НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ МЕДИЦИНИ ПРАЦІ ІМ. Ю.І. КУНДІЄВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

«СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ПЕРВИННОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ ПРОФЕСІЙНОЇ ЕТІОЛОГІЇ НА ОСНОВІ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СХИЛЬНОСТІ»

(методичний посібник)

Київ -2018

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ МЕДИЦИНИ ПРАЦІ ІМ. Ю.І. КУНДІЄВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

"УЗГОДЖЕНО"
Заступник начальника
лікувально-організаційного управління
НАМН України, д-р. мед. н.

_____ О.О.Петриченко
"____" _____ 2018 р.

«СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ПЕРВИННОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ ПРОФЕСІЙНОЇ ЕТІОЛОГІЇ НА ОСНОВІ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СХИЛЬНОСТІ»

(методичний посібник)

Київ -2018

УДК 616.24-007.272-056.7-057-084(083.12.132)

ББК 51.244:54.12

С 91

Установа-розробник: Державна установа «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України»

Авторський колектив:

Завідувачка відділу професійної патології ДУ «ІМП імені Ю.І. Кундієва НАМН», член-кор. НАМН України, д-р. мед. н., професор, Басанець А.В.

С.н.с. відділу професійної патології ДУ «ІМП імені Ю.І. Кундієва НАМН», к.мед.н. Остапенко Т.А.

Доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, к.б.н. Долінчук Л.В.

Головний лікар клініки професійних захворювань ДУ«ІМП імені Ю.І. Кундієва НАМН» Харченко Т.Д.

М.н.с. відділу професійної патології ДУ «ІМП імені Ю.І. Кундієва НАМН», к.мед.н. Гвоздецький В.А.

Завідувачка терапевтичним відділенням клініки професійних захворювань ДУ«ІМП імені Ю.І. Кундієва НАМН», к.мед.н. Єрмакова О.В.

контактний тел. (044) 284-34-37

Рецензенти:

Завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, д-р. мед. н., професор Досенко В.Є.

Завідувач клініко-функціонального відділення ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», член-кор. НАМН України, д-р. мед. н, професор Гаврисюк В.К.

Ухвалено Проблемною комісією МОЗ та НАМН України «Гігієна праці та профзахворювання» (протокол № 1 від 20 квітня 2018 р.)

Рекомендовано до друку Національною академією медичних наук України від 20.06.2018 р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ…… 5

ВСТУП……. 6

РОЛЬ СИСТЕМИ «ПРОТЕОЛІЗ-АНТИПРОТЕОЛІЗ» У РОЗВИТКУ ХОЗЛ……. 9

КЛІНІКО-ГЕНЕАЛОГІЧНЕ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СПАДКОВОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО ХОЗЛ ПРОФЕСІЙНОГО ҐЕНЕЗУ…… 17

АЛГОРИТМ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ХОЗЛ У ШАХТАРІВ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ УКРАЇНИ…….. 22

ВИСНОВКИ……. 25

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ…….. 26

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕЦМ	Екстрацелюлярний матрикс
ЄРТ	Європейського респіраторного товариства
МФЗ	Мультифакторні захворювання
НЕ	Нейтрофільна еластаза
НК	Нуклеїнова кислота
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
РНК	Рибонуклеїнова кислота
ХОЗЛ	Хронічне обструктивне захворювання легень
A2M	Альфа-2-макроглобулін
ELANE	Ген, що кодує нейтрофільну еластазу
ELN	Ген, що кодує еластин
IL	Інтерлейкін
GOLD	Глобальна ініціатива з хронічного обструктивного захворювання легень
MMP	Матриксна металопротеїназа
NIOSH	Національний Інститут Професійної Безпеки та Здоров'я
TIMP	Тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ
TNFα	Фактор некрозу пухлини α

ВСТУП

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) представляє собою важливу медико-соціальну проблему у зв’язку зі значною розповсюдженістю серед населення, скороченням тривалості життя пацієнтів, економічними збитками, пов'язаними з втратою працездатності населення. Протягом останніх 20 років кількість хворих, що стали інвалідами внаслідок даної патології, збільшилася в 7 разів. Дослідження, проведені у різних країнах, свідчать, що в наш час ХОЗЛ діагностується у 3–7 % дорослого населення, а захворюваність та смертність від захворювання у світі продовжує зростати. В положенні Європейського респіраторного товариства (ЄРТ) наголошено, що тільки приблизно у кожного четвертого пацієнта хвороба реєструється своєчасно [1].

За визначенням Глобальної ініціативи з хронічного обструктивного захворювання легень (Global Initiative for Obstructive Lung Disease – GOLD), ХОЗЛ – це захворювання, що можна попередити і лікувати, характеризується стійким обмеженням прохідності дихальних шляхів, яке зазвичай прогресує і асоціюється з посиленою запальною відповіддю дихальних шляхів і легень на вплив токсичних часток та газів [2].

Метою GOLD є підготовка рекомендацій з контролю ХОЗЛ на основі найкращої доступної наукової інформації. Ініціатива GOLD наголошує, що найбільш вивченим в епідеміологічних дослідженнях етіологічним фактором ХОЗЛ є сигаретний дим. Однак, вперше в редакції GOLD 2016 року абсолютно чітко було представлено позицію про можливість розвитку ХОЗЛ професійної етіології. А також в редакції документу 2017 року наголошується, що вплив органічного і неорганічного пилу, хімічних речовин і газів в попередні роки був явно недооцінений з точки зору ризику розвитку захворювання [2].

Національним Інститутом Професійної Безпеки та Здоров’я (NIOSH) в США, Державною установою «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України» було проведено ряд епідеміологічних і клінічних досліджень та доведено можливість розвитку ХОЗЛ у шахтарів вугільних шахт від впливу вугільно-породного пилу [3].

На сьогодні випадки ХОЗЛ професійного ґенезу реєструються у працюючих гірничорудної, металургійної, хімічної промисловості, сільському господарстві.

Ранні форми ХОЗЛ професійної етіології, коли профілактичні заходи та реабілітація пацієнта є ефективними, виявляються рідко. Зазначене є свідченням недосконалості профілактичної роботи, низької якості медичних оглядів на виробництві, коли робітники з ознаками запальних захворювань дихальних шляхів допускаються на роботи в небезпечних умовах праці, інколи, навіть, з вже встановленим професійним захворюванням [4, 5].

В Україні найбільша частка професійної патології зареєстрована у вугільній промисловості, при цьому провідне місце посідають захворювання системи органів дихання (пневмоконіоз, хронічний бронхіт, ХОЗЛ), що становлять 60-65% в структурі професійної захворюваності [6]. Доведено, що серед шахтарів показники смертності від захворювань бронхолегеневої системи вищі, ніж в популяції в цілому [7,8]. Дослідження останніх років свідчать, що тривалий вплив вугільно-породного пилу у шахтарів призводить до 15 % випадків ХОЗЛ професійної етіології [9]. Слід зазначити, що умови праці шахтарів в Україні далекі від нормативних, обумовлені використанням застарілого гірничошахтного обладнання, погіршенням гірничо-геологічних умов відпрацьованих вугільних пластів, незадовільним станом охорони праці та медико-санітарного забезпечення працюючих [10, 11], що й призводить до розвитку ХОЗЛ професійної етіології внаслідок впливу небезпечних факторів виробничого середовища.

ХОЗЛ відноситься до мультифакторних захворювань (МФЗ), що розвивається в результаті поєднаного впливу екзогенних та генетичних факторів. Підтвердженням мультифакторної природи ХОЗЛ служить той факт, що далеко не всі робітники, які контактують з пилом, хворіють на дане захворювання.

Виходячи з сучасних уявлень про патогенез МФЗ, вважається, що сукупність генів, які відповідають за формування схильності до захворювання, утворює систему пов'язаних між собою елементів, ефекти взаємодії яких на рівні

білкових продуктів визначають біохімічну індивідуальність людини. Залежно від цього у індивідуума формується властивий йому високий або низький ступінь схильності до того або іншого захворювання, який в разі дії відповідних чинників зовнішнього середовища реалізується у хворобу. Таким чином, для розуміння спадкової природи ХОЗЛ, як і інших МФЗ, необхідно встановити яке саме "несприятливе" поєднання поліморфних варіантів генів приводить до високої вірогідності розвитку патології.

При аналізі даних наукової літератури було виявлено більше 20 генів, що асоціюють з розвитком ХОЗЛ [12-17]. В залежності від функції білкових продуктів у процесі розвитку ХОЗЛ їх можна поділити на декілька груп.

1. Гени, експресія яких впливає на активність системи «протеоліз-антипротеоліз» (матриксні металопротеїнази (*MMPs*), тканинні інгібітори матриксних металопротеїназ (*TIMPs*), α-2 макроглобулін (*A2M*) та ін.;

2. Гени медіатори запалення білкової природи: прозапальні цитокіни (фактор некрозу пухлин альфа (*TNF-α*), рецептор інтерлейкіну 8 (*IL8RA*) та ін.) і реактивні агенти, які синтезуються альвеолярними макрофагами і епітеліальними клітинами;

3. Гени, експресія яких впливає на активність метаболізму ксенобіотиків (глутатіон S-трансфераза типу Т1 (*GSTT1*) та М1 (*GSTM1*), мікросомальна епоксид-гідролаза (*EPHX1*) та ін.);

4. Інші гени, які неможливо однозначно віднести до однієї з вказаних груп.

РОЛЬ СИСТЕМИ «ПРОТЕОЛІЗ-АНТИПРОТЕОЛІЗ» У РОЗВИТКУ ХОЗЛ

Теорія «протеоліз-антипротеоліз» припускає, що патогенез ХОЗЛ та емфіземи є результатом дисбалансу між ферментами, що руйнують екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) легень та білками-інгібіторами, які пригнічують протеолітичну активність даних ферментів. Значна кількість протеаз відіграє важливу роль в процесах ремоделювання та запалення в легенях. Тому для захисту від неконтрольованої деградації ЕЦМ вкрай важливо, щоб протеази були під контролем антипротеаз – інгібіторів активності ферментів. За даними наукових досліджень у хворих з патологією бронхолегеневої системи спостерігається високий вміст серинових та цистеїнових протеїназ та їх інгібіторів, які відіграють ключову роль у підтриманні існуючого балансу в легенях [18, 19].

Відомо, що головними біомаркерами хронічного запалення є нейтрофіли, макрофаги та Т-лімфоцити. Нейтрофіли, що циркулюють в кровотоці, у великій кількості концентруються в легенях, де продукують протеолітичні ферменти, такі як мієлопероксидаза, нейтрофільна еластаза (NE), металопротеаза, що поряд з інтерлейкінами (IL) та TNF-α являються основними медіаторами запалення при ХОЗЛ [21]. Важливу роль у формуванні запалення також відіграють альвеолярні макрофаги, які при пошкодженні тканини легень продукують прозапальні цитокіни та матриксині металопротеїнази (MMPs, matrix metalloproteinases). Відомо, що ферментативна активність MMPs, знаходиться під контролем прозапальних цитокінів (IL-6, TNF-α, IL-4, IL-13) та тканинних інгібіторів матриксних металопротеїназ (TIMPs, tissue inhibitor of metalloproteinases) [21, 22]. За високої концентрації нейтрофілів та макрофагів в дихальних шляхах порушується баланс системи «протеоліз-антипротеоліз», внаслідок чого кількість протеолітичних ферментів значно перевищує кількість їх інгібіторів. Підтримання даного балансу є ключовим при контролі прозапального стану, оскільки надвисока активність ферментів викликає деградацію всіх компонентів клітинного матриксу паренхіми легень, включаючи еластин, колаген,

фібронектин, ламінін та протеоглікани. При цьому наступає деградація еластичного каркаса тканин і порушення нормальної архітектоніки легень, що веде до розвитку емфіземи. При цьому розвивається обструктивний синдром, в основі якого лежить порушення рівноваги еластичної напруги між легеневою паренхімою та бронхами [22].

Активність ферментної системи «протеоліз-антипротеоліз» регулюється експресією генів, що кодують *MMPs, TIMPs*, α-2 макроглобулін (*A2M*) та ін.

Відомо, що MMPs, – це родина Zn^{+2}-залежних протеолітичних ферментів, які відіграють важливу роль в процесах ремодуляції та репарації легеневої тканини при запальних реакціях. Характер експресії матриксних металопротеїназ має багато спільного з експресією класичних реактантів гострої фази запалення. Їх активність зростає в період запальної реакції, більшість з них приймають безпосередню участь в процесі запалення, регулюючи секрецію цитокінів, шеддінг рецепторів та міграцію лейкоцитів в місце запалення [23]. На сьогодні в організмі людини ідентифіковано 24 гени, що кодують 23 ММР (23-я ММР має два дуплікатні гени). За структурою та специфічністю дії на субстрат їх можна поділити на 6 підродин: колагенази (ММР 1, 8, 13 та 18), желатинази (ММР 2 та 9), стромелізини (ММР 3, 10, 11 та 17), матрілізини (ММР 7 та 26), мембранозв'язані матриксні металопротеази (ММР 14, 15, 16, 17, 24 та 25) та матриксні металопротеази, що не відносяться ні до однієї з підродин (ММР 7, 12, 19 та 20) [21, 23].

На сьогодні встановлено, що всі металопротеїнази володіють схожими властивостями: руйнують компоненти екстрацелюлярного матриксу, такі як колаген та еластин, секретуються як проферменти (proMMPs) і для активації потребують протеолітичного розщеплення, активні в нейтральному середовищі (рис.1). Лише окремі представники MMPs, що пов'язані з клітинною мембраною (membrane type MMP, MT-MMP), секретуються у функціонально активній формі. Як поліфункціональні білки MMPs є єдиними ферментами, що здатні денатурувати фібрилярні колагени [21, 23].

Наукові дані, отриманні в результаті досліджень на тваринах і людині, дозволяють припустити, що MMPs в значній мірі залученні в патогенетичний процес ХОЗЛ [18, 24,25]. Деякі еластолітичні ферменти, такі як ММР-2, ММР-9 і ММР-12, були знайдені саме в альвеолярних макрофагах людини [26, 27]. Також показано, що гіперсекреція ММР-1 призводить до формування емфіземи, механізм її дії пов'язаний з деструкцією колагену III типу. Цей фермент (колагеназа) володіє здатністю розщеплювати природні потрійні спіралеподібні внутрішньотканинні колагени, але не еластин. Описано підвищення експресії ММР-1 в тканинах легень при емфіземі (переважно в альвеолоцитах) в бронхоальвеолярному змиві та мокроті у хворих на ХОЗЛ [18, 28].

Наукові дослідження показали, що ММР-9 (желатиназа В, колагеназа IV типу) відіграє важливу роль при запаленні дихальних шляхів та розвитку емфіземи легень. Збільшення вмісту даного ферменту в альвеолярних макрофагах здебільшого спостерігається у курців та осіб, хворих на ХОЗЛ. В мікропрепаратах альвеолярних макрофагів хворих на ХОЗЛ, in vitro виділяли більше ММР-9, ніж у альвеолярних макрофагах від здорових курців. При дослідженні хворих на ХОЗЛ виявлено підвищення концентрації ММР-9 в бронхоальвеолярному лаважі і мокротинні, у зв'язку з чим можна зробити припущення, що надлишкова секреція ММР-9 відіграє важливу роль в розвитку даного захворювання [18, 20, 21, 26, 27, 28].

Аналіз літератури свідчить, що значення ММР-12 в розвитку емфіземи легень доведено тільки в експериментах на мишах. Встановлено, що в мишей з підвищеною експресією γ-інтерферона та інтерлейкіна-13 розвиток емфіземи обумовлений активною секрецією ММР-12. В мишей з дефіцитом ММР-12 у відповідь на дію сигаретного диму емфізема не розвивалась [30]. Дослідженнями встановлено, що дана металопротеїназа сприяє звільненню TNF-α, що залучає нейтрофіли до продукції ними NE. TNF-α в 70% випадків став причиною розвитку емфіземи у мишей під впливом сигаретного диму [31].

Відомо, що поліморфізм A-82G (rs2276109) в промотрній ділянці гена *ММР-12* асоційований з ризиком ровитку пневмофіброзу. У гомозиготних носіїв

алелю А спостерігається збільшення експресії гену за рахунок підвищення спорідненості (афінності) до фактора транскрипції АР-1 (activatorprotein-1) [32].

В різних популяційних групах проведені численні дослідження щодо вивчення впливу поліморфізму генів *MMPs* на розвиток ХОЗЛ. Було показано, що деякі поліморфні варіанти в ділянці промотору гена *MMP-1* можуть збільшувати ризик розвитку ідіопатичного легеневого фіброзу [33]. Дослідження, проведені японськими вченими, показали значне збільшення частоти мінорних алелей поліморфізму С-1562Т гена *MMP-9* в групі курців, хворих на емфізему, в порівнянні з курцями без ознак захворювання [34]. В цей же час, китайські дослідники повідомили, що у носіїв мінорного алелю даного поліморфізму зростає ризик розвитку ХОЗЛ [35]. Проте, дослідження, проведені науковцями Оксфордського університету, показали, що поліморфні варіанти генів *MMP-1* та *MMP-12* були асоційовані зі зниженням функції легень у 590 обстежених, які продовжують курити, для поліморфізму гену *MMP-9* дана асоціація не підтвердилась [26]. Група вчених на чолі з доктором Haq генетипували 26 мононуклеотидних поліморфізмів, що в повному обсязі охоплюють описані варіації даних поліморфізмів у трьох генах: *MMP-1*, *MMP-9* та *MMP-12* у 977 осіб, хворих на ХОЗЛ, та 876 курців без патології легень європейського походження. Результати досліджень показали, що комбінації з двох мононуклеотидних поліморфізмів ММР-12 (rs652438 та rs2276109) асоціюються з тяжким або дуже тяжким перебігом ХОЗЛ [30].

Цікавим виявився той факт, що поєднання впливу декількох поліморфних варіантів гену частіше здійснюють вплив на швидкість зниження легеневої функції, ніж поодинока нуклеотидна заміна. Було показано, що комбінації алельних варіантів поліморфізму 1607delG гена *MMP-1* та А-357G гена *MMP-12* корелює зі швидким зниженням функції легень. На основі даних спостережень вчені зробили висновок, що наявність поліморфізму в даних генах являється етіологічним фактором розвитку пошкодження легень при ХОЗЛ [36].

Відомо, що регуляція активності ММРs здійснюється завдяки 4 тканинним інгібіторам матриксних металопротеїназ (TIMPs–tissue inhibitor of

metalloproteinases), які синтезуються клітинами сполучної тканини і лейкоцитами та формують нековалентні комплекси з MMPs. TIMPs є ключовими інгібіторами в тканинах, вони складаються з N-термінального і С-кінцевого доменів, що стабілізуються дисульфідними зв'язками, в яких цинк діє як каталітичний домен. TIMPs зв'язується з цинк-зв'язуючим каталітичним сайтом MMPs в молярному відношенні 1:1 [18, 37]. Експресія TIMPs в тканинах жорстко регулюється для підтримки рівноваги між протеолізом і його гальмуванням, що забезпечує стабільність позаклітинного матриксу. Для запобігання пошкоджень легеневої паренхіми TIMPs продукуються в кількості, необхідній для достатньої протидії високій активності MMPs, в іншому випадку, порушення продукції TIMPs може також призвести до накопичення позаклітинного матриксу з розвитком фіброзу, що є однією з характеристик ХОЗЛ. Таким чином, коректна продукція TIMPs має істотне значення для фізіологічної функції легень. В легенях TIMPs продукує багато типів клітин, таких як бронхіальні епітеліальні клітини, альвеолярні пневмоцити II типу, гладком'язові клітини і стимульовані клітини запалення (нейтрофіли і альвеолярні макрофаги). Таким чином, продукція TIMPs знаходиться під контролем клітинних компонентів легень і запалення [37].

Аналіз сучасної наукової літератури свідчить, що з розвитком ХОЗЛ асоціюють поліморфні генів *TIMP-1* (Phe124Phe (rs4898), Ile158Ile (rs11551797)) та *TIMP-2* (G-418C (rs2009196), G+853A (rs2277698)), функціональні характеристики яких поки що не з'ясовано.

Дослідження випадок-контроль в японській популяції показало, що два поліморфні варіанти (+853 G /A і -418 G / C) в області промотору гена *TIMP-2* асоційовані з розвитком ХОЗЛ. Частота +853G і -418C алелів була значно вищою в групі хворих на ХОЗЛ, ніж в групі контролю [38]. Однак, дослідження, проведені у єгипетській популяції, показали, що тільки алель +853G асоційований з розвитком ХОЗЛ [39], що вказує на важливе значення поліморфізму +853G/A гену *TIMP-2* у розвитку патології незалежно від етнічної приналежності. Також відомі дані щодо впливу поліморфних варіантів гену *TIMP-1* на розвиток ХОЗЛ. Дослідження, проведені у групі осіб кавказької

популяції, показали зв’язок поліморфізму Phe124Phe (T/C) гена *TIMP-1* зі зниженням $ОФВ_1$ та розвитком ХОЗЛ як у нинішніх, так і колишніх курців [40]. Вивчення поліморфізму Ile158Ile (C/T) гену *TIMP-1* не показало асоціації зі зниженням показників легеневої функції [40]. Однак, останній пов'язують з можливими змінами в структурі *TIMP-1*, що в свою чергу знижує спорідненість до *MMP-9* [18]. Аналіз ще одного поліморфізму (rs6609533, (GA) гену *TIMP-1* показав, що взаємодія між мінорним алелем А та інгібітором a_1АТ призводить до зниження активності тканинного інгібітору та підвищує ризик розвитку ХОЗЛ [41].

За результатами мета аналізу, опублікованого у березні 2016 року (Journal of Reseache in Medical Sciences), який включав вивчення результатів 20 наукових досліджень (923 пацієнта з ХОЗЛ, 641 – здорові особи), авторами з’ясовано, що підвищений рівень білків ММР-9 та TIMP-1 тісно корелює в патогенезі ХОЗЛ, та зазначено, що дані білки можуть бути використані у якості біологічних маркерів ранньої діагностики захворювання [29].

Таким чином, аналіз вітчизняної та світової літератури показав суперечливість наукових даних щодо ролі поліморфізму генів *MMPs* та *TIMPs* у розвитку ХОЗЛ, що вимагає проведення подальших генетичних досліджень на різних популяційних вибірках.

За даними літератури відомо, що α-2-макроглобулін (α2М) – це протеаза плазми крові з молекулярною масою 772 кДа, яка включає чотири майже однакові домени з’єднаних дисульфідними зв’язками, в яких цинк являється каталітичним центром. Даний білок синтезується в основному гепатоцитами і макрофагами. Функція α2М полягає в інгібуванні ендопротеїназ, в тому числі і MMPs. Механізм пригнічення є унікальним, α2М розщеплюється протеазами в специфічній ділянці, яка називається «регіон приманка», а потім піддається конформаційним змінам, які активують тіоефірні зв’язки, що забезпечують сайти ковалентного приєднання протеаз, створюючи таким чином пастку [37]. α2М видаляє з кровотоку надлишок MMPs, формуючи α-2-макроглобулін-ММР комплекс. Елімінація відбувається інтерналізацією цих комплексів в клітинах

(ендосомах) за допомогою спеціальних α2M рецепторів, так званих ліпопротеїнів низької щільності рецептор-зв'язаних білків (LRP, lipoprotein receptor-related protein), що знаходяться на поверхні клітин [38]. Таким чином, α2M можна розглядати як основний інгібітор MMP, незважаючи на деякі TIMPs, що також присутні в плазмі крові.

З літературних даних відомо, що інсерційно-делеційний (I/D, *rs121912684*) поліморфізм 5' сплайсинг сайта в 18 екзоні гена *α2M*, що може порушувати притягування та захоплення протеаз α-2 макроглобуліном [39]. Дослідження поліморфних варіантів гена *α2M* (*Cys972Gln* (*rs1800433*) та *Val1000Ile* (*rs669*)), проведені на 30-х пацієнтах, хворих на ХОЗЛ, та 30-х здорових особах контролю, не показали асоціації з розвитком захворювання [40]. Для встановлення взаємозв'язку поліморфізму гену *α2M* з розвитком ХОЗЛ необхідно проведення досліджень з більшою репрезентативною вибіркою.

Визначення біомаркерів генетичної схильності до розвитку професійних захворювань відкриває нові шляхи до їх первинної профілактики та є перспективним шляхом наукових розробок сьогодення.

Економічний збиток, пов'язаний з втратою трудового потенціалу, відшкодуванням компенсацій у зв'язку зі зниженням працездатності, медичними витратами на лікування та реабілітацію хворих, а також відтворенням робочої сили, робить проблему профілактики і ранньої діагностики професійних захворювань бронхолегеневої системи, в т.ч. ХОЗЛ, однією з пріоритетних у сфері медицини праці [41, 42]. Вищезазначене обумовлює актуальність проблеми та необхідність впровадження сучасних заходів первинної профілактики захворювання, удосконалення системи диспансерного нагляду за пацієнтами на ХОЗЛ, на що спрямований даний методичний посібник.

Метою даного методичного посібника є визначення генетичної складової розвитку ХОЗЛ професійної етіології та впровадження в Україні науково обґрунтованої системи заходів первинної профілактики захворювання у працівників вуглевидобувної галузі України.

Впровадження представленого методичного посібника дозволить:

1. Удосконалити систему профілактики та диспансерного нагляду за пацієнтами, хворими на ХОЗЛ професійної етіології;

2. Знизити професійну захворюваність на ХОЗЛ в Україні;

3. Зменшити витрати держави на лікування та відшкодування за втрату працездатності та інвалідність.

Методичний посібник є складовою частиною комплексних досліджень, які виконувались відділом професійної патології Державної установи «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України» в рамках НДР: «Сучасні підходи до діагностики та профілактики хронічного обструктивного захворювання легень на основі поглибленого вивчення патогенезу» (державний реєстраційний № 0110U001438, 2013-2015 р.р.), «З'ясування ролі генетичної складової у патогенезі хронічного обструктивного захворювання легень професійної етіології» (державний реєстраційний № 0116U000501, 2016-2018 р.р.).

Методичний посібник на цю тему в Україні видається вперше.

Методичний посібник розрахований на лікарів-профпатологів, пульмонологів, лікарів з гігієни праці, генетиків та рекомендовані для впровадження в закладах охорони здоров'я (обласних, міських, районних) профпатологічного профілю, вищих навчальних закладах медичного профілю.

КЛІНІКО-ГЕНЕАЛОГІЧНЕ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СПАДКОВОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО ХОЗЛ ПРОФЕСІЙНОГО ҐЕНЕЗУ

Одним з методів первинної профілактики розвитку ХОЗЛ професійної етіології є оцінка ступеня ризику виникнення захворювання шляхом виявлення групи осіб, що мають спадкову схильність до нього.

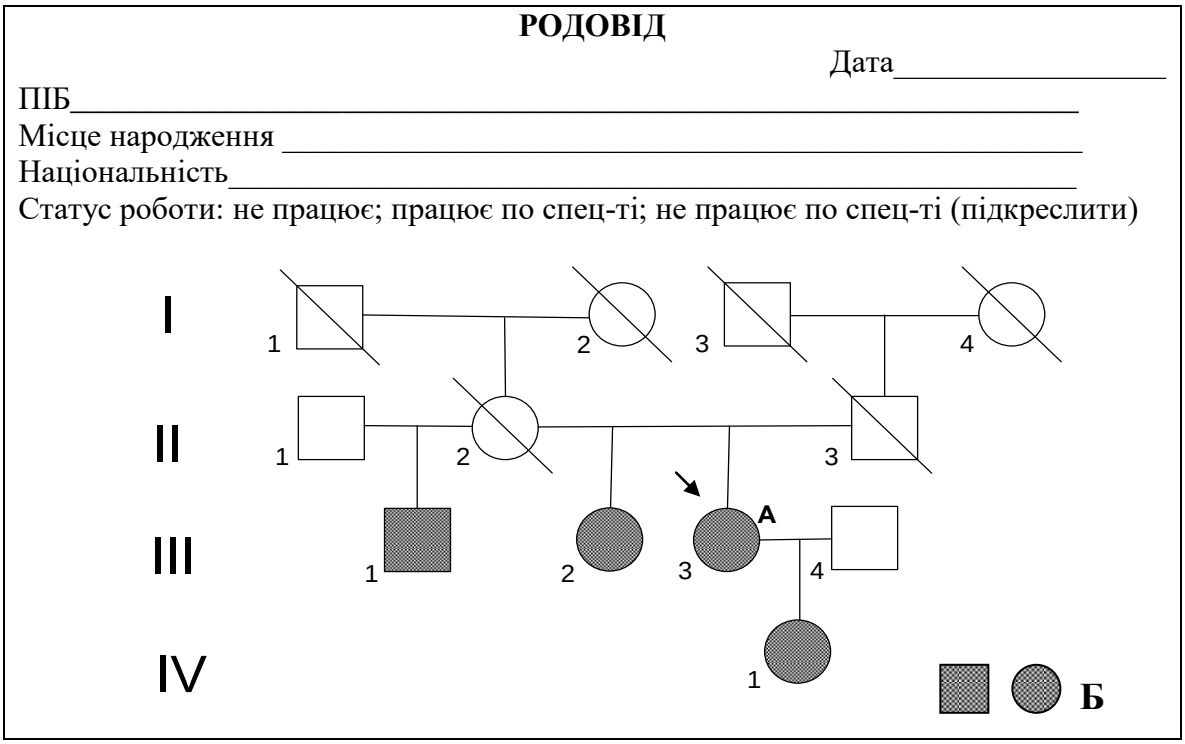
За даними літератури відомо, що однією з характерних особливостей мультифакторних захворювань є їх агрегація у певних сім'ях. Це обумовлено тим, що родичі мають більшу пропорцію спільних генів один з одним у порівнянні з будь-яким індивідом в загальній популяції. Відбувається "накопичення" певного мультифакторного захворювання в родинах хворих, тобто має місце явище "родинної агрегації". З іншого боку, родинний випадок не вказує однозначно на наявність спільної генетичної схильності у родичів і "накопичення" захворювання в родинах може бути випадковим [43-45].

За результатами наукового дослідження по визначенню коефіцієнту родинної агрегації (FA) встановлено, що у шахтарів з родинним анамнезом бронхолегеневої патології ризик розвитку ХОЗЛ в 2,8 рази вищий, ніж в загальній популяції, що доводить вагому роль генетичного компонента в патогенезі ХОЗЛ професійної етіології [46].

З метою встановлення ролі генетичної складової у розвитку ХОЗЛ професійної етіології було проведене клініко-генеалогічне дослідження та молекулярно-генетичне дослідження з аналізом генів, експресія яких впливає на активність системи «протеоліз-антипротеоліз» в родинах шахтарів, хворих на ХОЗЛ, та без патології системи органів дихання.

Слід зауважити, що даний метод має свої певні обмеження, які слід враховувати при проведенні дослідження. Необхідно враховувати, що родинний анамнез захворювань бронхолегеневої системи визначається при опитуванні зі слів респондентів дослідження, що обумовлює його певну об'єктивність. Даний метод рекомендований як етап алгоритму оцінки ступеня ризику розвитку професійного ХОЗЛ у шахтарів вугільних шахт України.

В ході клініко-генеалогічного аналізу для кожного шахтаря складається родовід з визначенням родинного анамнезу ХОЗЛ у родичів I, II, III ступеня спорідненості з застосуванням прийнятих стандартних символів (рис.1). Покоління зазначаються римськими цифрами зліва та зверху-вниз. Арабськими цифрами нумерують нащадків одного покоління зліва направо послідовно. На етапі генеалогічного аналізу визначається характер успадкування ознаки. Суть генеалогічного методу зводиться до виявлення споріднених зв'язків і дослідження ознак ХОЗЛ або хвороби серед близьких та далеких, прямих і непрямих родичів. Зазначене дозволяє при подальшому аналізі визначити осіб, що мають або мали родичів, які також працювали чи працюють в умовах шахтного середовища.



Примітка: А – особи, що працювали або працюють в умовах впливу підвищених концентрацій пилу; Б – особи, хворі на бронхолегеневі захворювання.

Рис. 1. Приклад складання родоводу.

Для визначення генотипу шахтарів рекомендовано застосування методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з електрофоретичною детекцією в агарозному гелі (*ММР-9*) та ПЛР з флуоресцентно-гібридизаційною детекцією в реальному часі (RealTime ПЛР) (*ММР-2, TIMP-2*).

Початковим етапом молекулярно-генетичного дослідження є виділення ДНК.

Виділення ДНК. В стерильних умовах проводиться забір венозної крові у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11.7 мМ) в якості антикоагулянту ("Sarstedt", Німеччина) (при необхідності кров заморожується та зберігається при температурі -20°С).

З лейкоцитів периферичної крові стандартним методом за допомогою комерційної тест-системи «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія) виділяється ДНК для молекулярно-генетичних досліджень. Метод виділення ДНК базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідинізоционатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрісу, а також для денатурації клітинних нуклеаз. У присутності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на *NucleoS*™- сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Далі ДНК екстрагується із сорбента та переноситься у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Отримана ДНК безпосередньо використовується для проведення ПЛР. Із свіжого біологічного матеріалу набір дозволяє виділяти високомолекулярну ДНК (40-50 тисяч пар нуклеотидів високої чистоти ($OD_{260/280\ нм}$ 1.6 – 2.0). Вихід чистої ДНК з 100 мкл цільної крові становить 3 – 5 мкг. В процесі виділення ДНК необхідно чітко дотримуватись рекомендацій, наведених у комерційному наборі.

Визначення поліморфізму $C^{-1562}\rightarrow T$ промотору гена *MMP-9*

$C^{-1562}\rightarrow T$ поліморфізм гену *MMP-9* визначається методом ПЛР з наступним аналізом рестрикційних фрагментів. Для цього ампліфікується промотор вказаного гену з застосуванням пари специфічних праймерів: прямий (sense) – (5`-CAACGTAGTGAAACCCCATCTCT-3`) і зворотній (antisense) (5`-TCCAGGCCCAATTATCACACTTAT-3`). ПЛР проводиться з використанням реагентів фірми «Fermentas» (Литва). Для ампліфікації застосовується 50-100 нг ДНК і додається до суміші, що містить 2,5 мкл 10-кратного Tag-буфера з

$(NH_4)_2SO_4$, 2,5 мкл 25 мМ розчину $MgCl_2$, 2,5 мкл 2 мМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ прямого та зворотного праймерів і 0,5 U Taq ДНК-полімерази, об'єм доводиться до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводиться в багатоканальному ампліфікаторі «Parkin Elmer 2700» (США). Ампліфікація гену *MMP-9* складається з 30 циклів: денатурація - 94°С (1 хв), гібридизація праймерів - 59°С (45 сек) та елонгація - 72°С (1 хв).

На наступному етапі 6 мкл продукту ампліфікації інкубується при 37°С протягом 18 годин із 1,5 U рестриктази *PaeI* ("Fermentas», Литва). Ампліфікати фрагменту промотора гену *MMP-9* після рестрикції розділяється в 2,5% агарозному гелі, що містить бромистий етидій. Наявність в -1562 положенні промотору цитозину перешкоджає рестрикції (фрагмент 379 пар основ), а при заміні на тимідин *PaeI* розщеплює ампліфіковану ділянку промотора (розмір фрагменту 320 пар основ). Візуалізація ДНК після горизонтального електрофорезу (180 V протягом 20хв) проводиться за допомогою трансілюмінатору ("Біоком", Росія) та відеосистеми ViTran (Росія) (рис. 2.).

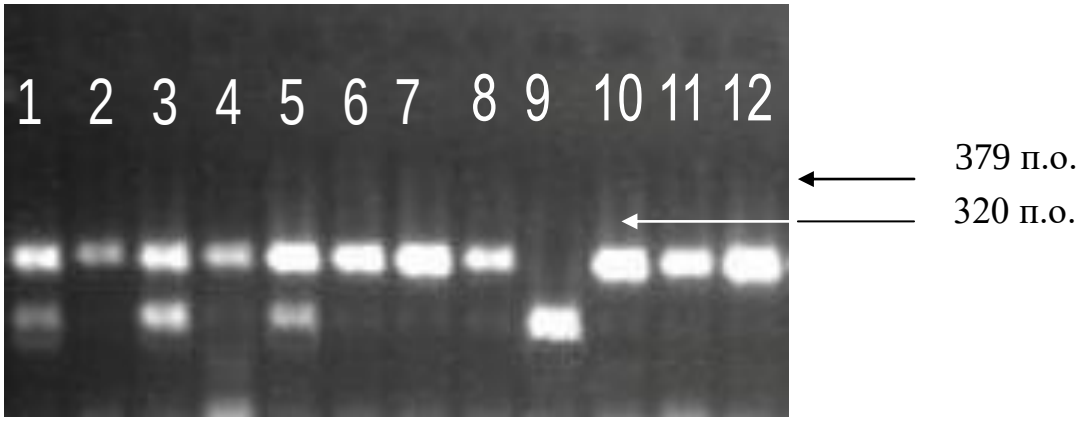
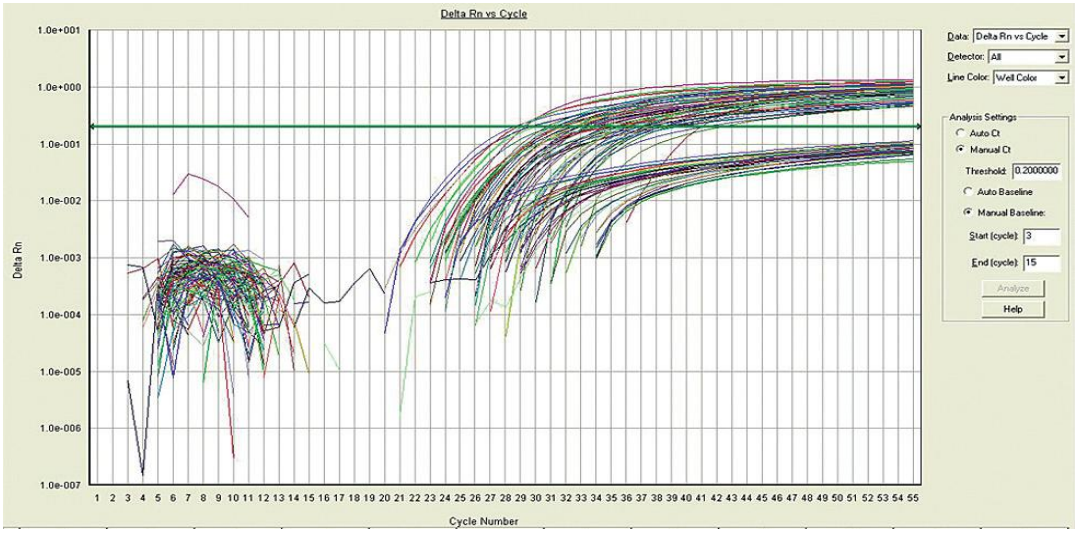


Рис. 2. Результати електрофорезу продуктів ПЛР фрагменту промотору гена *MMP-9* після рестрикції з використанням ферменту *PaeI*: смужки 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 відповідають *MMP-9*CC* генотипу; 1, 3, 5 – *MMP-9*CT* генотипу; 9 – *MMP-9*TT* генотипу.

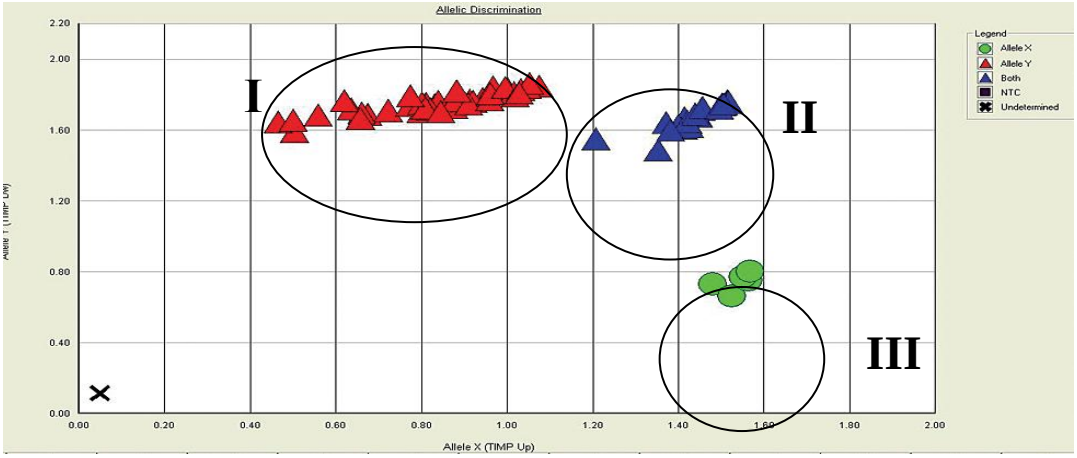
Визначення алельних поліморфізмів генів *MMP-2, TIMP-2*

Визначення алельного поліморфізму гену *MMP-2* (*C-1306T, rs243865)*, що кодує матриксну металопротеїназу-2, проводиться із застосуванням TaqMan®

SNP Assay C_3225943_10 і 7500 Fast Real_time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Алельний поліморфізм гену *TIMP-2* (rs9900972) визначається із застосуванням TaqMan® SNP Assay C__29843677_10 і 7500 Fast Real_time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Програма ампліфікації складається із 50 циклів (денатурація – 92°C, 15 с, гібридизація та елонгація – 60°C, 1 хв), після чого проводиться аналіз дискримінації алелей (рис. 3).



А)



Б)

Рис. 3. Результати ампліфікації (А) та дискримінації алелей (Б) гену *TIMP2* із застосування 7500 Fast Real_time PCR System у шахтарів з ХОЗЛ. I – гомозиготи G/G, II – гетерозиготи G/A, III – патологічні гомозиготи A/A, x – проба, що не містила ДНК.

На основі клініко-генеалогічного методу обстеження та молекулярно-генетичних досліджень розроблений алгоритм оцінки генетичної схильності до ризику розвитку ХОЗЛ професійного ґенезу.

АЛГОРИТМ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ХОЗЛ У ШАХТАРІВ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ УКРАЇНИ

Алгоритм передбачає наступні етапи:

Перший етап - клініко-генеалогічний аналіз у родині шахтаря (пробанда), проводиться за загальновизнаною схемою складання родоводів зі з'ясуванням наступних питань:

- наявність у пробанда родичів шахтарів I, II, III ступеня спорідненості (в разі позитивної відповіді зазначається ступінь спорідненості);
- стаж роботи родичів в умовах впливу пилу фіброгенної дії;
- наявність хронічної бронхолегеневої патології у родичів шахтарів.

В залежності від результатів клініко-генеалогічного аналізу пробанд може бути віднесений до однієї з наступних груп:

- I група – у пробанда відсутні родичі шахтарі. В даних родинах частота бронхолегеневої патології знаходиться на популяційному рівні, що відповідає дуже низькому ступеню схильності до ХОЗЛ.
- II група - у пробанда наявні родичі шахтарі, що мали контакт з вугільно-породним пилом не менше, ніж 10 років, та при цьому не мають захворювань бронхолегеневої системи. В даних родинах ступінь схильності до розвитку ХОЗЛ – низький.
- III група – у пробанда наявні 1-2 родичі шахтарі I, II, III ступеня спорідненості, що мають хронічні захворювання бронхолегеневої системи з нечастими загостреннями. В даних родинах ступінь схильності до розвитку ХОЗЛ - середній.
- IV група - у пробанда наявні більше 2-х родичів шахтарів I-II ступеня спорідненості, що мають хронічні захворювання бронхолегеневої системи з часто рецидивуючим важким перебігом. В даних родинах ступінь схильності до розвитку ХОЗЛ – високий (рис.4).

Рис.4. Алгоритм клініко-генеалогічного аналізу у родині пробанда.

Другий етап - молекулярно-генетичний аналіз з визначенням алельного поліморфізму генів матриксної металопротеїнази-9 (*MMP-9,* поліморфізм *C*$^{-1562}$*→T),* матриксної металопротеїнази-2 (*MMP-2,* поліморфізм *C-1306T*), та тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ-2 (*TIMP-2,* поліморфізм rs9900972) за допомогою методу ПЛР.

- При визначенні поліморфізму *C*$^{-1562}$*→T (rs*13925)* промотору гена *MMP-9* отримують генотипи: домінантний *(CC),* гетерозиготу (*CT)*, мінорний (*TT)*. Наявність в генотипі С алеля свідчить про низький рівень схильності до розвитку ХОЗЛ (OR=0,53; 95%CI: 0,27-1,02).
- При визначенні поліморфізму *C-1306T* (rs243865) гена *MMP-2* отримують генотипи: домінантний *(CC),* гетерозиготу (*CT)*, мінорний (*TT).* Наявність в генотипі Т алеля свідчить про високий рівень схильності до розвитку ХОЗЛ (OR=1,71; 95%CI: 0,96-3,05).
- При визначенні A/G *(*rs9900972) поліморфізму гена *TIMP-2* отримують генотипи: домінантний *(GG),* гетерозиготу (*GA)*, мінорний (*AA).* Наявність в генотипі А алеля свідчить про високий рівень схильності до розвитку ХОЗЛ (OR=1,84; 95%CI: 0,97- 3,48) (рис.5)

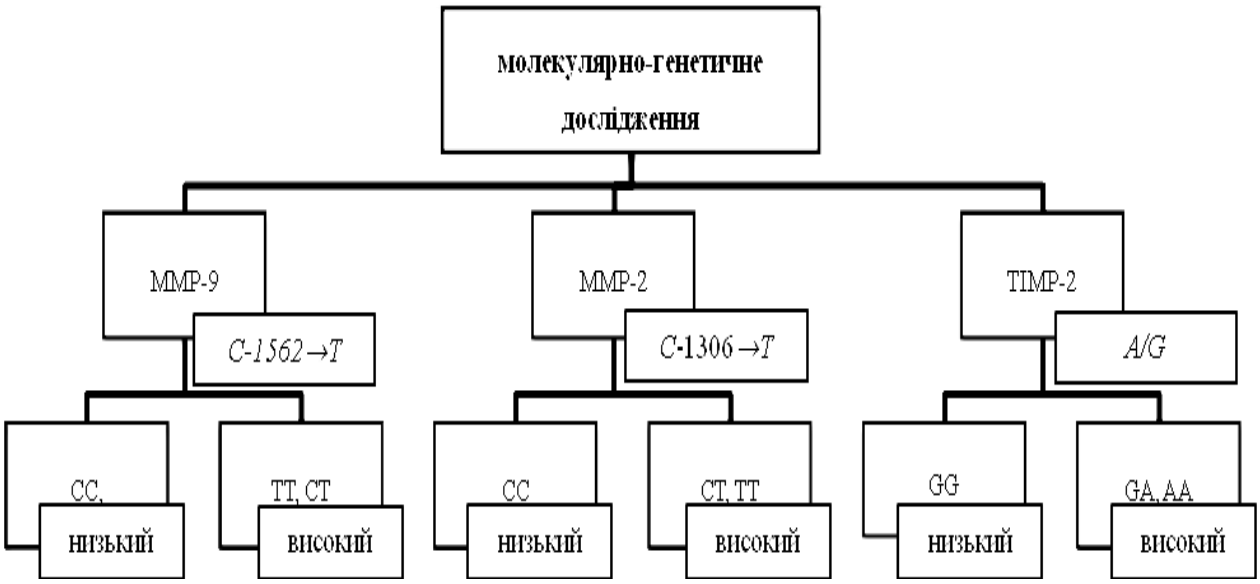


Рис 5. Алгоритм молекулярно-генетичного аналізу з визначенням алельного поліморфізму генів, що впливають на розвиток ХОЗЛ професійного ґенезу.

Інтегральна оцінка ступеня схильності шахтаря до розвитку ХОЗЛ формується на підставі підсумовування оцінок клініко-генеалогічного (I) та молекулярно-генетичного (II) етапів дослідження – нижча оцінка другого етапу зменшує ступінь схильності на один рівень, вища, – підвищує. Ступінь схильності може бути виражений трьома рівнями: низький (I етап – «дуже низький»/«низький» + II етап «низький»), середній (I етап – «популяційний»/«низький» + II етап «високий», або I етап – «середній»/«високий» + II етап «низький»), високий (I етап – «високий»/«середній» + II етап «високий»).

За результатами генетичного тестування кандидатам з виявленою схильністю до розвитку ХОЗЛ надаються рекомендації з раціонального працевлаштування у професії, де виключений можливий вплив пилу та токсичних речовин на організм, та можливе обмеження експозиції подразнюючими речовинами у майбутньому. Для працюючих, що вирішили обрати чи продовжити кар’єру шахтаря, рекомендовано сформувати диспансерну

групу для ретельного медичного спостереження та проведення додаткових профілактичних заходів.

ВИСНОВКИ

ХОЗЛ є мультифакторним захворюванням, у розвитку якого має значення вплив небезпечних чинників оточуючого середовища (в тому числі, виробничого), а також генетична схильність.

Основну групу ризику розвитку ХОЗЛ професійної етіології становлять особи з середнім та високим ступенем спадкової схильності. Таких потенційних кандидатів у підземні шахтарські професії необхідно інформувати про високу вірогідність розвитку в них ХОЗЛ в майбутньому, при цьому залишаючи право на вибір професії за особою-кандидатом.

Шахтарі з генетичною схильністю до розвитку ХОЗЛ мають бути включені в диспансерну групу спостереження для якої розробляються адекватний режим праці і відпочинку, схема профілактичних заходів у вигляді позачергових профілактичних медичних оглядів тощо. Працюючим групи ризику можливо запропонувати перехід в іншу професію, що виключає експозицію високими концентраціями вугільно-породного пилу, токсичних та подразнюючих речовин.

Очікуваний позитивний ефект при впровадженні запропонованого методичного посібника в практику охорони здоров’я ґрунтується на зниженні ризиків розвитку ХОЗЛ серед шахтарів підземних вугільних шахт, які експонуються вугільно-породним пилом, що дозволить знизити рівні професійної захворюваності, інвалідності та смертності серед працюючого населення і надати вагомий економічний ефект на рівні держави.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sullivan S. The economic burden of COPD / S. Sullivan, S. Ramsey, T. Lee // Chest. – 2000. –№ 117 (2) – 5S–9S.
2. Режим доступу: http://www. goldcopd. org. / Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (GOLD).
3. Santo Tomas LH. Emphysema and chronic obstructive pulmonary disease in coal miners / Santo Tomas LH. / CurrOpinPulm Med. –2011. –Vol. 17(2). – P.123–125.
4. Фещенко Ю. И. Хроническое обструктивное заболевание лёгких / Ю. И. Фещенко, Л. А. Яшина // DOKTOR. – 2004. – № 2. – С. 27–30.
5. Мазитова Н. Н. Профессиональные факторы и хроническая обструктивная болезнь легких: мета-анализ / Н.Н. Мазитова // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 9. – С. 588–592.
6. Лист Державної санітарно-епідеміологічної служби України (лист від 29.12.2011 № 01.03/3540).
7. Kohout J. Cause of death in patients with pneumoconiosis / J. Kohout, F. Sefrna // Ceskoslovenska spolecnost pracovniho lekarstvi v Praze. – 2001. – Vol. 53. – № 4. – P. 67–70.
8. Meijers J. M. Mortality of Dutch coal miners in relation to pneumoconiosis, chronic obstructive pulmonary disease, and lung function / J. M. Meijers, G. M. Swaen, J. J. Slangen // Occup. Environ. Med. – 1997. – Vol. 54. – № 10. – P. 708–713.
9. Blanc P. D. Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: an update / P. D. Blanc, K. Torén // Int. J. Tuber. Lung Dis. – 2007. – № 11 (3). – P. 251–257.
10. Комплексная гигиеническая оценка условий и характера труда (профессионального риска) горнорабочих / В. В. Суханов, В. В. Мухин, Д. О. Ластков [и др.] // Медицина труда в угольной промышленности. – Донецк, 2000. – С. 57–62.

11. Басанець А. В. Удосконалення системи діагностики пневмоконіозу у працюючих вугільних шахт як пріоритетна проблема професійної патології.: автореф. дис. на здобуття наук.ступеня док. м. наук : спец. 14.02.01 «Гігієна» / А.В. Басанець // – Київ, 2007. – 38 С.

12. Variability in proteinase-antiproteinase balance, nutritional status, and quality of life in stable chronic obstructive pulmonary disease due to tobacco and nontobacco etiology / A. Mohan , M. Sharma , A. Uniyal [et al.] // LungIndia. – 2016 – Vol. 33 (6). – P.605–610.

13. Induction of the Matrix Metalloproteinase 13 Gene in Bronchial Epithelial Cells by Interferon and Identification of its Novel Functional Polymorphism / Y. Mashimo, M. Sakurai-Yageta, M. Watanabe [et al.] // Inflammation – 2016. – Vol. 39 (3). – P. 949–962.

14. Effects of Fengbaisan on the expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease / Y. Wang , N.X. Su, Z.Q. Chen [et al.] // Chin J Integr Med. – 2014. – Vol. 20 (3). – P. 224–231.

15. Режим доступу: https://doi.org/10.1186/s12931-015-0188-4./ Serum metalloproteinase-9 is related to COPD severity and symptoms - cross-sectional data from a population based cohort-study / R. Linder , E. Rönmark, J. Pourazar [et al.] // Respir Res. – 2015.

16. Van Diemen C.C. Decorin and TGF-beta1 polymorphisms and development of COPD in a general population / C.C. Van Diemen, D.S. Postma, J.M. Vonk // Respir. Res.– 2006. – № 7. – P.89.

17. Matheson M.C.Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease. / M.C. Matheson, J.A. Ellis, J. Raven // J. Hum. Genet. – 2006. – № 51. – P. 196–203.

18. Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: from pathogenesis to potential clinical implications / S.Oikonomidi, K. Kostikas, I. Tsilioni [et al.] // Cur. Med. Chem. – 2009. -– Vol. 16 (10). - P. 1214–1228.

19. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ in induced sputum is correlated with MMP-9/TIMP-1 imbalance and formation of emphysema in COPD patients / X.M. Zhou , G. Hou, D.X. Gu [et al.] // J Thorac Dis. – 2017. – Vol. 9 (10). – P. 3703–3710.

20. Relationship between the thickness of bronchial wall layers, emphysema score, and markers of remodeling in bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic obstructive pulmonary disease / K. Górka, J. Soja, B. Jakieła [et al.] // Pol Arch Med Wewn. – 2016. – Vol. 126 (6). – P. 402–410.

21. Elkington P.T.G. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology / P.T.G. Elkington, J.S. Friedland // Thorax. – 2006. – Vol. 61. – P. 259–266.

22. Relationship between pulmonary matrix metalloproteinases and quantitative CT markers of small airways disease and emphysema in COPD / K. Ostridge, N. Williams, V. Kim [et al.] // Thorax. – 2016. – DOI:10.4103/1735-1995.178737.

23. Bhupinder S. S. Matrix metalloproteinases – an overview / S. S. Bhupinder // Research and Reports in Biology – 2010. – Vol. 1. – P. 1 – 20.

24. Navratilova Z. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / Z. Navratilova, V. Kolek, M. Petrek // Arch Immunol Ther Exp (Warsz) – 2016. – Vol. 64 (3). – P. 177–193.

25. A flavanone from Baccharis retusa (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF-κB, oxidative stress and metalloproteinases / L. Taguchi, N.M. Pinheiro, C.R. Olivo [et al.] // Respir Res. – 2015. – doi: 10.1186/s12931-015-0233-3.

26. Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD / I. K. Demedts, A. Morel-Montero, S. Lebecque [et al.] // Thorax. – 2006. – Vol. 61 – P.196–201.

27. Expression of matrix metalloproteinase-1 in alveolar macrophages, type II pneumocytes, and airways in smokers: relationship to lung function and emphysema / A.M. Wallace, L.B. Loy, R.T. Abboud [et. al.] // Lung. – 2014 – Vol.192 (4). – P. 467–72.

28. Zhou X. Erythromycin attenuates metalloprotease/anti-metalloprotease imbalance in cigarette smoke-induced emphysema in rats via the mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-κB activation pathway / X. Zhou, D. Gu , G. Hou // Mol Med Rep. – 2017. – Vol. 15 (5). – P. 2983–2990.

29. Relationships of MMP-9 and TIMP-1 proteins with chronic obstructive pulmonary disease risk: A systematic review and meta-analysis / Y. Li, Y. Lu, Z. Zhao [et al.] // J Res Med Sci. – 2016. – Vol. 71 (2). – P. 126–132.

30. Association of MMP – 12 polymorphisms with severe and very severe COPD: A case control study of MMPs – 1, 9 and 12 in a European population / I. Haq, S. Chappell, S.R. Johnson [et al.] // BMC Med. Genet. –2010. – Vol. 11. – P.7.

31. Design, synthesis, biological evaluation, and NMR studies of a new series of aryl sulfones as selective and potent matrix metalloproteinase-12 inhibitors / E. Nuti, L. Panelli, F. Casalini [et al.] // J.Med. Chem. – 2009. – Vol. 52 (20). – P. 6347–6361.

32. Association of a functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-12 promoter region with systemic sclerosis in an Italian population / M. Manetti, L. Ibba-Manneschi, C. Fatini [et al.] // J. rheumatol. – 2010. – Vol.37 (9) – P.1852–1857.

33. The association of genome-wide significant spirometric loci with COPD susceptibility/ P.J. Castaldi, M.H. Cho, A.A. Litonjua [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2011. – Vol.45. – P. 1147–1153.

34. Genetic polymorphism in matrixmetalloproteinase-9 and the susceptibility to chronic obstructive pulmonarydisease in Han population of south China / M. Zhou, S.G. Huang, H.Y.Wan [et al.] // Chin Med J (Engl). – 2004. – Vol.117. – P.1481–484.

35. Ito I. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema / I. Ito, S. Nagai, T. Handa [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2005. – Vol. 172. – P. 1378–1382.

36. Wallace A.M. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases: functional importance in the development of chronic obstructive pulmonary disease? / A. M. Wallace, A. J. Sandford // Am. J. Pharmacogenomics. – 2002. – Vol.2 (3). – P.167–75.

37. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases Genome Biology / G.Murphy // BioMed. Central Ltd. – 2011. – Vol. 12. –- P.233.

38. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease / K. Hirano, T. Sakamoto, Y. Uchida [et al.] //Eur. Respir. J. – 2001. – Vol. 18. – P. 748–752.

39. Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians // A.E. Hegab, T. Sakamoto, Y. Uchida [et al.] // Respir. Med. – 2005. – Vol. 99. – P. 107–110.

40. Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts /C.C. van Diemen, D.S. Postma, M. Siedlinski [et al.] // Respir. Res. – 2011. – Vol. 12. – P. 57–60.

41. Combinatorial effect of TIMP-1 and a1AT gene polymorphisms on development of chronic obstructive pulmonary disease / M. Kumar, D.P. Bhadoria, K. Dutta [et al.] //Clin. Biochem. – 2011. – Vol. 44. – P. 1067–1073.

42. Alpha 2-macroglobulin: a sensor for proteolysis / C.T. Chu, G.C. Howard, U.K. Misra, S.V. Pizzo // Ann N Y Acad Sci. – 1994 – Vol. 737. – P. 291–307.

43. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor / D.K. Strickland, J.D. Ashcom, S. Williams [et al.] // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265. – P. 17401–17404.

44. Matthijs G. A deletion polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene / G. Matthijs, P. Marynen. // Nucleic Acids Res. – 1991. – Vol. 19 (18). – P.5102.

45. Cloning of the human alpha 2-macroglobulin gene and detection of mutations in two functional domains: the bait region and the thiolester site / W. Poller, J.P. Faber, G. Klobeck, K. Olek // Hum. Genet. – 1992. – Vol. 88. – P. 313–319.

46. Здоровье работающих / под ред. Мухина В.В.: Донецк: ФЛП Дмитренко, 2011.- 280 с.

47. Кундієв Ю.І. Динаміка професійної захворюваності в Україні та досвід інституту медицини праці НАМН України / Ю.І. Кундієв, А.М. Нагорна, М.П. Соколова, І.Г. Кононова // Український журнал. з проблем медицини праці. - 2013. – № 4 (37). – С. 11 – 22.

48. Кошечкина Е.В. Генетика промежуточных фенотипов гипертонической болезни / Е.В. Кошечкина // Терапевт. арх. – 1995.- № 4. – С. 59 – 61.

49. Пузырев В. П. Молекулярные основы и клинические аспекты недостаточности альфа1-антитрипсина / В. П. Пузырев, В. Я. Савюк // Пульмонология. – 2003. – № 1. – С. 105–115.

50. Izmerov N. F. Genetic-biochemical criteria for individual sensitivity in development of occupational bronchopulmonary diseases / N. F. Izmerov, L. P. Kuzmina, L. A. Tarasova // Cent. Eur. J. Public Health. – 2002. – Vol. 10 (2). – P. 35–41.

51. Долінчук Л.В. Роль генетичної схильності та інфекційних агентів у розвитку хронічного обструктивного захворювання легень у шахтарів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня кандидата біологічних наук: спец. 14.02.01 «Гігієна та профпатологія» / Л.В. Долінчук // – Київ, 2015. – 20С.