

УДК 616.248:611.2:612.59:575.174.015.3

DOI: 10.12737/article\_59aca9cabd1528.72418133

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА TRPM8 В ФОРМИРОВАНИИ ФЕНОТИПА БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ С ХОЛОДОВОЙ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬЮ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ****Д.Е.Наумов, О.О.Котова, Д.А.Гассан, А.Г.Приходько, Ю.М.Перельман, В.П.Колосов***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22***РЕЗЮМЕ**

Цель исследования – оценить влияние полиморфизмов гена холодовых терморепцепторов *TRPM8* на формирование фенотипа холодовой гиперреактивности дыхательных путей (ХГДП) у больных бронхиальной астмой (БА). Ретроспективно проанализировано 167 случаев персистирующей БА легкой и средней тяжести. В каждом случае обследование включало двукратное проведение бронхопровокационной пробы с 3-минутной изокапнической гипервентиляцией холодным воздухом с интервалом 6 месяцев, стандартную спирометрию и генотипирование по семи полиморфизмам гена *TRPM8* (rs11562975, rs17868387, rs28901637, rs138810119, rs2052030, rs17865682 и rs1003540). Дважды положительная реакция на бронхопровокационную пробу служила критерием фенотипа БА с ХГДП. По результатам исследования была подтверждена прежде выявленная взаимосвязь полиморфизма rs11562975 с ХГДП, а также выявлено три новых полиморфизма (rs17868387, rs17865682 и rs1003540), в различной степени ассоциированных с данным фенотипом БА. Полученные данные свидетельствуют о вкладе молекулярно-генетических особенностей *TRPM8* в патогенез ХГДП и ставят задачи поиска дополнительных молекулярных механизмов холодуиндуцируемых респираторных реакций.

*Ключевые слова:* холодовая гиперреактивность дыхательных путей, бронхиальная астма, холодовые рецепторы, *TRPM8*, генетический полиморфизм.

**SUMMARY****ROLE OF TRPM8 GENE POLYMORPHISMS IN THE FORMATION OF ASTHMA PHENOTYPE WITH COLD AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS****D.E.Naumov, O.O.Kotova, D.A.Gassan, A.G.Prikhodko, J.M.Perelman, V.P.Kolosov***Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The aim of the study was to evaluate the effect of *TRPM8* cold thermoreceptor gene polymorphisms on the development of asthma phenotype with cold airway hyperresponsiveness (CAH). 167 cases of mild-to-moderate persistent asthma were retrospectively analyzed. In each case, the examination included two repeated bronchoprovocation tests with 3-min isocapic cold air hyperventilation with 6-month interval, standard

spirometry and genotyping of seven *TRPM8* polymorphisms (rs11562975, rs17868387, rs28901637, rs138810119, rs2052030, rs17865682 and rs1003540). A double positive response to the bronchoprovocation test served as a criterion for the phenotype of asthma with CAH. Based on the results of the study, previously revealed relationship between rs11562975 polymorphism and CAH was confirmed, and also three new polymorphisms (rs17868387, rs17865682 and rs1003540) differentially associated with CAH asthma phenotype were identified. The obtained data indicate the contribution of the molecular genetic peculiarities of *TRPM8* to the pathogenesis of CAH and substantiate the further search for additional molecular mechanisms of cold-induced respiratory reactions.

*Key words:* cold airway hyperresponsiveness, asthma, cold receptors, *TRPM8*, genetic polymorphism.

К настоящему времени накоплено большое количество данных, свидетельствующих о достоверном влиянии температуры атмосферного воздуха, как одного из основных климатических факторов, на течение хронической респираторной патологии, в том числе бронхиальной астмы (БА). В частности, по результатам опроса более 6,5 тыс. человек была зафиксирована высокая частота распространенности холодовых респираторных симптомов среди больных БА (до 70-80%), а само наличие БА было ассоциировано с увеличением частоты холодовых симптомов на 50%, по сравнению со здоровыми лицами [4]. Интересно, что риск холодовых респираторных симптомов (одышки, свистящих хрипов, отделения мокроты) также дополнительно возрастает у лиц, страдающих аллергическим ринитом, что указывает на общие патогенетические механизмы двух патологий [6]. Кроме увеличения частоты респираторных симптомов, дыхание холодным воздухом в естественных условиях сопровождается снижением функции внешнего дыхания и диффузионной способности легких [13]. Помимо перечисленных исследований, в серии работ, выполненных за последние годы, была доказана зависимость обострений БА от низкой температуры атмосферного воздуха. В ходе крупного исследования, проведенного в Шанхае (КНР), с 2005 по 2012 годы регистрировалась среднесуточная температура и случаи госпитализаций по поводу обострений БА. В результате анализа более 15 тыс. госпитализаций была выявлена достоверная обратная взаимосвязь между частотой обострений БА и температурой воздуха. Снижение среднесуточной температуры воздуха ниже 18,7°C оказывало существенное влияние на частоту госпитализаций в течение последующих 30 дней

[18]. Аналогичное исследование, проведенное в Гонконге, также выявило негативное влияние прохладной температуры воздуха на риск госпитализаций у больных БА (отношение шансов 1,33, 95%ДИ (1,13; 1,58)) [8]. Интересное наблюдение относительно влияния похолоданий на риск госпитализаций по поводу БА было сделано в Нью-Йорке (США). Основное отличие данного исследования от исследований, выполненных в КНР, заключалось в существенно более низкой средней температуре в зимние месяцы года. Авторы обнаружили парадоксальное снижение частоты госпитализаций с декабря по март, однако похолодания, происходившие в межсезонье (ноябрь или апрель), существенно увеличивали риск госпитализаций. Данный факт, вероятно, объясняется тем, что в периоды длительных холодов больные БА осознанно стараются минимизировать контакт с холодным триггером, тогда как в месяцы, когда среднесуточные температуры не настолько низкие, больные становятся менее осторожными и подвергаются действию холода в большей степени [3]. Еще одно исследование, проведенное на детской популяции больных БА, также установило независимую роль снижения температуры воздуха в увеличении риска обострений заболевания. Согласно построенной регрессионной модели, падение температуры на каждый градус сопровождалось ростом частоты обострений БА на 7,3% [5].

Холодный воздух не только провоцирует симптомы среди больных хроническими обструктивными болезнями легких, но и повышает риск развития респираторных заболеваний у здоровых людей. Так, среди лиц, регулярно выполняющих физическую работу на открытом воздухе, увеличивается распространенность хронического бронхита и одышки [7]. Еще более выраженные нарушения дыхательной системы отмечаются у жителей Крайнего Севера, постоянно испытывающих воздействие жестких климатических условий. В этом случае на уровне слизистой оболочки бронхов происходят серьезные морфофункциональные нарушения, в том числе истончение эпителиального пласта, лейкоцитарная инфильтрация, гиперплазия гладкомышечных клеток, а также нарушение кровоснабжения бронхиальной стенки. Все это сопровождается высоким уровнем респираторной заболеваемости и смертности [1].

Тем не менее, не все больные БА реагируют на снижение температуры вдыхаемого воздуха в равной степени. Ранее был продемонстрирован феномен холодовой гиперреактивности дыхательных путей (ХГДП), сопровождающийся развитием реакции бронхоспазма в ответ на ингаляцию холодного ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) воздуха и наблюдаемый у значительной части, но далеко не у всех пациентов с БА [2]. Проводя аналогию с БА, как многофакторным заболеванием с существенным вкладом наследственного компонента, можно предположить, что гетерогенность холодовых респираторных реакций также может быть обусловлена генетическими факторами.

Согласно современным представлениям, ключевая

роль в рецепции низких температур у человека отводится неселективным кальциевым каналам с транзиторным рецепторным потенциалом TRPM8 [11]. Показано, что данный класс рецепторов экспрессируется на нервных окончаниях респираторного тракта [14] и на бронхиальном эпителии [17], где способен опосредовать нервно-рефлекторную бронхоконстрикцию и местные воспалительные реакции в ответ на охлаждение. Ранее нами уже была установлена роль полиморфизма с.750G>C (rs11562975) гена *TRPM8* в формировании ХГДП у больных БА [10].

Целью настоящего исследования явилась верификация результатов ассоциативного анализа однонуклеотидного полиморфизма с.750G>C (rs11562975) с ХГДП, а также поиск других вариантов гена *TRPM8*, возможно, связанных с данным феноменом.

### Материалы и методы исследования

В исследование были включены 167 больных персистирующей БА легкой и средней степени тяжести, с неконтролируемым течением заболевания, обследованных в клинике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания с 2007 по 2017 годы. При проведении исследования руководствовались принципами Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом №200 от 01.04.2016 МЗ РФ. Больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания». Обследование пациентов включало изучение функции внешнего дыхания с оценкой параметров кривой «поток-объем» на аппарате «FlowScreen» (Erich-Jaeger, Германия) исходно, а также после проведения бронхопровокационной пробы с изокапнической гипервентиляцией холодным воздухом (ИГХВ). Гипервентиляция воздушной смесью с температурой  $-20^{\circ}\text{C}$ , содержащей 5%  $\text{CO}_2$ , проводилась в течение трех минут на уровне 60% от должной максимальной вентиляции. На основании полученных данных о проходимости дыхательных путей вычислялось процентное отношение изменения ( $\Delta$ , %) для параметров форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>), мгновенных объемных скоростей на уровнях 50% (МОС<sub>50</sub>) и 75% ФЖЕЛ (МОС<sub>75</sub>), а также индекса Вотчала-Тиффно (ИТ). При снижении ОФВ<sub>1</sub> на 10% и более или снижении МОС<sub>50</sub> на 25% и более по отношению к исходному диагностировалась ХГДП.

Больные отбирались в исследование ретроспективно по критерию наличия не менее двух повторных бронхопровокационных проб с ИГХВ с интервалом около 6 мес. Для повышения надежности при диагно-

стике фенотипа БА с ХГДП руководствовались одновременно результатами двух бронхопровокационных проб. При положительной реакции в обоих случаях холодовой бронхопровокации определялось наличие фенотипа БА с ХГДП, все остальные случаи расценивались как отсутствие ХГДП либо недостоверный фенотип и определялись в контрольную группу.

Кровь для генетических исследований отбиралась из локтевой вены в пробирки, содержащие антикоагу-

лянт (динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), после чего замораживалась до момента выделения ДНК при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Выделение ДНК производилось коммерческими наборами «ДНК-Экстрен-1» (ЗАО «Синтол», Россия) согласно протоколу производителя.

Генотипирование производилось по семи полиморфизмам *TRPM8*, расположенным как в кодирующих, так и не кодирующих участках гена (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика изученных полиморфизмов гена *TRPM8*

Идентификатор полиморфизма в базе данных NCBI dbSNP	Нуклеотидная позиция кодирующей последовательности	Регион и описание
rs11562975	c.750G>C	экзон 7 – однонуклеотидная замена, синонимичный вариант (p.Leu250Leu)
rs17868387	c.752A>G	экзон 7 – однонуклеотидная замена, миссенс вариант (p.Tyr251Cys)
rs28901637	c.747A>T	экзон 7 – однонуклеотидная замена, синонимичный вариант (p.Pro249Pro)
rs138810119	c.*726_*727insTTAT	3'-нетранслируемый регион – четырехнуклеотидная вставка
rs2052030	c.*1710C>G	3'-нетранслируемый регион – однонуклеотидная замена
rs17865682	c.*2325A>G	3'-окологенная область – однонуклеотидная замена
rs1003540	c.-199A>G	5'-окологенная область – однонуклеотидная замена

Полиморфизмы генотипировались методом LATE (Linear-After-the-Exponential) ПЦР [15]. Реакционная смесь включала: ДНК-матрица 100 нг, 1x ПЦР-буфер,  $\text{MgCl}_2$  – в концентрации, указанной в таблице 2, dNTP 0,25 мМ, праймеры и флуоресцентно-меченые зонды типа «molecular beacon» – в концентрациях, указанных в таблице 2, Hot Start Taq-полимераза, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 25 мкл. Амплификация проводилась в режиме: предварительная денатурация –  $95^{\circ}\text{C}/2,5$  мин., первый блок: 25 циклов – денатурация  $95^{\circ}\text{C}/10$  сек., отжиг при  $62^{\circ}\text{C}/15$  сек., элонгация  $72^{\circ}\text{C}/15$  сек., второй блок: 45 циклов – денатурация  $95^{\circ}\text{C}/10$  сек., отжиг при температуре, указанной в таблице 2 – 15 сек., элонгация  $72^{\circ}\text{C}/15$  сек., финальная элонгация –  $72^{\circ}\text{C}/5$  мин. Полиморфизмы rs11562975, rs17868387 и rs28901637 ввиду близкого расположения формировали «кластер», благодаря чему генотипировались одновременно с использованием одного зонда. Кроме этого, для генотипирования данных полиморфизмов, а также полиморфизма rs1003540 использовалась двухшаговая ПЦР с сокращенной продолжительностью циклов: предварительная денатурация –  $95^{\circ}\text{C}/1,5$  мин., первый блок: 25 циклов – денатурация  $92^{\circ}\text{C}/1$  сек., отжиг/элонгация при  $62^{\circ}\text{C}/15$  сек., второй блок: 45 циклов – денатурация  $92^{\circ}\text{C}/1$  сек., отжиг/элонгация при температуре, указанной в таблице 2 – 15 сек., финальная элонгация –  $72^{\circ}\text{C}/1$  мин. Анализ плавления зондов выполнялся по протоколу: предварительная денатура-

ция при  $90^{\circ}\text{C}/3$  мин., гибридизация –  $40^{\circ}\text{C}/3$  мин., плавление с градиентным повышением температуры от  $40^{\circ}\text{C}$  до  $70^{\circ}\text{C}$  с шагом  $0,5^{\circ}\text{C}/0,2$  мин. 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.

Статистические расчеты выполнялись в программном пакете Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., 2011) с использованием параметрических и непараметрических методов. 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) и U критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде  $M \pm m$  для нормально распределенных переменных и  $Me [Q1; Q3]$  – для переменных с распределением, отличным от нормального. Для ассоциативного анализа номинальных переменных использовался критерий  $\chi^2$  Пирсона или точный критерий Фишера.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Число больных БА с ХГДП, диагностированной первично, составило 53,6%, повторно – 47,6%. Среди лиц с первично обнаруженной ХГДП положительная

динамика в виде отсутствия ХГДП на втором визите была зафиксирована в 33% случаев. В то же время у 25% больных, несмотря на первичное отсутствие ХГДП, холодовой бронхоспазм развился при повторном обследовании. Двукратно обнаруженная ХГДП, послужившая критерием диагностики фенотипа БА с ХГДП, отмечалась у 36% пациентов. Больные с наличием и отсутствием ХГДП были сопоставимы по полу,

возрасту, стажу курения, длительности и тяжести заболевания. Тем не менее, наличие ХГДП было ассоциировано со сниженной функцией внешнего дыхания, что находило отражение в параметрах ОФВ<sub>1</sub> и ИТ. Краткая сравнительная характеристика групп больных с наличием и отсутствием фенотипа ХГДП представлена в таблице 3.

Таблица 2

**Последовательности и конечные концентрации праймеров и зондов, а также конечные концентрации MgCl<sub>2</sub> и значения температуры отжига\*, используемые при генотипировании полиморфизмов TRPM8**

Полиморфизмы	Праймеры и зонды	Концентрация праймеров и зондов	MgCl <sub>2</sub>	Температура отжига во втором блоке ПЦР*
rs11562975 rs17868387 rs28901637	Прямой 5'-CCAGTACCTTATGGATGACTT-3'	0,5 мкМ	2,5 мМ	58°C
	Обратный 5'-GGAGCTTTGCTTCGACAGTGGGAT-3'	0,02 мкМ		
	Зонд 5'-FAM-CGGCCAGGATATACAGTGGAGCCG-BHQ1-3'	0,5 мкМ		
rs138810119	Прямой 5'-CTTGAAAGGCACTACTGACTTTGTTCTTAT-3'	0,02 мкМ	2,5 мМ	57°C
	Обратный 5'-GAAATTGTTAGCAGTGATTACC-3'	0,5 мкМ		
	Зонд 5'-FAM-CGCGTACTCCTCTTATTTATTATTCGCG-BHQ1-3'	0,5 мкМ		
rs2052030	Прямой 5'-GGAGAGATTATCTTACTGAACAC-3'	0,5 мкМ	2,5 мМ	58°C
	Обратный 5'-TCACTACTGCCAGACAAAAGGAAAA-3'	0,02 мкМ		
	Зонд 5'-FAM-CGGCTCAAATACGACCACTGCCG-BHQ1-3'	0,5 мкМ		
rs17865682	Прямой 5'-GAATTGTCATGTGTTGCTTTTG-3'	0,4 мкМ	2,0 мМ	60°C
	Обратный 5'-AGAGAAGTCAGTTCATGTAACTCTGGGA-3'	0,02 мкМ		
	Зонд 5'-FAM-CCGGAAGTGAATCTGACCGG-BHQ1-3'	0,4 мкМ		
rs1003540	Прямой 5'-ATTATCCATCCCTACTCGTATCCACTG -3'	0,02 мкМ	2,5 мМ	58°C
	Обратный 5'-CTCGTACTATTCTACAAGTTACA-3'	0,5 мкМ		
	Зонд 5'-FAM-CGGCTATGCTTGGAGGCCG-BHQ1-3'	0,5 мкМ		

Примечание: \* – для полиморфизмов rs11562975, rs17868387, rs28901637 и rs1003540 указана температура объединенной стадии отжига/элонгации.

В общей группе частоты генотипов для всех полиморфизмов, кроме rs2052030 находились в равновесии Харди-Вайнберга. Для полиморфизма rs2052030 было зафиксировано нарушение равновесия (p<0,05) за счет снижения частоты гетерозиготного генотипа с одновременным увеличением числа CC и GG гомозигот.

Среди всех проанализированных полиморфизмов ассоциации с фенотипом ХГДП были выявлены для rs11562975, rs17868387, rs17865682 и rs1003540, для прочих полиморфизмов значимых взаимосвязей найдено не было.

Таблица 3

Характеристика групп по основным клинико-функциональным параметрам в зависимости от наличия фенотипа ХГДП

Параметр	Группа больных с фенотипом ХГДП (n=60)	Группа больных без фенотипа ХГДП (n=107)	Значимость различий
Возраст, лет	36,3±1,48	37,2±0,99	p>0,05
Пол (мужчины, %)	45	37,4	p>0,05
Тяжесть заболевания (средняя тяжесть, %)	68,3	63,6	p>0,05
Анамнез заболевания, лет	8,8±0,80	8,3±0,56	p>0,05
Стаж курения, пачка-лет	0 (0; 4)	0 (0; 5)	p>0,05
ОФВ <sub>1</sub> , %	88,9±1,98	93,7±1,70	p=0,07
ФЖЕЛ, %	104,5±1,92	104,0±1,51	p>0,05
ИТ, %	85,3±1,50	89,6±0,98	p=0,01

Таблица 4

Частоты генотипов и аллелей для полиморфизмов *TRPM8*, ассоциированных, либо показавших тенденцию к ассоциации с фенотипом ХГДП у больных БА

Полиморфизм	Генотипы и аллели	Группа с ХГДП n (%)	Группа без ХГДП n (%)	p*
rs11562975	GG	43 (71,7)	94 (87,9)	0,03
	GC	16 (26,7)	12 (11,2)	
	CC	1 (1,6)	1 (0,9)	
	G	102 (85)	200 (93,5)	0,01
	C	18 (15)	14 (6,5)	
rs17868387	AA	59 (98,3)	96 (89,7)	0,12
	AG	1 (1,7)	10 (9,4)	
	GG	0	1 (0,9)	
	A	119 (99,2)	202 (94,4)	0,03
	G	1 (0,8)	12 (5,6)	
rs17865682	AA	45 (75)	63 (58,9)	0,11
	AG	14 (23,3)	42 (39,2)	
	GG	1 (1,7)	2 (1,9)	
	A	104 (86,7)	168 (78,5)	0,07
	G	16 (13,3)	46 (21,5)	
rs1003540	AA	31 (51,7)	70 (65,4)	0,11
	AG	28 (46,7)	33 (30,8)	
	GG	1 (1,6)	4 (3,8)	
	A	90 (75)	173 (80,8)	0,21
	G	30 (25)	41 (19,2)	

Примечание: \* – указана значимость различий при анализе в общей (для генотипов) и мультипликативной (для аллелей) моделях.

Для полиморфизма rs11562975 ранее обнаруженная ассоциация была верифицирована на дополнительной популяционной выборке большей численности. Ассоциации были значимы при анализе в общей ( $p=0,03$ ), мультипликативной ( $p=0,01$ ), аддитивной ( $p=0,01$ ) и доминантной ( $p=0,009$ ) моделях. Носительство генотипа GC в 2 раза чаще встречалось у больных БА с ХГДП (26,7% против 11,2% у больных без ХГДП) (табл. 4). Аналогичная ассоциация была установлена при анализе частот аллелей – аллель С служил фактором предрасположенности к ХГДП, встречаясь у 15% больных соответствующей группы, тогда как среди пациентов без ХГДП отмечалось лишь 6,5% носителей. Отношение шансов для генотипов составило 2,88 95%ДИ (1,26-6,60), для аллелей – 2,52 95%ДИ (1,21-5,27). Вследствие редкости (2 случая), оценка функциональной значимости носительства гомозиготного генотипа CC была затруднена, однако, при сравнении средних значений  $\Delta\text{ОФВ}_1$  двух бронхопровокационных проб между носителями различных генотипов было обнаружено, что для носителей CC генотипа была характерна наиболее выраженная реакция (-22,2 [-36,02; -8,35]%), которая градиентно уменьшалась среди больных БА с GC (-11,1 [-14,5; -7,28]%) и GG (-7,78 [-14,0; -4,0]%) генотипами (значимость различий ( $p$ )  $\Delta\text{ОФВ}_1$  между GG и GC носителями составила 0,09).

Полиморфизм rs17868387 расположен в непосредственной близости от rs11562975, но, в отличие от последнего (синонимичный вариант), вызывает аминокислотную замену Tyr251Cys. Данная вариация практически целиком (92%) встречается лишь среди носителей GG генотипа по полиморфизму rs11562975. Несмотря на тенденцию к ассоциации rs17868387 с ХГДП в общей модели ( $p=0,12$ ), значимость его эффекта более четко просматривалась в мультипликативной ( $p=0,03$ ), аддитивной ( $p=0,04$ ) и рецессивной моделях ( $p=0,04$ ). В целом, можно сказать, что аллель G и соответствующие генотипы (AG, GG) проявляли протективные свойства, встречаясь преимущественно среди больных без ХГДП. Значимых различий в количественных параметрах реакции дыхательных путей на холод ( $\Delta\text{ОФВ}_1$ ) между носителями различных генотипов найдено не было.

Вариация rs17865682 демонстрировала тенденции к ассоциации с фенотипом ХГДП в общей ( $p=0,11$ ), мультипликативной ( $p=0,07$ ), аддитивной ( $p=0,05$ ) и рецессивной моделях ( $p=0,04$ ). Эффект полиморфизма заключался в большей предрасположенности к ХГДП среди носителей AA генотипа (75% против 58,9% у лиц без ХГДП), тогда как AG и GG генотипы преобладали у больных с отсутствием реакции на холод (39,2% против 23,3% для гетерозигот). Носители генотипа AA демонстрировали более выраженное снижение  $\Delta\text{ОФВ}_1$  в ответ на пробу с ИГХВ, по сравнению с носителями генотипа AG (-11,7 [-15,5; -5,63]%) и -9,0 [-12,0; -3,27]%,  $p=0,01$ ).

Полиморфизм rs1003540 также проявлял тенденции к ассоциации с ХГДП при анализе общей ( $p=0,11$ ) и доминантной модели наследования ( $p=0,08$ ). Носительство гетерозиготного генотипа (AG) чаще отмечалось

среди больных с ХГДП (46,7%), по сравнению с больными, не реагирующими на ИГХВ (30,8%). Отношение шансов наличия ХГДП для носителей AG генотипа, по сравнению с другими генотипами составило 1,96 95%ДИ (1,02; 3,77). Ассоциация подтверждалась также на уровне динамики  $\text{ОФВ}_1$  в ответ на бронхопровокационную пробу с ИГХВ.  $\Delta\text{ОФВ}_1$  для носителей генотипа AG был ниже (-10,6 [-18,5; -6,5]%) по сравнению с носителями генотипа AA (-7,4 [-13,0; -3,99]%),  $p=0,02$ .

Таким образом, результат проведенного исследования еще раз косвенно подтвердил факт участия каналов с транзиторным рецепторным потенциалом TRPM8 в формировании реакции холод-индуцированного бронхоспазма у больных БА. Из семи проанализированных полиморфизмов, для четырех была показана возможность влияния различной степени выраженности на фенотип БА с ХГДП. Тем не менее, эффект изученных полиморфизмов TRPM8 на ХГДП нельзя назвать определяющим, они выполняют лишь роль модулирующих факторов, в различной мере снижая (rs17868387, rs17865682) или увеличивая (rs11562975, rs1003540) риск выраженной холодовой респираторной реакции. Это обстоятельство логично проистекает из данных об общем вкладе генетических факторов в формирование феномена гиперреактивности дыхательных путей на уровне около 50% [9]. Помимо фенотипической гетерогенности, обусловленной не генетическими причинами (например, базисная терапия БА), недостаток значимости при анализе влияния ряда полиморфизмов TRPM8 может быть обусловлен относительно малым числом наблюдений. Можно заметить, что для некоторых вариаций число гетерозигот в подгруппах не превышает двух десятков, а количество редких гомозигот исчисляется единицами, что делает невозможной достоверную оценку эффектов данных генотипов. Таким образом, для однозначной оценки роли полиморфизмов гена TRPM8 целесообразно дальнейшее проведение исследований на выборках большей численности (порядка нескольких сотен человек).

Несмотря на трудности изолированного использования генетических маркеров для прогнозирования такого многофакторного признака, как ХГДП, данные о роли полиморфизмов TRPM8 в его формировании представляют ценность с точки зрения уточнения патогенетических механизмов и возможности использования при персонализированном назначении препаратов антагонистов TRPM8, разработка которых в настоящее время активно ведется [12, 16]. Интерес для дальнейших исследований также может представлять анализ взаимодействий полиморфизмов TRPM8 и других молекул, принимающих участие в терморцепции или модулирующих ее, при формировании ХГДП и выяснение особенностей внутриклеточного сигналинга, стоящих за каждой вариацией генетической последовательности.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-34-60189 мол\_a\_дк.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Луценко М.Т. Действие жестких климатических условий Северо-Востока России на состояние бронхиальных путей жителей Чукотки // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2017. Вып.63. С.53–60. doi: 10.12737/article\_58e44823bba495.56497484
2. Приходько А.Г., Колосов А.В. Особенности холодной реактивности дыхательных путей при болезнях органов дыхания // Пульмонология. 2008. №1. С.69–74.
3. Fitzgerald E.F., Pantea C., Lin S. Cold spells and the risk of hospitalization for asthma: New York, USA 1991–200 // *Lung*. 2014. Vol.192, №6. P.947–954.
4. Harju T., Mäkinen T., Näyhä S., Laatikainen T., Jousilahti P., Hassi J. Cold-related respiratory symptoms in the general population // *Clin. Respir. J.* 2010. Vol.4, №3. P.176–185.
5. Hervás D., Utrera J.F., Hervás-Masip J., Hervás J.A., García-Marcos L. Can meteorological factors forecast asthma exacerbation in a paediatric population? // *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 2015. Vol.43, №1. P.32–36.
6. Hyrkäs H., Jaakkola M.S., Ikäheimo T.M., Hugg T.T., Jaakkola J.J. Asthma and allergic rhinitis increase respiratory symptoms in cold weather among young adults // *Respir. Med.* 2014. Vol.108, №1. P.63–70.
7. Kotaniemi J.T., Latvala J., Lundbäck B., Sovijärvi A., Hassi J., Larsson K. Does living in a cold climate or recreational skiing increase the risk for obstructive respiratory diseases or symptoms? // *Int. J. Circumpolar Health*. 2003. Vol.62, №2. P.142–157.
8. Lam H.C., Li A.M., Chan E.Y., Goggins W.B. 3rd. The short-term association between asthma hospitalisations, ambient temperature, other meteorological factors and air pollutants in Hong Kong: a time-series study // *Thorax*. 2016. Vol.71, №12. P.1097–1109.
9. McGeachie M.J., Stahl E.A., Himes B.E., Pendergrass S.A., Lima J.J., Irvin C.G., Peters S.P., Ritchie M.D., Plenge R.M., Tantisira K.G. Polygenic heritability estimates in pharmacogenetics: focus on asthma and related phenotypes // *Pharmacogenet. Genomics*. 2013. Vol.23, №6. P.324–328.
10. Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Potapova T.A., Maksimov V.N., Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8 gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma // *Respirology*. 2015. Vol.20, №8. P.1192–1197.
11. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol // *Cell*. 2002. Vol.108, №5. P.705–715.
12. Preti D., Szallasi A., Patacchini R. TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review // *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2012. Vol.22, №6. P.663–695.
13. Rice M.B., Li W., Wilker E.H., Gold D.R., Schwartz J., Koutrakis P., Washko G., O'Connor G.T., Mittleman M.A. Extreme temperatures and lung function in the Framingham study // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017. №195. A2042.
14. Sabnis A.S., Shadid M., Yost G.S., Reilly C.A. Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol.39, №4. P.466–474.
15. Sanchez J.A., Pierce K.E., Rice J.E., Wanhg L.J. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol.101, №7. P.1933–1938.
16. Winchester W.J., Gore K., Glatt S., Petit W., Gardiner J.C., Conlon K., Postlethwaite M., Saintot P.P., Roberts S., Gosset J.R., Matsuura T., Andrews M.D., Glosop P.A., Palmer M.J., Clear N., Collins S., Beaumont K., Reynolds D.S. Inhibition of TRPM8 channels reduces pain in the cold pressor test in humans // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2014. Vol.351, №2. P.259–269.
17. Xing H., Ling J.X., Chen M., Johnson R.D., Tomi-naga M., Wang C.Y., Gu J. TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway // *Mol. Pain*. 2008. №4. P.22.
18. Zhang Y., Peng L., Kan H., Xu J., Chen R., Liu Y., Wang W. Effects of meteorological factors on daily hospital admissions for asthma in adults: a time-series analysis // *PLoS One*. 2014. Vol.9, №7. e102475.

## REFERENCES

1. Lutsenko M.T. Influence of the Russian North-East severe climatic conditions of the state of bronchi in Chukotka citizen. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2017; 63:53–60 (in Russian). doi: 10.12737/article\_58e44823bba495.56497484
2. Prikhodko A.G., Kolosov A.V. The particularities of cold-induced bronchial hyperreactivity in patients with chronic respiratory diseases. *Russian Pulmonology* 2008; 1:69–74 (in Russian).
3. Fitzgerald E.F., Pantea C., Lin S. Cold spells and the risk of hospitalization for asthma: New York, USA 1991–200. *Lung* 2014; 192(6):947–954.
4. Harju T., Mäkinen T., Näyhä S., Laatikainen T., Jousilahti P., Hassi J. Cold-related respiratory symptoms in the general population. *Clin. Respir. J.* 2010; 4(3):176–185.
5. Hervás D., Utrera J.F., Hervás-Masip J., Hervás J.A., García-Marcos L. Can meteorological factors forecast asthma exacerbation in a paediatric population? *Allergol. Immunopathol. (Madr)* 2015; 43(1):32–36.
6. Hyrkäs H., Jaakkola M.S., Ikäheimo T.M., Hugg T.T., Jaakkola J.J. Asthma and allergic rhinitis increase respiratory symptoms in cold weather among young adults. *Respir. Med.* 2014; 108(1):63–70.
7. Kotaniemi J.T., Latvala J., Lundbäck B., Sovijärvi A., Hassi J., Larsson K. Does living in a cold climate or recreational skiing increase the risk for obstructive respiratory diseases or symptoms? *Int. J. Circumpolar Health* 2003; 62(2):142–157.
8. Lam H.C., Li A.M., Chan E.Y., Goggins W.B. 3rd. The short-term association between asthma hospitalisations, ambient temperature, other meteorological factors and air pollutants in Hong Kong: a time-series study. *Thorax* 2016; 71(12):1097–1109.

9. McGeachie M.J., Stahl E.A., Himes B.E., Pendergrass S.A., Lima J.J., Irvin C.G., Peters S.P., Ritchie M.D., Plenge R.M., Tantisira K.G. Polygenic heritability estimates in pharmacogenetics: focus on asthma and related phenotypes. *Pharmacogenet. Genomics* 2013; 23(6):324–328.
10. Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Potapova T.A., Maksimov V.N., Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8 gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *Respirology* 2015; 20(8):1192–1197.
11. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002; 108(5):705–715.
12. Preti D., Szallasi A., Patacchini R. TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2012; 22(6):663–695.
13. Rice M.B., Li W., Wilker E.H., Gold D.R., Schwartz J., Koutrakis P., Washko G., O'Connor G.T., Mittleman M.A. Extreme temperatures and lung function in the Framingham study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017; 195:A2042.
14. Sabnis A.S., Shadid M., Yost G.S., Reilly C.A. Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008; 39(4):466–474.
15. Sanchez J.A., Pierce K.E., Rice J.E., Wang L.J. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(7):1933–1938.
16. Winchester W.J., Gore K., Glatt S., Petit W., Gardiner J.C., Conlon K., Postlethwaite M., Saintot P.P., Roberts S., Gosset J.R., Matsuura T., Andrews M.D., Glosop P.A., Palmer M.J., Clear N., Collins S., Beaumont K., Reynolds D.S. Inhibition of TRPM8 channels reduces pain in the cold pressor test in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2014; 351(2):259–269.
17. Xing H., Ling J.X., Chen M., Johnson R.D., Tomi-naga M., Wang C.Y., Gu J. TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway. *Mol. Pain* 2008; 4:22.
18. Zhang Y., Peng L., Kan H., Xu J., Chen R., Liu Y., Wang W. Effects of meteorological factors on daily hospital admissions for asthma in adults: a time-series analysis. *PLoS One* 2014; 9(7):e102475.

Поступила 22.05.2017

Контактная информация

Денис Евгеньевич Наумов,

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики неспецифических заболеваний легких, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: denn1985@bk.ru

Correspondence should be addressed to

Denis E. Naumov,

MD, PhD, Senior Staff Scientist,

Laboratory of Prophylaxis of Non-specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: denn1985@bk.ru