, оказывающие влияние на уровень контроля над БА – это тяжесть заболевания, наличие генотипа АА по ОНП rs7217735 TRPV2, а также степень гипоосмотической ГРДП, выраженная в снижении ОФВ₁ (Δ ОФВ₁, %) после пробы с ИДВ. Методом биномиальной логистической регрессии выведено прогностическое уравнение вида:

$$F = -0,627725 + 1,091917 \times \text{тяжесть БА} + 0,764803 \times \text{rs7217735} - 0,164064 \times \Delta\text{ОФВ}_1, \quad (5)$$

где *тяжесть БА* – переменная, отражающая степень тяжести БА и принимающая значение «1» – при средней тяжести, «0» – при легкой; rs7217735 – переменная, принимающая значение «1» – при генотипе АА по ОНП rs7217735 гена TRPV2, «0» – при генотипе АG или GГ; Δ ОФВ₁ – переменная, отражающая изменение ОФВ₁ после пробы с ИДВ в %.

Вычисление вероятности возникновения риска потери контроля над БА (Р) производится по формуле (2). Граничное значение Р равно 0,77. В случае, если Р больше 0,77, риск потери контроля над БА при повышении влажности атмосферного воздуха считается высоким, если меньше 0,77 – низким. По данным ROC-анализа, значение AUC равно 0,87 95%ДИ (0,80; 0,92). Чувствительность способа 80%, специфичность 79,2%, точность 80%.

ВЫВОДЫ

1. ГРДП на гипоосмотический стимул у больных БА детерминируется ОНП генов *TRPV2* и *TRPV4*. Установлено, что СС генотип rs1129235 *TRPV2* повышает шанс развития ГРДП на гипоосмотический стимул в 3,54 раза 95%ДИ (1,55; 8,07), $p=0,002$. В то же время генотип GG по ОНП rs3813769 и наличие аллеля G по ОНП rs7217735 в гомо- или гетерозиготном состоянии обладают протективным действием в отношении формирования гипоосмотической ГРДП ($p<0,001$ и $p=0,032$ (ОШ 0,45 95%ДИ (0,22; 0,95), соответственно). Для гена *TRPV4* установлена ассоциация rs6606743 с бронхопровокационной пробой с ИДВ (носительство AA генотипа снижает шанс возникновения ГРДП в ответ на снижение осмотического давления в 0,43 раза (95%ДИ (0,19; 0,94), $p=0,027$)).

2. ОНП rs222747 *TRPV1* может быть связан с развитием ГРДП на ДФН. GG генотип достоверно чаще встречается у лиц с бронхоспазмом после выполнения соответствующей бронхопровокационной пробы. Значимость ассоциации подтвердилась в рецессивной модели наследования ($p=0,04$).

3. Повышение уровня экспрессии *TRPV1* и *TRPV2* в бронхиальном эпителии у больных БА связано с развитием ГРДП на гипо- и гиперосмотические стимулы.

4. Генетически детерминированная осмотическая ГРДП у больных БА ассоциируется с потерей контроля над заболеванием и определяет особенности его течения. Пациенты с бронхоспазмом в ответ на воздействие гипо- и гиперосмотических аэрозольных стимулов имеют более тяжёлое течение заболевания. Осмотическая ГРДП тем сильнее, чем ниже исходные скоростные показатели форсированного выдоха пациента при спирометрии. Бронхоспазм на осмотические стимулы характеризуется обратной корреляцией с выраженностью бронходилатационной реакцией дыхательных путей в ответ на ингаляцию КДБА.

5. Прогнозирование осмотической ГРДП при воздействии высокой относительной влажности воздуха возможно на основании клинико-функциональных данных и генетических предикторов. Разработан способ прогнозирования осмотической ГРДП с использованием таких параметров, как тяжесть БА, изменение $ОФВ_1$ после ингаляции КДБА (сальбутамола) и ОНП rs1129235 гена *TRPV2*. Чувствительность данного способа равна 68%, специфичность 68%, точность 68%.

6. Больные БА имеют более высокую вероятность потери контроля над заболеванием при наличии AA генотипа по ОНП rs7217735 гена *TRPV2* (ОШ

2,46 95%ДИ (1,27; 4,75), $p=0,007$).

7. Прогнозирование потери контроля над БА в период сезонного повышения влажности атмосферного воздуха возможно с использованием установленных клинико-функциональных и генетических предикторов. Разработан способ прогнозирования потери контроля БА с использованием показателей: тяжесть БА, выраженность гипоосмотической ГРДП в ответ на бронхопровокационную пробу с ИДВ в виде снижения $ОФВ_1$, а также ОНП rs7217735 *TRPV2*. Чувствительность данного способа равна 80%, специфичность – 79,2%, точность – 80%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам со среднетяжелым течением БА и положительной реакцией на ингаляцию бронхолитика сальбутамола рекомендовано проведение генотипирования по ОНП rs1129235 гена осмотической рецепции *TRPV2* для определения риска развития гипоосмотической ГРДП.

Для прогнозирования возможно использование математического уравнения:

$$F = -1,90584 + 1,06002 \times TRPV2 + 0,06968 \times dОФВ_1БЛ + 0,84281 \times БА, \quad (1)$$

где *TRPV2* – переменная, принимающая значение «1» – при генотипе СС по ОНП rs1129235, «0» – при генотипах АА или АС; *dОФВ₁БЛ* – переменная, отражающая изменение (Δ) в % $ОФВ_1$ после ингаляции сальбутамола; *БА* – переменная, отражающая степень тяжести заболевания, принимающая значение «1» – при средней тяжести, «0» – при лёгкой.

Вычисление вероятности возникновения гипоосмотической ГРДП производится по формуле:

$$P = 1 / (1 + e^{-F}), \quad (2)$$

где e – основание натурального логарифма (2,718), F – значение, полученное вычислением по формуле (1).

Полученную вероятность P соотносят с граничным значением 0,46. В случае $P > 0,46$ можно говорить о повышенном риске развития ГРДП на гипоосмотический стимул.

2. Пациентам-носителям СС генотипа rs1129235 *TRPV2* или с вычисленной вероятностью $P > 0,46$ рекомендовано наблюдение у пульмонолога для корректировки терапии в периоды повышенной влажности атмосферного воздуха как фактора, гипоосмотически индуцирующего бронхоспазм, с целью предупреждения ухудшения контроля и обострения заболевания.

3. Дополнительно для прогнозирования потери контроля над БА в период

повышенной влажности атмосферного воздуха пациентам рекомендовано проведение генотипирования по ОНП rs7217735 *TRPV2*, а также бронхопровокационной пробы с ИДВ. На основании полученных данных использовать уравнение:

$$F = -0,627725 + 1,091917 \times \text{тяжесть БА} + 0,764803 \times \text{rs7217735} - 0,164064 \times \Delta \text{ОФВ}_1, \quad (5)$$

где *тяжесть БА* – переменная, отражающая степень тяжести БА, принимающая значение «1» – при средней тяжести, «0» – при лёгкой; *rs7217735* – переменная гена *TRPV2*, принимающая значение «1» – при генотипе АА по ОНП rs7217735, «0» – при генотипе АG или GG; $\Delta \text{ОФВ}_1$ – переменная, отражающая изменение ОФВ₁ после пробы с ИДВ.

Вычисление вероятности возникновения риска потери контроля над БА производится по формуле:

$$P = 1 / (1 + e^{-F}), \quad (2)$$

где *e* – основание натурального логарифма (2,718), *F* – значение, полученное вычислением по формуле (5).

В случае, если *P* больше 0,77, риск потери контроля над БА считается высоким, если меньше 0,77 – риск возникновения неконтролируемого течения БА при повышении влажности атмосферного воздуха – низкий.

4. Пациентам с высоким риском неконтролируемого течения БА рекомендовано наблюдение у пульмонолога для корректировки терапии в периоды повышенной влажности атмосферного воздуха как фактора, индуцирующего гипоосмотический бронхоспазм, с целью предупреждения ухудшения контроля и обострения заболевания.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. TRPV1 and TRPV2 are up-regulated in the airways of asthma patients with osmotic airway hyperresponsiveness / **Kotova O.**, Naumov D., Prikhodko A. [et al.] // **European Respiratory Journal**. – 2017. – Vol.50, suppl. 61 – P.PA1820.
2. TRPV4 single nucleotide polymorphisms and airway inflammation in asthma / Naumov D., **Kotova O.**, Prikhodko A. [et al.] // **European Respiratory Journal**. – 2017. – Vol.50, suppl. 61. – P.PA1821.
3. TRPV2 Gene polymorphisms are associated with hypoosmotic airway hyperresponsiveness in asthma / Naumov D., **Kotova O.**, Prikhodko A. [et al.] // **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. – 2017. – Vol.195., №S1 – P. A3234.

4. Interrelationships between ambient air humidity, asthma control, airway responsiveness to hypoosmolar stimulus in patients with different genotypes of rs6606743 single nucleotide polymorphism of TRPV4 gene / Afanaseva E.Y., Prikhodko A.G., **Kotova O.O.** [et al.] // **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** – 2021. – Vol.203. – P.A3120.

5. Анализ уровней экспрессии генов TRPV в респираторном эпителии больных бронхиальной астмой с осмотической гиперреактивностью дыхательных путей / **Котова О.О.**, Наумов Д.Е., Афанасьева Е.Ю. [и др.] // **Бюллетень физиологии и патологии дыхания.** – 2020. – Вып. 78. – С.40-46.

6. **Котова, О.О.** Современные представления о роли каналов с транзиторным рецепторным потенциалом ваниллоидного подсемейства (TRPV) в развитии осмотической гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой (обзор литературы) / **Котова О.О.** // **Бюллетень физиологии и патологии дыхания.** – 2021. – Вып. 81. – С.115-125.

7. Влияние полиморфизмов генов *TRPV1* и *TRPV4* на развитие осмотической гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой / **Котова О.О.**, Наумов Д.Е., Афанасьева Е.Ю., Перельман Ю.М. // **Бюллетень физиологии и патологии дыхания.** – 2021. – Вып. 81. – С.38-44.

8. **Котова, О.О.** Прогнозирование неконтролируемого течения бронхиальной астмы с учетом клинико-функциональных и генетических предикторов / **Котова О.О.** // Материалы XV международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2021). – Благовещенск: ДНЦ ФПД, 2021. – С.67-70.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АСТ	– Asthma Control Test, тест по контролю над астмой
TRPV	– каналы с транзиторным рецепторным потенциалом ваниллоидного подсемейства
БА	– бронхиальная астма
ВФЛ	– вентиляционная функция лёгких
ДДБА	– длительно действующие β_2 -агонисты
ДИ	– доверительный интервал
ДФН	– дозированная физическая нагрузка
ИГР	– ингаляция гипертонического раствора

ИДВ	– ингаляция дистиллированной воды
КДБА	– короткодействующие β_2 -агонисты
МОС ₂₅	– мгновенная объёмная скорость выдоха на уровне 25% ФЖЕЛ
МОС ₅₀	– мгновенная объёмная скорость выдоха на уровне 50% ФЖЕЛ
МОС ₇₅	– мгновенная объёмная скорость выдоха на уровне 75% ФЖЕЛ
м-РНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
ОНП	– однонуклеотидный полиморфизм
ОФВ ₁	– объём форсированного выдоха за 1-ю секунду
ПДРФ	– полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СОС ₂₅₋₇₅	– средняя объёмная скорость выдоха между 25% и 75% ФЖЕЛ
ФЖЕЛ	– форсированная жизненная ёмкость легких