

Отчет о проверке на заимствования №1



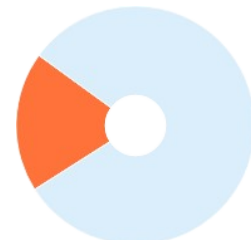
Автор: Клеутина Татьяна Александровна
Проверяющий: Клеутина Татьяна Александровна
Организация: Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://cfpd.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 119
 Начало загрузки: 05.09.2022 08:42:33
 Длительность загрузки: 00:00:17
 Имя исходного файла: ДИСС Сугайло без литературы.docx
 Название документа: ДИСС Сугайло без литературы
 Размер текста: 163 кБ
 Символов в тексте: 166897
 Слов в тексте: 19162
 Число предложений: 653

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 05.09.2022 08:42:51
 Длительность проверки: 00:17:12
 Комментарии: не указано
 Поиск с учетом редактирования: да
 Модули поиска: Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана, СМИ России и СНГ, Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), Издательство Wiley, Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Медицина, Интернет Плюс, Сводная коллекция ЭБС, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по Интернету, Кольцо вузов, Шаблонные фразы, ИПС Адилет, Сводная коллекция РГБ, Переводные заимствования (RuEn), Диссертации НББ, СПС ГАРАНТ, Патенты СССР, РФ, СНГ, eLIBRARY.RU, Цитирование, Переводные заимствования, Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Библиография, cfpd



ЗАИМСТВОВАНИЯ

18,55%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

81,45%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Самоцитирование — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
 Цитирование — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарии
[01]	3,93%	Котова, Олеся Олеговна Генетические аспекты формирования ос... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	
[02]	0,56%	Шелудько, Елизавета Григорьевна Клинико-функциональные и ге... http://dlib.rsl.ru	15 Окт 2019	Сводная коллекция РГБ	
[03]	0,54%	Клинико-функциональные и генетические особенности сочетани... https://cfpd.ru	27 Сен 2021	Интернет Плюс	
[04]	0,6%	Гассан, Дина Анатольевна Клинико-генетические особенности тя... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	
[05]	1,15%	ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА КАТИОННЫХ КАНАЛОВ <i>TRP... http://elibrary.ru	10 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[06]	0,62%	скачать полный текст выпуска http://cfpd.amursu.ru	28 Ноя 2017	Интернет Плюс	
[07]	2,25%	СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КАНАЛОВ С ТРАНЗИТОР... http://elibrary.ru	12 Фев 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[08]	0,43%	ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА КАТИОННЫХ КАНАЛОВ <i>TRP... http://elibrary.ru	10 Янв 2019	eLIBRARY.RU	
[09]	0,06%	Наумов, Денис Евгеньевич диссертация ... кандидата медицинских... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[10]	0%	РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА TRPM8 В ФОРМИРОВАНИИ ФЕНО... http://elibrary.ru	15 Фев 2018	eLIBRARY.RU	
[11]	0,24%	РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА TRPM8 В ФОРМИРОВАНИИ ФЕНО... http://elibrary.ru	15 Фев 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[12]	0,07%	dental-press.ru https://dental-press.ru	11 Окт 2021	Интернет Плюс	
[13]	0%	Роль полиморфизмов гена TRPM8 в формировании фенотипа бро... https://cyberleninka.ru	02 Фев 2022	Интернет Плюс	
[14]	0%	Роль полиморфизмов гена TRPM8 в формировании фенотипа бро... https://cyberleninka.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	
[15]	0%	Скачать текст статьи http://cfpd.amursu.ru	28 Ноя 2017	Интернет Плюс	
[16]	0%	naukaru.ru https://naukaru.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	
[17]	0,83%	ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА <i>TRPA1</i> НА ПРЕДРАСПОЛ... http://elibrary.ru	15 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	

[18]	0,25%	ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА <i>i</i>>TRPM8</i></i>> И КУРЕНИЕ КАК ФАК... http://elibrary.ru	15 Фев 2018	eLIBRARY.RU	
[19]	0,44%	СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КАНАЛОВ С ТРАНЗИТОР... http://elibrary.ru	12 Фев 2019	eLIBRARY.RU	
[20]	0%	ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА <i>i</i>>TRPM8</i></i>> И КУРЕНИЕ КАК ФАК... http://elibrary.ru	15 Фев 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[21]	0,02%	naukaru.ru https://naukaru.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	
[22]	0,12%	Скачать PDF Текст https://naukaru.ru	11 Окт 2021	Интернет Плюс	
[23]	0,19%	Скачать PDF Текст https://naukaru.ru	11 Окт 2021	Интернет Плюс	
[24]	0,43%	TRPA1-опосредованные эффекты на функциональную активность ... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	
[25]	0,45%	РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ... http://elibrary.ru	24 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[26]	0,52%	СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ МОН... https://cyberleninka.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	
[27]	0%	Хроническая обструктивная болезнь легких сочетанная с ишеми... http://dissers.ru	29 Янв 2019	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0%	ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА <i>i</i>TRPM8</i></i> КАК НЕЗАВИСИМЫЙ ФАКТОР ... http://elibrary.ru	25 Янв 2019	eLIBRARY.RU	
[29]	0%	Диагностика и лечение хронической обструктивной болезни легк... https://otherreferats.allbest.ru	05 Сен 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0%	Диагностика и лечение хронической обструктивной болезни легк... https://otherreferats.allbest.ru	10 Мар 2019	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0%	Способ прогнозирования риска формирования осмотической ги... https://edrid.ru	19 Фев 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0%	http://klinikcity.ru/wp-content/uploads/2012/04/Publications/Chronic... http://klinikcity.ru	26 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0%	Боговин, Лариса Викторовна Мотивация к лечению и кооператив... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,21%	ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ ... http://elibrary.ru	10 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[35]	0,26%	Акушерские и перинатальные исходы у курящих пациенток http://emil.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[36]	0,47%	Хроническая обструктивная болезнь легких http://studentlibrary.ru	26 Янв 2018	Медицина	
[37]	0,11%	Диссертация_Баздырев_2018	02 Ноя 2018	Кольцо вузов	
[38]	0,17%	Струнина, Юлия Зевеновна Особенности перекисного окисления ... http://dlib.rsl.ru	02 Фев 2013	Сводная коллекция РГБ	
[39]	0,1%	Хроническая обструктивная болезнь легких http://studentlibrary.ru	20 Дек 2016	Медицина	
[40]	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,04%	Полиморфизм гена TRPM8 как независимый фактор формирова... https://cyberleninka.ru	26 Авг 2022	Интернет Плюс	
[42]	0,08%	Особенности лиганд-рецепторных взаимоотношений в популяц... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	
[43]	0,13%	Респираторная медицина : руководство : в 3 т. http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[44]	0,37%	Способ прогнозирования риска формирования холодовой гипер... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[45]	0,3%	Викторова, Елена Владимировна Применение аэробной интервал... http://dlib.rsl.ru	14 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	
[46]	0%	http://www.webmed.irkutsk.ru/doc/pdf/gold2006rus.pdf http://webmed.irkutsk.ru	29 Мая 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0%	http://www.webmed.irkutsk.ru/doc/pdf/gold2006rus.pdf http://webmed.irkutsk.ru	18 Мар 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0%	https://dalgau.ru/upload/iblock/b90/n44akqdyo5qcoc6j5ck6ujewk5a6... https://dalgau.ru	05 Июл 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,16%	Ермаков, Геннадий Иванович диссертация ... доктора медицински... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[50]	0,06%	https://www.rzgm.ru/images/upload/users/sc/%D0%94%D0%B8%D1... https://rzgm.ru	04 Апр 2022	Интернет Плюс	
[51]	0%	СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КАНАЛОВ С ТРАНЗИТОР... https://cyberleninka.ru	26 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0%	СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КАНАЛОВ С ТРАНЗИТОР... https://cyberleninka.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0%	Кузнецов, Андрей Александрович Клинико-иммунологические по... http://dlib.rsl.ru	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	
[54]	0,08%	Диссертация на тему «Клинико-функциональные аспекты формир... https://disserscat.com	02 Июн 2022	Интернет Плюс	
[55]	0,46%	Diagnostic and therapeutic target for macular degeneration - Trustees ... http://freepatentsonline.com	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[56]	0%	АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНЫ - PDF https://docplayer.ru	02 Июн 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0%	ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА <i>i</i>TRPM8</i></i> КАК НЕЗАВИСИМЫЙ ФАКТОР ... http://elibrary.ru	25 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[58]	0%	Особенности экспрессии рецептора TRPM8 в респираторном трак... https://cyberleninka.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,41%	http://www.volgmed.ru/uploads/files/2014-11/34234-federalnye_klinic... http://volgmed.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	

[60]	0%	Профессиональные заболевания органов дыхания http://studentlibrary.ru	26 Янв 2018	Медицина	
[61]	0%	Практическая пульмонология : руководство для врачей http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0%	Осипов Евгений Михайлович АЛИЕВ ДЕНИС ФАХРИДДИНОВИЧ.doc	19 Июн 2017	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0%	АЛИЕВ ДЕНИС ФАХРИДДИНОВИЧ	27 Июл 2017	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0%	https://critub.ru/wp-content/uploads/DISSERTATSIYA-Sargsyan-A.P.-n... https://critub.ru	05 Сен 2022	Интернет Плюс	
[65]	0,19%	Пан, Эдгар Сергеевич Фармакологические эффекты и механизмы ... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	
[66]	0%	Роль активности воспаления в бронхах и на системном уровне в п... http://emil.ru	28 Апр 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0%	Оценка функции внешнего дыхания и показателей вариабельнос... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,31%	TONGUE. MOLECULAR AND FUNCTIONAL TYPES AND MODULATORY R... http://dspace.umh.es	09 Янв 2018	Переводные заимствования (RuEn)	
[69]	0%	Самерханова, Айгуль Энверовна Оптимизация комбинированной... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2005	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0%	Ефремова, Елена Владимировна Клиническое и прогностическое ... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0%	Боханова, Елена Григорьевна диссертация ... кандидата медицинс... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0%	https://www.rzgm.ru/images/upload/users/sc/disserMakarova.pdf https://rzgm.ru	29 Авг 2022	Интернет Плюс	
[73]	0%	Иммунодефицитный и аутоиммунный фенотипы хронической об... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0%	Вестник новых медицинских технологий. Том XVII, № 2, 2010 http://biblirossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0%	https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/04/GOLD_Report_Ru... https://goldcopd.org	15 Фев 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0%	Вестник новых медицинских технологий. Том XIX, № 2, 2012 http://biblirossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,25%	Автореферат http://1spbgmu.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[78]	0%	Фролова, Эльвира Бакиевна Взаимосвязь параметров вентиляции... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	
[79]	0%	Студеникина, Анастасия Александровна Влияние поликлональных... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,23%	не указано http://litru.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[81]	0%	Ishki аурулар : "Пульмонология" модули http://studentlibrary.ru	16 Янв 2018	Медицина	
[82]	0%	http://rostgmu.ru/wp-content/uploads/2020/03/%D0%9C%D0%B5%D... http://rostgmu.ru	09 Июн 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0%	Оптимизация диагностики и прогнозирования хронической обст... http://diss.natlib.uz	26 Дек 2020	Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0%	Состояние костно-мышечной системы у мужчин с хронической о... http://dep.nlb.by	04 Июл 2017	Диссертации НББ	
[85]	0%	Вестник новых медицинских технологий. Том XV, № 2, 2008 http://biblirossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0%	Этические принципы проведения медицинских исследований, вкл... https://ecuro.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0%	Вестник новых медицинских технологий. Том XVIII, № 2, 2011 http://biblirossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0%	Игнатова, Мария Сергеевна Нарушение сигнального JAK-STAT-пут... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0%	https://www.sechenov.ru/upload/iblock/693/SechenovMedicalJournal... https://sechenov.ru	22 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0%	Клинико-патогенетические аспекты формирования хронической ... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0%	Туратова КГМИПК 2017	18 Сен 2018	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0%	Молекулярно-генетические аспекты клеточной терапии патологи... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0%	Способ реабилитации больных бронхиальной астмой с отсутств... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0%	Иммуномодулирующие свойства диоксида титана и других краси... http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,18%	Т. 53, № 7 http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	
[96]	0%	Фармакоэпидемиологическая и фармакоэкономическая оценка э... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0%	https://www.ulsu.ru/media/uploads/hairutdinova%40ulsu.ru/2021/07... https://ulsu.ru	24 Дек 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0%	https://www.rzgm.ru/images/upload/users/sc/%D0%94%D0%B8%D1... https://rzgm.ru	06 Июн 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0%	Способ установления нормативных показателей вентиляционной... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[100]	0%	Патологическая анатомия http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[101]	0%	Патологическая анатомия хронической обструктивной болезни л... http://elibrary.ru	21 Дек 2013	eLIBRARY.RU	
[102]	0%	Патологическая анатомия хронической обструктивной болезни л... http://elibrary.ru	21 Дек 2013	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[103]	0%	Клинико-функциональные особенности бронхолегочной систем... http://emil.ru	28 Апр 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0%	анализ изменений клинико- функциональных и лабораторных па... http://elibrary.ru	28 Июн 2019	eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0%	Мужское бесплодие: обоснование диагностических и лечебных п... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0%	Клинико-иммунологическое обследование комплексного лечени... http://dslib.net	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[108]	0%	Маркеры воспаления и показатели систем коагуляции и фибрино... http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0%	Спирография в клинической практике http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	
[110]	0%	Роль NO-эргической системы в формирование рецидивирующих ... http://diss.natlib.uz	20 Апр 2017	Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0%	Хроническая обструктивная болезнь легких: особенности форми... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0%	Диссертация на тему «Характеристика паттернов информативных... https://dissercat.com	05 Сен 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,15%	Сосновских И.В.	22 Мая 2015	Кольцо вузов	
[114]	0%	ВОЗМОЖНОСТИ СКРИНИНГОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ВЕГЕТАТИВНО... http://elibrary.ru	раньше 2011	eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0%	Склифасовская, Анастасия Павловна Роль белков теплового шока ... http://dlib.rsl.ru	04 Апр 2022	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,15%	Проблемы геронтологии и гериатрии в ортопедии и травматолог... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	
[117]	0%	№ 78 (2020) https://cfpd.elpub.ru	05 Сен 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0%	В АмГУ прошли выборы ректора http://blagoveshensk.bezformata.ru	09 Фев 2022	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0%	Т. 25, № 4 http://emil.ru	28 Апр 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0%	Состояние репродуктивного здоровья у женщин, страдающих бр... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	
[121]	0%	XVIII Российский национальный конгресс "Человек и лекарство", 1... http://emil.ru	28 Апр 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0%	Новый анализ предскажет появление ХОБЛ у курильщиков https://iz.ru	29 Июн 2022	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0%	Диагностика и лечение хронической обструктивной болезни лёгк... https://med-gen.ru/docs/disser-kondratieva.pdf https://med-gen.ru	03 Янв 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0%	Молекулярно-генетические особенности патогенеза немелкоклет... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0%	Спирометрия. Спирография - online presentation https://en.ppt-online.org	28 Окт 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[127]	0%	Использование метода спирометрии	29 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	0%	Клинико-фармакологические основы современной пульмонолог... http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0%	Клинико-фармакологические основы современной пульмонологии http://bibliorossica.com	27 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	0%	Клинико-фармакологические основы современной пульмонологии http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	0%	[Ахмедов В. А. и др.] ; под ред. Е. Е. Баженова, В. А. Ахмедова, В. А. О... http://dlib.rsl.ru	01 Дек 2014	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	0%	Поликлиническая терапия	03 Ноя 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[133]	0%	https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/100527/1/urfu2266_d.pdf https://elar.urfu.ru	17 Фев 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	0%	Регуляторные механизмы иммунного ответа при внебольничной... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[135]	0%	104227 http://biblioclub.ru	13 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[136]	0%	Иммунология http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	0%	Влияние цитокинов TNM-а и GM-GCF на экспрессию остеокласт-сп... http://spinet.ru	29 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	0%	Предикторы и маркеры развития и прогрессирования хроническ... http://diss.natlib.uz	11 Ноя 2020	Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[139]	0%	Преходящие нарушения мозгового кровообращения: клинико-па... http://dep.nlb.by	04 Июл 2017	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[140]	<input type="checkbox"/>	РЕСПИРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА https://library.mededtech.ru	12 Мая 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[141]	<input type="checkbox"/>	Оценка клиничко-иммунологической эффективности физиотерапе... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[142]	<input type="checkbox"/>	Прогнозирование развития хронического лёгочного сердца у бол... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[143]	<input type="checkbox"/>	Особенности суточного ритма артериального давления, функцио... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[144]	<input type="checkbox"/>	Клиничко-морфологическая характеристика и антифиброзная тера... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[145]	<input type="checkbox"/>	Состояние иммунной системы и оксидантный статус у пациентов ... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[146]	<input type="checkbox"/>	Тахи-индуцированная систолическая дисфункция левого желудоч... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[147]	<input type="checkbox"/>	https://www.neurology.ru/sites/default/files/assets/documents/2019/... https://neurology.ru	12 Мар 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[148]	<input type="checkbox"/>	автореферат http://pharmso.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[149]	<input type="checkbox"/>	Тарасенко, Иван Викторович диссертация ... доктора медицинских... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[150]	<input type="checkbox"/>	Загрузить http://nii.pulmonology.ru	07 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[151]	<input type="checkbox"/>	Особенности медицинской экспертизы и реабилитации пациенто... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[152]	<input type="checkbox"/>	http://www.stgau.ru/science/dis/avtoreferat/yacik_2018/1.pdf http://stgau.ru	16 Июн 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[153]	<input type="checkbox"/>	Письменный, Дмитрий Сергеевич Прогностическое значение про... http://dlib.rsl.ru	30 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[154]	<input type="checkbox"/>	Сборник материалов 92-й Международной научно-практической ...	28 Фев 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[155]	<input type="checkbox"/>	Многоплодная беременность: пренатальная диагностика, медико... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[156]	<input type="checkbox"/>	vkr_chernovik (3) (1).pdf	17 Июн 2019	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[157]	<input type="checkbox"/>	vkr_chernovik (3).docx	18 Июн 2019	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[158]	<input type="checkbox"/>	Роль низко- и среднепенетрантных генов в развитии спорадическ... http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[159]	<input type="checkbox"/>	Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 апреля 2013 г. N ... http://ivo.garant.ru	22 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[160]	<input type="checkbox"/>	60054 http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[161]	<input type="checkbox"/>	Клиничко-фармакологические аспекты выбора витаминно-минера...	24 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[162]	<input type="checkbox"/>	https://www.rmj.ru/upload/iblock/e80/RMJ-04-2020-BDP.pdf https://rmj.ru	26 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[163]	<input type="checkbox"/>	https://www.ulsu.ru/media/uploads/ekomed2011%40mail.ru/2019/10... https://ulsu.ru	21 Янв 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[164]	<input type="checkbox"/>	Реакции дыхательной системы на воздействие аэрополлютантов ... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[165]	<input type="checkbox"/>	Способ прогнозирования тяжести течения хронической обструкт... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[166]	<input type="checkbox"/>	Пути снижения частоты обострений ХОБЛ: противовоспалительн... https://lvrach.ru	26 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[167]	<input type="checkbox"/>	Северный регион _2_32_. Том 3. 2015.doc	03 Окт 2016	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[168]	<input type="checkbox"/>	В Китае растет вирусная эпидемия http://strana.ru	25 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[169]	<input type="checkbox"/>	https://www.amursma.ru/upload/iblock/c42/Materialy_IX_Sezda_vrac... https://amursma.ru	29 Мар 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[170]	<input type="checkbox"/>	https://gnicpm.ru/wp-content/uploads/2020/08/profil_2013_2_pril.pdf https://gnicpm.ru	26 Авг 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[171]	<input type="checkbox"/>	https://www.bsmu.by/downloads/universitet/100let/konf.pdf https://bsmu.by	28 Фев 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[172]	<input type="checkbox"/>	http://nsmu.ru/science/smu/bulnsmu/Archiv/2400_%D0%91%D1%8E... http://nsmu.ru	10 Янв 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[173]	<input type="checkbox"/>	https://pirogovka.rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Conferences/Pir... https://pirogovka.rsmu.ru	24 Дек 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[174]	<input type="checkbox"/>	ОБРАЩАЕМ ВНИМАНИЕ.	15 Янв 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[175]	<input type="checkbox"/>	Эволюция глобальной инициативы по хронической обструктивн...	24 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»

3
На правах рукописи

Сугайло Ивана Юрьевна

**РОЛЬ TRP КАНАЛОВ В ФОРМИРОВАНИИ
КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

3.1.29. Пульмонология (медицинские науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Колосов Виктор Павлович, академик РАН,
113
доктор медицинских наук, профессор

1
Благовещенск, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КАНАЛОВ С ТРАНЗИТОРНЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ TRPA1, TRPV1, TRPV4, TRPM8 В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	14
1.1 Проблема хронической обструктивной болезни легких в современной медицине.....	14
1.2 Макрофаги как центральное звено патогенеза хронической обструктивной болезни легких	23
.....	39
1.3 Роль TRP каналов в патогенезе хронической обструктивной болезни легких	32
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА.....	39
2.1 Общеклинические методы исследования.....	39
2.2 Функциональные методы исследования.....	41
2.3 Культуральные методы исследования.....	43
2.4 Генотипирование полиморфизмов <i>TRP</i>	44
2.5 Определение экспрессии TRP рецепторов на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови.....	53
2.6 Иммунофлуоресцентные методы исследования.....	55
2.7 Статистические методы исследования.....	56
2.8 Клиническая характеристика обследованного контингента.....	57
2.8.1 Клиническая характеристика основной и контрольной групп.....	59

2.8.2 Клиническая характеристика больных хронической обструктивной болезнью легких с наличием и отсутствием прогрессирования бронхиальной обструкции 60

.....

ГЛАВА 3. РОЛЬ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ *TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ..... 72

3.1 Общая характеристика исследованных полиморфизмов..... 72

3.2 Взаимосвязь исследованных полиморфизмов с вентиляционной функцией легких и формированием хронической обструктивной болезни легких у курящих лиц..... 75

3.3 Влияние полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8* на прогрессирование бронхиальной обструкции у больных хронической обструктивной болезнью легких..... 82

ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TRP КАНАЛОВ НА МАКРОФАГАХ..... 86

4.1 Особенности экспрессии TRP на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови..... 86

4.2 Особенности экспрессии TRP на макрофагах мокроты..... 89

4.2.1 Особенности экспрессии TRP каналов у больных с прогрессированием бронхиальной обструкции..... 91

ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ TRP КАНАЛОВ С ОСОБЕННОСТЯМИ ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ..... 93

5.1 Особенности воспалительного ответа макрофагов <i>in vitro</i> и его взаимосвязь с экспрессией TRP каналов.....	93
5.2 Особенности воспалительного ответа макрофагов <i>in vivo</i> и его взаимосвязь с экспрессией TRP каналов.....	96

ГЛАВА 6. СПОСОБЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ С УЧЕТОМ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И СОПУТСТВУЮЩИХ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРЕДИКТОРОВ.....	101
6.1 Способ прогнозирования риска формирования хронической обструктивной болезни легких среди курящих лиц.....	101
6.2 Способ прогнозирования прогрессирующей бронхиальной обструкции у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108
ВЫВОДЫ.....	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является прогрессирующим заболеванием дыхательной системы, от которого, по данным Всемирной организации здравоохранения, умерло 3,23 млн человек в 2019 году. Распространенность ХОБЛ составляет в среднем 10,3% [4]. Ожидается, что заболеваемость ХОБЛ будет увеличиваться в связи с загрязнением атмосферы, курением и старением населения [214, 240]. Затраты на лечение ХОБЛ прямо пропорциональны ее тяжести, особенно велики экономические потери, ассоциированные с терапией обострений [110].

ХОБЛ является гетерогенным по патогенезу заболеванием, в развитие которого существенный вклад вносят табакокурение и воздействие аэрополлютантов. Однако не у всех злостных курильщиков развивается ХОБЛ [85, 149, 189]. Несомненным фактором риска является генетическая предрасположенность и, как следствие, дисфункция иммунных клеток с формированием хронического воспалительного процесса. Центральным звеном

патогенеза ХОБЛ являются макрофаги, выступающие в роли авангарда при взаимодействии с сигаретным дымом и пылевыми частицами. Современные исследования показали, что данные патогенные факторы могут специфически активировать каналы с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP) на различных клетках дыхательных путей, главным образом, макрофагов и эпителия дыхательных путей, реализуя иммунный ответ [73, 229]. Наибольший интерес представляют каналы TRP анкиринового подсемейства 1 (TRPA1), ваниллоидного подсемейства 1 (TRPV1), ваниллоидного подсемейства 4 (TRPV4) и меластатинового подсемейства 8 (TRPM8).

В последние годы представлены убедительные данные, свидетельствующие о неотъемлемой роли TRP рецепторов в патогенезе ХОБЛ. TRPA1 хорошо изучен на нейрональных клетках, где он коэкспрессируется с TRPV1 и участвует в восприятии температуры вдыхаемого воздуха, гипоксии и сигаретного дыма. Агонист TRPA1 (циннамальдегид (CA)), подавляя активность транскрипционного ядерного фактора (NF) κ B в макрофагах, ингибирует продукцию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [66]. Активация TRPA1 на макрофагах сопровождается увеличением продукции IL-8 [81]. Также известно, что блокада TRPA1 провоцировала снижение количества эозинофилов и макрофагов в бронхоальвеолярном лаваже при воздействии аллергена [230]. Экспрессия TRPV1 повышается во время воспаления дыхательных путей, опосредует возникновение ощущения боли и термогиперчувствительности [129]. Помимо экспрессии на нейрональных клетках, TRPV1 был идентифицирован на гладкомышечных клетках артерий (где он способен регулировать кровоток), фибробластах, эпителиальных клетках, макрофагах. Считается, что именно этот канал опосредует токсическое повреждение легких и болевой синдром [133, 137]. Полиморфизм rs3744683 гена *TRPV1* связан с риском ХОБЛ у курильщиков в популяции хань [229]. TRPV4, подобно TRPV1, найден не только на нейронах, но и на клетках глии. Экспрессируется на эндотелиальных клетках, что способствует ауторегуляции кровотока. Также, экспрессируясь в эпителиальных клетках трахеи, регулирует частоту биения ресничек [146]. Снижает проницаемость

альвеолярного барьера и активирует макрофаги, что приводит к острому воспалению легких [100]. Есть данные, что TRPV4 играет важную роль в разрушении эпителиального барьера и формировании отека легких [93]. Кроме того, полиморфизмы гена *TRPV4* связаны с ХОБЛ [237], а каналы TRPV4 хорошо экспрессируются в альвеолярных макрофагах [161]. TRPM8 является термочувствительным каналом, который может опосредовать кашель и бронхokonстрикцию, вызванную вдыханием холодного воздуха. Эпителиальный TRPM8 способствует продукции различных интерлейкинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-13) и цитокинов. Ментол (агонист TRPM8) способен повышать фагоцитарную активность макрофагов [121]. Однако роль TRPM8 в развитии респираторных симптомов по-прежнему остается спорной, поскольку ментол (агонист TRPM8) парадоксальным образом ингибирует кашель, вызванный капсаицином (агонистом TRPV1). По данным китайских ученых, из 6 исследованных полиморфизмов гена *TRPM8* 2 связаны с ХОБЛ, 5 – с легочной гипертензией, осложняющей течение ХОБЛ [227].

Мозаичность имеющейся информации относительно роли TRP каналов в развитии ХОБЛ обуславливает необходимость комплексных исследований, включающих изучение влияния генетических детерминант *TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* на формирование ХОБЛ среди курящих лиц и прогрессирование бронхиальной обструкции у пациентов с ХОБЛ, определение влияния экспрессии данных каналов на бронхиальную проходимость и особенности воспалительного процесса в дыхательных путях больных ХОБЛ. Все это сможет расширить возможности прогнозирования ХОБЛ и усовершенствовать первичную и вторичную профилактику данного заболевания.

Степень разработанности исследования

На основе имеющихся в литературе данных сформировано представление о роли TRP рецепторов в патогенезе ХОБЛ. В рамках диссертационного исследования изучены экспериментальные работы, рассматривающие возможное

влияние генетических вариантов, а также особенностей экспрессии TRPA1, TRPV1, TRPV4, TRPM8 каналов на макрофагах в формировании ХОБЛ и прогрессировании бронхиальной обструкции.

По результатам проведенного анализа в настоящее время комплексные исследования роли TRP рецепторов в формировании ХОБЛ и прогрессировании бронхиальной обструкции отсутствуют.

Цель исследования

Изучить эффекты полиморфизмов генов и особенностей экспрессии катионных каналов TRP у больных ХОБЛ с целью поиска новых биомаркеров заболевания, характеризующих его клиническое течение и прогноз.

Задачи исследования

1. Изучить значимость генотипов и аллельных вариантов *TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* в качестве биомаркеров формирования ХОБЛ у курящих лиц.
2. Определить значимость генотипов и аллельных вариантов *TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* в качестве биомаркеров прогрессирования бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.
3. Установить взаимосвязь между уровнями экспрессии каналов TRPA1, TRPV1, TRPV4 и TRPM8, гуморальными маркерами бронхиального воспаления и клинико-функциональными особенностями ХОБЛ.
4. На основании полученных данных разработать способы прогнозирования формирования ХОБЛ у курящих лиц и прогрессирования бронхиальной обструкции с учетом выявленных молекулярно-генетических биомаркеров, клинических и функциональных предикторов.

Научная новизна

Впервые определена роль полиморфизмов гена *TRPM8* в качестве биомаркеров формирования ХОБЛ среди курильщиков в европейской популяции, а также прогрессирования бронхиальной обструкции у лиц, страдающих данным заболеванием. В частности, установлено, что генотипы CC и GG по полиморфизму rs2052030 гена *TRPM8* увеличивают риск развития ХОБЛ, а носительство аллеля C по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8* ассоциировано с предрасположенностью к прогрессирующей бронхиальной обструкции при ХОБЛ.

Впервые изучены особенности экспрессии каналов TRP на макрофагах больных ХОБЛ и установлено преобладание экспрессии канала TRPV1, по сравнению с макрофагами курильщиков без признаков бронхиальной обструкции. Кроме того, получены данные, свидетельствующие о повышенной экспрессии канала TRPV4 на альвеолярных макрофагах пациентов ХОБЛ с прогрессирующей бронхиальной обструкцией, а также указывающие на взаимосвязь TRPV4 с увеличением продукции воспалительных медиаторов в респираторном тракте больных лиц.

Впервые разработаны способы прогнозирования формирования ХОБЛ у курящих лиц и прогрессирования бронхиальной обструкции, использующие математический аппарат биномиальной логистической регрессии и учитывающие молекулярно-генетические биомаркеры и клинико-функциональные предикторы.

Теоретическая значимость

Получены новые данные о влиянии полиморфизмов генов TRP каналов на формирование ХОБЛ у курящих лиц и прогрессирование бронхиальной обструкции, что обосновывает их использование в качестве биомаркеров заболевания. Выявленные особенности экспрессии TRP каналов на макрофагах больных ХОБЛ, а также их взаимосвязь с выраженностью воспалительной реакции и клинико-функциональными характеристиками, позволяют говорить о вероятном участии данных белков в патогенезе заболевания и рассматривать их в качестве фармакологических мишеней при разработке новых подходов к терапии.

Практическая значимость и внедрение результатов

Разработан и внедрен в практику пульмонологического отделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (ДНЦ ФПД) способ прогнозирования риска формирования ХОБЛ среди курящих лиц, учитывающий данные о генотипе по полиморфизму rs2052030 гена *TRPM8* в комплексе с возрастом и индексом курения (патент на изобретение №2767923 от 06.08.2021 г.). Предложен способ прогнозирования прогрессирующей бронхиальной обструкции у пациентов с ХОБЛ на основании информации о носительстве С аллеля по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8*, частоте обострений заболевания, результата оценочного теста ХОБЛ и степени нарушения вентиляционной функции легких (заявка на выдачу патента на изобретение №2022119286 от 14.07.2022 г.).

Методология и методы 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 нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом №200н от 01.04.2016 МЗ РФ. Предметом исследования стало изучение роли TRP рецепторов в формировании клинко-функциональных особенностей ХОБЛ. Настоящее исследование представляет собой самостоятельный фрагмент темы государственного задания ДНЦ ФПД №062 «Новые молекулярные и клеточные механизмы патогенеза хронической обструктивной болезни» (№ гос. регистрации: 4А-А19-119011590166-4), выполненный на базе ДНЦ ФПД. Объектом исследования явились 238 человек: 134 больных ХОБЛ (средней, тяжелой и крайне тяжелой степени тяжести) и 104 курящих человека без признаков бронхиальной обструкции. Применялись

общеклинические, функциональные, культуральные, молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные и статистические методы исследования. Все пациенты дали письменное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом №133-Д/1 от 28.11.2019г, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике ДНЦ ФПД.

Положения, выносимые на защиту

1. Генотипы CC и GG по полиморфизму rs2052030 гена *TRPM8* являются биомаркерами формирования ХОБЛ среди курильщиков.
2. С аллель по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8* является биомаркером прогрессирования бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.
3. Больные ХОБЛ характеризуются увеличенной экспрессией канала TRPV1 на макрофагах.
4. Повышенная экспрессия TRPV4 на альвеолярных макрофагах больных ХОБЛ взаимосвязана с наличием прогрессирующей бронхиальной обструкции, а также сопутствующим увеличением продукции медиаторов воспаления.
5. Разработанные способы, учитывающие молекулярно-генетические и клиничко-функциональные биомаркеры, позволяют прогнозировать формирование ХОБЛ и прогрессирование бронхиальной обструкции при данном заболевании.

Степень достоверности полученных результатов

Степень достоверности результатов научной работы подтверждается проведением всех этапов работы с учетом рекомендаций для медицинских и биологических исследований, достаточным объемом материала, репрезентативностью выборки, применением современных методов исследования, использованием сертифицированного оборудования и реактивов, использование

лицензионных статистических программ. Для статистической обработки использовались прикладные программы Statistica 12.0 (StatSoft, Inc. 2014), NCSS 12 (StatSoft, Inc., 2018), REST 2009 V2.0.13 (Qiagen GmbH, 2009). Анализ данных производился с помощью параметрических и непараметрических методов вариационной статистики с проверкой нормальности распределения значений переменных. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Выводы соответствуют поставленным задачам, получены благодаря комплексному анализу данных.

Публикации результатов научного исследования

По материалам исследования опубликовано 9 печатных публикаций в ведущих рецензируемых научных журналах, в том числе входящих в 1 квартиль международной реферативной базы Web of Science, из них 5 - в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ, в том числе патент на изобретение.

Личный вклад соискателя

Автором диссертационного исследования самостоятельно проведен поиск и анализ современных литературных данных по теме, сформулированы цель и задачи научной работы. Соискатель принимала непосредственное участие в отборе и обследовании пациентов для включения в исследование, сборе и обработке материала пациентов для молекулярно-генетических и иммунофлуоресцентных исследований. Самостоятельно культивировала макрофаги из моноцитов периферической крови, выполнила методику определения уровней цитокинов и TRP рецепторов, провела генотипирование и анализ экспрессии, а также единолично составила базу данных и осуществила статистические расчеты, результаты которых отражены в выводах и оформлены в виде публикаций и докладов.

Апробация работы

Материалы работы доложены и обсуждены на Международном Конгрессе Европейского Респираторного Общества (6-9 сентября 2020г), Международной Конференции Американского Торакального общества (14-19 мая 2021г), IX Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (27-28 мая 2021г.), Научной конференции «Молодые ученые-науке» (08.02.2022г.), XXIII региональной научно-практической конференции «Молодежь XXI века: шаг в будущее» (24.05.2022г.).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, включает в себя 17 таблиц, 24 рисунка, 2 формулы для расчета данных, 240 источников литературы отечественных и зарубежных авторов.

Содержит: введение, 6 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, а также четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы.

**ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ
КАНАЛОВ С ТРАНЗИТОРНЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ
ПОТЕНЦИАЛОМ TRPA1, TRPV1, TRPV4, TRPM8
В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ
БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ
ОБСТРУКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

**1.1 Проблема хронической обструктивной болезни легких
в современной медицине**

ХОБЛ - это болезнь преимущественно малых бронхов, развивающаяся в ответ на действие патогенных частиц и газов. Характеризуется продуктивным неспецифическим воспалением в период ремиссии и экссудативным воспалением в период обострения, что приводит к персистирующему ограничению воздушного потока с вторичным изменением ацинуса [19]. В результате этих процессов возникает одышка, постепенно снижается переносимость физических нагрузок, что влечет за собой значительное снижение качества жизни пациентов [11, 145].

ХОБЛ - тяжелое заболевание, поражающее с каждым годом все больше людей, ассоциировано с высоким экономическим и социальным бременем [216]. ХОБЛ занимает 3-е место среди причин смерти, уступая место инфаркту миокарда и инсульту [147], в 2019г это заболевание унесло жизни 3,23 миллионов человек [224]. Ожидается, что к 2040 г число жертв увеличится до 4,4 миллионов [64]. Широко известно, что показатели смертности у больных ХОБЛ выше, чем в общей популяции. Lenoir A. et al. сообщили, что из 67516 человек лишь у 17,3% не было обострений заболевания в течение трех лет [139].

По данным масштабных исследований (BOLD, PLATINO), проводившихся в Австралии и странах Южной Америки, распространенность ХОБЛ у лиц старше 40 лет на уровне от 7,8% до 20%, в среднем 10,1% [113, 153, 210]. В Европе это показатель составляет в среднем 6,4% (в Чехии – 6,7%, в Великобритании - 4,5%). [48, 193, 233,]. В Соединенных Штатах Америки - около 12% [184]. В России распространенность ХОБЛ - 15,3%, а среди людей, регулярно подвергающихся воздействию сигаретного дыма, еще выше – 21,8% [4]. В нашей стране особенностью ХОБЛ является преобладание среднетяжелого и тяжелого течения с частыми обострениями, которые приводят к высокой частоте госпитализаций [4]. В последние годы доля женщин с ХОБЛ неуклонно растет, что связано с индивидуальной предрасположенностью, а также воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды [115]. Австралийские ученые сообщили, что бронхиальная астма (БА), сезонный поллиноз и синусит являются предикторами ХОБЛ у некурящих женщин [79]. Ожидается, что распространенность заболевания будет расти, что связано со старением человечества и загрязнением атмосферного воздуха [67]. По прогнозам Venjafield A. et al. в 2050 г. численность больных ХОБЛ составит более 49 млн человек, то есть 9,3% населения. Это означает, что распространенность увеличится на 39,6% [48].

Экономические расходы на одного больного с диагнозом ХОБЛ превосходят траты на больного БА в 3 раза, причем затраты на лечение ХОБЛ прямо пропорциональны степени тяжести заболевания. Терапия обострений наносит большой экономический ущерб здравоохранению [19]. В России экономический

ущерб от ХОБЛ с учетом не прямых затрат, в том числе абсентеизма (невыхода на работу) и презентеизма (менее эффективной работы, связанной с плохим самочувствием), составляет 170,3 млрд руб. (0,2% от внутреннего валового продукта) [10]. Еще одна важная проблема ХОБЛ – поздняя диагностика [3]. Многие люди на ранней стадии ХОБЛ не знают про заболевание, не хотят обращаться к врачу или считают появившиеся жалобы частью «нормального» старения. Это приводит к поздней диагностике, а также более тяжелым стадиям заболевания [210]. Даже в экономически развитых странах ранняя выявляемость осуществляется не более чем в четверти случаев. По некоторым данным, в США 13 млн живут с недиагностированным ХОБЛ [69].

ХОБЛ является важным фактором развития ишемической болезни сердца, фибрилляции предсердий, инфаркта миокарда, рака легких, гастроэзофагеального рефлюкса, тревоги и депрессии [9, 75]. Поскольку ХОБЛ входит в группу коморбидных заболеваний [7, 15, 22], его ранняя профилактика и современное патогенетическое лечение способны благоприятно повлиять на органы-мишени, то есть сердце, головной мозг и почки [80]. Легочная гипертензия у больных ХОБЛ протекает тяжелее, чем у пациентов с идиопатической легочной артериальной гипертензией. Несмотря на сходные гемодинамические нарушения, была достигнута наихудшая дистанция теста шестиминутной ходьбы [215]. Таким образом, легочная гипертензия как частый спутник ХОБЛ определяет неблагоприятный исход заболевания [74]. Исходно более низкий уровень объема форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ₁) связан с высокой вероятностью развития сахарного диабета, БА и смертности от всех причин [195].

ХОБЛ - это гетерогенное по патогенезу заболевание и его механизмы до конца не изучены. Эта гетерогенность также проявляется различными фенотипами заболевания, выделение которых позволяет индивидуализировать подход к диагностике и лечению данного заболевания [24]. Традиционно известно два фенотипа, в зависимости от преобладающей симптоматики: бронхитический («синие отечники») и эмфизематозный («розовые пыхтельщики») [23, 28]. У больных с преобладанием эмфиземы основной жалобой является

одышка разной степени выраженности. Также характерны мультиорганная потеря массы тканей (костной, мышечной, жировой) и высокий риск развития рака легких. Учитывая современные данные, научное сообщество предлагает называть данный фенотип MOLT-фенотипом (multiorgan loss of tissue phenotype, фенотип с мультиорганной потерей массы тканей) [62, 63]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе атрофии мышечной ткани, до конца не изучены. Считается, что ее причиной могут являться системное воспаление, окислительный стресс, клеточная гипоксия, отсутствие физической активности, истощение питательных веществ [132]. Системность воспаления при ХОБЛ подтверждается наличием воспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерферон- γ (IFN- γ) и интерлейкин (IL) -12p70) в биоптате латеральной широкой мышцы бедра [132]. У пациентов с бронхитическим типом преобладает кашель и отделение мокроты слизистого или гнойного характера. Этот фенотип ассоциируется с частыми обострениями, метаболическим синдромом, сердечно-сосудистыми заболеваниями (особенно хроническим легочным сердцем) и высокой смертностью [236].

Также, в зависимости от частоты обострений, выделяют фенотип с частыми (два и более обострения в год) и редкими обострениями (менее двух обострений в год). Обострения представляют собой пагубные события в естественном течении болезни, ускоряя снижение легочной функции, могут осложняться развитием острой дыхательной недостаточности, декомпенсации сердечно-сосудистых заболеваний, тромбоэмболии легочной артерии [6, 8, 21]. Фенотип с частыми обострениями характеризуется прогрессирующим снижением функции легких и, как следствие, худшим исходом заболевания. Обострения имеют долгосрочные последствия для здоровья, влияя на физическое состояние, качество жизни и смертность. Установлена прямая зависимость между проходимостью дыхательных путей и частотой обострений. Выявлено, что снижение ОФВ₁ связано с увеличением частоты обострений [111]. И наоборот, увеличение ОФВ₁ на 100 миллилитров (мл) коррелировало с более редкими обострениями [238]. Возникновение обострения связывают с бактериальной колонизацией нижних

дыхательных путей, которая вызывает локальное воспаление [27, 29]. Таким образом, большая проходимость дыхательных путей способствует лучшему клиренсу секрета с последующим снижением бактериальной колонизации, что приводит к снижению частоты обострений [194]. Выявлено, что у пациентов с частыми обострениями чаще регистрировались респираторные причины смерти [139]. При этом наибольшая смертность наблюдается среди больных с эмфизематозным фенотипом и частыми обострениями [4].

В ряду фенотипов выделяют overlap-синдром – сочетание ХОБЛ и БА. У людей с персистирующей БА функция легких нарушена с раннего детства [57], что в более зрелом возрасте может служить предиктором ХОБЛ. Для этих пациентов характерно обилие жалоб, частые обострения и госпитализации, а также, как ни парадоксально, более низкий уровень смертности по сравнению с ХОБЛ без БА [206]. Важно дифференцировать ХОБЛ с БА. Так, для БА характерна обратимость бронхиальной обструкции, о наличии которой судят по увеличению $ОФВ_1$ после действия бронхолитика: постбронходилатационный $ОФВ_1$ ($ОФВ_{16}$) увеличивается на 200 мл или на 12% по сравнению с исходной спирометрией [25]. Напротив, у пациентов с ХОБЛ постбронходилатационный тест приводит к незначительному улучшению $ОФВ_1$, что свидетельствует о необратимой обструкции. Постбронходилатационное отношение $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ (форсированная жизненная емкость легких) ($ОФВ_{16}/ФЖЕЛ_6$) < 0,70 подтверждает наличие стойкого ограничения воздушного потока и служит основным критерием диагностики ХОБЛ [25, 117].

Клиническая картина ХОБЛ складывается из обострений и периодов ремиссии. В условиях длительного воздействия факторов риска ХОБЛ развивается медленно, прогрессирует постепенно. Длительное время заболевание протекает без клинических проявлений. Основными жалобами, с которыми пациенты обращаются к врачу, являются кашель (часто с отделением мокроты), одышка при физической нагрузке. По мере прогрессирования заболевания одышка может нарастать и беспокоить в покое, затрудняя повседневную деятельность [18]. Во время обострения возникает ухудшение общего состояния, нарастание

интенсивности кашля, усиление одышки, увеличение объема мокроты, усиление гнойности мокроты. Возможно повышение температуры тела. Одновременно ухудшаются показатели функции внешнего дыхания и газов крови [120]. Выраженная одышка является фактором риска смерти у пациентов с ХОБЛ [164]. Кроме того, пациенты с частыми обострениями испытывают выраженную одышку вследствие гиперкапнии [193]. Большинство обострений связано с бактериальными или вирусными инфекциями. Даже при стабильном течении ХОБЛ из дыхательных путей могут быть выделены бактериальные патогены (*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* и *Pseudomonas aeruginosa*). Выявлено, что в 40% случаев обострение связано с вирусной инфекцией. Первичные вирусные патогены включают риновирус, грипп А, респираторно-синцитиальный вирус [111, 225]. У таких пациентов наблюдается более выраженное воспаление, обострения происходят чаще, характерно прогрессирование бронхиальной обструкции [29]. Соотношение нейтрофилов к лимфоцитам и эозинофилы крови при стабильной фазе ХОБЛ связаны с будущими обострениями и демонстрируют достаточную продольную достоверность [78].

В целом, диагностика ХОБЛ состоит из трех аспектов: совокупности характерных для ХОБЛ жалоб, наличия факторов риска и данных спирометрии. На протяжении нескольких десятилетий объем форсированного выдоха за одну секунду является золотым стандартом в оценке ХОБЛ [85]. Согласно Глобальной инициативе по хронической обструктивной болезни легких (GOLD) выделяют четыре степени ограничения воздушного потока: $ОФВ_{16}$ более 80% - легкая степень, $ОФВ_{16}$ в пределах 50-79% - средняя степень, $ОФВ_{16}$ 30-49% - тяжелая степень, $ОФВ_{16}$ менее 30% - крайне тяжелая степень тяжести ХОБЛ [25, 92]. Поскольку для больных ХОБЛ характерно персистирующее ограничение скорости воздушного потока, необходимо отслеживать снижение $ОФВ_{16}$ в динамике, что очень важно для прогнозирования течения ХОБЛ и персонализированной терапии.

Критерием прогрессирования бронхиальной обструкции считается снижение $ОФВ_{16}$ на 50 мл в год [117, 166]. Так, если в течение года у пациента с ХОБЛ показатель $ОФВ_{16}$ уменьшается более чем на 50 мл, говорят о прогрессировании бронхиальной обструкции [155], для которой характерно состояние гипоксии, трансформирующейся в гипоксемию [99]. Снижение $ОФВ_{16}$ менее 50 мл в год свидетельствует об отсутствии прогрессирования бронхиальной обструкции. Наибольшая динамика снижения $ОФВ_{16}$ наблюдается на начальных стадиях ХОБЛ, далее ухудшение функции легких замедляется [50]. Не стоит забывать, что существует «нормальное» снижение функции легких, обусловленное старением (которое начинается с третьей декады жизни), при этом $ОФВ_{16}$ снижается до 25 мл в год и не сопровождается одышкой [177]. Если у человека без обструкции $ОФВ_{16}$ имеет граничные значения (несколько превышает 80% от должного) и при повторной спирограмме через 18 месяцев $ОФВ_{16}$ снижается на 40 мл, то можно прогнозировать у пациента дебют ХОБЛ в течение 5 лет. Таким образом, этот период «тишины» (немой период) можно назвать пре-ХОБЛ [186]. Данная группа пациентов нуждается в пристальном внимании, как со стороны здравоохранения, так и самого пациента. Отказ от курения, спирометрические пробы, своевременно назначенная терапия, легочная реабилитация могут значительно отсрочить осложнения данного заболевания и улучшить прогноз [177]. Как указывалось [24], гетерогенность патогенеза ХОБЛ проявляется различными фенотипами, однако определяют эту гетерогенность экзогенные (воздействие табака, пыли, вредных газов, продуктов сжигания биомассы) и эндогенные (нарушение правильного формирования легких в детстве, старение организма, генетическая предрасположенность) факторы риска. Суммация данных факторов приводит к заболеванию. Предиктором заболевания является курение, которое распространено как среди мужчин, так и женщин. К тому же, не стоит забывать, что пассивное курение также играет немаловажную роль в развитии ХОБЛ [232]. Воздействие сигаретного дыма способствует носительству *Streptococcus pneumoniae* в носоглотке, изменяет врожденные иммунные механизмы слизистой носа и разрушает эпителиальные барьеры [213].

Курение электронных сигарет представляет собой серьезную проблему. Несмотря на мнение, что парение электронных сигарет безопаснее обычных сигарет, многочисленные эпидемиологические исследования показывают обратное. Жидкость для электронных сигарет, из которой генерируется вдыхаемый аэрозоль, содержит пропиленгликоль, никотин в различных концентрациях, растительный глицерин, ароматизаторы и другие химические вещества. Аэрозоль, называемый также паром, состоит из мелкодисперстных частиц, содержащих многочисленные токсические соединения, такие как акролеин, толуол, ацетальдегид, формальдегид. Предполагается, что пользователи электронных сигарет более подвержены развитию рака и БА [60]. Даже после однократного использования электронных сигарет возникает окислительный стресс и дисфункция эндотелиальных клеток. У пользователей электронных сигарет повышался уровень системных маркеров воспаления (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, IFN- γ , RAGE (рецептор конечных продуктов гликирования белков) и MMP-9 (матриксная металлопротеиназа 9)), также были повышены уровни факторов роста (EGF (эпидермальный фактор роста), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), β -NGF (фактор роста нервов), PDGF-AA (фактор роста тромбоцитов-AA), SCF (фактор стволовых клеток), HGF (фактор роста гепатоцитов) и PlGF (плацентарный фактор роста)) [65]. Таким образом, использование электронных сигарет отрицательно влияет на окислительный стресс, воспаление и ремоделирование тканей. Отказ от курения является решающим для первичной и вторичной профилактики заболевания [37]. Однако курение не является необходимой причиной ХОБЛ: у многих курильщиков не развивается ХОБЛ, а некоторые пациенты с ХОБЛ никогда не курили [189]. Среди злостных курильщиков ХОБЛ формируется менее чем у 50% в течение жизни [149, 183]. По некоторым данным, ХОБЛ поражает от 15 до 30% курильщиков [46].

Воздействию пыли, вредных газов, продуктов сжигания биомассы подвержено не только население развивающихся стран, отапливающее жилье биотопливом, но и жители крупных мегаполисов [19, 144]. Работы, связанные с пылью, содержащей кадмий и кремний, гипс, битум относятся к самым опасным

профессиональным факторам по развитию ХОБЛ [13]. Строители, шахтеры, железнодорожники, работники металлургической и целлюлозно-бумажной промышленности имеют повышенный риск приобрести данное хроническое заболевание легких [96]. Очень важен тот факт, что курение потенцирует негативное воздействие пыли и других факторов риска. Ramírez-Venegas A. et al. сообщили, что воздействие биомассы на больных ХОБЛ приводит к медленному снижению $ОФВ_1$ в течение нескольких лет [180], однако курение потенцирует негативное воздействие аэрополлютантов, что проявляется прогрессированием обструкции [117].

Не только курение и вдыхание пылевых частиц могут приводить к ХОБЛ, но и нарушение роста легких в детстве, которое может привести к ограничению скорости воздушного потока в пожилом возрасте [102]. Фиксация научного сообщества на курении как на причине ХОБЛ привела к тому, что большинство крупных рандомизированных контролируемых исследований исключили некурящих из испытаний [102]. К тому же существует дефицит информации о вкладе генетических аспектов в развитие ХОБЛ, поскольку нельзя отрицать сложное взаимодействие окружающей среды и генома. Влияние наследственности на функцию легких и развитие ХОБЛ оценивают в 38-50% [198]. В настоящее время идет активный поиск молекулярно-генетических детерминант этого тяжелого заболевания. Редкие генетические варианты вносят существенный вклад в развитие ХОБЛ. Одним из них является редкий вариант *SERPINA1* (ген, связанный с дефицитом α_1 -антитрипсина), оказывающий кумулятивное воздействие на концентрацию α_1 -антитрипсина, функцию легких и эмфизему у курильщиков [169, 199]. Jarenbäck et al. выяснили, что некоторые ОНП гена *SUMF1* (модифицирующий сульфатазу фактор 1) ассоциированы с нарушением функции легких, ХОБЛ и эмфиземой. Эти генетические варианты *SUMF1* могут вызывать дефицит сульфатного баланса во внеклеточном матриксе легочной ткани, способствуя ремоделированию дыхательных путей и развитию ХОБЛ [114]. Отсутствие минорного аллеля (гомозиготность по основному аллелю) rs2276109 гена, кодирующего матриксную металлопротеиназу-12 (MMP-12),

ассоциировалось с увеличением риска ХОБЛ на 54% [109]. Показано, что rs2070600 гена *AGER* влияет на уровень системных растворимых рецепторов конечных продуктов повышенного гликозилирования (sRAGE) в мокроте, коррелирует со снижением функции легких, эмфиземой и прогрессированием ХОБЛ [82, 127]. Многообещающими являются исследования генов TRP: полиморфизм rs3744683 гена *TRPV1* связан с риском ХОБЛ у курильщиков в популяции хань [229], а из 6 исследованных полиморфизмов гена *TRPM8* в китайской популяции 2 связаны с ХОБЛ, 5 – с легочной гипертензией, осложняющей течение ХОБЛ [227], полиморфизмы *TRPV4* также связаны с ХОБЛ [237]. Эпигенетические механизмы могут частично объяснить взаимодействие экзо- и эндогенных факторов риска. Например, метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), вызванное курением, приводит к нарушению экспрессии гена и изменению метаболизма клеток. В частности, метилирование *CYP1B1*, гена, участвующего в метаболизме ксенобиотиков, в буккальном эпителии коррелировало с функцией легких и эмфиземой у женщин [130].

Постоянно продолжаются поиски новых биомаркеров ХОБЛ. Например, начальные изменения малых бронхов предлагают прогнозировать по азотному тесту [36], уровень С-реактивного белка (СРБ) коррелирует с уровнем смертности от ХОБЛ [58], высокий уровень фибриногена связан с риском осложнений этого респираторного заболевания [152], эозинофилия связана с обострениями, а также с реакцией на ингаляционные глюкокортикостероиды [173], а спирометрический показатель $СОС_{25-75}$ может служить биомаркером развития ХОБЛ у курильщиков [46]. Обилие предлагаемых эндофенотипов не разрешает проблему ранней диагностики ХОБЛ и прогнозирования прогрессирования бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ. Требуется подробное изучение механизмов развития ХОБЛ для выявления маркеров заболевания.

1.2 Макрофаги как центральное звено патогенеза хронической обструктивной болезни легких

Патогенетически ХОБЛ является болезнью малых дыхательных путей (с внутренним диаметром менее 2мм [77]), как уже говорилось, это заболевание запускается вдыханием вредных частиц, развитием обструкции и респираторными симптомами, включая кашель, выделение мокроты и одышку [200]. На гистологическом уровне наблюдается инфильтрация стенок дыхательных путей иммунными клетками, гиперсекреция слизи, ремоделирование дыхательных путей [106]. Эти патологические изменения вызывают сужение мелких бронхов, увеличивая сопротивление воздушному потоку. То обстоятельство, что на выдохе воздух выходит из легких не полностью, приводит к появлению воздушных ловушек, ведущих в свою очередь к гиперинфляции, клинически проявляющейся одышкой [1, 71].

Механизмы, лежащие в основе ХОБЛ, плохо изучены, но, по-видимому, решающую роль играет хроническое воспаление и окислительный стресс [40]. Cosio M.G. et al. предложили очень четкую, лаконичную схему патогенеза ХОБЛ [68], согласно которой это заболевание является аутоиммунным и развивается под действием сигаретного дыма и пылевых частиц, а патогенез состоит из трех этапов.

На первом этапе вдыхание раздражающих веществ (таких как сигаретный дым, аэрополлютанты, продукты сжигания биотоплива), активирует врожденный иммунный ответ, что приводит к привлечению большого количества нейтрофилов и макрофагов. В норме также активизируется мукоцилиарный клиренс, за счет чего из дыхательных путей удаляются патогенные частицы. С возрастом способность к «самоочищению» снижается [207]. Для пациентов с ХОБЛ характерна мукоцилиарная дисфункция, которая проявляется повышением проницаемости эпителия, нарушением работы цилиарного аппарата [87]. Эти процессы приводят к более длительной экспозиции патогенных частиц в дыхательных путях. Каким образом сигаретный дым и пылевые частицы активируют иммунные клетки, неизвестно. Существуют гипотезы прямой активации клеток липополисахаридами сигаретного дыма, а также опосредованно,

путем активации иммунных клеток продуктами клеточного распада. Последние образуются вследствие повреждения респираторного эпителия активными формами кислорода и азота. К продуктам клеточного распада, или DAMP (damage associated molecular pattern – ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны), относятся ДНК, рибонуклеиновая кислота (РНК), белки теплового шока и др. [187]. Эти молекулы активируют Toll-подобные рецепторы эпителиальных клеток и макрофагов. В результате активируется NFκB и высвобождаются различные липидные и пептидные медиаторы, цитокины и хемокины (IL-1b, IL-6, IL-8, хемотаксический белок моноцитов 1 (MCP-1), ICAM-1 (молекула клеточной адгезии 1), трансформирующий фактор роста бета 1 (TGFβ-1), TNF-α) [42], привлекая воспалительные клетки, преимущественно моноциты и нейтрофилы. Последние продуцируют протеолитические ферменты и активные формы кислорода и азота, способствуя большему повреждению эпителия и соединительной ткани. У предрасположенных к ХОБЛ лиц воспаление не самоограничивается по неизвестным причинам, что приводит к возникновению провоспалительного «порочного круга» с продуктами нейтрофильной деградации внеклеточного матрикса, который проявляет себя как хемоаттрактант, увеличивая приток новых воспалительных клеток. Возможно, это связано с нарушением эффероцитарного клиренса нейтрофилов, что проявляется нерегулярным воспалением при ХОБЛ. Однако, наиболее вероятно, что ключевая роль принадлежит функциональной неполноценности макрофагов. Имеются многочисленные данные, подтверждающие нарушение фагоцитарной активности макрофагов [118]. Если в ответ на пылевые частицы и сигаретный дым воспаление самостоятельно завершается, то не происходит и Т-клеточной активации и презентации аутоантигенов. Заболевание не развивается, либо формируется хронический необструктивный бронхит [68].

Второй этап заключается в презентации антигенов макрофагами CD4+ Т-лимфоцитам. Антигенпрезентирующие клетки секретируют IL-12, способствующий дифференцировке Th0 лимфоцитов в Th1-клетки. Последние начинают продуцировать широкий спектр хемокинов, поддерживая обновление и

дифференцировку макрофагов и лимфоцитов. Эффективность презентации антигенов и активность процессов, происходящих на данном этапе, определяет дальнейшее прогрессирование заболевания и коррелирует с тяжестью бронхиальной обструкции [68].

На третьем этапе продолжает нарастать клеточная инфильтрация макрофагами и нейтрофилами, продуцирующими протеолитические ферменты (ММР-2,-9,-12, эластазу), в результате чего повреждается эпителий и происходит ремоделирование дыхательных путей. Помимо активации CD4+, увеличивается количество CD8+ цитотоксических клеток, которые посредством перфорина и гранзимов атакуют клетки респираторного эпителия. В-лимфоциты, превращаясь в плазматические клетки, производят антитела. Антитела формируют иммунные комплексы, активируется система комплемента, что приводит к еще более выраженному повреждению легочной ткани. Этот факт подтверждается высоким содержанием В-клеток в лаважной жидкости, ассоциированным с эмфизематозными изменениями легочной ткани [178]. Увеличение клеточного «дебриса», присоединение бактериальной инфекции провоцируют дополнительный выброс антигенов, что «зацикливает» воспалительный процесс. Клинически это проявляется прогрессированием бронхиальной обструкции [82].

Макрофаги принимают участие на всех этапах патогенеза ХОБЛ, инициируя заболевание, поддерживая иммунные реакции и «зацикливая» воспаление. Многочисленными исследованиями подтверждено, что у больных ХОБЛ наблюдается существенное увеличение количества макрофагов в легочной паренхиме, дыхательных путях, а также образцах бронхоальвеолярного лаважата и мокроты [2].

Макрофаги удаляют клеточный детрит, а также принимают непосредственное участие в иммунном надзоре и разрешении воспаления [59] - эти клетки являются авангардом, стоящим на защите легких от повреждающих факторов. Макрофаги патрулируют эпителиальные поверхности дыхательных путей и сталкиваются с натиском огромного количества аберрантных биотических и абиотических агентов [174]. Увеличение макрофагов в мокроте и легочной

ткани у пациентов с ХОБЛ является доказательством участия макрофагов в патогенезе заболевания. Способность макрофагов продуцировать большинство медиаторов, экспрессирующихся в легочной ткани, также свидетельствует о ключевой роли этих клеток в патофизиологических процессах, характерных для ХОБЛ [47]. Макрофаги модулируют воспаление, определяют развитие и прогрессирование ХОБЛ [32]. В ответ на воздействие сигаретного дыма и твердых частиц макрофаги высвобождают широкий спектр цитокинов, запуская реакции врожденного и адаптивного иммунитета. Микросреда легких чрезвычайно динамична вследствие воздействия бактерий и раздражителей окружающей среды. Это приводит к высокой модулирующей способности иммунного ответа, осуществляемой макрофагами в результате поляризации. Признано, что строгая дихотомия макрофагов на M1 и M2 клетки упрощена, поскольку возможен широкий диапазон фенотипов макрофагов. Однако эта классификация по-прежнему широко используется в научной литературе [45]. M1 и M2 макрофаги характеризуются различной экспрессией поверхностных маркеров, продукцией специфических цитокинов и реализацией биологической активности [39, 235].

Дифференциация провоспалительных M1 макрофагов из недифференцированных M0 макрофагов опосредуется мощными индукторами: INF- γ , липополисахаридами (LPS) клеточной стенки бактерий, а также цитокинами, например, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и TNF- α [39, 59]. M1 макрофаги высвобождают провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-12, IL-15, IL-23 и IL-1 β), образуют активные формы кислорода и реактивные промежуточные соединения азота посредством индуцируемой iNOS. Кроме того, для данных клеток характерна высокая антигенпрезентирующая способность [39, 190]. Таким образом, M1 макрофаги проявляют противомикробную, цитотоксическую активность, оказывают иммуностимулирующие эффекты [39, 148, 190]. В отличие от M1 макрофагов, M2 макрофаги выполняют свою роль в моделировании воспаления, поддерживая ангиогенез, удаляя клеточный дебрис, ремоделируя ткани [17]. M2 фенотип индуцируется несколькими факторами, что приводит к

подмножеству фенотипов, именуемых M2a, M2b, M2c. IL-4 и IL-13 инициируют подтип M2a, что способствует уменьшению провоспалительных цитокинов и супероксидных анионов. Этими цитокинами регулируются металлопротеиназы, бета-2 интегрины, активатор плазминогена тканевого типа [39]. Макрофаги дифференцируются в M2b иммунным комплексом, лигандами рецептора IL-1 и LPS. M2b характеризуется повышенной продукцией IL-10 [39, 235]. M2c запускается глюкокортикоидами, TGF β -1 или IL-10 и характеризуется низкой продукцией провоспалительных цитокинов [20]. Wang Q. et al. предложили дополнительный подтип, M2d, стимулируемый факторами, ассоциированными с опухолью, и демонстрирующий сниженную экспрессию IL-12 и повышенное высвобождение IL-10 [220].

ХОБЛ проявляет себя как дисфункциональная патология, управляемая макрофагами. Некоторые авторы сообщают о двойной поляризации макрофагов у пациентов с ХОБЛ, то есть им присущи про- и противовоспалительные функции и, как следствие, маркеры, характерные для M1 и M2 макрофагов [45, 208]. Vazzan E. et al. сообщили, что эта двойная позитивность макрофагов становилась очевиднее по мере прогрессирования заболевания. Авторы предположили, что макрофаги могут переключать поляризацию в зависимости от микроокружения [45]. С другой стороны, Takiguchi H. et al. исследовали фенотипическое распределение макрофагов в бронхоальвеолярном лаваже пациентов с ХОБЛ и выяснили, что четверть макрофагов не определялись ни как M1, ни как M2. Двойные негативные макрофаги у пациентов с ХОБЛ встречались чаще, чем у здоровых людей [208].

Из недавних исследований стало известно, что макрофаги поддаются перепрограммированию, что приводит к изменению липидного метаболизма, зависящего от степени тяжести ХОБЛ [90]. Возможно, это приводит к дефекту эффероцитоза альвеолярных макрофагов больных ХОБЛ, который сопровождается нарушением способности удалять клеточный дебрис и мертвые либо поврежденные клетки [105, 231]. Предполагается, что дефекты фагоцитоза и эффероцитоза альвеолярных макрофагов могут способствовать бактериальной

колонизации и, как следствие, увеличивать риск обострения ХОБЛ [231]. Известно, что даже при 20-кратном увеличении количества макрофагов мокроты больных ХОБЛ, персистирует колонизация легких различными видами бактерий, такими как *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis* [47, 231]. Singh R. et al. сообщили, что дефектный фагоцитоз *H. influenzae* макрофагами (полученными из моноцитов пациентов с ХОБЛ) связан с частотой обострений ХОБЛ. При этом именно провоспалительная активность макрофагов способствовала прогрессированию заболевания, что противоречит изложенным выше фактам [202]. Известно, что М1 макрофаги продуцируют высокие уровни IL-8 и GM-CSF, которые в свою очередь стимулируют рекрутирование нейтрофилов и дифференцировку новых макрофагов [47, 101]. TNF- α и трансформирующий TGF β -1, секретируемые М1 макрофагами, представляют собой хорошо известные медиаторы воспаления дыхательных путей, связанного с курением, а также играют существенную роль в прогрессировании ХОБЛ [125]. М2 макрофаги также определяются в бронхоальвеолярном лаваже пациентов с ХОБЛ, их продукцию поддерживают IL-4, IL-13, IL-10. Существует противоречивость данных в отношении влияния сигаретного дыма на фенотип макрофагов. Lee J.W. et al. сообщили, что в вышеописанных условиях макрофаги дифференцируются в сторону поляризации М2 макрофагов наряду с экспрессией MMP-12 [135]. Последняя, по-видимому, индуцируется М2 макрофагами, препятствует воспалению и способствует ремоделированию тканей, что играет решающую роль в развитии эмфиземы у мышей [134]. Эти данные подтверждаются результатами исследования факталиа, нейтрофильной эластазы и MMP-12 в сыворотке крови, последние напрямую связаны с тяжестью заболевания у пациентов с эмфизематозным фенотипом и частыми обострениями [103]. Таким образом, MMP считаются критически важными для разрушения внеклеточного матрикса и усиления иммунного ответа [188]. Эти процессы связаны с деструкцией ткани, и, как следствие, с эмфиземой [32, 47]. Есть предположение, что некоторое преобладание М2 макрофагов над М1 клетками ухудшает сдерживание воспаления с сопутствующей индукцией ремоделирования легочной ткани [59].

Согласно другим данным, экстракт сигаретного дыма *in vitro* индуцирует провоспалительную активность макрофагов больных ХОБЛ, что проявляется повышенной экспрессией iNOS, которая поддерживает окислительный стресс, являющийся важным звеном в патогенезе ХОБЛ [45, 135]. Исследователи сообщали, что сигаретный дым способствовал высвобождению провоспалительных цитокинов (IL1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α) [55]. Эти молекулы повышены при ХОБЛ и связаны с развитием стойкого воспаления, эмфиземы и образования слизи в экспериментальных условиях [135]. С другой стороны, есть мнение, что макрофаги способствуют развитию ХОБЛ невоспалительным образом из-за их индуцированного курением перепрограммирования в сторону M1-деактивированных и частично M2-поляризованных макрофагов [197]. Большое количество экспериментов *in vivo* и *in vitro* [45, 47, 101, 125, 134, 135], проводимых на различных биологических жидкостях человека и животных (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, сыворотка крови, культура макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови) представляет широкий спектр данных об особенностях поляризации, которые порой противоречат друг другу, иногда дополняют общее представление об особенностях макрофагов больных ХОБЛ. Однако четкого представления об этой проблеме пока не существует. Исследование поляризации макрофагов больных ХОБЛ, особенности секреции про- и противовоспалительных цитокинов и факторов ремоделирования данными клетками может пролить свет на патогенетические механизмы ХОБЛ.

Помимо воспаления, важную роль в патофизиологии ХОБЛ играет окислительный стресс. Вдыхаемые раздражающие частицы (сигаретного дыма, пыли и прочее) повышают уровень окислительного стресса у больных ХОБЛ, что проявляется образованием активных форм кислорода. Запускается «порочный круг»: активные формы кислорода стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, рекрутируются воспалительные клетки, это приводит к образованию активных форм кислорода и усилению окислительного стресса. Окислительный стресс вызывает повреждение ДНК, а у пациентов с ХОБЛ существует нарушение репарации двухцепочечных разрывов ДНК, что отражает снижение

антиоксидантной защиты вследствие повышения уровня окислительного стресса [41].

Окислительный стресс, являясь важным звеном патогенеза ХОБЛ, тесно взаимосвязан с макрофагами. Активные формы кислорода и азота отрицательно влияют на функционирование макрофагов. И наоборот, макрофаги являются важным источником этих соединений, поскольку образуются в процессе фагоцитоза [70].

Эта особенность имеет биологические и клинические последствия. Tran H.V. et al. сообщили, что окислительный стресс снижает экспрессию маннозо-связывающего лектина в альвеолярных макрофагах пациентов ХОБЛ, что отрицательно влияет на активность клеток. Так при окислении маннозо-связывающего лектина нарушается эффероцитоз апоптотических клеток и фагоцитоз патогенов [212]. Другие исследователи предположили, что выраженный окислительный стресс при ХОБЛ может нарушать митохондриальную функцию и снижать метаболизм макрофагов [49]. С другой стороны, окислительный стресс может возникать вторично, вследствие дефектного фагоцитоза и aberrантной поляризации [70].

При использовании антиоксидантных соединений возможно добиться противовоспалительного эффекта. Например, экстракт прополиса восстанавливал повреждение легких, вызванного сигаретным дымом, в модели эмфиземы у мышей за счет уменьшения концентрации активных форм кислорода. Также происходило инициирование макрофагов в фенотип M2 с высвобождением IL-10, что способствовало противовоспалительному микроокружению [43].

Известно, что в макрофагах TRPV4 способствует образованию активных форм кислорода и азота, регулирует фагоцитоз, что приводит к клиренсу бактерий и разрешению инфекции. TRPV4, являясь механочувствительным рецептором, активирует клетки врожденного иммунитета и устанавливает «провоспалительную петлю» при фиброзных заболеваниях с отложением внеклеточного матрикса и жесткостью субстрата [154].

ХОБЛ, являясь гетерогенным заболеванием, патофизиологически определяются несколькими процессами, в которых макрофаги играют решающую роль: воспаление дыхательных путей, повреждение легочной ткани и ремоделирование дыхательных путей. Совокупность литературных данных позволяет предположить, что различные фенотипы макрофагов, взаимодействуя, могут влиять на формирование ХОБЛ и прогрессирование бронхиальной обструкции [84]. Дисфункция макрофагов является приоритетным объектом для исследования, поскольку макрофаги представляют собой ключевой элемент для полного понимания механизмов патогенеза и разработки новых подходов к терапии ХОБЛ. Многие исследования по изучению роли макрофагов в патогенезе ХОБЛ проводились на животных моделях, поэтому необходимо проведение дальнейших исследований на макрофагах человека, чтобы верифицировать полученные результаты [70].

1.3 Роль TRP каналов в патогенезе хронической обструктивной болезни легких

Истоки патогенеза ХОБЛ следует искать на этапе взаимодействия патогенных факторов (сигаретный дым, пылевые частицы) с клетками врожденного иммунитета, сопровождающегося процессами активации фагоцитоза и перекисного окисления липидов. Современные данные указывают, что возможно специфическое воздействие частиц сигаретного дыма и аэрополлютантов на клетки, опосредованное TRP каналами [122, 219].

TRP рецепторы представляют собой белки, расположенные на цитоплазматической мембране (внеклеточно) либо на эндоплазматическом ретикулуме (внутриклеточно). Эти рецепторы чувствительны к довольно широкому спектру химических и физических (термо-, осмо-, механо-, фоторецепция) стимулов экзогенной и эндогенной природы. Семейство TRP подразделяется на 7 подсемейств: TRPA, TRPV, TRPM, TRPC, TRPML, TRPP, TRPN. TRPN встречается только у беспозвоночных и рыб, экспрессия остальных

рецепторов подтверждена у человека [151]. Учитывая мультимодальность TRP рецепторов в отношении воспринимаемых стимулов и опосредуемых эффектов, интерес мирового научного сообщества к этим рецепторам значительно возрос за последнее десятилетие.

Чувствительные волокна, иннервирующие дыхательные пути, выполняют рецепторную функцию, опосредуют защитный рефлекторный ответ, ограничивая воздействие сигаретного дыма, пылевых частиц, продуктов сжигания биотоплива. Обычно это достигается с помощью воспаления, секреции слизи, сужения просвета бронхов, а также кашля и чихания. На молекулярном уровне большинство этих реакций опосредуется активацией TRP рецепторов [97].

Каналы TRP обнаружены на нейронах и ненейрональных клетках (эпителии дыхательных путей, иммунных, воспалительных, гладкомышечных клетках). Наибольший интерес с точки зрения спектра своей функциональной активности в респираторном тракте представляют TRPA1, TRPV1, TRPV4 и TRPM8 [217].

TRPA1 это единственный представитель анкиринового подсемейства каналов с транзиторным рецепторным потенциалом. Представляет собой ионный канал, проницаемый для ионов Na^+ и Ca^{2+} , чем и опосредуется биологический эффект. У здорового человека активация TRPA1 способна вызвать кашель (провоцируемый респираторным раздражителем) и бронхоспазм (для минимизации воздействия раздражителя). Активирующими стимулами для TRPA1 могут служить горчичное масло, васаби, низкая температура ($<17^\circ\text{C}$), широкий спектр едких соединений и раздражителей окружающей среды, таких как акролеин, каннабиноиды, формальдегид, коричный альдегид, кротоновый альдегид, слезоточивые газы, тяжелые металлы, анестетики (изофлуран, лидокаин), никотин [95,123]. Исследования показали важность TRPA1 в реализации нормального кашлевого рефлекса. В присутствии антагониста TRPA1 кашель, вызванный у морских свинок и людей, уменьшался [53]. Есть сообщения о защитной роли TRPA1 в модуляции тонуса дыхательных путей. В результате эксперимента было показано, что компоненты сигаретного дыма вызывают сокращение изолированных бронхиальных колец морской свинки путем

активации TRPA1 на чувствительных нейронах. В результате активации канала происходит высвобождение тахикинина, который воздействует на гладкомышечные клетки, инициируя сокращение [36].

Кроме того, TRPA1 участвует в высвобождении провоспалительных медиаторов различными ненейрональными клетками [95]. TRPA1 активируется некоторыми эндогенными медиаторами, такими как активные формы кислорода и азота [35]. Экспрессия TRPA1 увеличивалась в ответ на воздействие воспалительных факторов TNF- α , IL-1 β и IFN- γ . Дексаметазон подавлял экспрессию гена *TRPA1* в клетках A549 вследствие снижения стабильности мРНК [150]. Установлено, что агонист TRPA1 (СА) ингибирует iNOS, подавляя активность NF κ B в макрофагах. Аналогичный эффект был получен на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови: СА угнетал секрецию IL-1 и TNF- α , индуцированную LPS [66]. Несмотря на это, активация TRPA1 на макрофагах сопровождается увеличением продукции IL-8 [81]. Также известно, что блокада TRPA1 провоцировала снижение количества эозинофилов и макрофагов в бронхоальвеолярном лаваже при воздействии аллергена [230]. Таким образом, эффект TRPA1 в основном противовоспалительный, однако активация этого канала сопровождается повышением продукции IL-8.

TRPV1 признан «молекулярным шлюзом» к ноцицептивным ощущениям в различных тканях тела, может активироваться широким спектром химических (кислоты), физических (тепло), биологических (капсаицин) стимулов. TRPV1 в большом количестве экспрессируются на первичных чувствительных нейронах, иннервирующих все дыхательные пути от носа до альвеол, включая кровеносные сосуды и гладкие мышцы [95]. Этот канал способен активироваться провоспалительными медиаторами, что говорит о важной роли TRPV1 в воспалении, а также патогенезе некоторых заболеваний. В эксперименте у животных и человека кашель, вызванный с помощью капсаицина и лимонной кислоты (агонисты TRPV1), подавлялся с помощью антагониста TRPV1 [95]. Следовательно, TRPV1 также участвует в реализации нормального кашлевого

рефлекса - стимуляция эпителиальных клеток капсаицином, агонистом TRPV1, индуцировала дозозависимое высвобождение IL-8, аналогично TRPA1 [91]. TRPV1 играет важную роль в проявлении симптомов гиперчувствительности бронхов у пациентов с воспалительными заболеваниями дыхательных путей [137].

TRPV4 активируется осмотическими, физическими раздражителями (включая повышение температуры окружающей среды), а также эндогенными и экзогенными химическими стимулами (кислый pH, анандамид, метаболиты арахидоновой кислоты). Канал широко экспрессируется на ненейронных клетках: эпителиальных клетках дыхательных путей, фибробластах, воспалительных клетках, включая альвеолярные макрофаги и мононуклеарные клетки [54, 172].

TRPM8 активируется низкими температурами, а также охлаждающими соединениями (ментолом, ицилином, эвкалиптолом) [34]. Аfferентные нервы блуждающего нерва в дыхательных путях крыс экспрессируют рецепторы TRPM8, активирующиеся при низких температурах, однако процент клеток, экспрессирующих этот канал, невелик [227]. Ментол активирует TRPM8 в чувствительных нервных волокнах языка, вызывая ощущение свежести когнитивной иллюзии потока воздуха в дыхательных путях [119]. В эксперименте жевательная резинка с ментолом перед физической нагрузкой обеспечивала уменьшение одышки у трети пациентов с ХОБЛ и уменьшение дискомфорта в грудной клетке у двух третей испытуемых [179]. Являясь полимодальными преобразователями, TRP рецепторы могут быть активированы в одной и той же клетке одним и тем же химическим соединением. Поскольку TRPA1 и TRPV1 могут активироваться рядом эндогенных медиаторов воспаления, вполне вероятно, что они могут активироваться во время воспаления дыхательных путей [159]. Lin Y.J. et al. сообщили, что одновременная активация TRPA1 и TRPV1 их соответствующими селективными агонистами в околопороговых концентрациях вызывает резкий потенцирующий эффект [143].

Предполагается важное участие TRP каналов в патогенезе ХОБЛ [73]. TRPA1 является основным нейронным датчиком окислительного стресса, уровень

которого увеличивается при ХОБЛ [142]. В сигаретном дыме, который вдыхает большинство курильщиков, содержатся α,β -ненасыщенные альдегиды, кротоновый альдегид и акролеин [36]. Эти вещества, посредством активации TRPA1, способны вызывать раздражение и воспаление в дыхательных путях. Несмотря на то, что никотин может напрямую активировать TRPA1, его концентрация в сигаретном дыме недостаточна [136]. Активировать TRPA1 способны твердые частицы древесного дыма [196], а также частицы выхлопных газов дизельных двигателей [185]. TRPA1 экспрессируется на различных клетках респираторного тракта (чувствительных нейронах, фибробластах, В-клетках, CD4+, CD8+ лимфоцитах, тучных клетках, макрофагах). Несмотря на наличие предпосылок участия TRPA1 в патогенезе ХОБЛ, исследований полиморфизмов гена *TRPA1* и экспрессии этого канала на клетках у больных лиц не проводилось. Тем не менее, было установлено, что полиморфизмы *TRPA1* ассоциированы с бронхиальной астмой [12]. Антагонизм к TRPA1 может стать патогенетическим вариантом лечения ХОБЛ [158]. Известно, что сигаретный дым увеличивает экспрессию TRPA1 в клетках альвеолярного эпителия клеточной линии A549 [162]. Активация TRPA1 повышает экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1a, IL1b. Нокаут экспрессии TRPA1 сопровождается снижением провоспалительных и профибротических факторов (TGF β -1, IL-6, VEGF). В экспериментах СА снижал уровень провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β и IL-6) и угнетал фагоцитоз [126]. Соответственно, TRPA1 способствует инфильтрации легочной ткани лейкоцитами, в то же время снижая активность фагоцитоза. Оба этих процесса характерны для ХОБЛ [175].

TRPV1 задействован в повреждении бронхиального эпителия сигаретным дымом [219]. Блокирование TRPV1 в эксперименте с воздействием пылевых частиц на дыхательные пути снижало гиперреактивность бронхов, воспалительную клеточную инфильтрацию секрецию цитокинов и фосфорилирование NF κ B [230]. Антагонист TRPV1 AMG9810 эффективно снижал продукцию IL1 β , IL-6, IL-18 и экспрессию циклооксигеназы-2 макрофагами [163]. TRPV1, экспрессированный на CD4+ клетках, проявлял

провоспалительный эффект [76]. Активация TRPV1 на дендритных клетках приводила к нарушению фагоцитоза, экспрессии HLA-DR, CD40, CD80 и CD86, секреции цитокинов IL-6 и IL-12 [211]. При стимуляции TRPV1 эпителия роговицы продуцируются провоспалительные цитокины (IL-6 и IL-8) [222]. Аналогичная реакция наблюдалась и на бронхиальном эпителии [72].

Эффекты TRPV4 схожи с TRPA1 и TRPV1, что проявляется провоспалительным эффектом и снижением функционирования антигенпрезентирующих клеток. TRPV4 активируется компонентами сигаретного дыма и выхлопными газами дизельных двигателей, в результате чего запускается фагоцитирование опсонизированных и неопсонизированных частиц макрофагами, стимулированными липополисахаридами *in vitro* и *in vivo* у мышей [192]. Активация TRPV4 увеличивает продукцию активных форм кислорода и азота. Также этот канал может играть существенную роль в мукоцилиарной дисфункции, увеличивает проницаемость эндотелия и альвеолярного эпителия, способствуя отеку легочной ткани и инфильтрации воспалительными клетками [95].

В образцах легочной ткани пациентов с ХОБЛ была повышена экспрессия TRPV1 и TRPV4 на уровне мРНК. Высвобождение аденозинтрифосфата (АТФ) из первичных бронхиальных эпителиальных клеток под воздействием сигаретного дыма было ослаблено блокаторами обоих каналов TRP [44]. Выявлены полиморфизмы гена TRPV4, связанные с ХОБЛ [237].

Экспрессия TRPM8 увеличена у больных ХОБЛ. При активации этого катионного канала сигаретным дымом и угольной золой на эпителиальных клетках происходит повышенная секреция муцинов, различных цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- α) и фосфорилирование NF κ B [218].

Недавние исследования [54, 119, 143, 158, 172, 175, 222] предоставили ценную информацию и расширили наши знания в области участия TRP каналов в развитии патофизиологических состояний, ассоциированных с ХОБЛ. Однако многие вопросы остаются открытыми, в том числе недостаточно информации об экспрессии TRP на иммунных и воспалительных клетках, их роли в хроническом воспалительном процессе и ремоделировании бронхов.

Также нет объяснений, почему прогрессирование бронхиальной обструкции не всегда сопутствует коморбидным пациентам, почему после непродолжительного курения у пациента развивается прогрессирующее снижение легочной функции, почему заболевание протекает у каждого больного с индивидуальными особенностями, и обструкция дыхательных путей возникает не у каждого курящего субъекта. Несомненным является влияние окружающей среды на человека. Однако, по всей видимости, ответ кроется в особенностях генетического фона человека, который накладывает отпечаток на гетерогенность патогенеза. В связи с вероятной вовлеченностью TRP рецепторов в патологические процессы, происходящие в легких при ХОБЛ, необходимо изучить влияние полиморфизмов соответствующих генов и особенностей их экспрессии макрофагами на бронхиальную проходимость. Выявление молекулярно-генетических маркеров и сопутствующих клинико-функциональных предикторов позволит разработать способы прогнозирования формирования ХОБЛ у курящих лиц и прогрессирования бронхиальной обструкции, что крайне важно для его первичной и вторичной профилактики.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА

На базе клинико-диагностического и пульмонологического отделений ДНЦ ФПД проведено комплексное обследование 134 больных ХОБЛ и 104 лиц контрольной группы в период с 2019 по 2021 гг.

Все исследования проведены в соответствии с общепринятыми критериями: с «Этическими принципами проведения медицинских исследований, включающих людей в качестве испытуемых» ((Хельсинская декларация 1964 г.) с исправлениями и дополнениями на 64-ой Генеральной Ассамблее ВМА, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.); с «Правилами надлежащей клинической практики» (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. N 200н); перед включением в исследование все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в предстоящем исследовании (в соответствии с протоколом №133-Д/1 от 28.11.2019г, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике ДНЦ ФПД). Исследовательская работа была выполнена в рамках Государственного задания ДНЦ ФПД по теме №062 «Новые молекулярные и клеточные механизмы патогенеза хронической обструктивной болезни» (номер государственной регистрации: 4А-А19-119011590166-4).

В соответствии с поставленными задачами выполняли общеклинические, функциональные, культуральные, молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные и статистические методы исследования.

2.1 Общеклинические методы исследования

На амбулаторном этапе у пациентов проводили сбор жалоб, в том числе, методом анкетирования, уточнение анамнеза заболевания, анамнеза жизни, фиксировали результаты объективного осмотра. При опросе пациента уточняли наличие одышки: степень ее выраженности, зависимость от физической активности, характер прогрессирования, а также наличие, частоту, и характер кашля, цвет отделяемой мокроты. Анамнез заболевания включал длительность предъявляемых жалоб, последовательность их возникновения; частоту обострения заболевания; когда впервые выставлен диагноз; данные о получаемой медикаментозной терапии (вид, длительность, дозировка). В анамнезе жизни выяснялись следующие факты: наличие сопутствующей патологии; табакокурение: количество выкуриваемых сигарет в сутки, статус и стаж курения; страдает ли кто-нибудь из кровных родственников пациента заболеваниями легких (ХОБЛ, БА, саркоидоз и др.), онкопатологией, сердечно-сосудистыми заболеваниями; тип отопления дома (централизованное или печное), профессиональные вредности (пылевые поллютанты, химикаты). Объективный осмотр заключался в оценке общего состояния, осмотре кожного покрова, слизистых оболочек, лимфатических узлов, визуальной оценке формы грудной клетки, участия вспомогательной мускулатуры в акте дыхания. Далее проводились аускультация, перкуссия легких и сердца. Подсчитывалась частота дыхательных движений и сердечных сокращений. Для оценки нутритивного статуса применялся индекс массы тела (ИМТ), который рассчитывался по формуле: $ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост (м)}^2$. При значениях ИМТ от 25 до 30 кг/м², то у пациента диагностировали избыточную массу тела, а ИМТ свыше 30 кг/м² расценивали как ожирение [77, 157]. Индекс курения (ИК) определяли как

отношение произведения количества выкуриваемых сигарет в сутки и количества лет курения к 20 (пачка-лет) [51]. Для определения выраженности симптомов использовался оценочный тест ХОБЛ (COPD Assessment Test™(CAT)). Тест состоит из 8 вопросов, ответ на каждый оценивается в диапазоне от 0 до 5 баллов. Если общая сумма баллов составляет 0-10 баллов, это значит, что ХОБЛ оказывает незначительное воздействие на качество жизни пациента, 11-20 баллов – расцениваются как умеренное влияние, 21-30 – сильное, 31-40 – чрезмерно выраженное.

Изучение клинических особенностей течения ХОБЛ проводилось по специально разработанной программе с заполнением индивидуальной регистрационной карты больного. В данной карте пациент заполнял свои личные данные: фамилию, имя, отчество, возраст, рост, вес, место работы, должность, профессиональные вредности. Подробно описывались жалобы в течение недели до момента госпитализации. К ним относились приступы удушья (нет – 0 баллов, дневные – 1 балл, ночные – 2 балла, частота возникновения), слышимые хрипы при дыхании (дневные: нет – 0 баллов, периодические – 1 балл, постоянные – 2 балла; ночные: нет – 0 баллов, периодические – 1 балл, постоянные – 2 балла), кашель в течение дня (сухой – 0 баллов, с небольшим количеством мокроты – 1 балл, продуктивный – 2 балла), цвет выделяемой мокроты, характер кашля (дневной: нет-0 баллов, редкий эпизодический - 1 балл, менее одного эпизода в час – 2 балла, 1 и более эпизодов в час – 3 балла, постоянный – 4 балла; ночной: нет-0 баллов, редкий эпизодический - 1 балл, менее одного эпизода в час – 2 балла, 1 и более эпизодов в час – 3 балла, постоянный – 4 балла), наличие одышки [92]. Степень тяжести одышки определялась с помощью шкалы одышки mMRC (модифицированный вопросник Британского медицинского исследовательского совета для оценки тяжести одышки): 0 баллов – одышка при сильной физической нагрузке; 1 балл – одышка при ходьбе по ровной местности или поднимании по пологому холму; 2 балла – одышка вынуждает пациента идти по ровной поверхности медленнее, чем люди того же возраста; 3 балла – пациент задыхается,

пройдя 100 м, либо через несколько минут ходьбы по ровной поверхности; 4 балла – одышка при минимальной физической нагрузке.

2.2 Функциональные методы исследования

Оценка функции внешнего дыхания проводилась методом спирографии на аппарате Easy on-PC (niddMedizintechnik AG, Швейцария) исходно и в динамике после проведения бронходилатационной пробы с сальбутамолом. Исследование проводилось в первой половине дня. Прием β_2 -агонистов короткого действия отменяли за 8 часов, β_2 -агонистов длительного действия – за 12 часов до предполагаемого исследования. Курение исключали как минимум за 1 час перед процедурой, употребление алкоголя - за 4 часа, значительные физические нагрузки – на 30 минут. Следили за тем, чтобы одежда была свободной, не стягивала грудную клетку и живот. Пациентов просили воздержаться от обильного приема пищи за 2 часа перед исследованием. Исследование проводилось в положении сидя, носовое дыхание блокировалось с помощью наложения клипсы.

Регистрировались следующие показатели: ФЖЕЛ, ОФВ₁, отношение ОФВ₁ к ФЖЕЛ (ОФВ₁/ФЖЕЛ), пиковая объемная скорость выдоха (ПОС), мгновенные объемные скорости выдоха на уровне 25% (МОС₂₅), 50% (МОС₅₀), 75% (МОС₇₅) ФЖЕЛ, средняя объемная скорость выдоха на уровне 25-75% ФЖЕЛ (СОС₂₅₋₇₅). Согласно форме кривой «поток-объем» позволяла выявлять тип вентиляционных нарушений: обструктивный, рестриктивный или смешанный. Степень их выраженности определялась как: умеренные (I степени), значительные (II степени), резко выраженные (III степени) [14]. Бронходилатационная проба проводилась всем пациентам с целью определения обратимости бронхиальной обструкции. Спустя 15 минут после ингаляции короткодействующего β_2 -адреномиметика Сальбутамола в дозе 200 микрограмм (мкг) повторно исследовалась вентиляционная функция легких. Согласно последним рекомендациям ERS и ATS абсолютное и относительное изменение ОФВ₁ позволяет достаточно точно определить обратимость обструкции дыхательных

путей. Бронходилатационный тест считался положительным, если относительный прирост $ОФВ_{16}$ составлял более 12%, а абсолютный - более 200 мл. Прирост менее 12% или 200 мл расценивался как наличие необратимой бронхиальной обструкции [26]. Отношение $ОФВ_{16}/ФЖЕЛ_6 < 0,70$ подтверждало наличие ХОБЛ. Степень тяжести ограничения скорости воздушного потока оценивалась согласно $ОФВ_{16}$: GOLD 1 (легкая) - $ОФВ_{16} \geq 80\%$ от должного; GOLD 2 (средней тяжести) - $50\% \leq ОФВ_{16} < 80\%$ от должного; GOLD 3 (тяжелая) - $30\% < ОФВ_{16} < 50\%$ от должного; GOLD 4 (крайне тяжелая) - $ОФВ_{16} < 30\%$ от должного [92]. Измерение функции легких проводили в динамике. Снижение $ОФВ_{16}$ на 50 и более миллилитров в течение 12 месяцев расценивали, как прогрессирование бронхиальной обструкции. Снижение $ОФВ_{16}$ менее чем на 50 миллилитров за этот же промежуток времени говорило об отсутствии прогрессирования бронхиальной обструкции [117, 166]. Измерение уровня оксигенации крови (SpO_2) проводилось с помощью пульсоксиметра («Mednet GmbH», Германия). Датчик пульсоксиметра надевали на второй палец правой руки и через несколько секунд фиксировали частоту пульса и процент насыщения крови кислородом.

2.3 Культуральные методы исследования

Периферическую венозную кровь восьми больных ХОБЛ и шести человек из контрольной группы собирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА) и центрифугировали в течение 15 минут при 1000g для получения лейкоцитов. Лейкоциты отбирали пастеровской пипеткой и переносили в новую пробирку. К отобраным клеткам добавляли фосфатно-солевым буфером (ФСБ) до конечного объема 9 мл и перемешивали. В новой пробирке объемом 15 мл полученную суспензию медленно наслаивали на 3 мл фиколла с плотностью 1,077 г/мл (ООО «Биолот», Россия), и затем центрифугировали при 400g в течение 40 минут при температуре 23°C. Верхнюю часть плазмы удаляли, оставляя над интерфазой, содержащей мононуклеары периферической крови (МПК), 1-2 мл. Через оставшийся слой плазмы в стерильную коническую пробирку объемом 15 мл

отбирали МПК. Для удаления тромбоцитов полученные клетки трижды отмывали, добавляя стерильный ФСБ до полного объема пробирки, и осаждая центрифугированием при 150g 10 минут. После третьей отмывки супернатант декантировали и ресуспендировали осадок в 1 мл среды RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Германия). Выделение моноцитов методом адгезии из суспензии МПК производили, выдерживая клетки в культуральных флаконах T25 при 37°C в течение 2 часов, в 5 мл среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) и 1% пенициллина/стрептомицина. По окончании инкубации клетки трижды промывали ФСБ для удаления лимфоцитов, а прикрепившимся моноцитам вновь добавляли 5 мл среды RPMI-1640, содержащей 10% FCS, 1% пенициллина/стрептомицина и 50 нг/мл GM-CSF. Клетки культивировали в течение 6 суток, проводя замену среды на третьи сутки в объеме 2/3 от исходного. На 6 сутки для поляризации полученных M0 макрофагов в M1 и M2 фенотипы, клеткам меняли среду и добавляли липополисахариды *E. coli* (LPS) 100 нг/мл + рекомбинантный человеческий интерферон гамма (IFN- γ) 20 нг/мл, либо интерлейкин 4 (IL-4) 20 нг/мл, соответственно [209]. Клеткам в контрольной лунке также проводили замену среды, но стимулирующие поляризацию факторы не добавляли. Спустя сутки супернатант культуральной среды отбирали в пробирки 1,5 мл и замораживали при -80°C. Клетки растворяли в буфере RL (Qiagen, Германия) и хранили при -80°C для последующего выделения РНК.

2.4 Генотипирование полиморфизмов *TRP*

Генотипирование ОНП генов *TRP* проводилось всем испытуемым. Кровь для генетических исследований отбирали из локтевой вены в пробирки, содержащие антикоагулянт (динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), затем замораживали до момента выделения ДНК при -20°C. Выделение ДНК производили коммерческими наборами «ДНК-Экстра-1» (ЗАО «Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Полиморфизмы генов *TRPA1*, *TRPV1*,

TRPV4 и *TRPM8* отбирали для исследования на основании следующих критериев: частота минорного аллеля $>0,05$, наличие литературных данных, свидетельствующих о вероятной функциональной значимости полиморфизма, для полиморфизмов регуляторных областей – данные анализа *in silico*, указывающие на возможное влияние полиморфизма на связывание ДНК с транскрипционными факторами или малыми интерферирующими РНК (миРНК), для полиморфизмов кодирующих регионов гена – данные о влиянии на функцию белка [131]. Перечень отобранных для анализа полиморфизмов и их краткая характеристика приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Полиморфизмы, отобранные для исследования

Ген	Полиморфизм	Позиция	Регион
1	2	3	4
<i>TRPM8</i>	rs10166942 c.-990T>C	chr2:23391644 8	5'-фланкирующий регион
	rs7577262 g.234818869G>A	chr2:23391022 4	5'-фланкирующий регион
	rs11562975 c.750G>C p.Leu250=	chr2:23394590 6	экзон
	rs17868387 c.752A>G p.Tyr251Cys	chr2:23394590 8	экзон
	rs58514553 c.*727_*728insTTAT	chr2:23401798 3-234017987	3'-нетранслируемый регион
	rs2052030 c.*1710C>G	chr2:23401896 6	3'-нетранслируемый регион
	rs17865682 c.*2325A>G	chr2:23401958 1	3'-фланкирующий регион
	rs920829 c.535G>A p.Glu179Lys	chr8:72065468	экзон

<i>TRPA1</i>	rs7819749 c.558A>C p.Lys186Asn	chr8:72063566	ЭКЗОН
	rs4738202 c.2937+1275T>C	chr8:72028626	ИНТРОН
	rs959976 c.3053A>G p.His1018Arg	chr8:72023910	ЭКЗОН
	rs959974 c.3149+210C>A	chr8:72023604	ИНТРОН

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>TRPA1</i>	rs6996723 c.*1509G>A	chr8:72021397	3'-нетранслируемый регион
<i>TRPV1</i>	rs460716 c.-121T>C	chr17:3608514	5'-нетранслируемый регион
	rs222749 c.271C>T p.Pro91Ser	chr17:3592080	ЭКЗОН
	rs222747 c.945G>C p.Met315Ile	chr17:3589906	ЭКЗОН
	rs8065080 c.1753A>G p.Ile585Val	chr17:3577153	ЭКЗОН
<i>TRPV4</i>	rs6606743 g.109841374G>A	chr12:1098413 74	5'-фланкирующий регион
	rs7139451 g.109838274A>T	chr12:1098382 74	5'-фланкирующий регион
	rs11068434 c.-31-2338A>C	chr12:1098171 65	ИНТРОН

rs3825394 c.670A>C p.Arg224=	chr12:1098030 33	ЭКЗОН 11
------------------------------------	---------------------	----------

Полиморфизмы генотипировали методом асимметричной LATE (Linear-After-the-Exponential) ПЦР с анализом плавления зондов «molecular beacon». Реакционная смесь включала: ДНК-матрица 50 нг, 1x ПЦР-буфер, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,25 mM, праймеры и флуоресцентно-меченые зонды «molecular beacon» – в концентрациях, указанных в таблице 2, Hot Start Taq-полимераза, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 25 микролитров (мкл). Амплификация проводилась в режиме: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., первый блок: 25 циклов – денатурация 92°C/1 секунду (сек.), отжиг/элонгация при температуре, указанной в таблице 2 (Ta) – 15 сек., второй блок: 45 циклов – денатурация 92°C/1 сек., отжиг/элонгация при температуре, указанной в таблице 2 (Ta) – 15 сек., финальная элонгация - 72°C/5 мин. Анализ плавления зондов выполнялся по протоколу: предварительная денатурация при 90°C/3 мин., гибридизация - 30°C/3 мин., плавление с градиентным повышением температуры от 30°C до 70°C с шагом 0,5°C. На графиках, отражающих зависимость -dF/dT (изменение уровня флуоресценции от температуры), регистрировались кривые плавления. Наблюдаемые пики плавления либо их комбинации отражали наличие отдельных аллельных вариантов гена [131].

Таблица 2 - Олигонуклеотидные последовательности и температура стадий отжига/элонгации (Ta°C), использованные для генотипирования

Ген	Поли- морфизм	Последовательности зондов	17 праймеров и 11 Конц., мкМ	Ta°C
1	2	3	4	5
<i>TRPM8</i>	rs10166942	FWD 5'- ТАСТТАСТАССТААКАСТТГ-ГС-3'	0,5	64/58

		REV 5'- TGAGCAAGGTCTGAA- AGGAAGGATAGGG-3'	0,02	
		5'-FAM- CGCGTAACAAAGAGAGACAAAAG CGCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs7577262	FWD 5'- CCTCAAAAGCCCAGTCCCCTAAC CTCA-3'	0,02	65/62
		REV 5'- GTAAAGAATCAGTAAATGTGAACC ACT-3'	0,5	
		5'-FAM-CTCCGAATGCAG- TTTCCTCTCGGAG-BHQ1-3'	0,5	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
TRPM8	rs11562975 rs17868387	FWD 5'- CCAGTACCTTATGGATG- ACTT-3'	0,5	62/58
		REV 5'- GGAGCTTTGCTTCGACAGTGGGAT -3'	0,02	
		5'-FAM- CGGCCAGGATATACAGTGGAGCCG -BHQ1-3'	0,5	
	rs58514553	5'-CTTGAAAGGCACTACTGACTT- TGTTCTTAT-3'	0,02	62/57
		5'-GAAATTGTTAGCAGTGATTACC- 3'	0,5	
		5'-FAM-	0,5	

		CGCGTACTCCTCTTATTTAT-TATTCGCG-BHQ1-3'		
	rs2052030	5'-GGAGAGATTATCTTACTGAA-CAC-3'	0,5	62/58
		5'-TCACTACTGCCAGACAAAA-GGAAAA-3'	0,02	
		5'-FAM-CGGCTCAAATACGACCACT-GCCG-BHQ1-3'	0,5	
<i>TRPA1</i>	rs17865682	5'-GAATTGTCATGTGTTGCTTTTG-3'	0,5	62/60
		5'-AGAGAAGTCAGTTCATGTAAC-TCTGGGA-3'	0,02	
		5'-FAM-CCGGAAGTGAATCTGACCGG-BHQ1-3'	0,5	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	rs920829	FWD 5'-TGAATAAAAGATAAACAGACATGGTCCCT-3'	0,02	60/58
		REV 5'-AGAAAGCAGACAGATATGACA-3'	0,5	
		5'-FAM-CTGGCACCACAAATAATAGCGAGCCAG-BHQ1-3'	0,5	
	rs7819749	FWD 5'-GCGATTTGGGGTTTAACTGTGTCAT-3'	0,02	63/61
		REV 5'-GCAGCTTGGTGAATAGGGA-3'	0,5	

<i>TRPA1</i>		5'-FAM-CTTGCTTAACAAAGGAG- CAAG-BHQ1-3'	0,5	
	rs4738202	FWD 5'-GCCTACTTAGCACACCAG- 3'	0,5	63/60
		REV 5'- TTCCAATCGCTCTGTGTCTC- TGTATAATA-3'	0,02	
		5'-FAM- CCGGTCATAGAACATAGAA- TCCGG-BHQ1-3'	0,5	
rs959976	FWD 5'- TAGCAGATTGTGGGTTTCCTT- GAGGGCATA-3'	0,02	66/60	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPA1</i>	rs959976	REV 5'- AGATTTATCAGCATTTGGTA- TTTCTTG-3'	0,5	66/60
		5'-FAM- CGCGTTTTTTATCCGACAGC- ATACGCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs959974	FWD 5'-AACATATTTGCCACTATTC- ACCAATCAGTT-3'	0,02	63/59
		REV 5'-TTACTCCAGGGATCTTCAG- 3'	0,5	
		5'-FAM-CCGGGCCTTCCAATCATA-	0,5	

		ACCGG-BHQ1-3'		
	rs6996723	FWD 5'- AATCACTATACAGAAGCAA- TATCC-3'	0,5	62/57
		REV 5'- TTCTTGGCACTCAGTGAATG- TTGACT-3'	0,02	
		5'-FAM-CCTCCCCCTTGTCTTTATG- GAGG-BHQ1-3'	0,5	
	rs460716	FWD 5'-GCATTGTTCTGAGCA- GTGTGATGGAGAGTC-3'	0,02	66/63
		REV 5'-GGTTTCTCTTTGGCATAT- CCGA-3'	0,5	
		5'-FAM-CGCGTCCCTGTGTTCCCC- ACGCG-BHQ1-3'	0,5	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPV1</i>	rs222749	FWD 5'- AGACCCCCTGGATGGAGAC- CCTAAC-3'	0,02	66/63
		REV 5'- CCCCTGGCTTTGTGACATTT-3'	0,5	
		5'-FAM-CGCTGAGACGGCCCCA- CAGCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs222747	FWD 5'-GCCGACAACACGAAGTTT- 3'	0,5	67/61
		REV 5'- GCCTGAGCCGAAGCCCCCT-3'	0,02	
		FAM-CTCGCCCCAGCATCAGAAG-	0,5	

		CGAG-BHQ1-3'		
	rs8065080	FWD 5'-ATGATCCTGAGAGACCTGTGCCGTTTC-3'	0,02	65/64
		REV 5'-TGCCTACCCAGTGCCTTC-3'	0,5	
		5'-FAM-CCGCTACATCGTCTTCTTGCGG-BHQ1-3'	0,5	
<i>TRPV4</i>	rs6606743	FWD 5'-TTTTGGTCTAAGAACAGGGGAAGT-3	0,5	66/63
		REV 5'-AATTGTGAGGGGGTGAGGGAGCAC-3	0,02	
		5'-FAM-CGGCCACAGGAGCGATGCCG-BHQ1-3'	0,5	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPV4</i>	rs7139451	FWD 5'-GCATGACTCAGTAACCATTCATTTATTGC-3'	0,02	62/58
		REV 5'-TGAGAACTTACGTCCATAGAA-3'	0,5	
		5'-FAM-CGCGATAGTATTCCTTTGTGTGCGCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs11068434	FWD 5'-GGAGAGTCTAATCCACCTC-3'	0,5	62/58
		REV 5'-TAGTAGGACCTCTGGAGAC-	0,02	

		ACGAAGT-3		
		5'-FAM- CCGAGATTTGGGCTTTGCTC-GG- BHQ1-3'	0,5	
	rs3825394	FWD 5'- TGAGGAAACAGGCTTGGAG- AGGAGAT-3'	0,02	64/61
		REV 5'- GTAGATGTCACGGAAGGGC-3'	0,5	
		5'-FAM- CGGTCGCAACATGAGGGAG- GACCG-BHQ1-3'	0,5	

2.5 Определение экспрессии TRP рецепторов на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови

Выделение РНК из макрофагов проводили с использованием наборов Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Канада) согласно протоколу производителя. ⁸ Оценку качества РНК производили методом электрофореза образца в 1% агарозном геле с дальнейшим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией на трансиллюминаторе. В качественных образцах отмечалась хорошая визуализация 28S и 18S рРНК с соотношением интенсивности полос 2:1. Качественные образцы РНК, не имеющие признаков существенной деградации, подвергали обратной транскрипции с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ-1) (Синтол, Россия) согласно протоколу ⁵ производителя. Для проведения обратной транскрипции смесь 5 мкл РНК (1-2 мкг

тотальной РНК), воды и комбинации праймеров Олиго(dT)15 и Random(6) в рекомендуемом объеме инкубировали в течение 5 мин. при температуре 65°C, а затем охлаждали на льду 1 мин. После этого смесь инкубировали при температуре 25 °C еще 10 минут, а затем добавляли 2,5X реакционную смесь и ревертазу MMLV-RT. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Пробирки помещали в амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США) и инкубировали при температуре 42°C 1 час, после чего следовало повышение температуры до 92°C в течение 3 мин для инактивации MMLV. Обратную транскрипцию образцов, предназначенных для анализа экспрессии *TRPM8*, проводили с ген-специфическим праймером в следующих условиях. Смесь 5 мкл РНК (1-2 мкг тотальной РНК), раствора трегалозы, и комбинации Олиго(dT)15 и ген-специфического праймеров инкубировали в течение 5 мин. при температуре 65°C и охлаждали на льду 1 мин. Затем добавляли 2,5X реакционную смесь и ревертазу MMLV-RT. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Трегалозу добавляли в раствор до достижения конечной концентрации 0,6М, ген-специфический праймер – до 0,2 мкМ, праймер Олиго(dT)15 – в количестве, рекомендованном производителем набора. Пробирки помещали в амплификатор и инкубировали при температуре 60°C 1 час, после чего увеличивали температуру до 92°C на 3 мин. Полученную комплементарную ДНК (кДНК) хранили при -20°C до момента анализа.

Исследование экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen (Синтол, Россия). В качестве референсного использовали ген B2M (бета-2-микроглобулин). Смесь для ПЦР включала в себя: кДНК-матрица 100 нг; 1x ПЦР-буфер, содержащий EvaGreen, MgCl₂ – 2,5 мМ, dNTP 0,25 мМ, праймеры – по 0,2 мкМ прямого и обратного, Hot Start Taq-полимераза, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 25 мкл. Амплификацию проводили в режиме: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., 45 циклов – денатурация 95°C/5 сек., отжиг при специфичной для каждого гена праймеров температуре/10 сек., элонгация 72°C/10 сек. Последовательности праймеров и температура отжига для, использованные при

анализе экспрессии каждого гена, указаны в таблице 1. Дизайн праймеров исключал амплификацию с геномной ДНК. ПЦР для каждого образца проводили в трехкратных повторах. Из трех полученных значений пороговых циклов (Ct) вычисляли среднее арифметическое для каждого случая.

Таблица 3 – Последовательности праймеров и температура отжига, использованные в реакция для анализа экспрессии генов TRP

Ген	Последовательности праймеров	Температура отжига, °С
<i>TRPV1</i>	5'-AGATGATCCTGAGAGACCTGTGCC-3'	65
	5'-CATTCTTCCCGTCTTCAATCAGCGT-3'	
<i>TRPV4</i>	5'-TGGTGCTTCAGGGTGGATGA-3'	62
	5'-GAAGGCACTGCTGAAATGCG-3'	
<i>TRPA1</i>	5'-AGAGTCCTTCCTAGAACCATATCTGAG-3'	62
	5'-GCCAACTGCCAAACCAATAAGTAA-3'	

Продолжение таблицы 3

<i>TRPM8</i>	5'-CATGGAGTCTTCTGTCTGCTGTTTC-3'	65
	5'-GTGTCGTTGGCTTTTGTGTTGAT-3'	
<i>B2M</i>	5'-GGAGGCTATCCAGCGTACTC-3'	62
	5'-CTCTCTCCATTCTTCAGTAAGTCAAC-3'	

Примечание – для каждого гена в верхней строке указан прямой праймер, а в нижней – обратный.

2.6 Иммунофлуоресцентные методы исследования

Определение экспрессии каналов TRP и воспалительных маркеров *in vitro* проводили в клетках и супернатанте мокроты 39 больных ХОБЛ и 8 человек из контрольной группы.

Спонтанно продуцируемую мокроту собирали в утреннее время после туалета ротовой полости в стерильные контейнеры, взвешивали и добавляли двукратный объем 0,1% дитиотреитола. После этого мокроту с дитиотреитолом инкубировали в холодильнике в течение 20 минут, периодически перемешивая содержимое контейнера пастеровской пипеткой. После окончания инкубации образец фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 45 мкм, центрифугировали и отбирали супернатант для анализа цитокинов. Клеточный осадок однократно отмывали ФСБ, ресуспендировали и окрашивали антителами, конъюгированными с флуорохромами, для анализа методом проточной цитометрии. С целью определения экспрессии каналов TRPA1, TRPM8, TRPV1 и TRPV4 клетки инкубировали с первичными кроличьими поликлональными антителами к соответствующим белкам (Alomone Labs, Израиль), либо с изотипическими антителами, а затем с вторичными козьими антителами к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (Abcam, Великобритания). Величину экспрессии перечисленных маркеров определяли по сравнению с изотипическим контролем на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) и выражали в виде процента положительно окрашенных клеток или нормализованной медианной интенсивности флуоресценции (nMFI).

Концентрации цитокинов IL-4, IL-2, хемокинового лиганда 10 с мотивом CXС (CXCL10), IL-1 β , TNF- α , MCP-1, IL-17A, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-12p70, IL-8, TGF β -1, а также маркеров ремоделирования EGF, FGF2, MMP-9 и TIMP-1 в мокроте определяли с помощью мультиплексного анализа коммерческими наборами LEGENDplex (BioLegend, США) на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Полученные концентрации умножали на фактор разведения для вычисления истинной концентрации цитокинов в исходном образце. Концентрации цитокинов и маркеров ремоделирования измерялись в пикограммах на миллилитр (пг/мл).

2.7 Статистические методы исследования

Статистические расчеты выполняли в программных пакетах Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., 2014) и NCSS 12 (StatSoft, Inc., 2018). В процессе анализа результатов исследования использовались параметрические (для данных с нормальным распределением) и непараметрические (для данных с распределением, отличным от нормального) статистические методы. В качестве критического уровня значимости α принималось значение 0,05.

Нормальность распределения количественных переменных определяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. При их значимости предположение о нормальности распределения отвергалось. При нормальном распределении описательная характеристика переменной имеет вид: $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

Количественные величины, отличные от нормального распределения, представлены в формате $Me [Q1; Q3]$, где Me – медиана, $Q1$ – первый квартиль, $Q3$ – третий квартиль.

Критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность использовали для анализа ассоциаций между качественными признаками. Анализ количественных переменных с нормальным распределением проводился методом ANOVA (при множественных сравнениях) и t-Стьюдента. В случае распределения, отличного от нормального использовался ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (для множественных сравнений), для парных сравнений использовался тест Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического ρ критерия Спирмена.

Построение прогнозных математических моделей осуществлялось методом биномиальной логистической регрессии. Для определения оптимального значения отсечения и диагностической ценности метода проведен анализ ROC-кривых, определено значение площади под кривой (AUC). Рассчитаны чувствительность, специфичность и точность способа.

2.8 Клиническая характеристика обследованного контингента

Всего в исследование было включено 238 человек. Из них 104 курящих человека с отсутствием обструкции были включены в контрольную группу, а 134 человека проходили клинико-функциональное обследование и амбулаторное лечение с диагнозом ХОБЛ (GOLD II, III, IV) на базе ДНЦ ФПД с 2019 г. по 2022 г. включительно. Все пациенты находились в стадии ремиссии ХОБЛ и других хронических заболеваний. Диагноз ХОБЛ выставлен согласно Международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10), GOLD (пересмотр 2017, 2021 гг.); Федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению ХОБЛ Российского респираторного общества (2021 г.), Национального руководства по пульмонологии под редакцией Чучалина А.Г. (2009 г.). Пациенты с ХОБЛ в качестве базисной терапии чаще применяли комбинацию длительнодействующих β_2 -агонистов и глюкокортикостероидов в одном ингаляторе (формотерол\будесонид, сальметерол/флутиказон). Приверженность к лечению наблюдалась у 56% больных ХОБЛ.

У всех пациентов получено информированное согласие на включение в исследование. В основную группу были включены пациенты обоих полов в возрасте старше 35 лет с диагнозом ХОБЛ средней, тяжелой и крайне-тяжелой степени тяжести (GOLD stage II-IV). Критериями исключения являлись сопутствующие заболевания легких (БА, онкопатология, саркоидоз, интерстициальные заболевания легких, пневмония, туберкулез); сопутствующие системные заболевания, кроме патологии сердечно-сосудистой системы; аллергии и аллергическая предрасположенность. В группу контроля были включены курящие лица без признаков бронхиальной обструкции ($ОФВ_1/ФЖЕЛ > 0,7$).

Всем пациентам был проведен весь спектр клинико-функциональных обследований. Через 12 месяцев каждый пациент с ХОБЛ был повторно приглашен на обследование. По результатам спирографии было выявлено, что у

части пациентов в течение года снизились показатели функции легких. В результате динамического наблюдения и критерия прогрессирования бронхиальной обструкции [117, 166], пациенты с ХОБЛ были разделены на 2 группы (рисунок 1): группа без прогрессирования бронхиальной обструкции (n=75) и группа с прогрессированием бронхиальной обструкции (n=59).



Рисунок 1 - Дизайн исследования.

2.8.1 Клиническая характеристика основной и контрольной групп

При сравнении основной группы (пациенты с ХОБЛ) с контрольной (курящие лица) выяснилось, что пациенты из основной группы значительно старше ($60,9 \pm 0,6$ лет против $43,2 \pm 1,3$ лет), $p < 0,001$. Среди пациентов основной группы доля мужчин была выше, чем среди курящих лиц контрольной группы: 86% против 74%, $p = 0,02$. ИК в группе с ХОБЛ превышал таковой у курящих лиц более чем в 2 раза ($40[26;47]$ против $15[7;21]$, $p < 0,001$). Подавляющее большинство (91%) испытуемых из группы больных ХОБЛ были злостными курильщиками (с ИК > 20 пачка-лет), а в контрольной группе только 34%,

($p < 0,001$). В контрольной группе показатели спирографии были в пределах нормы: $ОФВ_{16} = 108,5 \pm 2,18\%$, $ОФВ_{16}/ФЖЕЛ_6 = 80,0 \pm 0,89\%$, а у пациентов с ХОБЛ наблюдалось резкое снижение бронхиальной проходимости. В частности, $ОФВ_{16}$ составлял $50,4 \pm 1,57\%$, а соотношение $ОФВ_{16}/ФЖЕЛ_6$ равнялось $47,5 \pm 0,94\%$ (таблица 4).

Таблица 4 - Характеристика основной и контрольной групп

Параметр	Основная группа (n=134)	Контрольная группа (n=104)	Значимость
1	2	3	4
Возраст, лет	60,9±0,6	43,2±1,3	<0,001
Пол, м/ж (%)	86/14	74/26	0,02
ИК, пачка-лет	40[26;47]	15[7;21]	<0,001
ИК>10пачка-лет,%	98	68	<0,001
ИК>20пачка-лет,%	91	34	<0,001
ОФВ ₁ , % от должного	43,6±1,5	105,8±1,3	<0,001
ФЖЕЛ, % от должного	60,1±1,7	108,8±1,1	<0,001
ЖЕЛ, % от должного	72,4±1,8	106,7±1,4	<0,001
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %	45,9±1,2	79,3±1,1	<0,001

Продолжение таблицы 4

ПОС, % от должного	44,5±1,7	101,7±1,6	<0,001
МОС ₅₀ , % от должного	20,5±2,5	92,5±2,4	<0,001
МОС ₇₅ , % от должного	14,4±1,3	81,8±1,5	<0,001
СОС ₂₅₋₇₅ , % от должного	17,8±1,7	92,5±1,8	<0,001
ОФВ ₁ реакция на бронхолитик, %	17,3±1,4	6,1±1,3	<0,001
ОФВ ₁₆ , % от должного	49,2±1,5	108,5±1,6	<0,001
ОФВ ₁₆ /ФЖЕЛ ₆ , %	47,2±1,2	80,0±1,0	<0,001

Примечание: n (%), где n – количество пациентов, % – процентное отношение количества пациентов к общему числу обследованных в группе; $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего; $Me[Q1;Q3]$, где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний (25%) и верхний (75%) квартили, соответственно.

Таким образом, больные ХОБЛ были заметно старше, имели более длительный анамнез курения и выраженные нарушения вентиляционной функции легких по сравнению с контрольной группой.

2.8.2 Клиническая характеристика больных с хронической обструктивной болезнью легких с наличием и отсутствием прогрессирования бронхиальной обструкции

В общей группе из 134 человек с ХОБЛ присутствовало 115 (85,8%) мужчин и 19 (14,2%) женщин в возрасте от 38 до 81 года (средний возраст $60 \pm 0,78$ лет). При сравнении пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции и без прогрессирования бронхиальной обструкции обращает на себя внимание разница в возрасте испытуемых. Средний возраст пациентов из группы с прогрессированием бронхиальной обструкции составил $62,2 \pm 0,97$ лет, в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции испытуемые были несколько моложе - $59,6 \pm 0,99$ лет, $p=0,049$. При распределении пациентов по полу и возрасту учитывалась классификация возрастов (таблица 5), принятая Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, 2022г) [223].

Таблица 5 - Распределение больных по полу и возрасту

Возраст (годы)	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, n (%)

Молодой возраст (18-44)		
Мужчины	3 (4,0)	2 (3,4)
Женщины	1 (1,4)	0 (0,0)
Средний возраст (45-59)		
Мужчины	27 (36)	14 (23,7)
Женщины	1 (1,3)	1 (1,7)
Пожилой возраст (60-74)		
Мужчины	32 (42,7)	35 (59,3)
Женщины	9 (12,0)	6 (10,2)
Старческий возраст (75-90)		
Мужчины	1 (1,3)	1 (1,7)
Женщины	1 (1,3)	0 (0,0)
Всего:		
Мужчины	63 (84)	52 (88)
Женщины	12 (16)	7 (12)

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

В группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией преобладали более тяжелые стадии заболевания. Так, на долю тяжелой и крайне тяжелой ХОБЛ приходилось 76,3% (n=45), против 48% (n=36) при сравнении с испытуемыми без прогрессирования бронхиальной обструкции (таблица 6).

Таблица 6 - Стадии ХОБЛ групп испытуемых

Стадия ХОБЛ по GOLD	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, n (%)	Значимость
II	39 (52)	14 (23,7)	$\chi^2=11,0$ p=0,004
III	25 (33,3)	32 (54,3)	

IV	11 (14,7)	13 (22)	
----	-----------	---------	--

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

Сравнивая две группы, выяснилось, что в группе с прогрессирующей обструкцией обострения были более частыми (61,0% (n=36) против 24% (n=18), $\chi^2=18,8$, $p=0,0001$), а стаж заболевания был более длительным (5[3;9] против 4[1;7], $p=0,03$). На момент обследования большинство пациентов курили: отмечалось 74,7% (n=56) курящих в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 64,4% (n=38) в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции. В группе без прогрессирования бронхиальной обструкции бросили курить 20% человек, а в группе с прогрессирующей обструкцией несколько больше (30%), что было статистически незначимо, однако указывало на то, что пациенты с более тяжелым ХОБЛ вынуждены отказаться от табакокурения чаще, чем пациенты без прогрессирования бронхиальной обструкции. Длительность курения и количество ежедневно выкуриваемых сигарет в группе с прогрессирующей обструкцией несколько преобладали, но различие было статистически незначимо. Абсолютное большинство пациентов начали курить около 20 лет. В обеих группах ИК был достаточно высоким, более 30 пачка-лет. В группе с прогрессированием бронхиальной обструкции ИК составил $39,13 \pm 2,2$ пачка-лет, что было больше, чем в группе без прогрессирования обструкции ($33,8 \pm 1,5$), $\chi^2=0,04$, $p < 0,05$ (таблица 7).

Таблица 7 - Анамнез курения в группах исследования

Анамнез курения	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции	Значимость
	n (%)	n (%)	

Не курящие лица	2 (2,7)	4(6,8)	$\chi^2=2,6$
Курящие лица	56 (74,7)	37(62,7)	$p=0,28$
Бывшие курильщики	17 (22,6)	18 (30,5)	
	$M\pm m$	$M\pm m$	
Длительность курения, лет	$33,9\pm 1,4$	$35,7\pm 1,7$	$\chi^2=0,19$ $p > 0,05$
Начальный возраст курения, лет	$20,2\pm 0,98$	$20,1\pm 1,2$	$\chi^2=0,85$ $p > 0,05$
Количество ежедневно выкуриваемых сигарет, шт.	$18,5\pm 0,57$	$21,0\pm 0,99$	$\chi^2=0,09$ $p > 0,05$
Индекс курения (ИК), пачка-лет	$33,8\pm 1,5$	$39,1\pm 2,2$	$\chi^2=0,04$ $p < 0,05$

Примечание: n (%), где n – количество пациентов, % – процентное отношение количества пациентов к общему числу обследованных в группе; $M\pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

Среди сопутствующей патологии у обследованных преобладали гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, заболевания верхних дыхательных путей, хронические заболевания пищеварительной системы. Сахарный диабет и ишемическая болезнь сердца в группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией встречались чаще, чем в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции (таблица 8).

Таблица 8 - Сопутствующая патология пациентов с ХОБЛ

Сопутствующая патология	Группа пациентов без прогрессирования обструкции	Группа пациентов с прогрессированием обструкции	Значимость

	n (%)	n (%)	
Гипертоническая болезнь	55 (66,27)	37 (67,27)	p>0,05
Ишемическая болезнь сердца	42 (50,60)	39 (70,90)	p<0,05
Хроническое легочное сердце	17 (13)	22 (13)	p>0,05
Хронический синусит/фарингит/ларингит	8 (9,64)	11(20)	p>0,05
Сахарный диабет	4 (4,82)	12 (21,82)	p<0,01
Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки	6 (7,23)	4 (7,27)	p>0,05
Алиментарное ожирение	6 (7,23)	9 (16,36)	p>0,05
Экссудативный перикардит	5 (6,02)	2 (3,64)	p>0,05
Постинфарктный кардиосклероз	3 (3,61)	1 (1,82)	p>0,05
Мочекаменная болезнь	1 (1,20)	2 (3,64)	p>0,05
Хронический пиелонефрит	2 (2,41)	1 (1,82)	p>0,05
Остеопороз	1 (1,20)	2 (3,64)	p>0,05

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

В анамнезе пневмония была у 26,5% (n=22) в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 40% (n=22) с прогрессирующей бронхиальной обструкцией, $\chi^2=2,77$, p=0,69. Перенесли туберкулез 7% (n=6) испытуемых группы без прогрессирования бронхиальной обструкции, 5,5% (n=3) с прогрессирующей бронхиальной обструкцией.

При обращении к врачу-пульмонологу пациенты предъявляли разнообразные респираторные жалобы. Жалобы на одышку беспокоили подавляющее большинство пациентов. Более половины испытуемых из группы с

прогрессирующей бронхиальной обструкцией страдали от тяжелой и очень тяжелой одышки. В группе без прогрессирования бронхиальной обструкции преобладала средняя степень одышки (таблица 9).

Таблица 9 - Степень одышки в группах исследования

Степень одышки по mMRC	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, n (%)	Значимость
0 (нет)	3 (4)	0 (0)	$\chi^2=12,2$ $p=0,016$
1 (легкая)	14 (18,7)	6 (10,1)	
2 (средняя)	41 (54,7)	22 (37,3)	
3 (тяжелая)	12 (16)	24 (40,7)	
4 (очень тяжелая)	5 (6,6)	7 (11,9)	

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

При анализе оценочного теста САТ обращает на себя внимание большая разница баллов в группах: 28[10;36] в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции против 11[8;33] в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции, ($p<0,001$). ИМТ в сравниваемых группах не отличался: 24,7[22,1;30,0] в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 25,3[22,6;30,7] в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции, $p=0,6$.

Используя интегральную оценку ХОБЛ [92], включающую количество обострений за предыдущий год, САТ и mMRC, все пациенты были разделены на следующие категории: А, В, D (таблица 10). Больных категории С среди испытуемых не было обнаружено. Было обнаружено, что среди больных с прогрессирующей бронхиальной обструкцией частота встречаемости ХОБЛ

категории D была достоверно выше, по сравнению с пациентами без прогрессирующей бронхиальной обструкции.

Таблица 10 – Категории пациентов по GOLD

Категория пациентов	Группа пациентов без прогрессирующей бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессирующей бронхиальной обструкцией, n (%)	Значимость
A	11 (14,7)	0 (0,0)	$\chi^2=23,1$ $p<0,001$
B	46 (61,3)	23 (39)	
D	18 (24)	36 (61)	

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

У подавляющего большинства пациентов был влажный кашель, в группе с прогрессирующей обструкцией кашель с мокротой беспокоил более 90% больных. В группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией частота этих симптомов встречалась чаще: слизистая мокрота - у 60% (n=33), скудная мокрота – у 72,7% (n=40). Для сравнения, в группе без прогрессирующей бронхиальной обструкции слизистая мокрота - у 39,7% (n=33), скудная мокрота – у 43,4% (n=36). Разница в характере мокроты между группами в обоих случаях получилась значимой ($p<0,05$). Жалобы на хрипы в груди, слабость, чувство дискомфорта, заложенности в грудной клетке чаще встречались в группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией, однако статистической значимости не отмечалось (таблица 11).

Таблица 11 - Характеристика жалоб исследованного контингента

Жалоба	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, n (%)	Значимость
Сухой кашель	22 (26,51)	5 (9,09)	$\chi^2=12,70$ p=0,0018
Влажный кашель	54 (65,06)	50 (90,91)	
Слизистая мокрота	33 (39,76)	33 (60,00)	$\chi^2=12,59$ p=0,0056
Слизисто-гнойная мокрота	23 (20,71)	18 (32,73)	
Скудная мокрота	36 (43,37)	40 (72,73)	$\chi^2=12,23$ p=0,016
Умеренное количество мокроты	12 (14,46)	7 (12,73)	
Обильная мокрота	8 (9,64)	4 (7,27)	
Чувство дискомфорта, заложенности в грудной клетке	60 (72,29)	39 (70,91)	$\chi^2=0,031$ p=0,86
Хрипы в груди	34 (40,96)	26 (47,27)	$\chi^2=0,54$ p=0,46
Слабость	40 (48,19)	33 (60,0)	$\chi^2=1,85$ p=0,17

Примечание: n – количество пациентов, % – процентное отношение количества пациентов к общему числу обследованных в группе. M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

Среди показателей объективного обследования пациентов существенной разницы при сравнении групп не прослеживалось (таблица 12). В обеих группах значение медианы насыщаемости крови кислородом (SpO₂) составило 93%, медианное значение частоты сердечных сокращений (ЧСС) - 86 в минуту. Подсчитано, что средняя частота дыхания (ЧД) составила 22, этот показатель был

за пределами нормы и свидетельствовал об одышке. В группе без прогрессирования бронхиальной обструкции медиана систолического артериального давления (САД) составила 120 мм рт. ст., медиана диастолического артериального давления (ДАД) – 80 мм рт. ст. В группе с прогрессированием бронхиальной обструкции цифры были несколько больше (125 и 80 мм рт. ст. соответственно), различия между группами были незначимы.

Таблица 12 - Показатели объективного обследования пациентов

Показатель	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, Ме[Q ₁ ;Q ₃]	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, Ме[Q ₁ ;Q ₃]	Значимость
SpO ₂	93[91;93]	93[91;94]	p=0,73
САД	120[110;130]	125[120;130]	p=0,57
ДАД	80[80;80]	80[80;80]	p=0,76
ЧСС	86[77;89]	86[80;95]	p=0,18
ЧД	22[19;24]	22[20;24]	p=0,22

Примечание: Ме – медиана, Q₁ и Q₃ – нижний (25%) и верхний (75%) квартили соответственно.

Коробочный перкуторный звук регистрировался примерно у половины пациентов: 48,2%(n=40) в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 49,1% (n=27) в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции. Аускультативно выслушивалось ослабленное везикулярное дыхание у 41% (n=34) без прогрессирования бронхиальной обструкции, в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции этот показатель встречался в 60% (n=33) случаев. Жесткое дыхание в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции встречалось в 12,7% (n=7). В группе без прогрессирования бронхиальной обструкции - несколько реже – в 9,6% (n=8). Тоны сердца у всех испытуемых были приглушенные. При изучении клинического и биохимического анализов крови

разницы по показателям между группами пациентов не прослеживалось. В группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией чаще встречались гиперфибриногенемия и лейкоцитоз (таблица 12).

Таблица 13 - Показатели крови пациентов из обследованных групп

Показатель	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, n (%)	Значимость
Гиперфибриногенемия	29 (34,94)	28 (50,91)	$\chi^2=3,48, p=0,062$
Лейкоцитоз	21 (25,30)	17 (30,91)	$\chi^2=0,60, p=0,90$
Скорость оседания эритроцитов	15 (18,07)	9 (16,36)	$\chi^2=0,60, p=0,90$

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

При проведении электрокардиографии выявлены признаки перегрузки правых отделов сердца у 71,08% (n=59) в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 81,82% (n=45) в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции, $\chi^2=2,05, p=0,15$. По результатам компьютерной томографии выявлено, что эмфизема диагностировалась в трети случаев в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и с прогрессированием бронхиальной обструкции: 33,4% (n=28) и 34,5% (n=19) соответственно. Хронический бронхит встречался у подавляющего большинства испытуемых, несколько чаще в группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией: 81,7% (n=49) против 70,5% (n=55). Значимость была невысокой ($\chi^2=2,55, p=0,64$). Анамнестически выявлено, что предыдущие обострения происходили на фоне

грибковых и бактериальных инфекций. При посеве мокроты ранее выявлялись *Candida albicans* в 41,6% (n=25) в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции и 23,1% (n=18) в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции, $\chi^2=5,60$, $p=0,018$. Также высевались *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Различий по частоте встречаемости тех или иных микроорганизмов между группами не выявлено.

При проведении спирографии выявлено, что исходно ОФВ₁₆ в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции составлял $56,1 \pm 2,5\%$ от должного, а в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции значительно ниже, $45,7 \pm 2,6\%$ от должного, $p < 0,001$. Спустя год ОФВ₁₆ в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции практически не изменился ($55,0 \pm 2,2\%$ от должного), а в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции значения ОФВ₁₆ резко снизились: $36,1 \pm 2,2\%$ от должного, $p < 0,001$. Отличия по другим спирометрическим показателям также были статистически значимы (таблица 14). Среди обследованных отсутствие реакции на бронхолитик было отмечено в 40% случаев заболевания.

Таблица 14 - Показатели спирографии обследуемого контингента

Показатель спирографии	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, М±m	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, М±m	Значимость
1	2	3	4
ОФВ ₁ (1 явка)	52,1±1,7	45,9±2,8	<0,001
ОФВ ₁ (2 явка)	50,1±1,8	35,7±2,4	<0,001

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4
---	---	---	---

ФЖЕЛ (1 явка)	78,8±1,9	65,8±2,2	<0,001
ФЖЕЛ (2 явка)	72,9±2,0	60,5±2,6	<0,001
ЖЕЛ (1 явка)	84,4±1,5	78,4±1,5	<0,001
ЖЕЛ (2 явка)	80,4±1,4	69,9±1,8	<0,001
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ (1 явка)	48,1±1,5	47,1±1,4	<0,001
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ (2 явка)	46,1±1,6	46,7±1,7	<0,001
ПОС (1 явка)	54,2±2,1	55,2±2,4	<0,001
ПОС (2 явка)	53,8±2,2	41,3±2,1	<0,001
МОС ₅₀ (1 явка)	21,04±1,6	15,6±1,6	<0,001
МОС ₅₀ (2 явка)	18,9±1,5	11,8±1,2	<0,001
МОС ₇₅ (1 явка)	17,8±1,9	10,5±1,7	<0,001
МОС ₇₅ (2 явка)	13,5±1,8	9,1±1,8	<0,001
СОС ₂₅₋₇₅ (1 явка)	24,5±1,7	15,1±1,5	<0,001
СОС ₂₅₋₇₅ (2 явка)	20,2±1,6	12,7±1,2	<0,001
ОФВ ₁₆ (1 явка)	56,1±2,5	45,7±2,6	<0,001
ОФВ ₁₆ (2 явка)	55,0±2,2	36,1±2,2	<0,001
ОФВ ₁₆ /ФЖЕЛ ₆ (1 явка)	53,9±2,5	47,3±2,6	<0,001
ОФВ ₁₆ /ФЖЕЛ ₆ (2 явка)	52,8±2,2	42,7±2,2	<0,001

Примечание: $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего. Спирометрические показатели измеряются в процентах от должного, кроме ОФВ₁/ФЖЕЛ и ОФВ₁₆/ФЖЕЛ₆, измеряемых в %.

Таким образом, пациенты с прогрессированием бронхиальной обструкции как правило, старше 60 лет, характеризуются более тяжелой одышкой, отягощенным анамнезом курения, чаще относятся к категории D по GOLD. Среди сопутствующих заболеваний диагностируются ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, сахарный диабет.

ГЛАВА 3. РОЛЬ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ *TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ

ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ

3.1 Общая характеристика исследованных полиморфизмов

В процессе исследования был проанализирован 21 однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) генов *TRPA1*, *TRPM8*, *TRPV1*, *TRPV4*, предположительно вносящих вклад в формирование ХОБЛ и прогрессирование бронхиальной обструкции. Оценка встречаемости аллельных вариаций данных генов произведена среди больных ХОБЛ и лиц контрольной группы. Определены генотипы ОНП *TRPA1*, *TRPM8*, *TRPV1*, *TRPV4* у 238 человек. Частоты генотипов для исследованных ОНП и расчет их отклонения от равновесия Харди-Вайнберга приведены в таблице 15. Для всех ОНП полученные значения частот генотипов соответствовали ожидаемым ($p > 0,05$).

Таблица 15 - Распределение частот генотипов и соответствие равновесию Харди-Вайнберга (ХВ)

Ген	Полиморфизм	Генотип	Частота, %	Отклонение ХВ
1	2	3	4	5
<i>TRPM8</i>	rs10166942	ТТ	67	$p > 0,05$
		СТ	30	
		СС	3	
	rs7577262	GG	80	$p > 0,05$
		GA	18	
		AA	2	
rs11562975	GG	78	$p > 0,05$	
	GC	21		

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

<i>TRPM8</i>	rs11562975	CC	1	p>0,05
	rs17868387	AA	88	p>0,05
		AG	11	
		GG	1	
	rs58514553	II	58	p>0,05
		ID	35	
		DD	7	
	rs2052030	CC	52	p>0,05
		CG	40	
		GG	8	
	rs17865682	AA	72	p>0,05
		AG	25	
GG		3		
<i>TRPA1</i>	rs920829	GG	73	p>0,05
		AG	25	
		AA	2	
	rs7819749	GG	45	p>0,05
		GT	46	
		TT	9	
	rs4738202	AA	5	p>0,05
		AG	37	
		GG	58	
	rs959976	AA	61	p>0,05
		AG	34	
		GG	5	
rs959974	GG	19	p>0,05	

<i>TRPA1</i>	rs959974	GT	50	p>0,05
		TT	31	

		GG	74	
	rs6996723	GA	25	p>0,05
		AA	1	
<i>TRPV1</i>	rs460716	CC	56	
		CT	38	p>0,05
		TT	6	
	rs222749	CC	90	
		CT	10	p>0,05
		TT	-	
	rs222747	CC	54	
		CG	38	p>0,05
		GG	8	
	rs8065080	AA	37	
		AG	46	p>0,05
		GG	17	
<i>TRPV4</i>	rs6606743	AA	27	
		AG	50	p>0,05
		GG	23	
<i>TRPV4</i>	rs7139451	AA	21	
		AT	49	p>0,05
		TT	30	
	rs11068434	TT	50	p>0,05
		TG	41	
		GG	9	p>0,05
	rs3825394	AA	18	
		AC	49	p>0,05
		CC	33	

3.2 Взаимосвязь исследованных полиморфизмов

с вентиляционной функцией легких и формированием хронической

обструктивной болезни легких у курящих лиц

При анализе влияния носительства генотипов полиморфизма *TRPA1* rs7819749 на функцию легких, наиболее низкие значения спирометрических параметров были характерны для носителей генотипа ТТ, наиболее высокие – для генотипа GG, гетерозиготы GT занимали промежуточное положение (рисунок 2).

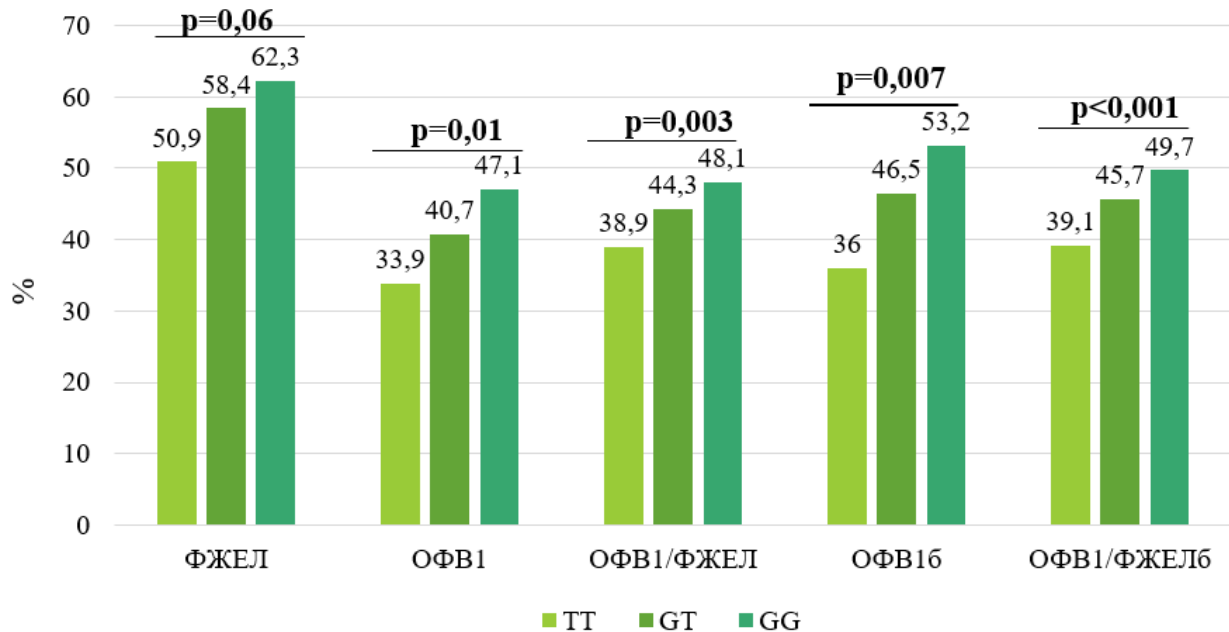


Рисунок 2 - Влияние полиморфизма *TRPA1* rs7819749 на функцию легких у больных ХОБЛ.

Примечание: значимость показана при сравнении носителей генотипов ТТ и GG.

Аналогичная взаимосвязь со степенью нарушений вентиляционной функции легких была установлена для полиморфизма *TRPA1* rs959974 (рисунок 3). Очевидно, что носители генотипа ТТ по полиморфизму rs959974 имели наиболее высокие значения бронхиальной проходимости, для гетерозиготных больных были характерны промежуточные значения, а для гомозигот GG нарушения вентиляционной функции легких были выражены в наибольшей степени. Статистически значимые различия были отмечены исключительно при сравнении спирометрических параметров между носителями ТТ и GG генотипов.

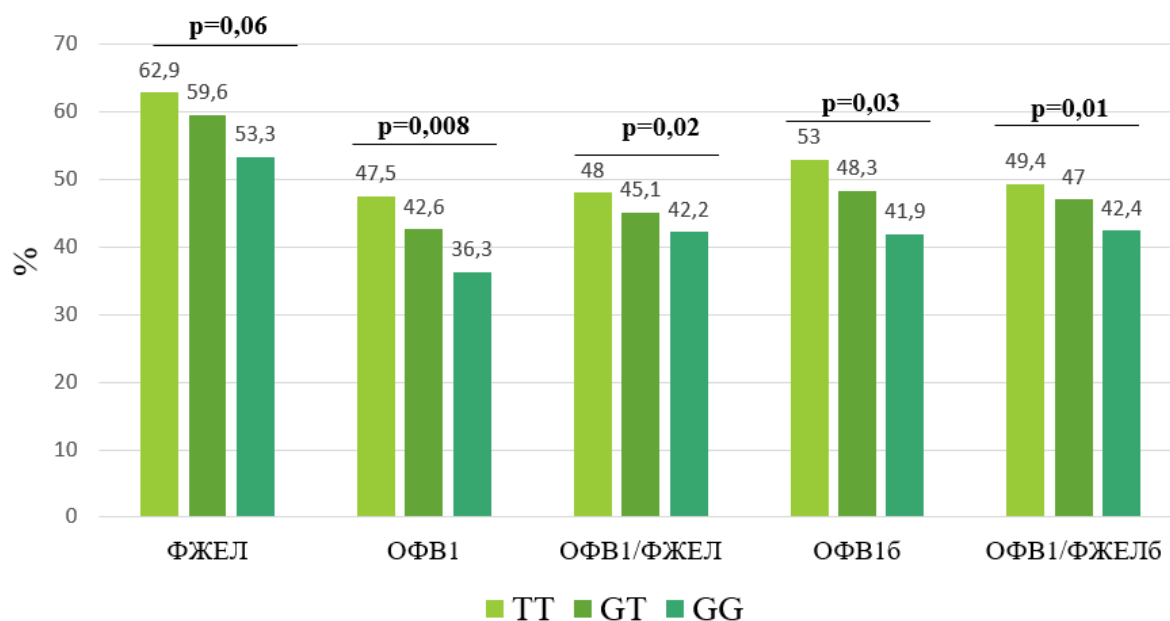


Рисунок 3 - Влияние полиморфизма rs959974 гена *TRPA1* на функцию легких у больных ХОБЛ.

Примечание: значимость показана при сравнении носителей генотипов TT и GG.

Для ОНП *TRPM8* rs17865682 и rs10166942 особенности показателей функции внешнего дыхания были найдены для носителей гомозиготных генотипов по минорному аллелю. Так, носители генотипа GG по rs17865682 отличались более высокими значениями ОФВ₁/ФЖЕЛ (56,2±5,45%) по сравнению с гетерозиготами AG (43,4±1,84%, p=0,01) и носителями AA генотипа (45,7±1,12, p=0,02). Между носителями генотипов GG и AG различия также были значимы и для постбронходилатационных значений ОФВ₁/ФЖЕЛ (p=0,02). Для полиморфизма rs 10166942 гена *TRPM8* достоверные различия были обнаружены между носителями генотипов TT и CC. Последние отличались снижением показателей ОФВ₁/ФЖЕЛ (37,9±1,08% против 46,5±1,22%, p=0,04) и ПОС (29,3±3,66% против 44,8±2,23%, p=0,04).

Для ряда ОНП ассоциаций с количественными значениями показателей вентиляционной функции легких не было установлено, однако были обнаружены взаимосвязи с качественными критериями, отражающими степень нарушения

бронхиальной проходимости. Так, была найдена ассоциация полиморфизма *TRPM8* rs10166942 со снижением $ОФВ_{16}$ менее 60% от должного, которая становилась достоверной после введения коррекции на пол, возраст и анамнез курения в логистической регрессионной модели (скорректированное ОШ 1,72 95%ДИ (1,03;2,88), $p=0,04$). Аналогичный результат был получен для полиморфизма *TRPA1* rs959974. В общей и рецессивной моделях были отмечены тенденции к ассоциации генотипа GG со снижением $ОФВ_{16}$ менее 60% (24% против 9,1%, $p=0,16$). При этом введение коррекции на пол, возраст и курение приводило к возрастанию статистической значимости ассоциации полиморфизма (скорректированное ОШ 2,20 95%ДИ (1,00; 4,83), $p=0,05$).

Дополнительный интерес представляет возможное влияние полиморфизмов изучаемых генов TRP на обратимость бронхиальной обструкции, определяемую в пробе с бронхолитиком, у больных ХОБЛ. Результаты, полученные некоторыми исследователями, свидетельствуют, что положительная реакция на бронхолитик у больных ХОБЛ может быть ассоциирована с достоверным снижением риска тяжелого обострения (ОШ 0,38 95%ДИ (0,15; 0,93)) [166], хотя другими авторами данный тезис не подтверждается [112]. В различной мере реакция на бронхолитик зависела от полиморфизмов *TRPM8* rs17865682, *TRPV4* rs7139451 и *TRPV1* rs222749. Генотипы AG и GG по полиморфизму *TRPM8* rs17865682 чаще встречались в подгруппе больных с отрицательной реакцией на бронхолитик (рисунок 4). Ассоциация была значима в общей, доминантной и мультипликативной моделях, а также после поправки на пол, возраст, анамнез курения и исходное значение $ОФВ_1$ (скорректированное ОШ 3,66 95%ДИ (1,81; 7,40), $p<0,001$).

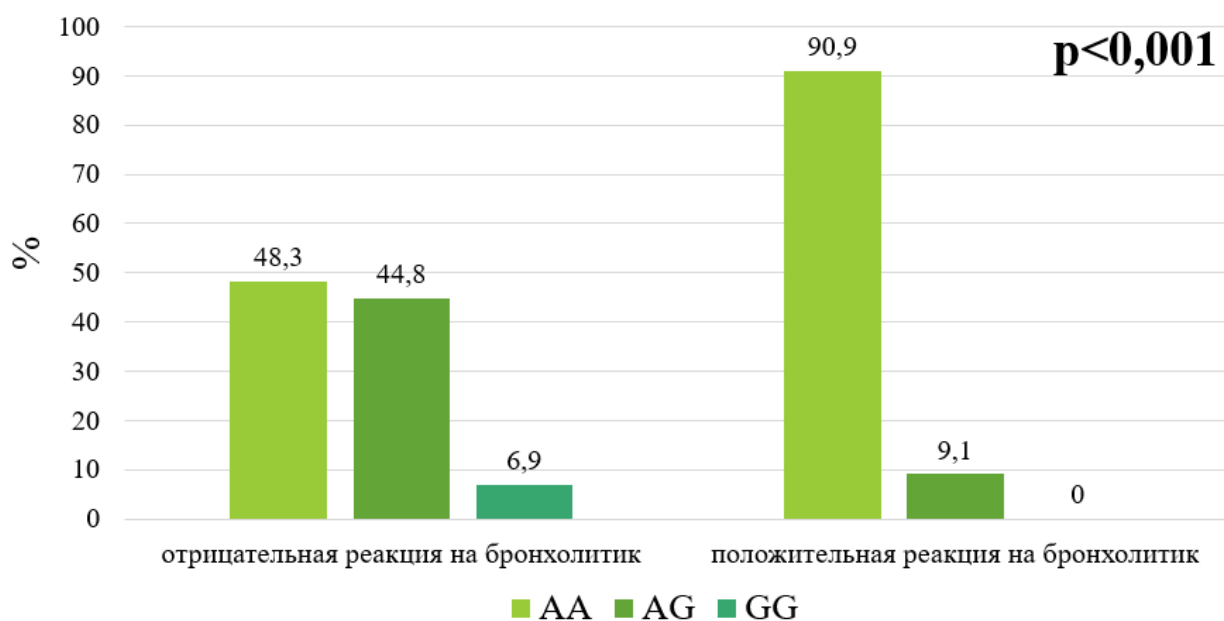


Рисунок 4 - Ассоциация полиморфизма *TRPM8* rs17865682 с реакцией на бронхолитик у больных ХОБЛ.

Для полиморфизма *TRPV1* rs222749 ассоциация заключалась в более высокой частоте гетерозигот СТ в подгруппе больных с отрицательной реакцией на бронхолитик (20,7% против 4,6%, $p=0,03$). Аналогично полиморфизму *TRPV4* rs7139451, статистическая значимость ассоциации исчезала после коррекции.

Полиморфизм *TRPV4* rs7139451 был значимо связан с реакцией на бронхолитик в доминантной модели (рисунок 5), однако после коррекции на конфаундеры с помощью логистического регрессионного анализа ассоциация пропадала.

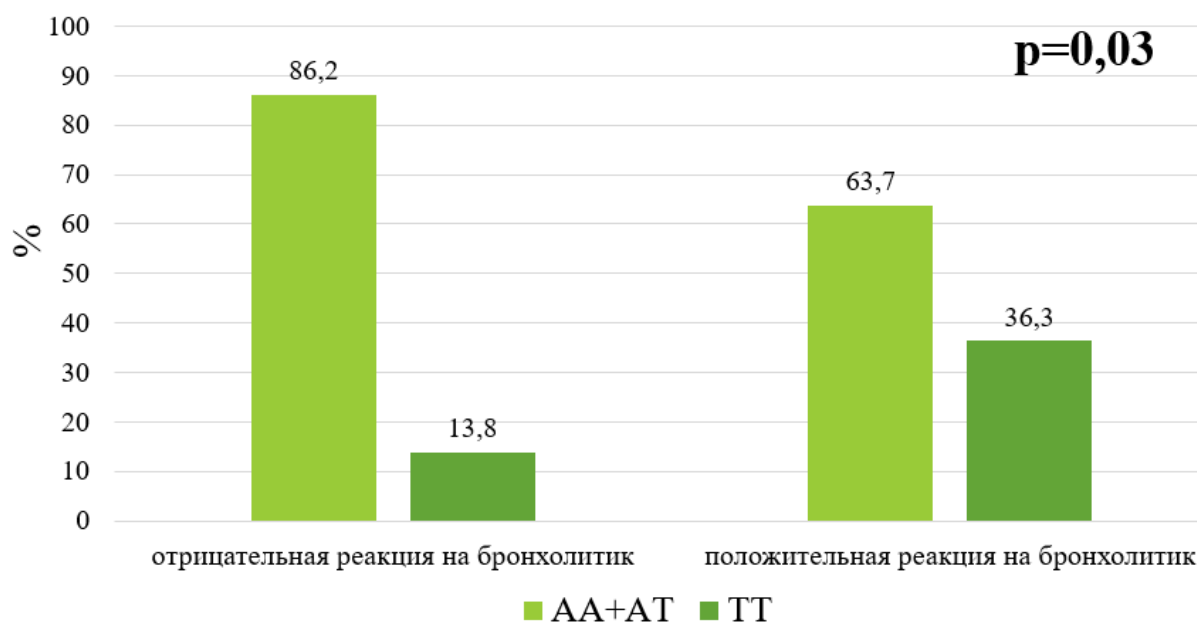


Рисунок 5 - Ассоциация полиморфизма *TRPV4* rs7139451 с реакцией на бронхолитик у больных ХОБЛ.

Носительство G аллеля (генотипы CG или GG) по полиморфизму *TRPM8* rs2052030 сопровождалось снижением проходимости дыхательных путей у больных ХОБЛ. Различия были значимы для показателей ОФВ₁ и ФЖЕЛ, при этом для ЖЕЛ, ОФВ₁/ФЖЕЛ, ОФВ₁₆, ОФВ₁₆/ФЖЕЛ₆ отмечались статистически незначимые тенденции (рисунок 6).

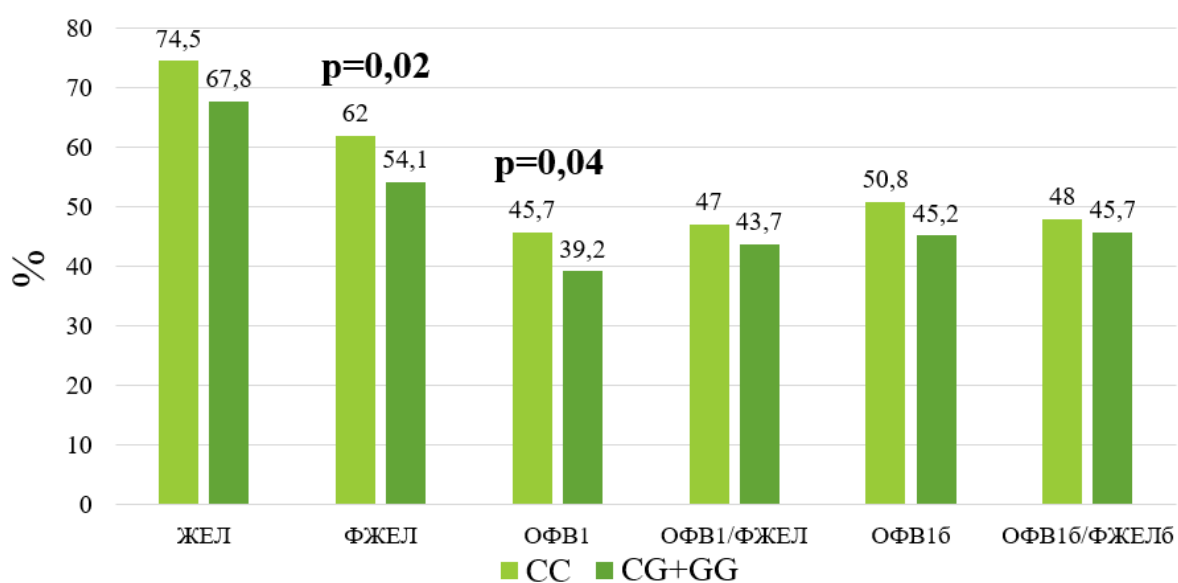


Рисунок 6 - Влияние полиморфизма rs2052030 гена *TRPM8* на функцию легких у больных ХОБЛ.

При анализе больных ХОБЛ и курящих лиц с ИК>10 пачка-лет с ХОБЛ оказался ассоциирован полиморфизм *TRPM8* rs2052030. Гетерозиготы CG rs2052030 гена *TRPM8* достоверно реже встречались среди больных ХОБЛ, по сравнению с гомозиготными носителями CC и GG, которые преобладали в подгруппе больных лиц: 52,4% против 32,8%, $p=0,008$. (рисунок 7).

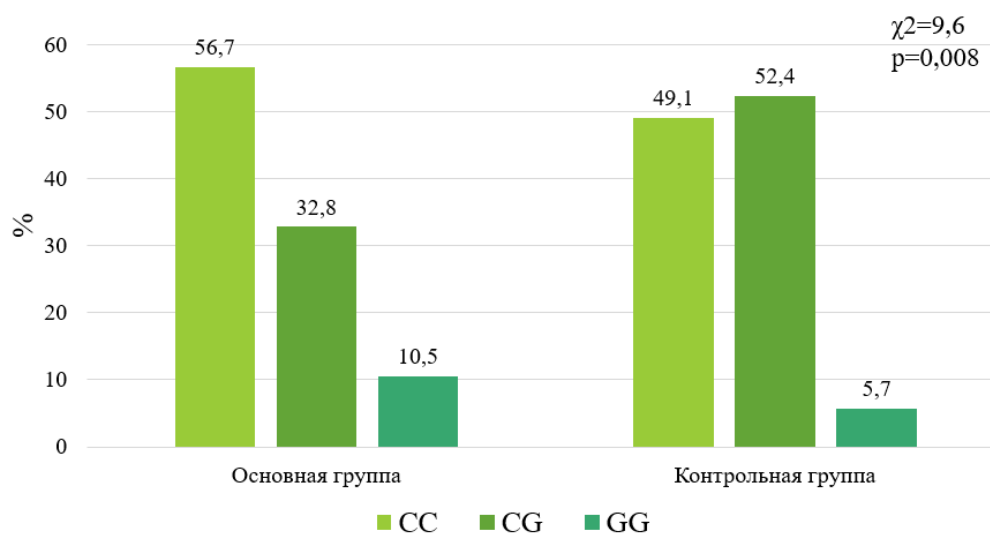


Рисунок 7 - Частота встречаемости генотипов полиморфизма rs2052030 гена *TRPM8* в основной и контрольной группах.

При анализе в сверхдоминантной модели (CG против CC+GG) ассоциация оставалась значимой после коррекции на пол, возраст и анамнез курения (скорректированное отношение шансов (ОШ) 0,59 95% доверительный интервал (ДИ) (0,41; 0,86), $p=0,006$).

ОНП *TRPM8* rs11562975 был проанализирован в доминантной модели наследования (GG против GC+CC), ввиду редкой встречаемости гомозиготных носителей С аллеля. Было установлено, что носители аллеля С в гетеро- и гомозиготном состоянии отличались более низкими значениями спирометрических показателей. Однако отличия были статистически значимыми только для ОФВ₁/ФЖЕЛ исходно и на фоне действия бронхолитика (рисунок 8).

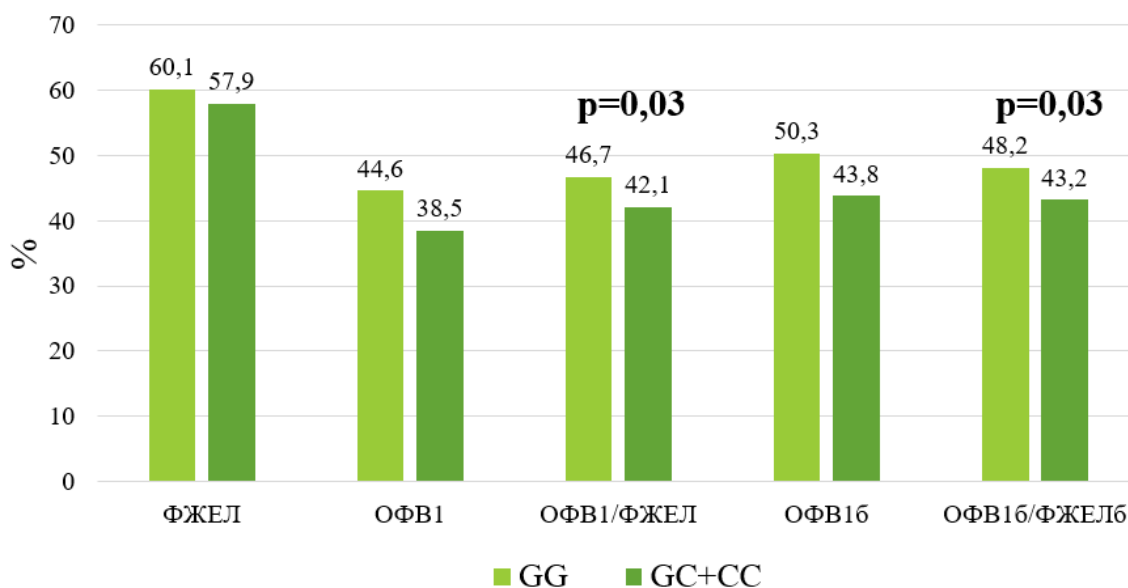


Рисунок 8 - Влияние полиморфизма rs11562975 *TRPM8* на функцию легких у больных ХОБЛ.

Носительство аллеля С (генотипы GC и CC) по полиморфизму *TRPM8* rs11562975 было достоверно ассоциировано со значениями $ОФВ_{16} < 60\%$ в доминантной и мультипликативной модели и демонстрировало тенденции к соответствующей взаимосвязи в общей модели наследования. В доминантной модели ассоциация оставалась значимой после коррекции на пол, возраст и анамнез курения (скорректированное ОШ 2,17 95%ДИ (1,13; 4,19), $p=0,02$) (рисунок 9).

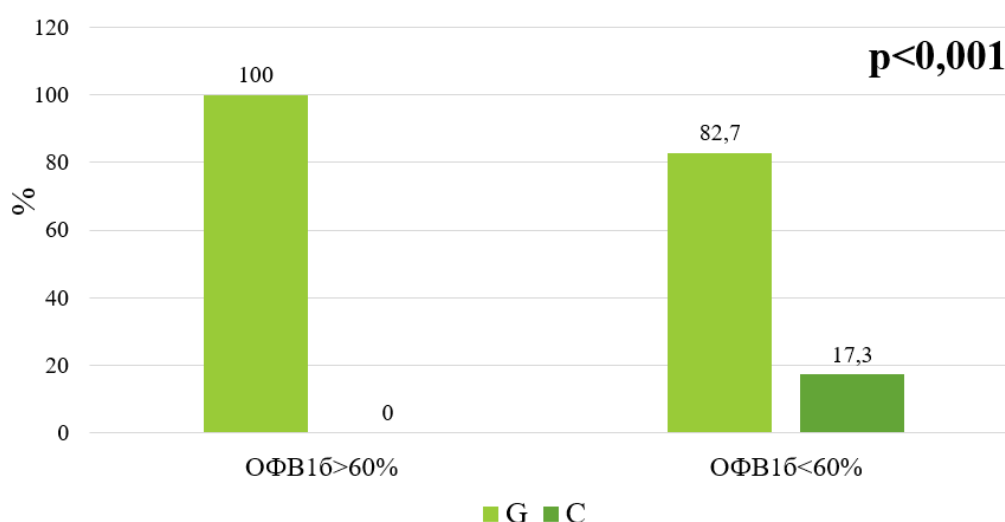


Рисунок 9 - Ассоциация полиморфизма *TRPM8* rs11562975 с $ОФВ_{16} < 60\%$ у больных ХОБЛ.

3.3 Влияние полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8* на прогрессирование бронхиальной обструкции у больных хронической обструктивной болезнью легких

Анализ влияния на прогрессирование бронхиальной обструкции проводился для всех полиморфизмов, однако значимая ассоциация выявилась только с ОНП rs11562975 гена *TRPM8*.

В частности, было обнаружено, что у пациентов с прогрессирующей бронхиальной обструкцией преобладает носительство С аллеля (в составе генотипов GC и CC) по ОНП *TRPM8* rs11562975 (рисунок 10). Среди больных группы с прогрессированием ХОБЛ частота носительства генотипов GC и CC составляла 35%, что было выше, по сравнению с пациентами группы без прогрессирования бронхиальной обструкции (11%, $p=0,02$). Ассоциация оставалась значимой после коррекции на пол, возраст, анамнез курения и $ОФВ_1$ в логистической регрессионной модели (скорректированное ОШ 1,71 95%ДИ (1,02;2,83), $p=0,04$).

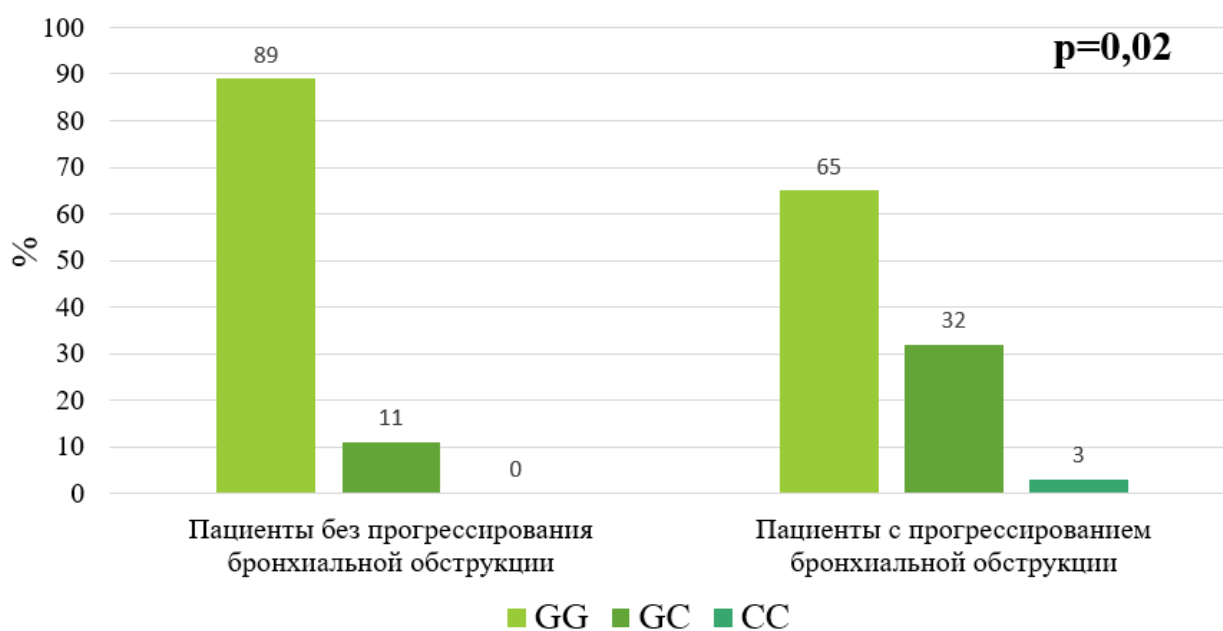


Рисунок 10 - Эффект полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8* на прогрессирование бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.

Носители аллеля С (генотипы GC+CC) отличались более существенным снижением ОФВ₁₆ в течение года по сравнению с больными, имевшими генотип GG: -0,12[-0,34;-0,03] л против -0,02[-0,13;0,04] л, $p=0,002$ (рисунок 12).

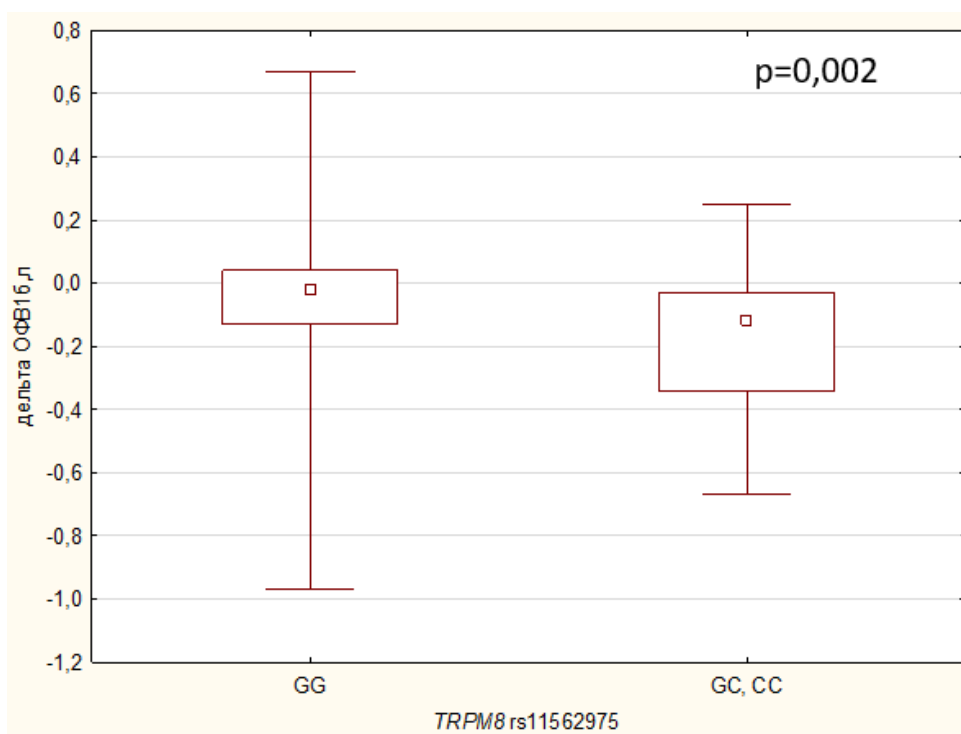


Рисунок 11 - Снижение ОФВ₁₆ (в литрах) в течение года у носителей G и C аллелей rs11562975 гена *TRPM8*.

Можно сделать вывод, что носительство С аллеля (генотипы GC+CC) по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8* является фактором риска более тяжелого течения ХОБЛ, которое характеризуется прогрессирующим снижением ОФВ₁₆.

Таким образом, в результате исследования выявлено, что некоторые полиморфизмы генов *TRPM8* и *TRPA1* способны влиять на предрасположенность к ХОБЛ у курящих лиц, а также оказывать эффект на прогрессирование бронхиальной обструкции при данном заболевании.

В частности, вне зависимости от пола, возраста и анамнеза курения гетерозиготный генотип по полиморфизму *TRPM8* rs2052030 являлся протективным в отношении ХОБЛ, тогда как при носительстве генотипов *CC* или *GG* вероятность наличия заболевания была выше. Учитывая расположение rs2052030 в 3' нетранслируемой области *TRPM8*, его эффект может быть опосредован влиянием на стабильность образующихся мРНК и, соответственно, уровнем экспрессии гена.

Определенные сложности возникают при попытке объяснить сверхдоминантный тип наследования, что, прежде всего, связано с ограниченными знаниями о физиологической и патогенетической роли *TRPM8* у человека. Хотя подобные наблюдения являются единичными, существуют данные, подтверждающие возможность данного типа наследования при ХОБЛ. Так, в ходе мета-анализа была подтверждена патогенная роль гетерозиготного носительства по полиморфизму *IL-1 β* -31T/C в отношении ХОБЛ, при этом гомозиготы имели сниженный риск заболевания [226].

Прочие полиморфизмы *TRPM8*, несмотря на отсутствие взаимосвязи с ХОБЛ как нозологией, оказывали значимый эффект на показатели вентиляционной функции легких. В качестве одного из наиболее важных результатов – удалось верифицировать модулирующее воздействие полиморфизма rs11562975 *TRPM8* на формирование бронхиальной обструкции под действием курения. Больные ХОБЛ носители аллеля *C* в гетеро- и гомозиготном варианте отличались достоверным снижением проходимости дыхательных путей как исходно, так и на фоне действия бронхолитика, по сравнению с больными, имевшими генотип *GG*. В настоящем исследовании полиморфизм rs11562975 оказался независимым предиктором снижения постбронходилатационного значения $ОФВ_1$ менее 60% от должного у больных ХОБЛ, что хорошо согласуется с полученными ранее аналогичными результатами для больных БА, злоупотребляющих курением [5]. При изучении данного полиморфизма выяснилось, что носительство *C* аллеля (генотипы *GC+CC*) является фактором риска более тяжелого течения ХОБЛ, характеризующегося прогрессирующим

бронхиальной обструкции. В ходе исследования выяснилось, что С аллель также чаще встречался среди пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции. СС и GC генотипы по rs11562975 гена *TRPM8* характеризовались более существенным снижением $ОФВ_{16}$ в течение года по сравнению с носителями GG генотипа.

На вентиляционную функцию легких также оказывали влияние другие полиморфизмы гена *TRPM8* (rs2052030, rs10166942, rs1786582). При этом оно было менее выраженным и в большинстве случаев прослеживалось на уровне тенденций с пограничными уровнями статистической значимости. Для полиморфизма rs10166942, расположенного в 5' фланкирующем регионе гена, и, вероятно, влияющем на его экспрессию. В частности, носительство С аллеля служило фактором предрасположенности к формированию холодовой гиперреактивности дыхательных путей у женщин, больных БА [160]. В настоящем исследовании ввиду существенного преобладания мужчин среди больных ХОБЛ не удалось проанализировать половые различия, однако именно носительство генотипа СС сопровождалось более низкими показателями $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ как до, так и после пробы с бронхолитиком.

Помимо полиморфизмов *TRPM8*, связь с особенностями показателей вентиляционной функции легких была установлена для полиморфизмов гена *TRPA1* rs7819749 и rs959974. Первый представляет собой миссенс вариант с аминокислотной заменой Lys186Asn, а второй расположен в зоне интрона. Исследования, подтверждающие функциональную значимость rs7819749, в настоящее время отсутствуют, но rs959974 прежде был ассоциирован с БА у детей. Полиморфизм rs959974 также был достоверно связан со снижением постбронходилатационного $ОФВ_1$ менее 60% у больных ХОБЛ после коррекции на пол, возраст и анамнез курения.

ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TRP КАНАЛОВ НА МАКРОФАГАХ

4.1 Особенности экспрессии TRP на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови

При анализе экспрессии на уровне мРНК, было установлено, что в макрофагах здоровых лиц, не подвергнутых стимуляции, *TRPM8* экспрессировался в наименьшей степени, *TRPA1* был экспрессирован в 16,7 раза выше, *TRPV4* – в 100 раз выше, а *TRPV1* – в 140 раз выше, по сравнению с *TRPM8*. Среди больных ХОБЛ отмечалась аналогичная картина: экспрессия *TRPA1* была увеличена в 4,2 раза, *TRPV4* – в 41 раз, а *TRPV1* – в 334 раза, относительно уровня *TRPM8*. Различия в экспрессии TRP в макрофагах между здоровыми и больными лицами указаны на рисунке 12. Больные ХОБЛ отличались систематически более высоким уровнем экспрессии *TRPV1*. Различия в экспрессии *TRPV1* были значимы при сравнении контрольных M0 макрофагов ($p=0,009$) и макрофагов с M2-подобным фенотипом, стимулированных IL-4 ($p=0,01$). Экспрессия *TRPM8* была также увеличена у больных ХОБЛ, однако различия не достигали статистической значимости.

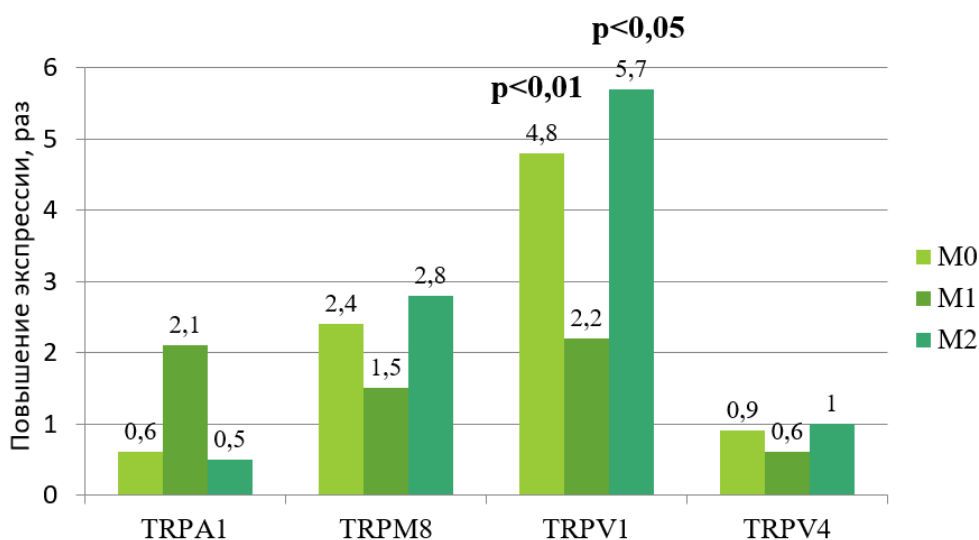


Рисунок 12 – Различия в экспрессии генов TRP на уровне мРНК в макрофагах больных ХОБЛ, по сравнению с макрофагами здоровых лиц.

В макрофагах, полученных из моноцитов здоровых добровольцев, экспрессия генов TRP существенно не реагировала на стимуляцию LPS/IFN- γ или IL-4. Так, под действием LPS/IFN- γ экспрессия *TRPV1* и *TRPV4* несколько снижалась, а *TRPA1* – возрастала. Действие IL-4, напротив, сопровождалось некоторым снижением экспрессии *TRPA1*.

Реакция макрофагов больных ХОБЛ на LPS/IFN- γ и IL-4 была более выраженной (рисунок 13). В частности, в ответ на LPS/IFN- γ отмечалось снижение *TRPV1* и *TRPV4* в 6,2 раза ($p < 0,001$) и в 4,3 раза ($p = 0,08$) соответственно, но увеличение транскрипции *TRPA1* в 5,9 раза ($p = 0,005$). При этом, действие IL-4, напротив, сопровождалось двукратным снижением экспрессии *TRPA1* ($p = 0,02$), но достоверно не влияло на другие гены TRP.

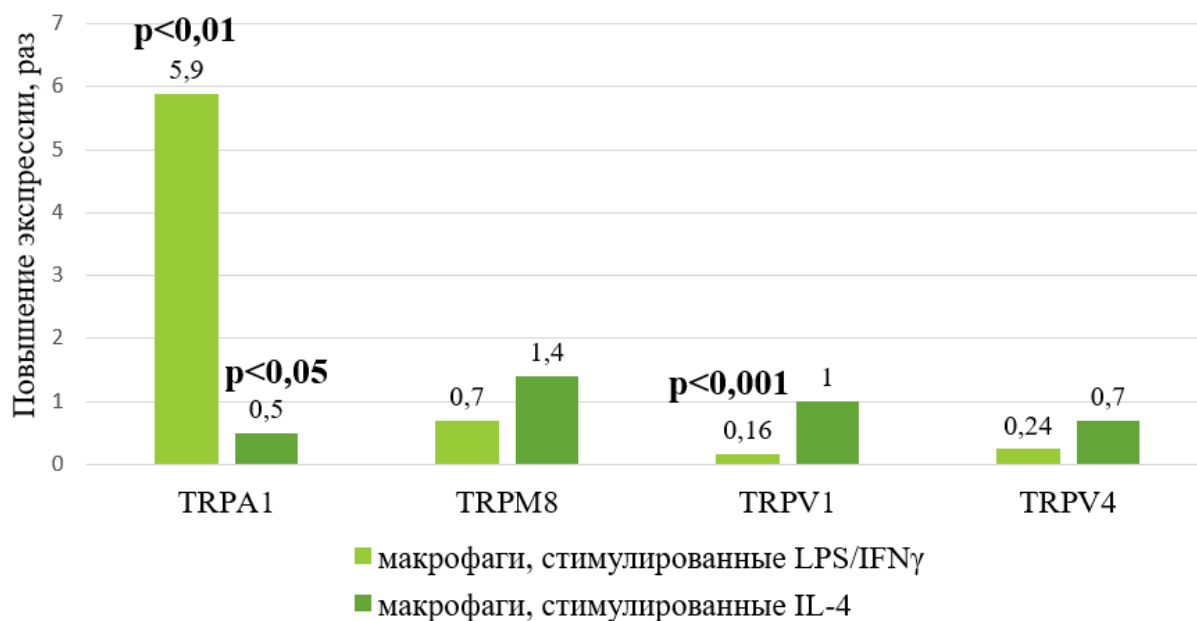


Рисунок 13 – Различия в экспрессии генов TRP на уровне мРНК в макрофагах больных ХОБЛ, стимулированных LPS/IFN- γ или IL-4, по сравнению с М0 контрольными клетками, не получавших соответствующей стимуляции.

Таким образом, при анализе экспрессии генов TRP на макрофагах, полученных из моноцитов больных ХОБЛ и испытуемых контрольной группы, была обнаружена достоверная апрегуляция *TRPV1* и тенденция к увеличению уровня транскриптов *TRPM8*.

Макрофаги больных ХОБЛ были более чувствительны к основным факторам, вызывающим поляризацию – LPS/IFN- γ и IL-4, и реагировали на LPS/IFN- γ снижением экспрессии *TRPV1* и *TRPV4*, но увеличением *TRPA1* и *TRPM8*. При этом экспозиция с IL-4 снижала экспрессию *TRPA1*, но не влияла на каналы *TRPV*. По имеющимся данным, активация *TRPA1* на макрофагах сопровождается угнетением поляризации в М1-фенотип [221]. Подобным эффектом обладает и TRPM8: в эксперименте ментол подавлял продукцию TNF- α макрофагами и способствовал синтезу IL-10 [121]. Тем не менее, *TRPM8* был необходим для осуществления эффективного фагоцитоза, при его блокаде фагоцитарная активность клеток падала. В отличие от *TRPA1* и *TRPM8*, *TRPV1* и

TRPV4 ассоциированы с провоспалительным ответом макрофагов. Так, блокирование *TRPV1* селективными антагонистами снижало LPS-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-18 и экспрессию циклооксигеназы-2 [163]. Также, макрофаги, полученные от *TRPV1*-нокаутных мышей, демонстрировали снижение способности к фагоцитозу при стимуляции LPS [83]. Аналогичные эффекты были отмечены для *TRPV4*. Активация этого канала на макрофагах сопровождалась увеличением продукции активных форм кислорода и азота [100], а сам рецептор был необходим для LPS-стимулированного фагоцитоза *E. coli* и латексных частиц [192]. Таким образом, при действии провоспалительного стимула, клетки компенсаторно начинали экспрессировать TRP с противовоспалительной активностью, тогда как в условиях экспозиции с противовоспалительным IL-4, экспрессия *TRPA1* и *TRPM8*, напротив, увеличивалась.

4.2 Особенности экспрессии TRP на макрофагах мокроты

Для определения особенностей экспрессии TRP каналов на уровне белка в мокроте из общей группы больных ХОБЛ (134 человека) было выбрано 39 человек, у 24 (61,5%) отмечено прогрессирование бронхиальной обструкции, а у 15 (38,5%) отсутствует прогрессирование бронхиальной обструкции в течение года. В группу контроля вошли 8 человек из группы курящих лиц (104 человека).

Установлено, что процент макрофагов, экспрессирующих каналы TRP, в целом был невысок. Среди лиц контрольной группы каналы *TRPA1* и *TRPV4* имели наиболее высокую экспрессию (около 13%), тогда как *TRPM8* и *TRPV1* были экспрессированы в меньшей степени (около 6%). У больных ХОБЛ наблюдали достоверное увеличение экспрессии *TRPV1* (как по проценту положительных клеток, так и по значению nMFI), а также некоторое снижение *TRPA1*, которое не было статистически значимым (рисунок 14).

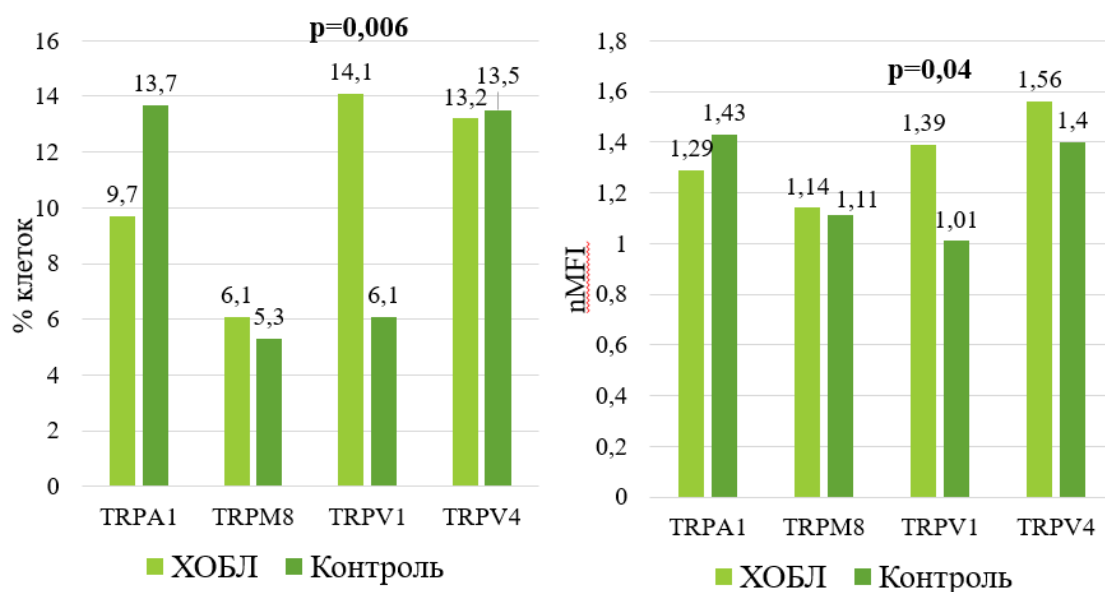


Рисунок 14 – Экспрессия белка каналов TRP в макрофагах мокроты больных ХОБЛ и лиц контрольной группы.

У больных ХОБЛ экспрессия всех каналов TRP была взаимосвязана, в наибольшей степени это было характерно для TRPA1 и TRPM8 (таблица 16). У лиц контрольной группы сохранялась взаимосвязь экспрессии только между TRPA1 и TRPM8 ($\rho=0,74$, $p<0,001$), а все прочие корреляции исчезали.

Таблица 16 – Корреляция экспрессии каналов TRP на макрофагах мокроты больных ХОБЛ

	TRPA1	TRPM8	TRPV1	TRPV4
TRPA1		0,72, $p<0,001$	0,56, $p<0,001$	0,48, $p=0,002$
TRPM8			0,44, $p=0,005$	0,33, $p=0,04$
TRPV1				0,43, $p=0,005$

Не обнаружена взаимосвязь экспрессии TRP с индексом курения, однако экспрессия TRPV4 была значимо выше среди активных курильщиков, по сравнению с лицами, курившими в прошлом, либо никогда не курившими. Различие было значимо, как для экспрессии, выраженной в процентах (15,2

[9,3;23,6] % против 9,7 [3,7;13,1] %, $p=0,006$), так и для значений nMFI (1,64 [1,44;1,86] против 1,41 [1,22;1,64], $p=0,03$).

Экспрессия TRPA1 и TRPM8 имела прямую корреляцию с некоторыми показателями бронхиальной проходимости (таблица 17). Так, ОФВ₁/ФЖЕЛ коррелировал с TRPA1 и TRPM8. Вторым показателем, взаимосвязанным с экспрессией данных TRP был СОС₂₅₋₇₅, его корреляции с TRPA1 и TRPM8 также были значимы.

Таблица 17 – Корреляция экспрессии TRPA1 и TRPM8 в макрофагах с показателями спирометрии у больных ХОБЛ

	TRPM8	TRPA1
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ	$\rho=0,32$ ($p=0,04$)	$\rho=0,36$ ($p=0,02$)
СОС ₂₅₋₇₅	$\rho=0,35$ ($p=0,03$)	$\rho=0,37$ ($p=0,02$)

Таким образом, процент макрофагов мокроты, экспрессирующих перечисленные TRP каналы, оказался невысоким и чаще находился в диапазоне от 5% до 15%. Сравнивая экспрессию TRP на макрофагах больных ХОБЛ и испытуемых из контрольной группы, обнаружено, что TRPV1 был единственным каналом, экспрессия которого при ХОБЛ была достоверно увеличена. При этом экспрессия TRPV4 существенно не отличалась между группами, уровень TRPM8 был немного увеличен, а TRPA1 несколько снижен. Аналогичная закономерность прослеживалась в макрофагах, полученных из моноцитов больных ХОБЛ, при сравнении экспрессии TRP на уровне мРНК с макрофагами, дифференцированными из моноцитов лиц контрольной группы. Это свидетельствует о надежности и воспроизводимости результатов, и указывает на то, что найденные особенности, вероятно, генетически или эпигенетически детерминированы. В литературе отсутствуют данные об экспрессии каналов TRP на макрофагах больных ХОБЛ, а имеющиеся источники указывают на повышенную экспрессию TRPV1, TRPV4 и TRPM8 в клетках респираторного эпителия [44, 140].

4.2.1 Особенности экспрессии TRP каналов у больных с прогрессирующим бронхиальной обструкцией

В группе с прогрессирующей обструкцией уровень экспрессии TRPV4 был достоверно выше по сравнению с группой без прогрессирующей обструкции 14,1% против 7,5%, соответственно ($p=0,004$). В отношении других каналов подобных закономерностей не выявлено (таблица 15).

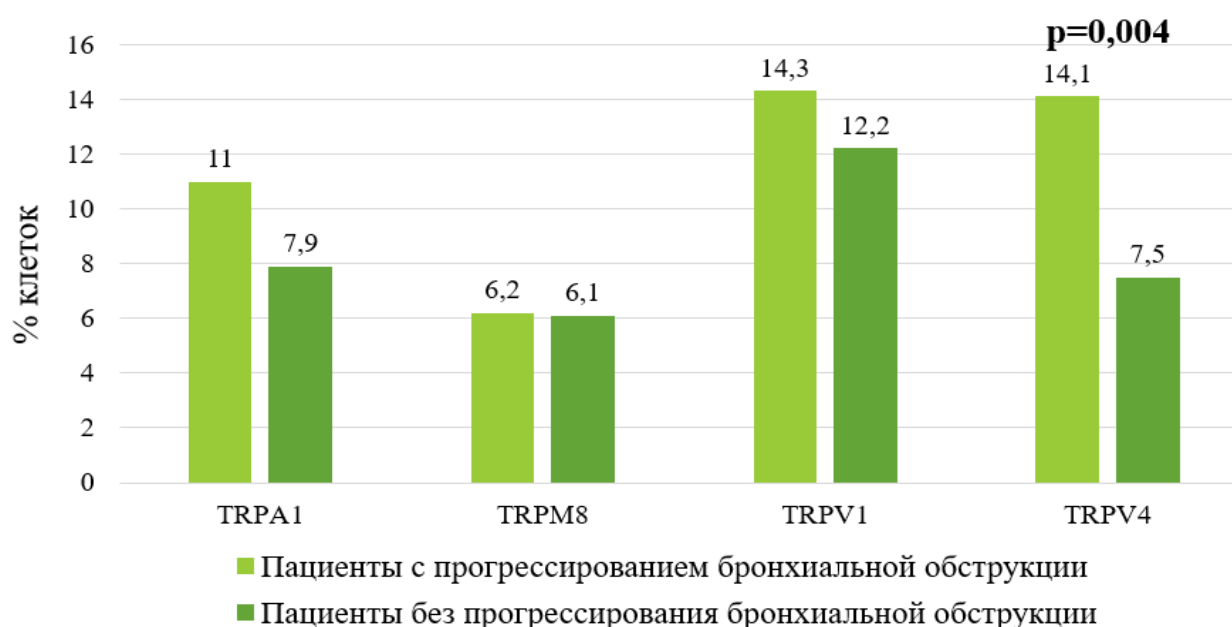


Рисунок 15 - Процентное соотношение макрофагов, экспрессирующих каналы TRP в образцах мокроты больных с прогрессирующей обструкцией и без прогрессирующей обструкции.

Можно предположить, что высокая экспрессия TRPV4 приводит к прогрессирующей обструкции за счет процессов ремоделирования дыхательных путей у больных ХОБЛ [116, 33], интенсивность которых, вероятно, преобладает в группе с прогрессирующей обструкцией. Есть данные, что

активация канала TRPV4 канала играет важную роль в развитии легочной гипертензии [205]. Показано, что TRPV4 опосредует провоспалительную гибель клеток, вызванную воздействием сигаретного дыма [181]. Эти данные согласуются с полученными в настоящем исследовании. Поскольку при изучении взаимосвязи курения с уровнем TRP рецепторов вновь статистически значимым оказался канал TRPV4.

ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ TRP КАНАЛОВ С ОСОБЕННОСТЯМИ ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

6

5.1 Особенности воспалительного ответа макрофагов *in vitro* и его взаимосвязь с экспрессией TRP каналов

Культивирование макрофагов в присутствии GM-CSF и последующая стимуляция LPS/IFN- γ приводили к появлению распластанных клеток округлой формы, имеющих классическую морфологию «яичницы-глазуньи» (M1 провоспалительный фенотип). Поляризация в присутствии IL-4, напротив, сопровождалась появлением вытянутых, веретенообразных клеток, представляющих собой альтернативно активированные макрофаги M2 противовоспалительного фенотипа (рисунок 16).

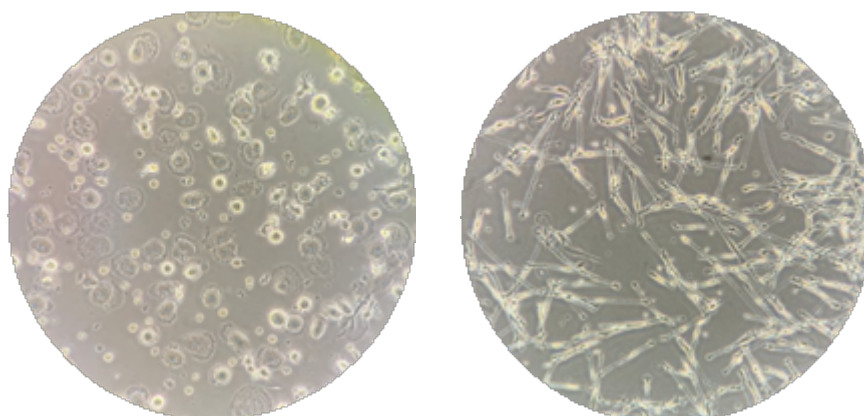


Рисунок 16 – Морфология макрофагов, полученных культивированием с GM-CSF и стимуляцией LPS/IFN- γ (M1-поляризация, слева), либо стимуляцией IL-4 (M2-поляризация, справа). Фазовый контраст. Увеличение: 10x20.

При изучении изменения концентрации цитокинов в культуральной среде выяснилось, что в ответ на стимуляцию макрофагов LPS/IFN- γ происходил достоверный рост продукции CXCL10, IL-10, IL-4, IL-1b, TNF α , IL-6, IL-12p70, TGFb1. Концентрация IL-2, IL-8 и MCP-1 в ответ на стимуляцию макрофагов LPS/IFN- γ существенно не изменялась. Уровень IL-2 был низким и не реагировал на стимуляцию, тогда как IL-8 исходно определялся в концентрациях около 5 нг/мл, а в ответ на LPS/IFN- γ происходило его снижение. Продукция MCP-1 также была исходно высокой и достоверно не изменялась под действием LPS/IFN- γ . Обращал на себя внимание относительно более высокий прирост уровня CXCL10 у больных ХОБЛ, тогда как в контрольной группе медианное значение его концентрации после стимуляции LPS/IFN- γ было более, чем в два раза ниже. В то же время продукция противовоспалительного цитокина IL-10 более существенно возрастала среди лиц контрольной группы, несмотря на то, что исходные концентрации цитокина были сопоставимы в обеих группах (рисунок 17).

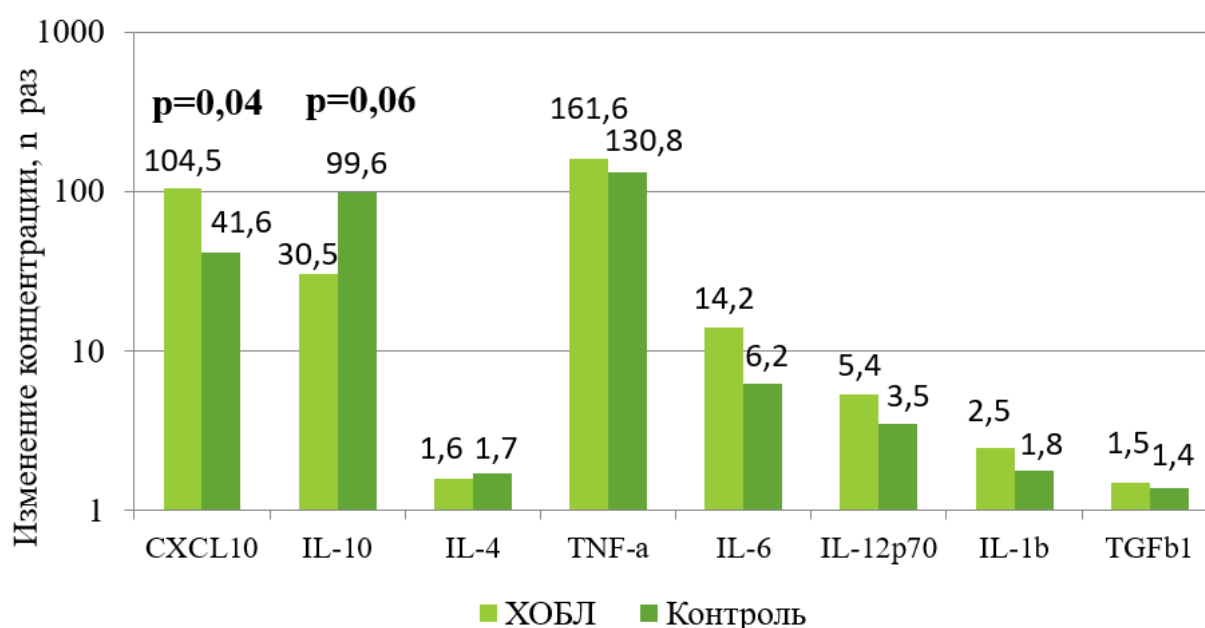


Рисунок 17 – Кратность изменения концентрации цитокинов в культуральной среде в ответ на стимуляцию макрофагов LPS/IFN- γ по сравнению с исходным уровнем.

Взаимоотношения исходной экспрессии TRPM8 с продукцией цитокинов под действием LPS/IFN- γ характеризовались отрицательной корреляцией с IL-4, CXCL10, IL-1 β , TGF- β 1. Для TRPA1 выявлялась прямая взаимосвязь с реакцией TNF- α и IL-17a. TRPV4 демонстрировал прямую корреляцию с IL-12p70 и обратную с TGF- β 1, для TRPV1 корреляции с цитокинами под действием LPS/IFN- γ не выявлено (рисунок 18).

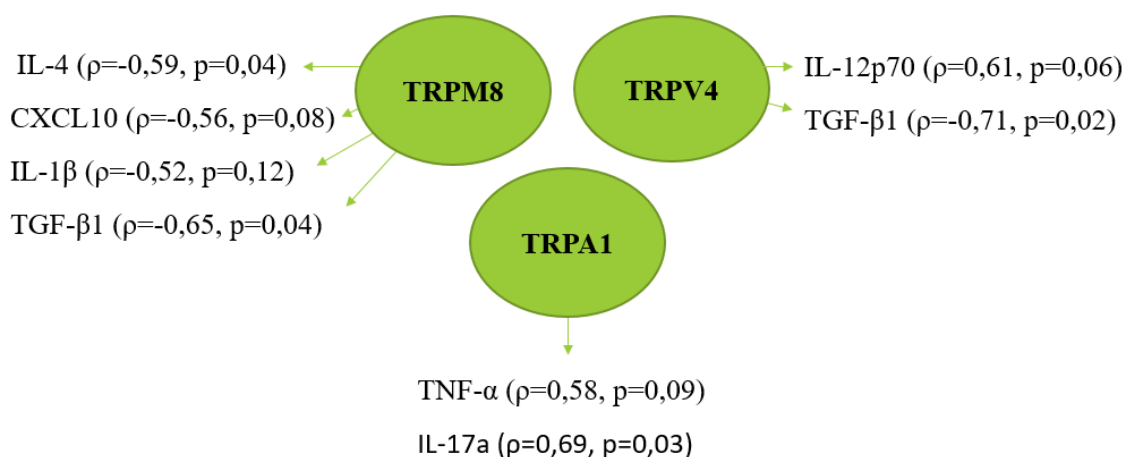


Рисунок 18 – Корреляции экспрессии TRP с продукцией цитокинов под действием LPS/IFN- γ .

Поляризация в присутствии IL-4 сопровождалась появлением обратной корреляции TRPM8 с IL-2 и IL-17a, TRPA1 – с IL-12p70 и IL-8, TRPV1 – с IL-17a и IL-12p70, а TRPV4 – с IL-2, IL-17a, IL-6, а также CXCL10 (рисунок 19).

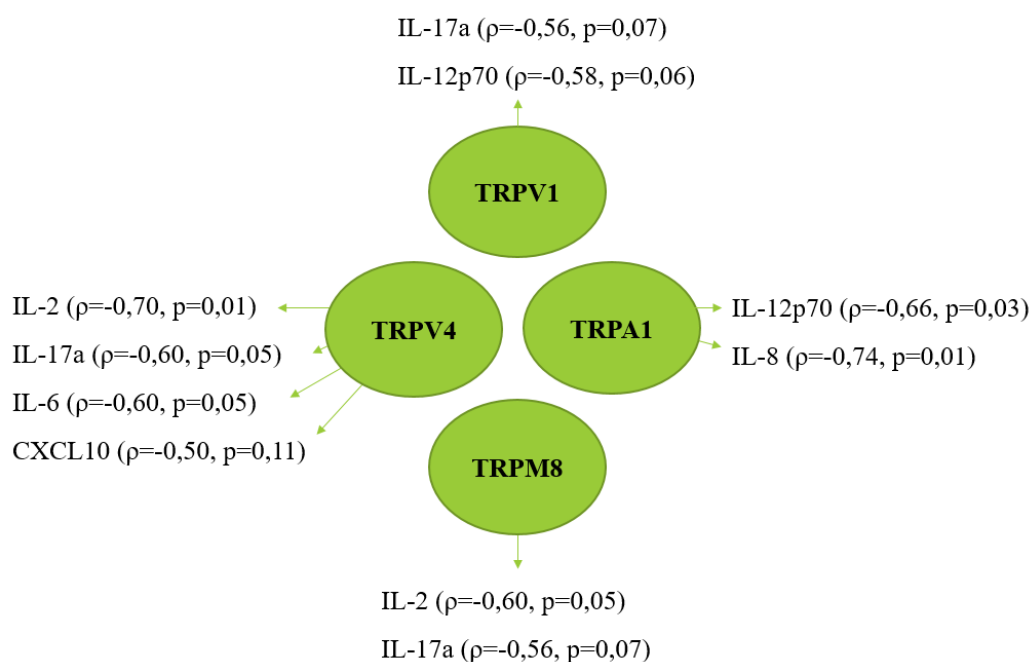


Рисунок 19 - Корреляции экспрессии TRP с продукцией цитокинов под действием IL-4.

Поляризация LPS/IFN- γ увеличивала в макрофагах продукцию большинства цитокинов, в основном провоспалительных, в том числе IL-1 β , TNF- α , IL-6, а M2 поляризация в присутствии IL-4 приводила к росту продукции IL-2, IL-12p70 и TGF- β 1. Таким образом, для M1 клеток типичны более высокие концентрации IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL10 и IL-12p70.

В аспекте гуморальных воспалительных маркеров больные ХОБЛ наиболее сильно отличались по уровню IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, провоцирующих воспаление и ассоциированных с обострениями ХОБЛ [108, 170, 234], а также противовоспалительного IL-10, выполняющего защитную роль при данном заболевании. Примечательно, что M1 и M2 макрофаги являются одними из основных источников данных цитокинов в респираторном тракте.

Хорошо известно, что IL-4 вызывает поляризацию макрофагов в M2 противовоспалительный фенотип, отличительными чертами которого являются низкая способность к фагоцитозу и презентации антигенов, но секреции противовоспалительных цитокинов IL-10, обладающего иммуносупрессивным эффектом.

5.2 Особенности воспалительного ответа макрофагов *in vivo* и его взаимосвязь с экспрессией TRP каналов

В мокроте больных ХОБЛ были существенно увеличены концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, CXCL10, MCP-1, а также противовоспалительных IL-4 и IL-10 (рисунок 20). Уровни IL-2, TNF- α , IFN- γ и TGF- β 1 хотя и были несколько выше у больных ХОБЛ, значимо не отличались от лиц контрольной группы.

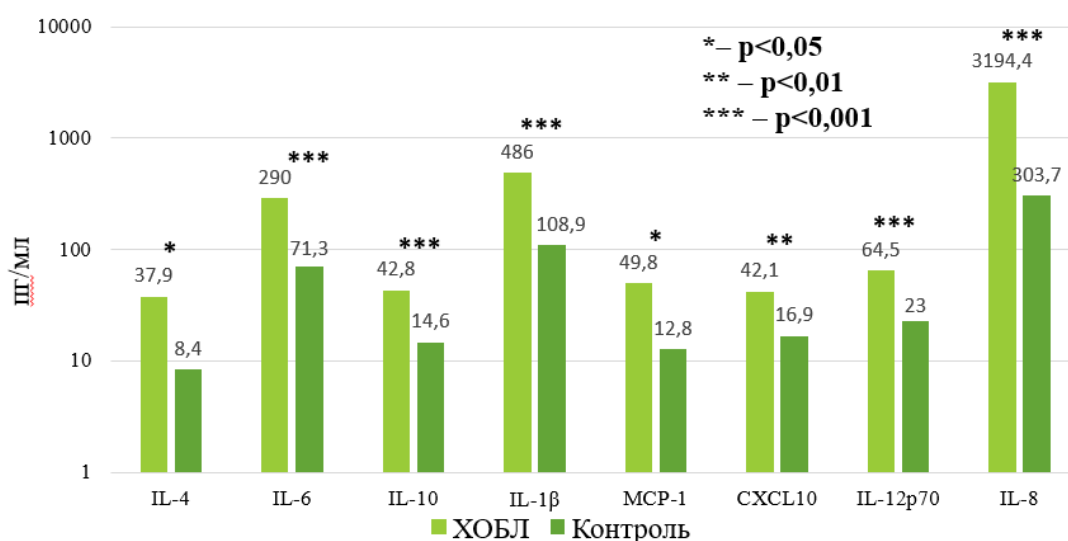


Рисунок 20 – Концентрация цитокинов и факторов ремоделирования в мокроте больных ХОБЛ и лиц контрольной группы.

При этом у лиц, продолжавших курить, отмечалось статистически значимое увеличение концентраций IL-2 (2,8 [1,4;4,1] пг/мл против 0,1 [0;2,8] пг/мл, $p=0,02$), IL-17a (5,4 [1,1;19,3] пг/мл против 1,5 [0;2,8] пг/мл, $p=0,03$), IL-10 (46,8 [32,8;52,7] пг/мл против 35,9 [18,6;42,8] пг/мл, $p=0,01$) и IL-12p70 (70,7 [56,7;76,8] пг/мл против 48,9 [24,5;66,0] пг/мл, $p=0,01$). Тенденции к повышению отмечались также для IL-6 и IFN- γ .

Наибольшее число корреляционных взаимосвязей с концентрацией цитокинов и факторов ремоделирования было обнаружено для канала TRPV4. Его экспрессия была взаимосвязана с уровнями IL-4, CXCL10, MCP-1, TGF- β 1, EGF.

Дополнительно, для TRPV1 была найдена взаимосвязь с TNF- α и TIMP-1, для TRPM8 – с IL-8 (рисунок 21).

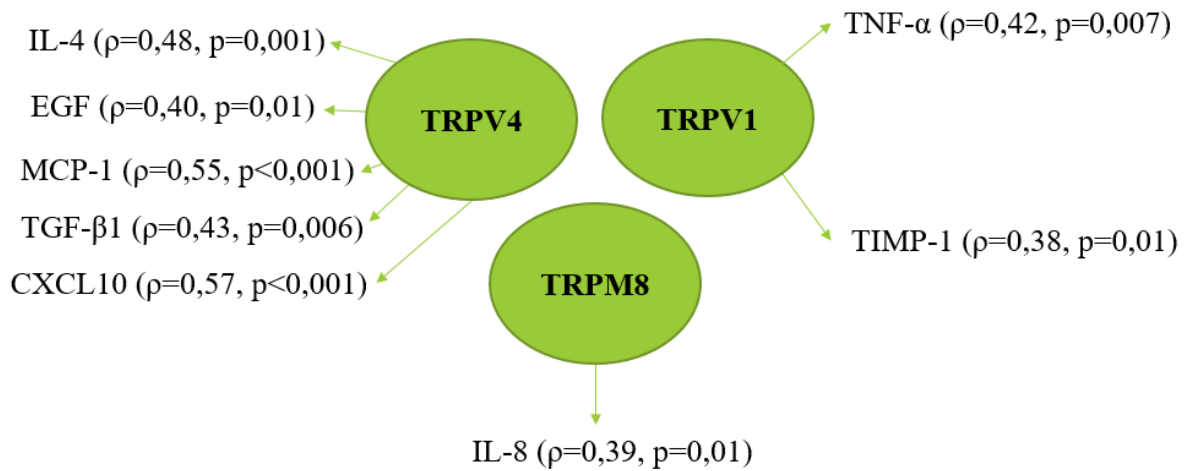


Рисунок 21 - Взаимосвязь концентрации цитокинов и факторов ремоделирования с каналами TRP.

Сравнивая уровни экспрессии цитокинов у пациентов с прогрессирующей обструкцией и без прогрессирования бронхиальной обструкции (рисунок 22), выяснилось, что в первой группе наблюдения были высоко экспрессированы как про-, так и противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-10, IL-2, IFN- γ , IL-12p70) и факторы ремоделирования (CXCL10, MCP-1, TGF β -1).

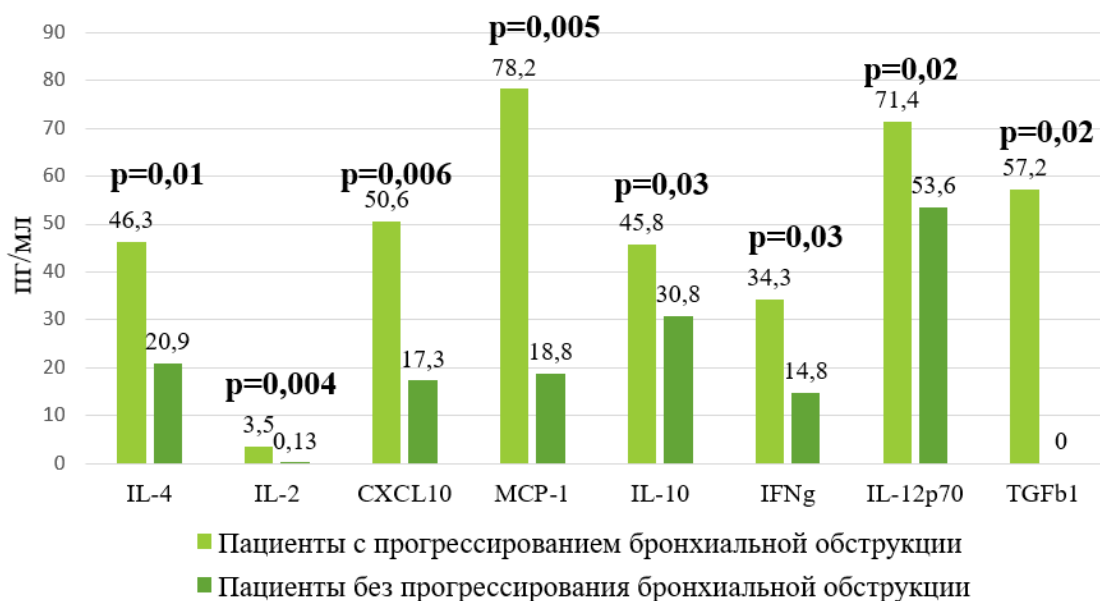


Рисунок 22 - Особенности цитокинового профиля у пациентов с прогрессирующей бронхиальной обструкцией и без прогрессирования бронхиальной обструкции.

Уровни цитокинов и факторов ремоделирования не были связаны с параметрами функции внешнего дыхания, однако соотношение MMP-9/TIMP-1 отрицательно коррелировало с ФЖЕЛ ($\rho = -0,29$, $p = 0,07$), ОФВ1 ($\rho = -0,36$, $p = 0,02$) и ИТ ($\rho = -0,31$, $p = 0,05$). Показатель MMP-9/TIMP-1 также был значительно выше в подгруппе ХОБЛ с крайне тяжелой бронхиальной обструкцией (GOLD IV) по сравнению с больными, имевшими более легкую обструкцию GOLD II, III (265,4 [26,4;3323,9] против 16,4 [2,9;228,2], $p = 0,04$).

Повышение концентрации провоспалительных цитокинов свидетельствует об активном воспалении дыхательных путей. Показано, что IL-4 стимулирует пролиферацию, дифференцировку и активацию фибробластов, эндотелиоцитов, эпителиальных клеток, усиливает привлечение воспалительных клеток.

MSP-1 коррелировал с тяжестью ХОБЛ [176]. Предполагается, что TGF β -1 является медиатором фиброза периферических дыхательных путей у больных ХОБЛ, а IFN- γ ответственен за активацию макрофагов [86].

Известно, что высокая концентрация IL-8 коррелирует с высоким содержанием нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже [98], особенно у пациентов с частыми обострениями ХОБЛ. IL-8 высвобождается в больших количествах у больных ХОБЛ, продолжающих курить. IL-10-противовоспалительный цитокин, регулирует чрезмерную продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов [203].

Таким образом, больные ХОБЛ характеризуются высоким уровнем воспаления в дыхательных путях, о чем говорят повышенные концентрации цитокинов в мокроте. Удалось установить некоторые взаимосвязи экспрессии TRP каналов с воспалительными маркерами. Так TRPV1, который был гиперэкспрессирован на макрофагах больных ХОБЛ, был также взаимосвязан с уровнем TNF- α . Экспрессия TRPV4, увеличенная у курящих лиц, коррелировала с

концентрациями некоторых цитокинов, в том числе противовоспалительными (IL-4 и TGF- β 1) и провоспалительными (CXCL10, MCP-1, IFN- γ). TRPM8 был взаимосвязан с уровнем провоспалительного IL-8. Уровни цитокинов в мокроте не были взаимосвязаны с показателями функции внешнего дыхания у обследованных больных ХОБЛ. Таким образом, предполагаемое влияние TRP на бронхиальную проходимость не обязательно опосредовано продукцией изученного спектра цитокинов, а может быть вызвано какими-либо неучтенными факторами.

**ГЛАВА 6. СПОСОБЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ
И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ
БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ
С УЧЕТОМ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И СОПУТСТВУЮЩИХ
КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРЕДИКТОРОВ**

**6.1 Способ прогнозирования риска формирования хронической
обструктивной болезни легких среди курящих лиц**

На основании проведенного анализа получены данные о протективном влиянии гетерозиготного полиморфизма rs2052030 гена *TRPM8* на формирование ХОБЛ у курящих лиц. Соответственно, гомозиготные носители имеют повышенный риск развития ХОБЛ. В результате отбора были выявлены три переменные, способные оказать влияние на формирование ХОБЛ у курящих лиц, в том числе: ОНП rs2052030 гена *TRPM8*, возраст пациента и индекс курения.

Методом биномиальной логистической регрессии установлено взаимовлияние вышеупомянутых параметров на течение ХОБЛ и определены коэффициенты для данных переменных.

Вид разработанного прогностического уравнения:

$$F = - 6,22738 + 0,3746 \times \text{ОНП} + 0,10491 \times \text{ВОЗР} + 0,03958 \times \text{ИК},$$

где ОНП – переменная, отражающая генотип по полиморфизму rs2052030 гена *TRPM8* и принимающая значение 0 при генотипе CG и 1 – в случае генотипов CC или GG;

ВОЗР – переменная, отражающая возраст в годах;

ИК – переменная, отражающая индекс курения (пачка-лет);

рассчитывают вероятность (P) формирования ХОБЛ по формуле:

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

где e – основание натурального логарифма, равное 2,718;

F – значение, полученное вычислением по формуле, приведенной выше;

Полученную вероятность сравнивают с граничным значением 0,65. При $P \geq 0,65$ прогнозируют высокий риск формирования ХОБЛ, а при $P < 0,65$ – низкий риск развития заболевания.

Разработанное уравнение имело достаточную классифицирующую способность (площадь под ROC-кривой 0,88 95%ДИ(0,82;0,91), $p < 0,001$) и прогностические характеристики: чувствительность – 78%, специфичность – 83%, точность – 80% (рисунок 23).

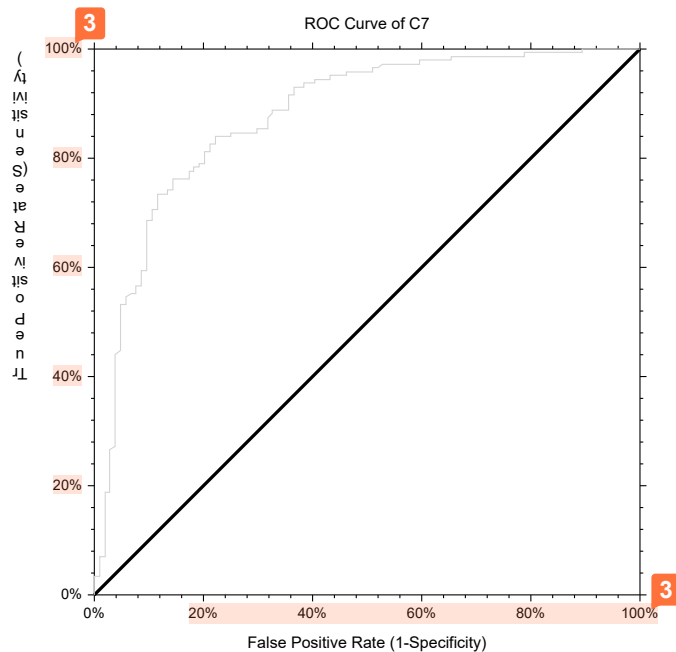


Рисунок 23 - ROC – кривая, построенная на основании математического уравнения по прогнозированию риска формирования ХОБЛ среди курящих лиц в зависимости от ОНП rs2052030 гена *TRPM8*, возраста пациента и индекса курения.

Ниже приведены примеры использования предложенного способа:

Пример 1. Пациент М., 51 год. Первично обследован во время прохождения профилактического осмотра. Из анамнеза - курит с 20 лет по 10 сигарет в день. Показатели спирометрии в пределах нормы: $ОФВ_1 - 88,5\%$, $ОФВ_1/ФЖЕЛ - 72,1\%$. Произведен забор крови для генетического анализа, по результатам был выявлен генотип *СС* по полиморфизму *rs2052030* гена *TRPM8*. Проведена беседа о необходимости отказа от курения.

При условии курения в том же объеме расчетная вероятность развития ХОБЛ через 5 лет составит:

Возраст через 5 лет = $51 + 5 = 56$ лет.

Индекс курения через 5 лет = $(56 - 20) \times 10 / 20 = 18$.

$$F = -6,22738 + 0,3746 \times ОНП + 0,10491 \times ВОЗР + 0,03958 \times ИК \\ = -6,22738 + 0,3746 \times 1 + 0,10491 \times 56 + 0,03958 \times 18 = 0,73462$$

$$P = 1 / (1 + e^{-F}) = 1 / (1 + 2,718^{-0,73462}) = 0,676$$

Поскольку полученное значение вероятности *P* превышает граничное значение (0,65), риск формирования ХОБЛ расценен как высокий.

Несмотря на рекомендации, в течение последующих 5 лет пациент не отказался от курения и не сократил число выкуриваемых сигарет в день. При повторном визите – жалобы на регулярный продуктивный кашель и одышку (степень I по шкале mMRC). По результатам спирометрического исследования выявлено снижение $ОФВ_1$ до 68,8% и $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ – до 62,3%. На фоне действия бронхолитика $ОФВ_1 - 87,9\%$, $ОФВ_1/ФЖЕЛ - 67,2\%$, что соответствует диагнозу ХОБЛ с вентиляционными нарушениями легкой степени (GOLD stage I). Таким образом, сделанный прогноз оказался верным.

Пример 2. Пациент П., 50 лет. Обратился с жалобами на длительный продуктивный кашель. Курит с 27 лет по 1,5 пачки сигарет в день ($ИК=34,5$). При генетическом исследовании выявлено носительство протективного гетерозиготного генотипа *CG* по полиморфизму *rs2052030* гена *TRPM8*.

Расчетная вероятность наличия ХОБЛ на момент обращения:

$$F = -6,22738 + 0,3746 \times ОНП + 0,10491 \times ВОЗР + 0,03958 \times ИК \\ = -6,22738 + 0,3746 \times 0 + 0,10491 \times 50 + 0,03958 \times 34,5 = 0,38363$$

$$P = 1 / (1 + e^{-F}) = 1 / (1 + 2,718^{-0,38363}) = 0,595$$

Поскольку полученное значение вероятности P меньше 0,65, риск наличия ХОБЛ расценен как низкий.

При дальнейшем обследовании отклонений в показателях спирометрии не выявлено: $ОФВ_1$ – 89%, $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ – 87,5%. ХОБЛ не была подтверждена, выставлен диагноз «Хронический необструктивный бронхит». Таким образом, сделанный прогноз подтвердился.

6.2 Способ прогнозирования прогрессирующей бронхиальной обструкции у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

На основании проведенного анализа получены данные о существенном влиянии C аллеля ОНП rs11562975 гена *TRPM8* на прогрессирование бронхиальной обструкции у пациентов с ХОБЛ. Соответственно, GG генотип является протективным в отношении прогрессирования бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ. В результате исследования выявлены четыре переменные, способные оказать влияние на прогрессирование бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ: генотип по ОНП rs11562975 гена *TRPM8*, $ОФВ_{16}$, (% от должного), частота обострений (ЧО), значение САТ в баллах.

Методом биномиальной логистической регрессии установлено взаимовлияние вышеупомянутых параметров на прогрессирование бронхиальной обструкции и определены коэффициенты для данных переменных.

Вид разработанного прогностического уравнения:

$$F = -5,20318 + 0,89733 \times rs11562975 + 0,05320 \times ОФВ_{16} + 0,67048 \times ЧО + 0,15464 \times САТ,$$

где *rs11562975* – переменная, принимающая значение «1» при генотипе GC или CC по ОНП rs11562975 гена *TRPM8*, «0» - при генотипе GG.

$ОФВ_{16}$ – количественная переменная, отражающая постбронходилатационный объем форсированного выдоха за 1 секунду, выражаемая в процентах от должного.

$ЧО$ – переменная, принимающая значение «1» у пациентов с частыми обострениями, «0» - с редкими обострениями.

$САТ$ – результат теста оценки ХОБЛ, выраженный в баллах.

Вычисление вероятности прогрессирования бронхиальной обструкции производится по формуле:

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

где e – основание натурального логарифма (2,718),

F – значение, полученное вычислением по формуле.

Для полученной вероятности P определено граничное значение, равное 0,71. В случае, если P больше 0,71, риск прогрессирования ХОБЛ считается высоким, если меньше 0,71 – низким.

Разработанное уравнение имело достаточную классифицирующую способность (площадь под ROC-кривой 0,81 95%ДИ(0,72;0,87), $p < 0,05$) и прогностические характеристики: чувствительность 76%, специфичность 80%, точность 75% (рисунок 24).

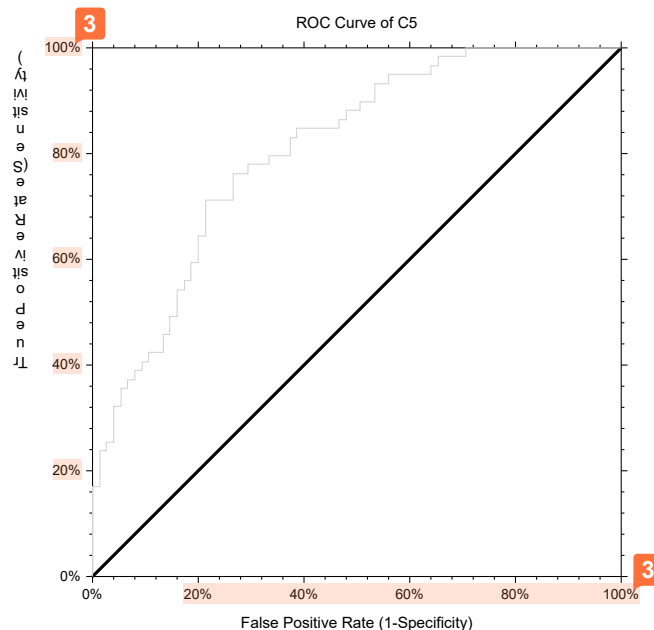


Рисунок 24 – ROC-кривая, построенная на основании математического уравнения по прогнозированию прогрессирующей обструкции у пациентов с ХОБЛ в

зависимости от генотипа по ОНП rs11562975 гена *TRPM8*, ОФВ₁₆, частоты обострений, САТ.

Ниже приводятся примеры использования разработанного способа прогнозирования течения ХОБЛ.

Пример 1. Больной П., 63г. Диагноз: Хроническая обструктивная болезнь легких, эмфизематозный тип, тяжелой степени тяжести, ремиссия. ДН I. ИК 55 пачка-лет.

Вне обострения произведен забор крови для генетического анализа, в результате был выявлен генотип GC по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8*; при проведении спирометрии ОФВ₁₆ равен 42% (1,45л). За предшествующий год произошло 3 обострения ХОБЛ. Результат тестирования САТ – 28 баллов.

На основании разработанного способа прогнозирования прогрессирующей обструкции произведен расчет:

$$\begin{aligned}
 F &= - 5,20318 + 0,89733 \times \text{rs11562975} + 0,05320 \times \text{ОФВ}_{16} + 0,67048 \times \text{ЧО} + \\
 &+ 0,15464 \times \text{САТ} = - 5,20318 + 0,89733 \times 1 + 0,05320 \times 42 + \\
 &+ 0,67048 \times 1 + 0,15464 \times 28 = 1,391 \\
 P &= 1 / (1 + e^{-F}) = 1 / (1 + 2,718^{-1,391}) = 0,801
 \end{aligned}$$

Поскольку полученное значение P (0,801) больше 0,71, можно предположить о наличии у пациента высокого риска прогрессирующей обструкции. При повторной спирометрии через 12 месяцев ОФВ₁₆ составило 34,6% (1,18л). Таким образом, в течение года ОФВ₁₆ уменьшился на 270мл, что значительно превышает порог в 50мл. Сделанный прогноз оказался верным.

Пример 2. Пациент Т., 64 г. Диагноз: Хроническая обструктивная болезнь легких, смешанный тип, тяжелой степени тяжести, ремиссия. ДН I. ИК 48 пачка-лет. Вне обострения проведено дополнительное обследование: в результате генотипирования по ОНП rs11562975 гена *TRPM8* выявлено носительство CC генотипа; при проведении спирометрии ОФВ₁₆ составил 30,3% (1,03л). За последний год зафиксировано 4 обострения ХОБЛ. Результат тестирования САТ – 23 балла.

На основании разработанного способа прогнозирования прогрессирующей обструкции произведен расчет:

$$\begin{aligned}
 F &= - 5,20318 + 0,89733 \times rs11562975 + 0,05320 \times \text{ОФВ}_{16} + 0,67048 \times \text{ЧО} + \\
 &+ 0,15464 \times \text{САТ} = - 5,20318 + 0,89733 \times 1 + 0,05320 \times 30,3 + \\
 &+ 0,67048 \times 1 + 0,15464 \times 23 = 1,793 \\
 P &= 1 / (1 + e^{-F}) = 1 / (1 + 2,718^{-1,793}) = 0,857.
 \end{aligned}$$

Вероятность $P=0,857$, превышает $0,71$, следовательно, у данного пациента высокий риск прогрессирования ХОБЛ. Спустя один год при повторном обследовании ОФВ_{16} $20,2\%$ ($0,68\text{л}$). Объем форсированного выдоха за одну секунду в течение года уменьшился на 350 мл. Таким образом, прогноз подтвердился.

Пример 3. Пациент Р., 70 л. Диагноз: Хроническая обструктивная болезнь легких, смешанный тип, тяжелой степени тяжести, ремиссия. ДН I. ИК 43 пачка-лет. Вне обострения пациент обследован: при генетическом обследовании выявлено носительство протективного GG генотипа по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8*; при проведении спирографии ОФВ_{16} равен 40% ($1,23$ л). За предыдущий год одна госпитализация в стационар по поводу обострения ХОБЛ. Результат САТ – 24 балла.

На основании разработанного способа прогнозирования прогрессирующей обструкции произведен расчет:

$$\begin{aligned}
 F &= - 5,20318 + 0,89733 \times rs11562975 + 0,05320 \times \text{ОФВ}_{16} + 0,67048 \times \text{ЧО} + \\
 &+ 0,15464 \times \text{САТ} = - 5,20318 + 0,89733 \times 0 + 0,05320 \times 40 + \\
 &+ 0,67048 \times 0 + 0,15464 \times 24 = 0,356 \\
 P &= 1 / (1 + e^{-F}) = 1 / (1 + 2,718^{-0,356}) = 0,588.
 \end{aligned}$$

Расчетная вероятность P ($0,588$) меньше $0,71$, следовательно, у данного пациента прогнозируется отсутствие прогрессирования бронхиальной обструкции. Спустя 1 год при повторном обследовании ОФВ_{16} составил 38% ($1,19$ л). Таким образом, ОФВ_{16} в течение года уменьшился на 40 мл (данная величина не достигает порогового значения в 50 мл) и прогрессирования бронхиальной обструкции не отмечается, что и было подтверждено предложенным способом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на достижения в области современной медицины, заболеваемость и смертность от ХОБЛ продолжает неуклонно расти. Основным фактором риска данного заболевания является курение, однако ухудшение экологической обстановки и загрязнение воздуха играют немаловажную роль в формировании ХОБЛ. Тот факт, что данное респираторное заболевание развивается не у всех курящих лиц, свидетельствует о важной роли индивидуальных молекулярно-генетических особенностей в развитии ХОБЛ.

Каналы с транзиторным рецепторным потенциалом представляют собой важную мишень для исследований, поскольку являются чувствительными к основным триггерам ХОБЛ и имеют непосредственное отношение к патогенетическим механизмам. Индивидуальные особенности генотипов и аллельных вариантов генов *TRP* определяют уровень экспрессии соответствующих каналов на клетках бронхиального эпителия, макрофагах, различных иммунных клетках, что влечет за собой продукцию различных цитокинов и факторов ремоделирования, приводящих либо к элиминации частиц сигаретного дыма и/или пылевых частиц и завершению воспаления, либо к привлечению в место воспаления большого количества клеток с «заикливанием» воспаления и дальнейшим прогрессированием заболевания.

При проведении научной работы удалось изучить TRP каналы на уровне полиморфизмов, экспрессии этих каналов на уровне мРНК, белка, а также взаимосвязи TRP с цитокинами и факторами ремоделирования.

Получены данные, указывающие на способность некоторых ОНП генов *TRPM8* и *TRPA1* влиять на развитие ХОБЛ у курящих лиц, а также оказывать эффект на степень бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ. Гомозиготные

генотипы GG и CC ОНП rs2052030 гена *TRPM8* служат предиктором формирования ХОБЛ у курящих. В свою очередь, генотип CG является протективным в возникновении данного заболевания.

Кроме этого, ряд однонуклеотидных вариаций в генах *TRPM8* и *TRPA1* может влиять на течение заболевания, способствуя более высоким темпам его прогрессирования, о чем свидетельствуют более выраженные явления бронхиальной обструкции у носителей аллелей риска по соответствующим полиморфизмам. В этом отношении особое внимание привлекает полиморфизм *TRPM8* rs11562975, для которого прежде также было выявлено влияние на прогрессирование бронхиальной обструкции - носительство С аллеля rs11562975 гена *TRPM8* является фактором риска по прогрессированию бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.

При изучении экспрессии TRP каналов на макрофагах, дифференцированные из моноцитов периферической крови больных ХОБЛ, в том числе, в условиях поляризации, обнаружено, что экспрессия *TRPM8* и *TRPA1* возрастает в клетках, имеющих провоспалительный фенотип, и снижается под действием факторов, направляющих дифференцировку по противовоспалительному фенотипу.

При изучении экспрессии TRP каналов на макрофагах мокроты выявлено, что *TRPM8* и *TRPA1* характеризуются противовоспалительным эффектом, причем экспрессия данных каналов тесно взаимосвязана. Апрегуляция TRPV4 связана прогрессированием бронхиальной обструкции пациентов с ХОБЛ.

У больных ХОБЛ была достоверно увеличена экспрессия TRPV1. При этом экспрессия TRPV4 существенно не отличалась между группами, уровень *TRPM8* был немного увеличен, а *TRPA1* снижен, аналогичный паттерн наблюдается в макрофагах, полученных из моноцитов больных ХОБЛ. Это свидетельствует о надежности и воспроизводимости результатов, и указывает на то, что найденные особенности генетически или эпигенетически детерминированы.

В ходе исследования установлена взаимосвязь TRP рецепторов и про- и противовоспалительных цитокинов. Альвеолярные макрофаги у больных ХОБЛ

отличаются смешанным воспалительным фенотипом, однако провоспалительный компонент воспаления преобладает, что находит свое отражение в высоких концентрациях провоспалительных цитокинов *in vivo* и *in vitro*.

Необходимо отметить, что участие рецепторов TRP в патогенезе ХОБЛ не обязательно проявляется увеличением уровня экспрессии. Так, для канала TRPV4 обнаружены множественные взаимосвязи с концентрацией цитокинов, вероятно участвующих в ремоделировании дыхательных путей, в мокроте больных ХОБЛ, хотя экспрессия данного канала у больных лиц достоверно не отличалась от контрольной группы.

Выявленные эффекты активации и блокирования TRPA1 указывают на его противовоспалительную роль на макрофагах, что полностью согласуется с литературными данными. На положительную роль TRPA1 и TRPM8 при ХОБЛ указывают выявленные в ходе настоящего исследования отрицательные корреляции между экспрессией данных рецепторов и степенью бронхиальной обструкции.

Основываясь на обнаруженных отрицательных корреляционных взаимоотношениях TRPM8 с продукцией большинства цитокинов *in vitro*, и степенью бронхиальной обструкции *in vivo*, можно сделать вывод о его преимущественно благотворном влиянии на патогенез ХОБЛ.

Таким образом, были установлены особенности экспрессии и функциональной активности каналов TRP на макрофагах, которые свидетельствуют об их вкладе в патогенез ХОБЛ.

Перспективным представляется собой выявление молекулярно-генетических особенностей заболевания, которое позволит диагностировать ХОБЛ у курящих лиц, а также прогнозировать прогрессирование бронхиальной обструкции у пациентов, страдающих данным заболеванием.

ВЫВОДЫ

1. Гомозиготные генотипы по полиморфизму rs2052030 гена TRPM8 увеличивают вероятность формирования ХОБЛ у курящих лиц, тогда как CG генотип является протективным в отношении развития заболевания.

2. Больные ХОБЛ⁶ имеющие генотипы GC или CC по полиморфизму rs11562975 гена TRPM8, находятся в группе риска по прогрессированию бронхиальной обструкции; величина ежегодного снижения ОФВ₁²² у данных пациентов значимо больше, по сравнению с носителями генотипа GG.

3. Закономерности экспрессии TRP каналов на макрофагах, дифференцированных *in vitro* из моноцитов периферической крови в присутствии GM-CSF, и альвеолярных макрофагах больных ХОБЛ схожи. При этом, в сравнении с контрольной группой, отмечается достоверное увеличение экспрессии канала TRPV1.

4. Канал TRPV4 характеризуется повышенной экспрессией у больных ХОБЛ с прогрессирующей бронхиальной обструкцией, а также взаимосвязан с концентрациями IL-4, MCP-1, CXCL10, EGF и TGF- β 1, что может свидетельствовать о его участии в процессах ремоделирования дыхательных путей при данном заболевании.

5. Больные ХОБЛ отличаются более выраженной воспалительной реакцией в респираторном тракте, о чем можно судить по повышенным уровням IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, CXCL10, IL-12p70 и MCP-1. Наличие прогрессирующей бронхиальной обструкции сопровождается еще большим увеличением продукции данных цитокинов, наряду с IL-2, IFN- γ и TGF- β 1.

6. Использование комплекса биомаркеров, включая генотип по полиморфизму rs2052030 гена TRPM8, возраст и индекс курения, в составе

разработанной математической модели позволяет прогнозировать риск формирования ХОБЛ среди курящих лиц.

7. Разработанный способ, одновременно учитывающий генотип по полиморфизму rs11562975 гена TRPM8, частоту обострений, выраженность симптомов согласно тесту САТ и значение $ОФВ_{16}$, позволяет прогнозировать наличие прогрессирующей бронхиальной обструкции у пациентов с ХОБЛ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве биомаркера предрасположенности к ХОБЛ у курильщиков рекомендуется использовать ОНП rs2052030 гена *TRPM8*.
2. С целью повышения точности прогнозирования риска формирования ХОБЛ среди курящих лиц предлагается использовать разработанное регрессионное уравнение:

$$F = - 6,22738 + 0,3746 \times \text{ОНП} + 0,10491 \times \text{ВОЗР} + 0,03958 \times \text{ИК},$$

где ОНП – переменная, отражающая генотип по полиморфизму rs2052030 гена *TRPM8* и принимающая значение 0 при генотипе CG и 1 – в случае генотипов CC или GG;

ВОЗР – переменная, отражающая возраст в годах;

ИК – переменная, отражающая индекс курения (пачка-лет);

рассчитывают вероятность (P) формирования ХОБЛ по формуле:

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

где e – основание натурального логарифма, равное 2,718;

F – значение, полученное вычислением по формуле, приведенной выше.

Полученную вероятность сравнивают с граничным значением 0,65. При $P \geq 0,65$ прогнозируют высокий риск формирования ХОБЛ, а при $P < 0,65$ – низкий риск развития заболевания.

3. В качестве биомаркера прогрессирующей бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ рекомендуется использовать ОНП rs11562975 гена *TRPM8*.
4. Для повышения точности прогнозирования прогрессирования бронхиальной обструкции рекомендовано использовать разработанное регрессионное уравнение:

$F = -5,20318 + 0,89733 \times rs11562975 + 0,05320 \times OFV_{16} + 0,67048 \times ЧО + 0,15464 \times САТ$,
 где $rs11562975$ – переменная, принимающая значение «1» при генотипе GC и CC по ОНП $rs11562975$ *TRPM8*, «0» - при генотипе GG.

OFV_{16} – количественная переменная, отражающая постбронходилатационный объем форсированного выдоха за 1 секунду, выражаемая в процентах от должного.
 ЧО – переменная, принимающая значение «1» у пациентов с частыми обострениями, «0» - с редкими обострениями.

САТ – тест оценки ХОБЛ, выраженный в баллах.

Вычисление вероятности прогрессирования бронхиальной обструкции производится по формуле:

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

где e – основание натурального логарифма (2,718),

F – значение, полученное вычислением по формуле.

Для полученной вероятности P определено граничное значение, равное 0,71. В случае, если P больше 0,71, риск прогрессирования ХОБЛ считается высоким, если меньше 0,71 – низким.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

БА	– бронхиальная астма
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖЕЛ	– жизненная емкость легких
ИК	– индекс курения
ИМТ	– индекс массы тела
МОС ₂₅	– мгновенная объемная скорость выдоха на уровне 25% ФЖЕЛ
МОС ₅₀	– мгновенная объемная скорость выдоха на уровне 50% ФЖЕЛ
МОС ₇₅	– мгновенная объемная скорость выдоха на уровне 75% ФЖЕЛ
мл	– миллилитр
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
ОНП	– однонуклеотидный полиморфизм
ОФВ ₁	– объем форсированного выдоха за первую секунду
ОФВ ₁₆	– объем форсированного выдоха за первую секунду на фоне действия бронхолитика
ОШ	– отношение шансов
пг	– пикограмм
ПОС	– пиковая объемная скорость
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СОС ₂₅₋₇₅	– средняя объемная скорость выдоха на уровне 25-75% ФЖЕЛ
ФЖЕЛ	– форсированная жизненная емкость легких
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ХОБЛ	– хроническая обструктивная болезнь легких
СА	– cinnamaldehyde, циннамальдегид (агонист TRPA1)
САТ	– COPD Assessment Test, оценочный тест по ХОБЛ
СХСЛ10	– C-X-C motif chemokine ligand 10, хемокиновый лиганд 10 с мотивом СХС

DAMPs	– damage associated molecular patterns, молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением 50
iNOS	– inducible nitric oxide synthase, индуцибельная синтаза оксида азота
IFN- γ	– interferon-gamma, интерферон-гамма
IL	– interleukin, интерлейкин
GOLD	– Global initiative for chronic obstructive lung disease, Глобальная инициатива по хронической обструктивной болезни легких 65
GM-CSF	– granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
LPS	– lipopolysaccharides, липополисахариды
MCP-1	– Monocyte Chemoattractant Protein 1, хемотаксический белок моноцитов 1
MMP	– матриксная металлопротеиназа
nMFI	– normalized median fluorescence intensity, нормализованная медианная интенсивность флуоресценции
TNF- α	– tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли альфа 65
TGF β -1	– transforming growth factor beta 1, трансформирующий фактор роста бета 1
TRP	– transient receptor potential channel, канал с транзиторным рецепторным потенциалом
TRPA1	– transient receptor potential ankyrin 1, канал с транзиторным рецепторным потенциалом анкиринового подсемейства 1
TRPM8	– transient receptor potential melastatin 8, канал с транзиторным рецепторным потенциалом меластатинового подсемейства 8
TRPV1	– transient receptor potential vanilloid 1, канал с транзиторным рецепторным потенциалом ваниллоидного подсемейства 1 68
TRPV4	– transient receptor potential vanilloid 4, канал с транзиторным рецепторным потенциалом ваниллоидного подсемейства 4 1