

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.24-036.12:612.59:579.174.015.3

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ TRPM8 КАК ФАКТОР ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ХОЛОДОВОЙ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

Д.Е.Наумов¹, Ю.М.Перельман¹, В.П.Колосов¹, В.Н.Максимов², М.И.Воевода², А.В.Колосов¹, С.Д.Чжоу³, Ц.Ли³¹Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22²Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН, 630017, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1³Вторая госпитальная клиника Чунцинского медицинского университета, КНР, 400010, г. Чунцин, ул. Линьцзян, 76

РЕЗЮМЕ

Целью настоящего исследования было изучить влияние однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *TRPM8* на холодовую гиперреактивность дыхательных путей у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких. Было обследовано 140 больных персистирующей бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких. Всем пациентам проводилось генотипирование по ОНП с.750G>C, с.1256G>A, с.3048C>T и с.3174C>G, а также спирометрия до и после 3-минутной изокапнической гипервентиляции холодным воздухом. По результатам анализа установлено, что носительство GC генотипа и C аллеля по ОНП с.750G>C чаще встречалось среди лиц, положительно реагировавших на холодовую бронхопровокацию. Больные гетерозиготы демонстрировали значительное снижение ОФВ₁ после холодовой пробы, в то время как реакция GG гомозигот была менее выражена. Для других ОНП не было зафиксировано статистически значимых связей со статусом холодовой гиперреактивности, однако CC гомозиготы по ОНП с.3048C>T и с.3174C>G также были склонны к развитию бронхоспазма в ответ на гипервентиляцию холодным воздухом. Таким образом, выявленные ассоциации являются доказательством участия термочувствительных рецепторов TRPM8 в формировании реакции дыхательных путей на низкие температуры.

Ключевые слова: полиморфизм, терморецепция, холод, *TRPM8*, гиперреактивность дыхательных путей, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких.

SUMMARY

GENETIC POLYMORPHISM OF THERMOSENSITIVE CATION CHANNELS TRPM8 AS A FACTOR PREDISPOSING TO COLD AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASES

D.E.Naumov¹, J.M.Perelman¹, V.P.Kolosov¹, V.N.Maksimov², M.I.Voevoda², A.V.Kolosov¹, X.D.Zhou³, Q.Li³¹Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation²Research Institute of Therapy of Siberian Branch RAMS, 175/1 Borisa Bogatkova Str., Novosibirsk, 630017, Russian Federation³The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 76 Linjiang Road, Chongqing, 400010, China

The aim of the present study was to investigate the influence of *TRPM8* single-nucleotide polymorphisms (SNP) on cold airway hyperresponsiveness in patients with chronic obstructive lung diseases. 140 patients with persistent bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease were examined. All of them were genotyped for с.750G>C, с.1256G>A, с.3048C>T, с.3174C>G SNPs and underwent spirometry testing before and after 3-minute isocapnic cold air hyperventilation. We found that GC genotype and C allele carriers for SNP с.750G>C prevailed among subjects who reacted positively on the cold air bronchoprovocation. Affected heterozygotes had substantial fall of

FEV₁ after the cold challenge while response in GG homozygotes was less prominent. There were no statistically significant associations with cold hyperresponsiveness status for the rest of studied SNPs. However, CC homozygotes for SNPs c.3048C>T and c.3174C>G appeared also to be predisposed to bronchoconstriction in response to cold air hyperventilation. Thus, the discovered associations prove the contribution of TRPM8 thermoreceptors into the development of airway response to low temperatures.

Key words: polymorphism, thermoreception, cold, TRPM8, airway hyperresponsiveness, bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease.

Хронические обструктивные заболевания легких представляют собой одну из ведущих проблем респираторной медицины. Этот факт обусловлен широкой распространенностью данной группы нозологий, и прежде всего, ее наиболее частых представителей – бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Другая причина актуальности – проблема терапии, обусловленная необходимостью постоянного приема поддерживающих доз фармакологических препаратов, что налагает определенные требования на приверженность больных к лечению, а также различной эффективностью самого лечения, происходящей от значительной этиопатогенетической неоднородности БА и ХОБЛ. Невозможность достижения основных целей терапии, заключающихся в поддержании контроля заболевания при БА и профилактике нарастания обструкции при ХОБЛ, является основной причиной высокого социально-экономического бремени, поскольку сопровождается длительными сроками временной нетрудоспособности и инвалидизацией населения.

Известно, что неблагоприятные климатические факторы, а в особенности низкие сезонные температуры, характерные для территорий Сибири и Дальнего Востока, предъявляют повышенные требования к адаптационным возможностям органов дыхания. Было показано, что длительное вдыхание холодного воздуха может вызывать появление респираторных симптомов даже у здоровых лиц [10]. Больные, страдающие обструктивной респираторной патологией, в большей степени предрасположены к неблагоприятным температурным воздействиям на дыхательные пути [9]. По данным наблюдений, периоды сезонных похолоданий обычно сопровождаются увеличением частоты обострений БА и ХОБЛ [5], что в определенной степени обусловлено наличием у части больных феномена холодовой гиперреактивности дыхательных путей (ХГДП) [3].

В настоящее время считается доказанным вклад генетических факторов в этиологию и патогенез БА и ХОБЛ, в том числе и как детерминант измененной реактивности. В этом отношении за последнее время было выделено множество генов, полиморфные варианты которых оказались ассоциированы с неспецифической гиперреактивностью дыхательных путей, выявленной в бронхопровокационных тестах с мета-

холином или гистамином. Формирование ХГДП также может быть сопряжено с изменениями на молекулярно-генетическом уровне. При этом наряду с неспецифическим эффектом некоторых генетических вариантов, например, полиморфизмом Arg16Gly гена β_2 -адренорецепторов, связь с которым была продемонстрирована нами ранее [2], ожидаемо также наличие и некоторого специфического этиологического компонента. Исходя из модальности провоцирующего фактора, в качестве такого компонента в первую очередь можно рассматривать систему термочувствительных рецепторов. На сегодняшний день известно несколько рецепторных механизмов, обеспечивающих восприимчивость организма к низким температурам. Основная их часть представлена катионными каналами – проводниками ионов кальция, калия и натрия, расположенными на чувствительных окончаниях нейронов. Особое внимание привлекают каналы с транзитным рецепторным потенциалом меластатинового и анкиринового подсемейств – TRPM8 и TRPA1, для которых была доказана их роль в проведении холодового стимула различного температурного диапазона. Обычная температура активации для TRPM8 соответствует приблизительно 8-28°C, тогда как активация TRPA1, экспрессированного на ноцицептивных нейронах, происходит при более низких температурах и сопряжена с чувством боли при воздействии холода [11]. Поскольку система кондиционирования поступающего в легкие воздуха не допускает существенного снижения температуры, маловероятно участие TRPA1 в формировании ХГДП. С этой точки зрения ген катионного канала с транзитным рецепторным потенциалом меластатинового подсемейства 8 (TRPM8), кодирующий холодовой терморецептор, является лучшим кандидатом для исследования специфической роли его отдельных структурных вариаций в формировании индивидуальной чувствительности к низким температурам. Выявление таких вариаций, возможно, позволит дать частичное объяснение различной интенсивности реакций дыхательных путей на холодовую гипервентиляцию среди больных хроническими обструктивными заболеваниями легких.

Целью исследования было определить роль изменчивости гена TRPM8 в формировании особенностей бронхомоторного ответа дыхательных путей на их охлаждение у больных БА и ХОБЛ. Планировалось изучить связь отдельных полиморфных маркеров кодирующей области гена с.750G>C, с.1256G>A, с.3048C>T, с.3174C>G, с изменениями показателей функции внешнего дыхания при холодовой гипервентиляции.

Материалы и методы исследования

Обследовано 140 больных хроническими обструктивными заболеваниями легких европеоидной расы, проживающих на территории Амурской области: 57 мужчин и 83 женщины в возрасте от 16 до 58 лет (средний возраст 34,86±0,95 лет). Из них 96 человек имели диагноз персистирующей БА легкой и средней степени тяжести, у 44 больных была диагностирована ХОБЛ

средней степени тяжести. Диагнозы ставились в соответствии с критериями Глобальных инициатив по БА [7] и ХОБЛ [8] за 2010 г. Среди больных БА преобладала смешанная форма заболевания с неконтролируемым течением на момент госпитализации. Пациенты с ХОБЛ также испытывали клиническое ухудшение на момент обследования, соотношение отдельных фенотипов было приблизительно равным. Обследование пациентов включало изучение функции внешнего дыхания с оценкой параметров кривой «поток-объем» форсированного выдоха на аппарате «FlowScreen» (Erich Jaeger, Германия) исходно, а также после проведения бронхопровокационной пробы с изоклапнической гипервентиляцией холодным воздухом (ИГХВ). Гипервентиляция воздушной смесью с температурой -20°C, содержащей 5% CO₂, проводилась в течение трех минут на уровне 60% от должной максимальной вен-

тиляции. На основании полученных данных о проходимости дыхательных путей вычислялось процентное отношение изменения (Δ , %) для параметров форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁), мгновенных объемных скоростей на уровнях 50% (МОС₅₀) и 75% ФЖЕЛ (МОС₇₅), а также индекса Вотчала-Тиффно (ИТ). При снижении ОФВ₁ на 10% и более по отношению к исходному диагностировалась ХГДП.

Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из образцов периферической венозной крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. Ген *TRPM8* типировался по четырем полиморфным сайтам, три из которых представляли собой синонимичные замены (табл. 1).

Таблица 1

Общая характеристика изучаемых однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП)

ОНП	Позиция мРНК	Замена нуклеотида	Позиция аминокислоты	Замена аминокислоты	Экзон
c.750G>C	790	G→C	250	Leu (син.)	7
c.1256G>A	1296	G→A	419	Ser→Asn	11
c.3048C>T	3088	C→T	1016	Ile (син.)	22
c.3174C>G	3214	C→G	1058	Val (син.)	23

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) c.750G>C (rs11562975), c.1256G>A (rs7593557) и c.3174C>G (rs11563071) проводили с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР). Детекцию ОНП c.3048C>T (rs11563208) осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с рестриктазой TaqI («Сибэнзим», г. Новосибирск). К продукту амплификации добавляли 5 ЕД рестриктазы TaqI, рестрикцию проводили в течение 17 ч при 65°C. У гомозигот по С аллелю наблюдали фрагменты размером 141 пар нуклеотидов (п.н.), у гетерозигот – 141 п.н. и 165 п.н., а гомозиготный генотип по Т аллелю – фрагмент в 165 п.н. Условия ПЦР были следующими: денатурация при 95°C – 1 мин., отжиг (при температуре, указанной в таблице 2) – 1 мин., синтез при 72°C – 1 мин. (30 циклов).

Амплификационная смесь в объеме 12,5 мкл содержала трис-НСl (рН9,0) 75 мМ, (NH₄)₂SO₄ 0,01% Tween-20, MgCl₂ (табл. 2), по 0,2 мМ каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 1,25 ЕД Tag-полимеразы и 0,5 мкг геномной ДНК.

Все исследования проводились с соблюдением «Этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека» и в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации» после получения письменного согласия каждого пациента и были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН.

Таблица 2

Температура отжига и концентрация MgCl₂, используемые в ходе ПЦР для генотипирования каждого ОНП

ОНП	Температура отжига, С°	Концентрация MgCl ₂ , мМ
c.750G>C	60	2,5
c.1256G>A	69	1,8
c.3048C>T	63	1,8
c.3174C>G	60	1,8

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., 2003). Оценка соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга проводилась с использованием критерия хи-квадрат Пирсона. Для тестирования ассоциации генотипа с качественными признаками также использовался критерий хи-квадрат Пирсона. Различия в распределении частот генотипов и аллелей в четырехпольных таблицах сопряженности оценивались с помощью точного двустороннего критерия Фишера. Для проверки нормальности распределения количественных переменных использовались критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Равенство дисперсий проверялось критерием Левина. При несоответствии

распределения переменной нормальному закону или отклонении гипотезы о равенстве дисперсий использовались методы непараметрической статистики (ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни). Для оценки связи между двумя переменными проводился ранговый корреляционный анализ Спирмена. В качестве критического уровня значимости (α) принималось значение 0,05. В случае проведения множественных сравнений для коррекции уровня значимости α использовалась поправка Бонферрони. Данные представлены в виде $M \pm m$ для нормально распределенных величин (где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего),

либо $Me (q_1; q_3)$ для величин, распределение которых не подчинялось нормальному закону (где Me – медиана, q_1 и q_3 – нижний и верхний квартили, соответственно).

Результаты исследования и их обсуждение

Частоты генотипов по исследованным ОНП находились в равновесии Харди-Вайнберга и представлены в таблице 3. Стоит отметить редкую встречаемость гомозиготных генотипов по редким аллелям (частота от 0,015 до 0,096), а для ОНП с.1256G>A – AA гомозиготы не были выявлены.

Таблица 3

Частоты генотипов и аллелей исследованных ОНП

ОНП	Частоты генотипов и аллелей		
с.750G>C	GG 107 (77,5%)	GC 29 (21%)	CC 2 (1,5%)
	G 243 (88%)	C 33 (12%)	
с.1256G>A	GG 121 (89%)	GA 15 (11%)	AA -
	G 257 (94,5%)	A 15 (5,5%)	
с.3048C>T	CC 64 (47%)	CT 59 (43,4%)	TT 13 (9,6%)
	C 187 (68,75%)	T 85 (31,25%)	
с.3174C>G	CC 111 (81%)	CG 22 (16%)	GG 4 (3%)
	C 244 (89%)	G 30 (11%)	

После проведения бронхопровокационной пробы все больные были распределены в две группы, согласно реакции на ИГХВ. Группу 1 составили 54 (38,6%) пациента с наличием ХГДП, во 2 группе находились 86 (61,4%) больных с неизменной бронхиальной реактивностью в ответ на холодный воздух. После бронхопровокации среднее снижение ОФВ₁ в 1 группе составило 14,5% (11; 21), во 2 – 4,5% (1,3; 7). Анализ функции внешнего дыхания продемонстрировал исходно более низкие показатели проходимости дыхательных путей у больных с ХГДП. Указанные различия между 1 и 2 группами были особенно значимы при сравнении переменных: ОФВ₁ – 90,55% (76,3; 101) и 97% (87; 109), соответственно, $p=0,006$; МОС₅₀ – 55,45% (42; 71) и 70% (52; 88), соответственно, $p<0,001$; МОС₇₅ – 44% (34; 57) и 56% (44,9; 73), соответственно, $p=0,002$. Прослеживалась слабая положительная корреляционная связь Δ ОФВ₁ с исходными значениями для ОФВ₁ ($r=0,26$; $p<0,01$), ИТ ($r=0,3$; $p<0,01$), ПОС ($r=0,23$; $p<0,01$), МОС₅₀ ($r=0,32$; $p<0,01$) и МОС₇₅ ($r=0,3$; $p<0,01$).

Для 1 группы больных наблюдалась характерная тенденция к снижению показателей функции внешнего дыхания в холодное время года, чего не отмечалось во

2 группе. Статистически достоверные различия в 1 группе для холодного и теплого времени года были получены для показателей ИТ – 83,25% (76,5; 89) и 90% (80; 95), соответственно, $p=0,04$ и МОС₅₀ – 52,3% (40,5; 71) и 61% (55; 76,9), соответственно, $p=0,04$.

Достоверной связи исхода пробы с ИГХВ и степенью тяжести заболевания не прослеживалось, что, вероятно, является следствием качественного характера переменных и, соответственно, их меньшей чувствительности по сравнению с количественными показателями.

В ходе ассоциативного анализа со статусом ХГДП производилась оценка связи для отдельных генотипов и аллелей гена для каждого ОНП. Было обнаружено, что носительство гетерозиготного генотипа по ОНП с.750G>C гораздо чаще встречалось среди лиц 1 группы, положительно реагировавших на ИГХВ, тогда как GG гомозиготы, напротив, преобладали во 2 группе ($p=0,009$). Значимость ассоциации сохранялась при анализе между группами GG гомозигот и всех носителей C аллеля ($p=0,02$). Сходный, хотя и менее значимый эффект наблюдался при сравнении частот аллелей: носительство C аллеля оказалось связано с ХГДП ($p=0,04$). Отношение шансов формирования

ХГДП для генотипов GC и GG составило 3,23; 95%ДИ (1,38; 7,56), $p=0,007$. Для носителей гетерозиготного генотипа ОНП с.750G>C также была установлена значительно более выраженная реакция на холодовую гипервентиляцию, подтвержденная как ранговым дисперсионным анализом, так и в ходе апостериорных сравнений. Больные гетерозиготы демонстрировали снижение ОФВ₁ после бронхопровокационной пробы на 12% (8,1; 16), в то время как GG гомозиготы только на 6,7% (2,2; 11), $p<0,001$. Наряду с ОФВ₁, у гетерозигот значимо снижались и другие спирометрические показатели форсированного выдоха, за исключением ФЖЕЛ.

Для ОНП с.1256G>A, с.3048C>T и с.3174C>G не было зафиксировано достоверных ассоциаций со статусом ХГДП, исходными показателями функции внешнего дыхания и их изменениями при бронхопровокационной пробе с ИГХВ. Однако при соотношении отдельных генотипов с реакцией на ИГХВ обнаруживались некоторые статистически незначимые тенденции.

Так, для мутации с.3048C>T, CC генотип по сравнению с носительством гетерозиготного CT генотипа ассоциировался с большим падением в ответ на бронхопровокационную пробу с ИГХВ параметров ОФВ₁, которое составило -8,4% (-12; -4,5) и -6,1% (-11; -1,4), соответственно, $p=0,09$, а также с более выраженным снижением показателей МОС₅₀ до -13% (-23; -6,1) и -8,7% (-21; 1,89), соответственно, $p=0,09$. Тенденции для ОНП с.3174C>G включали не только ассоциации с изменением показателей функции внешнего дыхания после 3-минутной ИГХВ, но также и с исходными параметрами: CC гомозиготы по сравне-

нию с носителями гетерозиготного CG генотипа имели склонность к исходно сниженным ОФВ₁, ФЖЕЛ и ПОС, а после пробы с ИГХВ демонстрировали большее снижение показателей: ОФВ₁ до -8,3% (-12; -3,3) и -6,1% (-10; -1,8), соответственно, $p=0,14$; ИТ до -3,85% (-8,2; 0,29) и -1,05% (-4,1; 2,95), соответственно, $p=0,02$; МОС₅₀ до -13% (-23; -2,4) и -7% (-17; 1,18), соответственно, $p=0,16$; МОС₇₅ до -13% (-25; 0) и -2,9% (-14; 6), соответственно, $p=0,03$.

При введении дополнительной дифференцировки по половому признаку установлено, что среди лиц мужского пола перечисленные ассоциации для ОНП с.750G>C оставались четко выраженными, в отличие от женщин. Среди последних частота положительной реакции на ИГХВ не зависела от частот генотипов, а при анализе данных спирометрического теста достоверные различия между носителями GG и GC генотипов отмечались только по изменению скорости воздушного потока на уровне дистальных бронхов. Кроме того, у мужчин, носителей гомозиготного генотипа по ОНП с.3174C>G, регистрировалась более выраженная реакция на бронхопровокацию по сравнению с CG носителями, причем разница по показателю Δ ОФВ₁ была высокозначимой: -8,6% (-14,5; -4,7) и -5,5% (-7; -1,8), соответственно, $p=0,007$. Для переменных Δ ИТ, Δ МОС₅₀ и Δ МОС₇₅ фиксировались аналогичные ассоциации при достигнутом уровне значимости $p=0,03$.

Анализ гаплотипов для четырех исследованных ОНП позволил выявить четыре основных гаплотипа, частота встречаемости которых в исследованной выборке была более 5%. Частоты и структура гаплотипов представлены в таблице 4.

Таблица 4

Выявленные гаплотипы для исследованных ОНП и их частоты

Гаплотип	Аллели				Частота
	с.750G>C	с.1256G>A	с.3048C>T	с.3174C>G	
H1	G	G	C	C	47%
H2	G	G	T	C	26%
H3	C	G	C	C	9,6%
H4	G	G	C	G	6,5%

Частота гаплотипа H3 среди лиц 1 группы составляла 13,6% и превышала частоту встречаемости во 2 группе (6,6%), хотя достигнутый уровень значимости ($p=0,045$) с учетом коррекции был недостаточным – ОШ 2,27 95%ДИ (1; 5,15). Частоты прочих гаплотипов практически не различались в группах больных с ХГДП и с неизменной реактивностью дыхательных путей на холодовую гипервентиляцию.

Приведенные данные по распространенности ХГДП в нашей выборке больных БА и ХОБЛ (более трети обследованных) еще раз свидетельствуют об актуальности изучения этого феномена. Ассоциация гиперреактивности в ответ на ИГХВ с относительным снижением показателей функции внешнего дыхания,

с одной стороны, может говорить о предрасположенности больных с исходно более низкими показателями вентиляции к холодовому бронхоспазму, и, таким образом, вероятно, являться отражением неспецифического компонента бронхиальной гиперреактивности. С другой стороны, сезонность, проявляющаяся снижением ряда объемно-скоростных характеристик в холодное время года у больных с ХГДП, свидетельствует, что сама холодная гиперреактивность в условиях систематического контакта с триггером может стать фактором, способствующим прогрессированию респираторной патологии и сопровождаться снижением функции легких. Во 2 группе больных сезонной связи с показателями вентиляционной функции зафик-

сировано не было, что объяснимо относительной индивидуальностью температурного климатического фактора для данных пациентов.

В настоящей работе нами была впервые показана важность индивидуальных особенностей структуры гена катионных каналов *TRPM8* в обеспечении регуляции температурного гомеостаза дыхательной системы в условиях хронической обструктивной патологии легких. ОНП с.750G>C, проявляющийся заменой 790 нуклеотида в 7 экзоне с гуанина на цитозин, но не приводящий к изменению аминокислотной структуры белка вследствие вырожденности генетического кода, явился значимым фактором, существенно изменяющим ответ респираторного тракта на воздействие низких температур. Шанс обнаружить ХГДП был в 3 раза выше при носительстве С аллеля в гетерозиготном состоянии, по сравнению с носительством гомозиготного GG генотипа. Реакция GC индивидов на холододовую гипервентиляцию проявлялась более существенным снижением основных параметров бронхиальной проходимости, по сравнению с больными носителями генотипа GG, который являлся протективным в условиях бронхопровокации.

Связь прочих ОНП гена *TRPM8* с ХГДП была менее очевидна. Для с.3048C>T и с.3174C>G (генотип CC) была обнаружена тенденция к избыточному ответу на холододовую гипервентиляцию, которая в случае ОНП с.3174C>G становилась отчетливее у лиц мужского пола. Аналогичные гендерные различия в эффекте аллелей были характерны и для ОНП с.750G>C.

Сведения о роли отдельных ОНП в формировании ХГДП нашли свое подтверждение при анализе гаплотипов. Гаплотип CGCC, встречающийся приблизительно в 10% случаев, и состоящий из аллелей риска исследованных ОНП, в наибольшей степени ассоциирован с развитием холододовой бронхоспазма.

В литературе отсутствуют данные по изучению влияния изменчивости гена *TRPM8* на реактивность дыхательных путей, однако есть информация, затрагивающая влияние генетических факторов на температурную чувствительность кожи. В исследовании Т.В.Козыревой и соавт. [1] здоровые гетерозиготы по полиморфизму с.750G>C проявляли большую чувствительность к холоду по отношению к носителям генотипа GG, что в целом согласуется с данными, полученными в наших экспериментальных условиях. В нашем исследовании, при одинаковой продолжительности холододовой гипервентиляции, субъекты, генотип которых предрасполагал к холододовой гиперчувствительности, демонстрировали выраженный бронхоспзм в ответ на более интенсивную афферентацию (в случае предполагаемого рефлекторного механизма реагирования). Другой механизм, в большей мере ответственный за долгосрочную реакцию, предполагает роль выброса провоспалительных медиаторов, известных своей способностью индуцировать гиперреактивность (IL-1 β , IL-4, IL-13 и др.), при активации *TRPM8*, экспрессированных непосредственно на эпителиальных клетках дыхательных путей

[12].

Точный генез ХГДП в аспекте влияния изученных генетических вариаций представляется неясным. Синонимичные замены традиционно считаются функционально неактивными и часто не учитываются при поиске причинных мутаций для той или иной патологии. Тем не менее, есть все основания полагать, что отсутствие влияния на аминокислотную структуру белка далеко не всегда означает нейтральность такой замены для носителя. Существуют примеры влияния синонимичных мутаций на сплайсинг мРНК, процесс трансляции и фолдинг белка [13]. В любом случае, наиболее вероятным конечным эффектом перечисленных процессов служит изменение количества рецепторов на поверхности клетки. Кроме того, недавно было установлено, что короткие изоформы *TRPM8*, образующиеся за счет альтернативного сплайсинга, способны принимать участие в регуляции полной формы *TRPM8*, взаимодействуя с ее С-терминальным доменом и стабилизируя закрытое состояние канала [4]. Подобная регуляция напоминает снижение активности *TRPM8* под влиянием повышенной температуры [6]. Таким образом, изменяя сплайсинг, синонимичные мутации могут влиять и на генерацию коротких изоформ *TRPM8*. Этот феномен может представлять альтернативное объяснение тому, как изученные ОНП опосредуют изменения холододовой чувствительности.

Таким образом, нами были обнаружены генетические изменения, затрагивающие особенности холододовой реактивности дыхательных путей у больных БА и ХОБЛ. Установлено, что изменчивость гена *TRPM8* является фактором, влияющим на реактивность дыхательных путей у больных в ответ на холододовую бронхопровокацию. В исследованной группе больных гетерозиготный генотип синонимичного ОНП с.750G>C оказался фактором предрасположенности к бронхоконстрикторной реакции в ответ на пробу с ИГХВ. Кроме этого, носительство гомозиготного генотипа по частым аллелям двух других ОНП (с.3048C>T и с.3174C>G), вероятно, также производит негативный эффект, увеличивая восприимчивость к холододовому воздействию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Связь однонуклеотидного полиморфизма rs11562975 гена термочувствительного ионного канала *TRPM8* с чувствительностью человека к холоду и ментолу / Т.В.Козырева [и др.] // Физиол. человека. 2011. Т.37, №2. С.71–76.
2. Роль полиморфизма гена β_2 -адренорецепторов в формировании холододовой гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой / Д.Е.Наумов [и др.] // Бюлл. эксп. биол. мед. 2012. Т.154, Вып.7. С.83–86.
3. Приходько А.Г., Прозорова А.В., Перельман Ю.М. Изменения реактивности дыхательных путей в процессе естественного развития бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2006. Вып.23. С.38–42.
4. Regulation of activity of transient receptor potential

melastatin 8 (TRPM8) channel by its short isoforms / G.Bidaux [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol.287, №5. P.2948–2962.

5. Donaldson G.C., Wedzicha J.A. COPD exacerbations. 1: Epidemiology // *Thorax*. 2006. Vol.61, №2. P.164–168.

6. Short isoforms of the cold receptor TRPM8 inhibit channel gating by mimicking heat action rather than chemical inhibitors / J.A.Fernández [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol.287, №5. P.2963–2970.

7. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. 2010. URL: <http://www.ginasthma.org>.

8. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2010. URL: <http://www.goldcopd.org>.

9. Cold-related respiratory symptoms in the general population / T.Harju [et al.] // *Clin. Resp. J.* 2010. №4. P.176–185.

10. One-year occupational exposure to a cold environment alters lung function / Y.Jammes [et al.] // *Arch. Environ. Health*. 2002. Vol.57, №4. P.360–365.

11. McKemy D.D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation // *Mol. Pain*. 2005. №1. P.16–22.

12. Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures / A.S.Sabnis [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008. Vol.295, №1. P.L194–200.

13. Venetianer P. Are synonymous codons indeed synonymous? // *Biomol. Concepts*. 2012. Vol.3, №1. P.21–28.

REFERENCES

1. Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ya., Potapova T.A., Romashchenko A.G., Voevoda M.I. *Fiziologiya cheloveka* 2011; 37(2):71–76.

2. Naumov D.E., Perelman J.M., Maksimov V.N., Kolosov V.P., Voevoda M.I., Zhou X.D., Q. Li. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny* 2012; 154(7):83–86.

3. Prikhodko A.G., Prozorova A.V., Perelman J.M. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2006; 23:38–42.

4. Bidaux G., Beck B., Zholos A., Gordienko D., Lemonnier L., Flourakis M., Roudbaraki M., Borowiec A.S., Fernández J., Delcourt P., Lepage G., Shuba Y., Skryma R., Prevarskaya N. Regulation of activity of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel by its short isoforms. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(5):2948–2962.

5. Donaldson G.C., Wedzicha J.A. COPD exacerbations. 1: Epidemiology. *Thorax* 2006; 61(2):164–168.

6. Fernández J.A., Skryma R., Bidaux G., Magleby K.L., Scholfield C.N., McGeown J.G., Prevarskaya N., Zholos A.V. Short isoforms of the cold receptor TRPM8 inhibit channel gating by mimicking heat action rather than chemical inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(5):2963–2970.

7. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. 2010. Available at: <http://www.ginasthma.org>.

8. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2010. Available at: <http://www.goldcopd.org>.

9. Harju T., Mäkinen T., Näyhä S., Laatikainen T., Jousilahti P., Hassi J. Cold-related respiratory symptoms in the general population. *Clin. Resp. J.* 2010; 4:176–185.

10. Jammes Y., Delvolgo-Gori M.J., Badier M., Guillot C., Gazazian G., Parlenti L. One-year occupational exposure to a cold environment alters lung function. *Arch. Environ. Health* 2002; 57(4):360–365.

11. McKemy D.D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol. Pain* 2005; 1:16–25.

12. Sabnis A.S., Reilly C.A., Veranth J.M., Yost G.S. Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008; 295(1):L194–200.

13. Venetianer P. Are synonymous codons indeed synonymous? *Biomol. Concepts* 2012; 3(1):21–28.

Поступила 10.08.2012

Контактная информация

Денис Евгеньевич Наумов,

аспирант лаборатории функциональных методов исследования дыхательной системы, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: denn1985@bk.ru

Correspondence should be addressed to

Denis E. Naumov,

MD, Postgraduate student of Laboratory of Functional Research of Respiratory System, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: denn1985@bk.ru