

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

*На правах рукописи*

**Сугайло Ивана Юрьевна**

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

3.1.29. Пульмонология (медицинские науки)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

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

Благовещенск, 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КАНАЛОВ С ТРАНЗИТОРНЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ TRPA1, TRPV1, TRPV4, TRPM8 В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБ- СТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	14
1.1 Проблема хронической обструктивной болезни легких в современ- ной медицине.....	14
1.2 Макрофаги как центральное звено патогенеза хронической обструк- тивной болезни легких .....	23
1.3 Роль TRP каналов в патогенезе хронической обструктивной болезни легких .....	32
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАК- ТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА.....	39
2.1 Общеклинические методы исследования.....	39
2.2 Функциональные методы исследования.....	41
2.3 Культуральные методы исследования.....	43
2.4 Генотипирование полиморфизмов <i>TRP</i> .....	44
2.5 Определение экспрессии TRP рецепторов на макрофагах, дифферен- цированных из моноцитов периферической крови.....	53
2.6 Иммунофлуоресцентные методы исследования.....	55
2.7 Статистические методы исследования.....	56
2.8 Клиническая характеристика обследованного контингента.....	57
2.8.1 Клиническая характеристика основной и контрольной групп.....	59
2.8.2 Клиническая характеристика больных хронической обструктивной болезнью легких с наличием и отсутствием прогрессирования бронхи- альной обструкции .....	60

ГЛАВА 3. РОЛЬ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ <i>TRPA1</i> , <i>TRPV1</i> , <i>TRPV4</i> , <i>TRPM8</i> В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ.....	72
3.1 Общая характеристика исследованных полиморфизмов.....	72
3.2 Взаимосвязь исследованных полиморфизмов с вентиляционной функцией легких и формированием хронической обструктивной болезни легких у курящих лиц.....	75
3.3 Влияние полиморфизма rs11562975 гена <i>TRPM8</i> на прогрессирование бронхиальной обструкции у больных хронической обструктивной болезнью легких.....	82
ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TRP КАНАЛОВ НА МАКРОФАГАХ.....	86
4.1 Особенности экспрессии TRP на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови.....	86
4.2 Особенности экспрессии TRP на макрофагах мокроты.....	89
4.2.1 Особенности экспрессии TRP каналов у больных с прогрессированием бронхиальной обструкции.....	91
ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ TRP КАНАЛОВ С ОСОБЕННОСТЯМИ ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ.....	93
5.1 Особенности воспалительного ответа макрофагов <i>in vitro</i> и его взаимосвязь с экспрессией TRP каналов.....	93
5.2 Особенности воспалительного ответа макрофагов <i>in vivo</i> и его взаимосвязь с экспрессией TRP каналов.....	96

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

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

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

ХОБЛ является гетерогенным по патогенезу заболеванием, в развитие которого существенный вклад вносят табакокурение и воздействие аэрополлютантов. Однако не у всех злостных курильщиков развивается ХОБЛ [85, 149, 189]. Несомненным фактором риска является генетическая предрасположенность и, как следствие, дисфункция иммунных клеток с формированием хронического воспалительного процесса. Центральным звеном патогенеза ХОБЛ являются макрофаги, выступающие в роли авангарда при взаимодействии с сигаретным дымом и пылевыми частицами. Современные исследования показали, что данные патогенные факторы могут специфически активировать каналы с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP) на различных клетках дыхательных путей, главным образом, макрофагов и эпителия дыхательных путей, реализуя иммунный ответ [73, 229]. Наибольший интерес представляют каналы TRP анкиринового подсемейства 1 (TRPA1), ваниллоидного подсемейства 1 (TRPV1), ваниллоидного подсемейства 4 (TRPV4) и меластатинового подсемейства 8 (TRPM8).

В последние годы представлены убедительные данные, свидетельствующие о неотъемлемой роли TRP рецепторов в патогенезе ХОБЛ. TRPA1 хорошо изучен на нейрональных клетках, где он коэкспрессируется с TRPV1 и участву-

ет в восприятии температуры вдыхаемого воздуха, гипоксии и сигаретного дыма. Агонист TRPA1 (циннамальдегид (CA)), подавляя активность транскрипционного ядерного фактора (NF)  $\kappa$ B в макрофагах, ингибирует продукцию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [66]. Активация TRPA1 на макрофагах сопровождается увеличением продукции IL-8 [81]. Также известно, что блокада TRPA1 провоцировала снижение количества эозинофилов и макрофагов в бронхоальвеолярном лаваже при воздействии аллергена [230]. Экспрессия TRPV1 повышается во время воспаления дыхательных путей, опосредует возникновение ощущения боли и термогиперчувствительности [129]. Помимо экспрессии на нейрональных клетках, TRPV1 был идентифицирован на гладкомышечных клетках артерий (где он способен регулировать кровоток), фибробластах, эпителиальных клетках, макрофагах. Считается, что именно этот канал опосредует токсическое повреждение легких и болевой синдром [133, 137]. Полиморфизм rs3744683 гена *TRPV1* связан с риском ХОБЛ у курильщиков в популяции хань [229]. TRPV4, подобно TRPV1, найден не только на нейронах, но и на клетках глии. Экспрессируется на эндотелиальных клетках, что способствует ауторегуляции кровотока. Также, экспрессируясь в эпителиальных клетках трахеи, регулирует частоту биения ресничек [146]. Снижает проницаемость альвеолярного барьера и активирует макрофаги, что приводит к острому воспалению легких [100]. Есть данные, что TRPV4 играет важную роль в разрушении эпителиального барьера и формировании отека легких [93]. Кроме того, полиморфизмы гена *TRPV4* связаны с ХОБЛ [237], а каналы TRPV4 хорошо экспрессируются в альвеолярных макрофагах [161]. TRPM8 является термочувствительным каналом, который может опосредовать кашель и бронхоконстрикцию, вызванную вдыханием холодного воздуха. Эпителиальный TRPM8 способствует продукции различных интерлейкинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-13) и цитокинов. Ментол (агонист TRPM8) способен повышать фагоцитарную активность макрофагов [121]. Однако роль TRPM8 в развитии респираторных симптомов по-прежнему остается спорной, поскольку ментол (агонист TRPM8) парадоксальным образом ингибирует кашель, вызванный капсаицином

(агонистом TRPV1). По данным китайских ученых, из 6 исследованных полиморфизмов гена *TRPM8* 2 связаны с ХОБЛ, 5 – с легочной гипертензией, осложняющей течение ХОБЛ [227].

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

### **Степень разработанности исследования**

На основе имеющихся в литературе данных сформировано представление о роли TRP рецепторов в патогенезе ХОБЛ. В рамках диссертационного исследования изучены экспериментальные работы, рассматривающие возможное влияние генетических вариантов, а также особенностей экспрессии *TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* каналов на макрофагах в формировании ХОБЛ и прогрессировании бронхиальной обструкции.

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

### **Цель исследования**

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

## Задачи исследования

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

## Научная новизна

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

Впервые изучены особенности экспрессии каналов *TRP* на макрофагах больных ХОБЛ и установлено преобладание экспрессии канала *TRPV1*, по сравнению с макрофагами курильщиков без признаков бронхиальной обструкции. Кроме того, получены данные, свидетельствующие о повышенной экспрессии канала *TRPV4* на альвеолярных макрофагах пациентов ХОБЛ с про-

грессирующей бронхиальной обструкцией, а также указывающие на взаимосвязь TRPV4 с увеличением продукции воспалительных медиаторов в респираторном тракте больных лиц.

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

### **Теоретическая значимость**

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

### **Практическая значимость и внедрение результатов**

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

ния, результата оценочного теста ХОБЛ и степени нарушения вентиляционной функции легких (заявка на выдачу патента на изобретение №2022119286 от 14.07.2022 г.).

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2013 г. и нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом №200н от 01.04.2016 МЗ РФ. Предметом исследования стало изучение роли TRP рецепторов в формировании клиничко-функциональных особенностей ХОБЛ. Настоящее исследование представляет собой самостоятельный фрагмент темы государственного задания ДНЦ ФПД №062 «Новые молекулярные и клеточные механизмы патогенеза хронической обструктивной болезни» (№ гос. регистрации: 4А-А19-119011590166-4), выполненный на базе ДНЦ ФПД. Объектом исследования явились 238 человек: 134 больных ХОБЛ (средней, тяжелой и крайне тяжелой степени тяжести) и 104 курящих человека без признаков бронхиальной обструкции. Применялись общеклинические, функциональные, культуральные, молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные и статистические методы исследования. Все пациенты дали письменное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом №133-Д/1 от 28.11.2019г, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике ДНЦ ФПД.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Генотипы CC и GG по полиморфизму rs2052030 гена *TRPM8* являются биомаркерами формирования ХОБЛ среди курильщиков.
2. С аллель по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8* является биомаркером прогрессирования бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.

3. Больные ХОБЛ характеризуются увеличенной экспрессией канала TRPV1 на макрофагах.
4. Повышенная экспрессия TRPV4 на альвеолярных макрофагах больных ХОБЛ взаимосвязана с наличием прогрессирующей бронхиальной обструкции, а также сопутствующим увеличением продукции медиаторов воспаления.
5. Разработанные способы, учитывающие молекулярно-генетические и клинико-функциональные биомаркеры, позволяют прогнозировать формирование ХОБЛ и прогрессирование бронхиальной обструкции при данном заболевании.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Степень достоверности результатов научной работы подтверждается проведением всех этапов работы с учетом рекомендаций для медицинских и биологических исследований, достаточным объемом материала, репрезентативностью выборки, применением современных методов исследования, использованием сертифицированного оборудования и реактивов, использованием лицензионных статистических программ. Для статистической обработки использовались прикладные программы Statistica 12.0 (StatSoft, Inc. 2014), NCSS 12 (StatSoft, Inc., 2018), REST 2009 V2.0.13 (Qiagen GmbH, 2009). Анализ данных производился с помощью параметрических и непараметрических методов вариационной статистики с проверкой нормальности распределения значений переменных. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Выводы соответствуют поставленным задачам, получены благодаря комплексному анализу данных.

### **Публикации результатов научного исследования**

По материалам исследования опубликовано 9 печатных публикаций в ведущих рецензируемых научных журналах, в том числе входящих в 1 квартиль

международной реферативной базы Web of Science, из них 5 - в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ, в том числе патент на изобретение.

### **Личный вклад соискателя**

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

### **Апробация работы**

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

## **Объем и структура работы**

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

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

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

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

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

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

По данным масштабных исследований (BOLD, PLATINO), проводившихся в Австралии и странах Южной Америки, распространенность ХОБЛ у лиц старше 40 лет на уровне от 7,8% до 20%, в среднем 10,1% [113, 153, 210]. В Европе это показатель составляет в среднем 6,4% (в Чехии – 6,7%, в Великобри-

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

Экономические расходы на одного больного с диагнозом ХОБЛ превосходят траты на больного БА в 3 раза, причем затраты на лечение ХОБЛ прямо пропорциональны степени тяжести заболевания. Терапия обострений наносит большой экономический ущерб здравоохранению [19]. В России экономический ущерб от ХОБЛ с учетом не прямых затрат, в том числе абсентеизма (невыхода на работу) и презентеизма (менее эффективной работы, связанной с плохим самочувствием), составляет 170,3 млрд руб. (0,2% от внутреннего валового продукта) [10]. Еще одна важная проблема ХОБЛ – поздняя диагностика [3]. Многие люди на ранней стадии ХОБЛ не знают про заболевание, не хотят обращаться к врачу или считают появившиеся жалобы частью «нормального» старения. Это приводит к поздней диагностике, а также более тяжелым стадиям заболевания [210]. Даже в экономически развитых странах ранняя выявляемость осуществляется не более чем в четверти случаев. По некоторым данным, в США 13 млн живут с недиагностированным ХОБЛ [69].

ХОБЛ является важным фактором развития ишемической болезни сердца, фибрилляции предсердий, инфаркта миокарда, рака легких, гастроэзофагеального рефлюкса, тревоги и депрессии [9, 75]. Поскольку ХОБЛ входит в группу коморбидных заболеваний [7, 15, 22], его ранняя профилактика и современное патогенетическое лечение способны благоприятно повлиять на органы-мишени, то есть сердце, головной мозг и почки [80]. Легочная гипертензия у больных ХОБЛ протекает тяжелее, чем у пациентов с идиопатической легочной артериальной гипертензией. Несмотря на сходные гемодинамические нарушения, была достигнута наихудшая дистанция теста шестиминутной ходьбы [215]. Таким образом, легочная гипертензия как частый спутник ХОБЛ определяет неблагоприятный исход заболевания [74]. Исходно более низкий уровень объема форсированного выдоха за 1 секунду ( $ОФВ_1$ ) связан с высокой вероятностью развития сахарного диабета, БА и смертности от всех причин [195].

ХОБЛ - это гетерогенное по патогенезу заболевание и его механизмы до конца не изучены. Эта гетерогенность также проявляется различными фенотипами заболевания, выделение которых позволяет индивидуализировать подход к диагностике и лечению данного заболевания [24]. Традиционно известно два фенотипа, в зависимости от преобладающей симптоматики: бронхитический («синие отечники») и эмфизематозный («розовые пыхтельщики») [23, 28]. У больных с преобладанием эмфиземы основной жалобой является одышка разной степени выраженности. Также характерны мультиорганная потеря массы тканей (костной, мышечной, жировой) и высокий риск развития рака легких. Учитывая современные данные, научное сообщество предлагает называть данный фенотип MOLT-фенотипом (multiorgan loss of tissue phenotype, фенотип с мультиорганной потерей массы тканей) [62, 63]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе атрофии мышечной ткани, до конца не изучены. Считается, что ее причиной могут являться системное воспаление, окислительный стресс, клеточная гипоксия, отсутствие физической активности, истощение питательных веществ [132]. Системность воспаления при ХОБЛ подтверждается наличием воспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерфе-

рон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и интерлейкин (IL) -12p70) в биоптате латеральной широкой мышцы бедра [132]. У пациентов с бронхитическим типом преобладает кашель и отделение мокроты слизистого или гнойного характера. Этот фенотип ассоциируется с частыми обострениями, метаболическим синдромом, сердечно-сосудистыми заболеваниями (особенно хроническим легочным сердцем) и высокой смертностью [236].

Также, в зависимости от частоты обострений, выделяют фенотип с частыми (два и более обострения в год) и редкими обострениями (менее двух обострений в год). Обострения представляют собой пагубные события в естественном течении болезни, ускоряя снижение легочной функции, могут осложняться развитием острой дыхательной недостаточности, декомпенсации сердечно-сосудистых заболеваний, тромбоэмболии легочной артерии [6, 8, 21]. Фенотип с частыми обострениями характеризуется прогрессирующим снижением функции легких и, как следствие, худшим исходом заболевания. Обострения имеют долгосрочные последствия для здоровья, влияя на физическое состояние, качество жизни и смертность. Установлена прямая зависимость между проходимостью дыхательных путей и частотой обострений. Выявлено, что снижение ОФВ<sub>1</sub> связано с увеличением частоты обострений [111]. И наоборот, увеличение ОФВ<sub>1</sub> на 100 миллилитров (мл) коррелировало с более редкими обострениями [238]. Возникновение обострения связывают с бактериальной колонизацией нижних дыхательных путей, которая вызывает локальное воспаление [27, 29]. Таким образом, большая проходимость дыхательных путей способствует лучшему клиренсу секрета с последующим снижением бактериальной колонизации, что приводит к снижению частоты обострений [194]. Выявлено, что у пациентов с частыми обострениями чаще регистрировались респираторные причины смерти [139]. При этом наибольшая смертность наблюдается среди больных с эмфизематозным фенотипом и частыми обострениями [4].

В ряду фенотипов выделяют overlap-синдром – сочетание ХОБЛ и БА. У людей с персистирующей БА функция легких нарушена с раннего детства [57], что в более зрелом возрасте может служить предиктором ХОБЛ. Для этих па-

циентов характерно обилие жалоб, частые обострения и госпитализации, а также, как ни парадоксально, более низкий уровень смертности по сравнению с ХОБЛ без БА [206]. Важно дифференцировать ХОБЛ с БА. Так, для БА характерна обратимость бронхиальной обструкции, о наличии которой судят по увеличению  $ОФВ_1$  после действия бронхолитика: постбронходилатационный  $ОФВ_1$  ( $ОФВ_{16}$ ) увеличивается на 200 мл или на 12% по сравнению с исходной спирометрией [25]. Напротив, у пациентов с ХОБЛ постбронходилатационный тест приводит к незначительному улучшению  $ОФВ_1$ , что свидетельствует о необратимой обструкции. Постбронходилатационное отношение  $ОФВ_1/ФЖЕЛ$  (форсированная жизненная емкость легких) ( $ОФВ_{16}/ФЖЕЛ_6$ ) < 0,70 подтверждает наличие стойкого ограничения воздушного потока и служит основным критерием диагностики ХОБЛ [25, 117].

Клиническая картина ХОБЛ складывается из обострений и периодов ремиссии. В условиях длительного воздействия факторов риска ХОБЛ развивается медленно, прогрессирует постепенно. Длительное время заболевание протекает без клинических проявлений. Основными жалобами, с которыми пациенты обращаются к врачу, являются кашель (часто с отделением мокроты), одышка при физической нагрузке. По мере прогрессирования заболевания одышка может нарастать и беспокоить в покое, затрудняя повседневную деятельность [18]. Во время обострения возникает ухудшение общего состояния, нарастание интенсивности кашля, усиление одышки, увеличение объема мокроты, усиление гнойности мокроты. Возможно повышение температуры тела. Одновременно ухудшаются показатели функции внешнего дыхания и газов крови [120]. Выраженная одышка является фактором риска смерти у пациентов с ХОБЛ [164]. Кроме того, пациенты с частыми обострениями испытывают выраженную одышку вследствие гиперкапнии [193]. Большинство обострений связано с бактериальными или вирусными инфекциями. Даже при стабильном течении ХОБЛ из дыхательных путей могут быть выделены бактериальные патогены (*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* и *Pseudomonas aeruginosa*). Выявлено, что в 40% случаев

обострение связано с вирусной инфекцией. Первичные вирусные патогены включают риновирус, грипп А, респираторно-синцитиальный вирус [111, 225]. У таких пациентов наблюдается более выраженное воспаление, обострения происходят чаще, характерно прогрессирование бронхиальной обструкции [29]. Соотношение нейтрофилов к лимфоцитам и эозинофилы крови при стабильной фазе ХОБЛ связаны с будущими обострениями и демонстрируют достаточную продольную достоверность [78].

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

Критерием прогрессирования бронхиальной обструкции считается снижение  $ОФВ_{16}$  на 50 мл в год [117, 166]. Так, если в течение года у пациента с ХОБЛ показатель  $ОФВ_{16}$  уменьшается более чем на 50 мл, говорят о прогрессировании бронхиальной обструкции [155], для которой характерно состояние гипоксии, трансформирующейся в гипоксемию [99]. Снижение  $ОФВ_{16}$  менее 50 мл в год свидетельствует об отсутствии прогрессирования бронхиальной обструкции. Наибольшая динамика снижения  $ОФВ_{16}$  наблюдается на начальных стадиях ХОБЛ, далее ухудшение функции легких замедляется [50]. Не стоит забывать, что существует «нормальное» снижение функции легких, обусловленное старением (которое начинается с третьей декады жизни), при этом  $ОФВ_{16}$  снижается до 25 мл в год и не сопровождается одышкой [177]. Если у

человека без обструкции ОФВ<sub>16</sub> имеет граничные значения (несколько превышает 80% от должного) и при повторной спирограмме через 18 месяцев ОФВ<sub>16</sub> снижается на 40 мл, то можно прогнозировать у пациента дебют ХОБЛ в течение 5 лет. Таким образом, этот период «тишины» (немой период) можно назвать пре-ХОБЛ [186]. Данная группа пациентов нуждается в пристальном внимании, как со стороны здравоохранения, так и самого пациента. Отказ от курения, спирометрические пробы, своевременно назначенная терапия, легочная реабилитация могут значительно отсрочить осложнения данного заболевания и улучшить прогноз [177]. Как указывалось [24], гетерогенность патогенеза ХОБЛ проявляется различными фенотипами, однако определяют эту гетерогенность экзогенные (воздействие табака, пыли, вредных газов, продуктов сжигания биомассы) и эндогенные (нарушение правильного формирования легких в детстве, старение организма, генетическая предрасположенность) факторы риска. Суммация данных факторов приводит к заболеванию. Предиктором заболевания является курение, которое распространено как среди мужчин, так и женщин. К тому же, не стоит забывать, что пассивное курение также играет немаловажную роль в развитии ХОБЛ [232]. Воздействие сигаретного дыма способствует носительству *Streptococcus pneumoniae* в носоглотке, изменяет врожденные иммунные механизмы слизистой носа и разрушает эпителиальные барьеры [213].

Курение электронных сигарет представляет собой серьезную проблему. Несмотря на мнение, что парение электронных сигарет безопаснее обычных сигарет, многочисленные эпидемиологические исследования показывают обратное. Жидкость для электронных сигарет, из которой генерируется вдыхаемый аэрозоль, содержит пропиленгликоль, никотин в различных концентрациях, растительный глицерин, ароматизаторы и другие химические вещества. Аэрозоль, называемый также паром, состоит из мелкодисперстных частиц, содержащих многочисленные токсические соединения, такие как акролеин, толуол, ацетальдегид, формальдегид. Предполагается, что пользователи электронных сигарет более подвержены развитию рака и БА [60]. Даже после однократного

использования электронных сигарет возникает окислительный стресс и дисфункция эндотелиальных клеток. У пользователей электронных сигарет повышался уровень системных маркеров воспаления (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-13, IFN- $\gamma$ , RAGE (рецептор конечных продуктов гликирования белков) и MMP-9 (матриксная металлопротеиназа 9)), также были повышены уровни факторов роста (EGF (эпидермальный фактор роста), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов),  $\beta$ -NGF (фактор роста нервов), PDGF-AA (фактор роста тромбоцитов-AA), SCF (фактор стволовых клеток), HGF (фактор роста гепатоцитов) и PlGF (плацентарный фактор роста)) [65]. Таким образом, использование электронных сигарет отрицательно влияет на окислительный стресс, воспаление и ремоделирование тканей. Отказ от курения является решающим для первичной и вторичной профилактики заболевания [37]. Однако курение не является необходимой причиной ХОБЛ: у многих курильщиков не развивается ХОБЛ, а некоторые пациенты с ХОБЛ никогда не курили [189]. Среди злостных курильщиков ХОБЛ формируется менее чем у 50% в течение жизни [149, 183]. По некоторым данным, ХОБЛ поражает от 15 до 30% курильщиков [46].

Воздействию пыли, вредных газов, продуктов сжигания биомассы подвержено не только население развивающихся стран, отапливающее жилье биотопливом, но и жители крупных мегаполисов [19, 144]. Работы, связанные с пылью, содержащей кадмий и кремний, гипс, битум относятся к самым опасным профессиональным факторам по развитию ХОБЛ [13]. Строители, шахтеры, железнодорожники, работники металлургической и целлюлозно-бумажной промышленности имеют повышенный риск приобрести данное хроническое заболевание легких [96]. Очень важен тот факт, что курение потенцирует негативное воздействие пыли и других факторов риска. Ramírez-Venegas A. et al. сообщили, что воздействие биомассы на больных ХОБЛ приводит к медленному снижению ОФВ<sub>1</sub> в течение нескольких лет [180], однако курение потенцирует негативное воздействие аэрополлютантов, что проявляется прогрессированием обструкции [117].

Не только курение и вдыхание пылевых частиц могут приводить к ХОБЛ, но и нарушение роста легких в детстве, которое может привести к ограничению скорости воздушного потока в пожилом возрасте [102]. Фиксация научного сообщества на курении как на причине ХОБЛ привела к тому, что большинство крупных рандомизированных контролируемых исследований исключили некурящих из испытаний [102]. К тому же существует дефицит информации о вкладе генетических аспектов в развитие ХОБЛ, поскольку нельзя отрицать сложное взаимодействие окружающей среды и генома. Влияние наследственности на функцию легких и развитие ХОБЛ оценивают в 38-50% [198]. В настоящее время идет активный поиск молекулярно-генетических детерминант этого тяжелого заболевания. Редкие генетические варианты вносят существенный вклад в развитие ХОБЛ. Одним из них является редкий вариант *SERPINA1* (ген, связанный с дефицитом  $\alpha_1$ -антитрипсина), оказывающий кумулятивное воздействие на концентрацию  $\alpha_1$ -антитрипсина, функцию легких и эмфизему у курильщиков [169, 199]. Jarenbäck et al. выяснили, что некоторые ОНП гена *SUMF1* (модифицирующий сульфатазу фактор 1) ассоциированы с нарушением функции легких, ХОБЛ и эмфиземой. Эти генетические варианты *SUMF1* могут вызывать дефицит сульфатного баланса во внеклеточном матриксе легочной ткани, способствуя ремоделированию дыхательных путей и развитию ХОБЛ [114]. Отсутствие минорного аллеля (гомозиготность по основному аллелю) rs2276109 гена, кодирующего матриксную металлопротеиназу-12 (MMP-12), ассоциировалось с увеличением риска ХОБЛ на 54% [109]. Показано, что rs2070600 гена *AGER* влияет на уровень системных растворимых рецепторов конечных продуктов повышенного гликозилирования (sRAGE) в мокроте, коррелирует со снижением функции легких, эмфиземой и прогрессированием ХОБЛ [82, 127]. Многообещающими являются исследования генов TRP: полиморфизм rs3744683 гена *TRPV1* связан с риском ХОБЛ у курильщиков в популяции хань [229], а из 6 исследованных полиморфизмов гена *TRPM8* в китайской популяции 2 связаны с ХОБЛ, 5 – с легочной гипертензией, осложняющей течение ХОБЛ [227], полиморфизмы *TRPV4* также связаны с ХОБЛ

[237]. Эпигенетические механизмы могут частично объяснить взаимодействие экзо- и эндогенных факторов риска. Например, метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), вызванное курением, приводит к нарушению экспрессии гена и изменению метаболизма клеток. В частности, метилирование *CYP1B1*, гена, участвующего в метаболизме ксенобиотиков, в буккальном эпителии коррелировало с функцией легких и эмфиземой у женщин [130].

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

## **1.2 Макрофаги как центральное звено патогенеза хронической обструктивной болезни легких**

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

душных ловушек, ведущих в свою очередь к гиперинфляции, клинически проявляющейся одышкой [1, 71].

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

На первом этапе вдыхание раздражающих веществ (таких как сигаретный дым, аэрополлютанты, продукты сжигания биотоплива), активирует врожденный иммунный ответ, что приводит к привлечению большого количества нейтрофилов и макрофагов. В норме также активизируется мукоцилиарный клиренс, за счет чего из дыхательных путей удаляются патогенные частицы. С возрастом способность к «самоочищению» снижается [207]. Для пациентов с ХОБЛ характерна мукоцилиарная дисфункция, которая проявляется повышением проницаемости эпителия, нарушением работы цилиарного аппарата [87]. Эти процессы приводят к более длительной экспозиции патогенных частиц в дыхательных путях. Каким образом сигаретный дым и пылевые частицы активируют иммунные клетки, неизвестно. Существуют гипотезы прямой активации клеток липополисахаридами сигаретного дыма, а также опосредованно, путем активации иммунных клеток продуктами клеточного распада. Последние образуются вследствие повреждения респираторного эпителия активными формами кислорода и азота. К продуктам клеточного распада, или DAMP (damage associated molecular pattern – ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны), относятся ДНК, рибонуклеиновая кислота (РНК), белки теплового шока и др. [187]. Эти молекулы активируют Toll-подобные рецепторы эпителиальных клеток и макрофагов. В результате активируется NFκB и высвобождаются различные липидные и пептидные медиаторы, цитокины и хемокины (IL-1b, IL-6, IL-8, хемотаксический белок моноцитов 1 (MCP-1), ICAM-1 (молекула клеточной адгезии 1), трансформирующий фактор роста бета 1

(TGF $\beta$ -1), TNF- $\alpha$ ) [42], привлекая воспалительные клетки, преимущественно моноциты и нейтрофилы. Последние продуцируют протеолитические ферменты и активные формы кислорода и азота, способствуя большему повреждению эпителия и соединительной ткани. У предрасположенных к ХОБЛ лиц воспаление не самоограничивается по неизвестным причинам, что приводит к возникновению провоспалительного «порочного круга» с продуктами нейтрофильной деградациии внеклеточного матрикса, который проявляет себя как хемоаттрактант, увеличивая приток новых воспалительных клеток. Возможно, это связано с нарушением эффероцитарного клиренса нейтрофилов, что проявляется нерегулярным воспалением при ХОБЛ. Однако, наиболее вероятно, что ключевая роль принадлежит функциональной неполноценности макрофагов. Имеются многочисленные данные, подтверждающие нарушение фагоцитарной активности макрофагов [118]. Если в ответ на пылевые частицы и сигаретный дым воспаление самостоятельно завершается, то не происходит и Т-клеточной активации и презентации аутоантигенов. Заболевание не развивается, либо формируется хронический необструктивный бронхит [68].

Второй этап заключается в презентации антигенов макрофагами CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам. Антигенпрезентирующие клетки секретируют IL-12, способствующий дифференцировке Th0 лимфоцитов в Th1–клетки. Последние начинают продуцировать широкий спектр хемокинов, поддерживая обновление и дифференцировку макрофагов и лимфоцитов. Эффективность презентации антигенов и активность процессов, происходящих на данном этапе, определяет дальнейшее прогрессирование заболевания и коррелирует с тяжестью бронхиальной обструкции [68].

На третьем этапе продолжает нарастать клеточная инфильтрация макрофагами и нейтрофилами, продуцирующими протеолитические ферменты (MMP-2,-9,-12, эластазу), в результате чего повреждаются эпителий и происходит ремоделирование дыхательных путей. Помимо активации CD4<sup>+</sup>, увеличивается количество CD8<sup>+</sup> цитотоксических клеток, которые посредством перфорина и гранзимов атакуют клетки респираторного эпителия. В-лимфоциты,

превращаясь в плазматические клетки, производят антитела. Антитела формируют иммунные комплексы, активируется система комплемента, что приводит к еще более выраженному повреждению легочной ткани. Этот факт подтверждается высоким содержанием В-клеток в лаважной жидкости, ассоциированным с эмфизематозными изменениями легочной ткани [178]. Увеличение клеточного «дебриса», присоединение бактериальной инфекции провоцируют дополнительный выброс антигенов, что «заикликает» воспалительный процесс. Клинически это проявляется прогрессированием бронхиальной обструкции [82].

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

Макрофаги удаляют клеточный детрит, а также принимают непосредственное участие в иммунном надзоре и разрешении воспаления [59] - эти клетки являются авангардом, стоящим на защите легких от повреждающих факторов. Макрофаги патрулируют эпителиальные поверхности дыхательных путей и сталкиваются с натиском огромного количества аберрантных биотических и абиотических агентов [174]. Увеличение макрофагов в мокроте и легочной ткани у пациентов с ХОБЛ является доказательством участия макрофагов в патогенезе заболевания. Способность макрофагов продуцировать большинство медиаторов, экспрессирующихся в легочной ткани, также свидетельствует о ключевой роли этих клеток в патофизиологических процессах, характерных для ХОБЛ [47]. Макрофаги модулируют воспаление, определяют развитие и прогрессирование ХОБЛ [32]. В ответ на воздействие сигаретного дыма и твердых частиц макрофаги высвобождают широкий спектр цитокинов, запуская реакции врожденного и адаптивного иммунитета. Микросреда легких чрезвычайно динамична вследствие воздействия бактерий и раздражителей окружающей сре-

ды. Это приводит к высокой модулирующей способности иммунного ответа, осуществляемой макрофагами в результате поляризации. Признано, что строгая дихотомия макрофагов на M1 и M2 клетки упрощена, поскольку возможен широкий диапазон фенотипов макрофагов. Однако эта классификация по-прежнему широко используется в научной литературе [45]. M1 и M2 макрофаги характеризуются различной экспрессией поверхностных маркеров, продукцией специфических цитокинов и реализацией биологической активности [39, 235].

Дифференциация провоспалительных M1 макрофагов из недифференцированных M0 макрофагов опосредуется мощными индукторами: INF- $\gamma$ , липополисахаридами (LPS) клеточной стенки бактерий, а также цитокинами, например, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и TNF- $\alpha$  [39, 59]. M1 макрофаги высвобождают провоспалительные цитокины (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-15, IL-23 и IL-1 $\beta$ ), образуют активные формы кислорода и реактивные промежуточные соединения азота посредством индуцируемой iNOS. Кроме того, для данных клеток характерна высокая антигенпрезентирующая способность [39, 190]. Таким образом, M1 макрофаги проявляют противомикробную, цитотоксическую активность, оказывают иммуностимулирующие эффекты [39, 148, 190]. В отличие от M1 макрофагов, M2 макрофаги выполняют свою роль в моделировании воспаления, поддерживая ангиогенез, удаляя клеточный дебрис, ремоделируя ткани [17]. M2 фенотип индуцируется несколькими факторами, что приводит к подмножеству фенотипов, именуемых M2a, M2b, M2c. IL-4 и IL-13 инициируют подтип M2a, что способствует уменьшению провоспалительных цитокинов и супероксидных анионов. Этими цитокинами регулируются металлопротеиназы, бета-2 интегрины, активатор плазминогена тканевого типа [39]. Макрофаги дифференцируются в M2b иммунным комплексом, лигандами рецептора IL-1 и LPS. M2b характеризуется повышенной продукцией IL-10 [39, 235]. M2c запускается глюкокортикоидами, TGF $\beta$ -1 или IL-10 и характеризуется низкой продукцией провоспалительных цитокинов [20]. Wang Q. et al. предложили дополнительный подтип, M2d, сти-

мулируемый факторами, ассоциированными с опухолью, и демонстрирующий сниженную экспрессию IL-12 и повышенное высвобождение IL-10 [220].

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

Из недавних исследований стало известно, что макрофаги поддаются перепрограммированию, что приводит к изменению липидного метаболизма, зависящего от степени тяжести ХОБЛ [90]. Возможно, это приводит к дефекту эффероцитоза альвеолярных макрофагов больных ХОБЛ, который сопровождается нарушением способности удалять клеточный дебрис и мертвые либо поврежденные клетки [105, 231]. Предполагается, что дефекты фагоцитоза и эффероцитоза альвеолярных макрофагов могут способствовать бактериальной колонизации и, как следствие, увеличивать риск обострения ХОБЛ [231]. Известно, что даже при 20-кратном увеличении количества макрофагов мокроты больных ХОБЛ, персистирует колонизация легких различными видами бактерий, такими как *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis* [47, 231]. Singh R. et al. сообщили, что дефектный фагоцитоз *H. influenzae* макрофагами (полученными из моноцитов пациентов с ХОБЛ) связан с частотой обострений ХОБЛ. При этом именно провоспалительная активность макрофагов способствовала прогрессированию заболевания, что противоречит изложенным выше фактам [202]. Известно, что M1 макрофаги продуцируют высокие уровни IL-8

и GM-CSF, которые в свою очередь стимулируют рекрутирование нейтрофилов и дифференцировку новых макрофагов [47, 101]. TNF- $\alpha$  и трансформирующий TGF $\beta$ -1, секретируемые M1 макрофагами, представляют собой хорошо известные медиаторы воспаления дыхательных путей, связанного с курением, а также играют существенную роль в прогрессировании ХОБЛ [125]. M2 макрофаги также определяются в бронхоальвеолярном лаваже пациентов с ХОБЛ, их продукцию поддерживают IL-4, IL-13, IL-10. Существует противоречивость данных в отношении влияния сигаретного дыма на фенотип макрофагов. Lee J.W. et al. сообщили, что в вышеописанных условиях макрофаги дифференцируются в сторону поляризации M2 макрофагов наряду с экспрессией MMP-12 [135]. Последняя, по-видимому, индуцируется M2 макрофагами, препятствует воспалению и способствует ремоделированию тканей, что играет решающую роль в развитии эмфиземы у мышей [134]. Эти данные подтверждаются результатами исследования фракталина, нейтрофильной эластазы и MMP-12 в сыворотке крови, последние напрямую связаны с тяжестью заболевания у пациентов с эмфизематозным фенотипом и частыми обострениями [103]. Таким образом, MMP считаются критически важными для разрушения внеклеточного матрикса и усиления иммунного ответа [188]. Эти процессы связаны с деструкцией ткани, и, как следствие, с эмфиземой [32, 47]. Есть предположение, что некоторое преобладание M2 макрофагов над M1 клетками ухудшает сдерживание воспаления с сопутствующей индукцией ремоделирования легочной ткани [59].

Согласно другим данным, экстракт сигаретного дыма *in vitro* индуцирует провоспалительную активность макрофагов больных ХОБЛ, что проявляется повышенной экспрессией iNOS, которая поддерживает окислительный стресс, являющийся важным звеном в патогенезе ХОБЛ [45, 135]. Исследователи сообщали, что сигаретный дым способствовал высвобождению провоспалительных цитокинов (IL1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$ ) [55]. Эти молекулы повышены при ХОБЛ и связаны с развитием стойкого воспаления, эмфиземы и образования слизи в экспериментальных условиях [135]. С другой стороны, есть мнение, что макрофаги способствуют развитию ХОБЛ невоспалительным образом из-за

их индуцированного курением перепрограммирования в сторону M1-деактивированных и частично M2-поляризованных макрофагов [197]. Большое количество экспериментов *in vivo* и *in vitro* [45, 47, 101, 125, 134, 135], проводимых на различных биологических жидкостях человека и животных (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, сыворотка крови, культура макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови) представляет широкий спектр данных об особенностях поляризации, которые порой противоречат друг другу, иногда дополняют общее представление об особенностях макрофагов больных ХОБЛ. Однако четкого представления об этой проблеме пока не существует. Исследование поляризации макрофагов больных ХОБЛ, особенности секреции про- и противовоспалительных цитокинов и факторов ремоделирования данными клетками может пролить свет на патогенетические механизмы ХОБЛ.

Помимо воспаления, важную роль в патофизиологии ХОБЛ играет окислительный стресс. Вдыхаемые раздражающие частицы (сигаретного дыма, пыли и прочее) повышают уровень окислительного стресса у больных ХОБЛ, что проявляется образованием активных форм кислорода. Запускается «порочный круг»: активные формы кислорода стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, рекрутируются воспалительные клетки, это приводит к образованию активных форм кислорода и усилению окислительного стресса. Окислительный стресс вызывает повреждение ДНК, а у пациентов с ХОБЛ существует нарушение репарации двухцепочечных разрывов ДНК, что отражает снижение антиоксидантной защиты вследствие повышения уровня окислительного стресса [41].

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

Эта особенность имеет биологические и клинические последствия. Tran H.V. et al. сообщили, что окислительный стресс снижает экспрессию маннозо-

связывающего лектин в альвеолярных макрофагах пациентов ХОБЛ, что отрицательно влияет на активность клеток. Так при окислении маннозосвязывающего лектина нарушается эффероцитоз апоптотических клеток и фагоцитоз патогенов [212]. Другие исследователи предположили, что выраженный окислительный стресс при ХОБЛ может нарушать митохондриальную функцию и снижать метаболизм макрофагов [49]. С другой стороны, окислительный стресс может возникать вторично, вследствие дефектного фагоцитоза и aberrантной поляризации [70].

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

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

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

проводились на животных моделях, поэтому необходимо проведение дальнейших исследований на макрофагах человека, чтобы верифицировать полученные результаты [70].

### **1.3 Роль TRP каналов в патогенезе хронической обструктивной болезни легких**

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

TRP рецепторы представляют собой белки, расположенные на цитоплазматической мембране (внеклеточно) либо на эндоплазматическом ретикулуме (внутриклеточно). Эти рецепторы чувствительны к довольно широкому спектру химических и физических (термо-, осмо-, механо-, фоторецепция) стимулов экзогенной и эндогенной природы. Семейство TRP подразделяется на 7 подсемейств: TRPA, TRPV, TRPM, TRPC, TRPML, TRPP, TRPN. TRPN встречается только у беспозвоночных и рыб, экспрессия остальных рецепторов подтверждена у человека [151]. Учитывая мультимодальность TRP рецепторов в отношении воспринимаемых стимулов и опосредуемых эффектов, интерес мирового научного сообщества к этим рецепторам значительно возрос за последнее десятилетие.

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

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

TRPA1 это единственный представитель анкиринового подсемейства каналов с транзиторным рецепторным потенциалом. Представляет собой ионный канал, проницаемый для ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , чем и опосредуется биологический эффект. У здорового человека активация TRPA1 способна вызвать кашель (провоцируемый респираторным раздражителем) и бронхоспазм (для минимизации воздействия раздражителя). Активирующими стимулами для TRPA1 могут служить горчичное масло, васаби, низкая температура ( $<17^\circ\text{C}$ ), широкий спектр едких соединений и раздражителей окружающей среды, таких как акролеин, каннабиноиды, формальдегид, коричный альдегид, кротоновый альдегид, слезоточивые газы, тяжелые металлы, анестетики (изофлуран, лидокаин), никотин [95,123]. Исследования показали важность TRPA1 в реализации нормального кашлевого рефлекса. В присутствии антагониста TRPA1 кашель, вызванный у морских свинок и людей, уменьшался [53]. Есть сообщения о защитной роли TRPA1 в модуляции тонуса дыхательных путей. В результате эксперимента было показано, что компоненты сигаретного дыма вызывают сокращение изолированных бронхиальных колец морской свинки путем активации TRPA1 на чувствительных нейронах. В результате активации канала происходит высвобождение тахикинина, который воздействует на гладкомышечные клетки, инициируя сокращение [36].

Кроме того, TRPA1 участвует в высвобождении провоспалительных медиаторов различными ненейрональными клетками [95]. TRPA1 активируется некоторыми эндогенными медиаторами, такими как активные формы кислорода и азота [35]. Экспрессия TRPA1 увеличивалась в ответ на воздействие воспалительных факторов  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  и  $\text{IFN-}\gamma$ . Дексаметазон подавлял экспрессию гена *TRPA1* в клетках A549 вследствие снижения стабильности мРНК

[150]. Установлено, что агонист TRPA1 (СА) ингибирует iNOS, подавляя активность NF $\kappa$ B в макрофагах. Аналогичный эффект был получен на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови: СА угнетал секрецию IL-1 и TNF- $\alpha$ , индуцированную LPS [66]. Несмотря на это, активация TRPA1 на макрофагах сопровождается увеличением продукции IL-8 [81]. Также известно, что блокада TRPA1 провоцировала снижение количества эозинофилов и макрофагов в бронхоальвеолярном лаваже при воздействии аллергена [230]. Таким образом, эффект TRPA1 в основном противовоспалительный, однако активация этого канала сопровождается повышением продукции IL-8.

TRPV1 признан «молекулярным шлюзом» к ноцицептивным ощущениям в различных тканях тела, может активироваться широким спектром химических (кислоты), физических (тепло), биологических (капсаицин) стимулов. TRPV1 в большом количестве экспрессируются на первичных чувствительных нейронах, иннервирующих все дыхательные пути от носа до альвеол, включая кровеносные сосуды и гладкие мышцы [95]. Этот канал способен активироваться провоспалительными медиаторами, что говорит о важной роли TRPV1 в воспалении, а также патогенезе некоторых заболеваний. В эксперименте у животных и человека кашель, вызванный с помощью капсаицина и лимонной кислоты (агонисты TRPV1), подавлялся с помощью антагониста TRPV1 [95]. Следовательно, TRPV1 также участвует в реализации нормального кашлевого рефлекса - стимуляция эпителиальных клеток капсаицином, агонистом TRPV1, индуцировала дозозависимое высвобождение IL-8, аналогично TRPA1 [91]. TRPV1 играет важную роль в проявлении симптомов гиперчувствительности бронхов у пациентов с воспалительными заболеваниями дыхательных путей [137].

TRPV4 активируется осмотическими, физическими раздражителями (включая повышение температуры окружающей среды), а также эндогенными и экзогенными химическими стимулами (кислый pH, анандамид, метаболиты арахидоновой кислоты). Канал широко экспрессируется на ненейрональных клетках: эпителиальных клетках дыхательных путей, фибробластах, воспали-

тельных клетках, включая альвеолярные макрофаги и мононуклеарные клетки [54, 172].

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

Предполагается важное участие TRP каналов в патогенезе ХОБЛ [73]. TRPA1 является основным нейронным датчиком окислительного стресса, уровень которого увеличивается при ХОБЛ [142]. В сигаретном дыме, который вдыхает большинство курильщиков, содержатся  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные альдегиды, кротоновый альдегид и акролеин [36]. Эти вещества, посредством активации TRPA1, способны вызывать раздражение и воспаление в дыхательных путях. Несмотря на то, что никотин может напрямую активировать TRPA1, его концентрация в сигаретном дыме недостаточна [136]. Активировать TRPA1 способны твердые частицы древесного дыма [196], а также частицы выхлопных газов дизельных двигателей [185]. TRPA1 экспрессируется на различных клетках респираторного тракта (чувствительных нейронах, фибробластах, В-клетках,

CD4+, CD8+ лимфоцитах, тучных клетках, макрофагах). Несмотря на наличие предпосылок участия TRPA1 в патогенезе ХОБЛ, исследований полиморфизмов гена *TRPA1* и экспрессии этого канала на клетках у больных лиц не проводилось. Тем не менее, было установлено, что полиморфизмы *TRPA1* ассоциированы с бронхиальной астмой [12]. Антагонизм к TRPA1 может стать патогенетическим вариантом лечения ХОБЛ [158]. Известно, что сигаретный дым увеличивает экспрессию TRPA1 в клетках альвеолярного эпителия клеточной линии A549 [162]. Активация TRPA1 повышает экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1a, IL1b. Нокаут экспрессии TRPA1 сопровождается снижением провоспалительных и профибротических факторов (TGF $\beta$ -1, IL-6, VEGF). В экспериментах СА снижал уровень провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6) и угнетал фагоцитоз [126]. Соответственно, TRPA1 способствует инфильтрации легочной ткани лейкоцитами, в то же время снижая активность фагоцитоза. Оба этих процесса характерны для ХОБЛ [175].

TRPV1 задействован в повреждении бронхиального эпителия сигаретным дымом [219]. Блокирование TRPV1 в эксперименте с воздействием пылевых частиц на дыхательные пути снижало гиперреактивность бронхов, воспалительную клеточную инфильтрацию секрецию цитокинов и фосфорилирование NF $\kappa$ B [230]. Антагонист TRPV1 AMG9810 эффективно снижал продукцию IL1 $\beta$ , IL-6, IL-18 и экспрессию циклооксигеназы-2 макрофагами [163]. TRPV1, экспрессированный на CD4+ клетках, проявлял провоспалительный эффект [76]. Активация TRPV1 на дендритных клетках приводила к нарушению фагоцитоза, экспрессии HLA-DR, CD40, CD80 и CD86, секреции цитокинов IL-6 и IL-12 [211]. При стимуляции TRPV1 эпителия роговицы продуцируются провоспалительные цитокины (IL-6 и IL-8) [222]. Аналогичная реакция наблюдалась и на бронхиальном эпителии [72].

Эффекты TRPV4 схожи с TRPA1 и TRPV1, что проявляется провоспалительным эффектом и снижением функционирования антигенпрезентирующих клеток. TRPV4 активируется компонентами сигаретного дыма и выхлопными газами дизельных двигателей, в результате чего запускается фагоцитирование

опсонизированных и неопсонизированных частиц макрофагами, стимулированными липополисахаридами *in vitro* и *in vivo* у мышей [192]. Активация TRPV4 увеличивает продукцию активных форм кислорода и азота. Также этот канал может играть существенную роль в мукоцилиарной дисфункции, увеличивает проницаемость эндотелия и альвеолярного эпителия, способствуя отеку легочной ткани и инфильтрации воспалительными клетками [95].

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

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

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

Также нет объяснений, почему прогрессирование бронхиальной обструкции не всегда сопутствует коморбидным пациентам, почему после непродолжительного курения у пациента развивается прогрессирующее снижение легочной функции, почему заболевание протекает у каждого больного с индивидуальными особенностями, и обструкция дыхательных путей возникает не у каждого курящего субъекта. Несомненным является влияние окружающей среды на человека. Однако, по всей видимости, ответ кроется в особенностях генетического фона человека, который накладывает отпечаток на гетерогенность патогенеза. В связи с вероятной вовлеченностью TRP рецепторов в патологию

ческие процессы, происходящие в легких при ХОБЛ, необходимо изучить влияние полиморфизмов соответствующих генов и особенностей их экспрессии макрофагами на бронхиальную проходимость. Выявление молекулярно-генетических маркеров и сопутствующих клинико-функциональных предикторов позволит разработать способы прогнозирования формирования ХОБЛ у курящих лиц и прогрессирования бронхиальной обструкции, что крайне важно для его первичной и вторичной профилактики.

## **ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА**

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

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

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

### **2.1 Общеклинические методы исследования**

На амбулаторном этапе у пациентов проводили сбор жалоб, в том числе, методом анкетирования, уточнение анамнеза заболевания, анамнеза жизни, фиксировали результаты объективного осмотра. При опросе пациента уточняли наличие одышки: степень ее выраженности, зависимость от физической активности, характер прогрессирования, а также наличие, частоту, и характер

кашля, цвет отделяемой мокроты. Анамнез заболевания включал длительность предъявляемых жалоб, последовательность их возникновения; частоту обострения заболевания; когда впервые выставлен диагноз; данные о получаемой медикаментозной терапии (вид, длительность, дозировка). В анамнезе жизни выяснялись следующие факты: наличие сопутствующей патологии; табакокурение: количество выкуриваемых сигарет в сутки, статус и стаж курения; страдает ли кто-нибудь из кровных родственников пациента заболеваниями легких (ХОБЛ, БА, саркоидоз и др.), онкопатологией, сердечно-сосудистыми заболеваниями; тип отопления дома (централизованное или печное), профессиональные вредности (пылевые поллютанты, химикаты). Объективный осмотр заключался в оценке общего состояния, осмотре кожного покрова, слизистых оболочек, лимфатических узлов, визуальной оценке формы грудной клетки, участия вспомогательной мускулатуры в акте дыхания. Далее проводились аускультация, перкуссия легких и сердца. Подсчитывалась частота дыхательных движений и сердечных сокращений. Для оценки нутритивного статуса применялся индекс массы тела (ИМТ), который рассчитывался по формуле:  $ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост (м)}^2$ . При значениях ИМТ от 25 до 30  $\text{кг}/\text{м}^2$ , то у пациента диагностировали избыточную массу тела, а ИМТ свыше 30  $\text{кг}/\text{м}^2$  расценивали как ожирение [77, 157]. Индекс курения (ИК) определяли как отношение произведения количества выкуриваемых сигарет в сутки и количества лет курения к 20 (пачка-лет) [51]. Для определения выраженности симптомов использовался оценочный тест ХОБЛ (COPD Assessment Test™(CAT)). Тест состоит из 8 вопросов, ответ на каждый оценивается в диапазоне от 0 до 5 баллов. Если общая сумма баллов составляет 0-10 баллов, это значит, что ХОБЛ оказывает незначительное воздействие на качество жизни пациента, 11-20 баллов – расценивают как умеренное влияние, 21-30 – сильное, 31-40 – чрезмерно выраженное.

Изучение клинических особенностей течения ХОБЛ проводилось по специально разработанной программе с заполнением индивидуальной регистрационной карты больного. В данной карте пациент заполнял свои личные данные:

фамилию, имя, отчество, возраст, рост, вес, место работы, должность, профессиональные вредности. Подробно описывались жалобы в течение недели до момента госпитализации. К ним относились приступы удушья (нет – 0 баллов, дневные – 1 балл, ночные – 2 балла, частота возникновения), слышимые хрипы при дыхании (дневные: нет – 0 баллов, периодические – 1 балл, постоянные – 2 балла; ночные: нет – 0 баллов, периодические – 1 балл, постоянные – 2 балла), кашель в течение дня (сухой – 0 баллов, с небольшим количеством мокроты – 1 балл, продуктивный – 2 балла), цвет выделяемой мокроты, характер кашля (дневной: нет-0 баллов, редкий эпизодический - 1 балл, менее одного эпизода в час – 2 балла, 1 и более эпизодов в час – 3 балла, постоянный – 4 балла; ночной: нет-0 баллов, редкий эпизодический - 1 балл, менее одного эпизода в час – 2 балла, 1 и более эпизодов в час – 3 балла, постоянный – 4 балла), наличие одышки [92]. Степень тяжести одышки определялась с помощью шкалы одышки mMRC (модифицированный вопросник Британского медицинского исследовательского совета для оценки тяжести одышки): 0 баллов – одышка при сильной физической нагрузке; 1 балл – одышка при ходьбе по ровной местности или поднимании по пологому холму; 2 балла – одышка вынуждает пациента идти по ровной поверхности медленнее, чем люди того же возраста; 3 балла – пациент задыхается, пройдя 100 м, либо через несколько минут ходьбы по ровной поверхности; 4 балла – одышка при минимальной физической нагрузке.

## 2.2 Функциональные методы исследования

Оценка функции внешнего дыхания проводилась методом спирографии на аппарате Easy on-PC (nddMedizintechnik AG, Швейцария) исходно и в динамике после проведения бронходилатационной пробы с сальбутамолом. Исследование проводилось в первой половине дня. Прием  $\beta_2$ -агонистов короткого действия отменяли за 8 часов,  $\beta_2$ -агонистов длительного действия – за 12 часов до предполагаемого исследования. Курение исключали как минимум за 1 час перед процедурой, употребление алкоголя - за 4 часа, значительные физи-

ческие нагрузки – на 30 минут. Следили за тем, чтобы одежда была свободной, не стягивала грудную клетку и живот. Пациентов просили воздержаться от обильного приема пищи за 2 часа перед исследованием. Исследование проводилось в положении сидя, носовое дыхание блокировалось с помощью наложения клипсы.

Регистрировались следующие показатели: ФЖЕЛ, ОФВ<sub>1</sub>, отношение ОФВ<sub>1</sub> к ФЖЕЛ (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ), пиковая объемная скорость выдоха (ПОС), мгновенные объемные скорости выдоха на уровне 25% (МОС<sub>25</sub>), 50% (МОС<sub>50</sub>), 75% (МОС<sub>75</sub>) ФЖЕЛ, средняя объемная скорость выдоха на уровне 25-75% ФЖЕЛ (СОС<sub>25-75</sub>). Согласно форме кривой «поток-объем» позволяла выявлять тип вентиляционных нарушений: обструктивный, рестриктивный или смешанный. Степень их выраженности определялась как: умеренные (I степени), значительные (II степени), резко выраженные (III степени) [14]. Бронходилатационная проба проводилась всем пациентам с целью определения обратимости бронхиальной обструкции. Спустя 15 минут после ингаляции короткодействующего β<sub>2</sub>-адреномиметика Сальбутамола в дозе 200 микрограмм (мкг) повторно исследовалась вентиляционная функция легких. Согласно последним рекомендациям ERS и ATS абсолютное и относительное изменение ОФВ<sub>1</sub> позволяет достаточно точно определить обратимость обструкции дыхательных путей. Бронходилатационный тест считался положительным, если относительный прирост ОФВ<sub>16</sub> составлял более 12%, а абсолютный - более 200 мл. Прирост менее 12% или 200 мл расценивался как наличие необратимой бронхиальной обструкции [26]. Отношение ОФВ<sub>16</sub>/ФЖЕЛ<sub>6</sub><0,70 подтверждало наличие ХОБЛ. Степень тяжести ограничения скорости воздушного потока оценивалась согласно ОФВ<sub>16</sub>: GOLD 1 (легкая) - ОФВ<sub>16</sub>≥80% от должного; GOLD 2 (средней тяжести) - 50%≤ОФВ<sub>16</sub><80% от должного; GOLD 3 (тяжелая) - 30%≤ОФВ<sub>16</sub><50% от должного; GOLD 4 (крайне тяжелая) - ОФВ<sub>16</sub><30% от должного [92]. Измерение функции легких проводили в динамике. Снижение ОФВ<sub>16</sub> на 50 и более миллилитров в течение 12 месяцев расценивали, как прогрессирование бронхиальной обструкции. Снижение ОФВ<sub>16</sub> менее чем на 50

миллилитров за этот же промежуток времени говорило об отсутствии прогрессирования бронхиальной обструкции [117, 166]. Измерение уровня оксигенации крови ( $SpO_2$ ) проводилось с помощью пульсоксиметра («Mednet GmbH», Германия). Датчик пульсоксиметра надевали на второй палец правой руки и через несколько секунд фиксировали частоту пульса и процент насыщения крови кислородом.

### 2.3 Культуральные методы исследования

Периферическую венозную кровь восьми больных ХОБЛ и шести человек из контрольной группы собирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА) и центрифугировали в течение 15 минут при 1000g для получения лейкоцитов. Лейкоциты отбирали пастеровской пипеткой и переносили в новую пробирку. К отобраным клеткам добавляли фосфатно-солевым буфером (ФСБ) до конечного объема 9 мл и перемешивали. В новой пробирке объемом 15 мл полученную суспензию медленно наслаивали на 3 мл фиколла с плотностью 1,077 г/мл (ООО «Биолот», Россия), и затем центрифугировали при 400g в течение 40 минут при температуре 23°C. Верхнюю часть плазмы удаляли, оставляя над интерфазой, содержащей мононуклеары периферической крови (МПК), 1-2 мл. Через оставшийся слой плазмы в стерильную коническую пробирку объемом 15 мл отбирали МПК. Для удаления тромбоцитов полученные клетки трижды отмывали, добавляя стерильный ФСБ до полного объема пробирки, и осаждая центрифугированием при 150g 10 минут. После третьей отмывки супернатант декантировали и ресуспендировали осадок в 1 мл среды RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Германия). Выделение моноцитов методом адгезии из суспензии МПК производили, выдерживая клетки в культуральных флаконах T25 при 37°C в течение 2 часов, в 5 мл среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) и 1% пенициллина/стрептомицина. По окончании инкубации клетки трижды промывали ФСБ для удаления лимфоцитов, а прикрепившимся моноцитам вновь добавляли 5 мл среды RPMI-1640, содер-

жащей 10% FCS, 1% пенициллина/стрептомицина и 50 нг/мл GM-CSF. Клетки культивировали в течение 6 суток, проводя замену среды на третьи сутки в объеме 2/3 от исходного. На 6 сутки для поляризации полученных M0 макрофагов в M1 и M2 фенотипы, клеткам меняли среду и добавляли липополисахариды *E. coli* (LPS) 100 нг/мл + рекомбинантный человеческий интерферон гамма (IFN- $\gamma$ ) 20 нг/мл, либо интерлейкин 4 (IL-4) 20 нг/мл, соответственно [209]. Клеткам в контрольной лунке также проводили замену среды, но стимулирующие поляризацию факторы не добавляли. Спустя сутки супернатант культуральной среды отбирали в пробирки 1,5 мл и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Клетки растворяли в буфере RL (Qiagen, Германия) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующего выделения РНК.

#### 2.4 Генотипирование полиморфизмов *TRP*

Генотипирование ОНП генов *TRP* проводилось всем испытуемым. Кровь для генетических исследований отбирали из локтевой вены в пробирки, содержащие антикоагулянт (динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), затем замораживали до момента выделения ДНК при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Выделение ДНК производили коммерческими наборами «ДНК-Экстран-1» (ЗАО «Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Полиморфизмы генов *TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV4* и *TRPM8* отбирали для исследования на основании следующих критериев: частота минорного аллеля  $>0,05$ , наличие литературных данных, свидетельствующих о вероятной функциональной значимости полиморфизма, для полиморфизмов регуляторных областей – данные анализа *in silico*, указывающие на возможное влияние полиморфизма на связывание ДНК с транскрипционными факторами или малыми интерферирующими РНК (миРНК), для полиморфизмов кодирующих регионов гена – данные о влиянии на функцию белка [131]. Перечень отобранных для анализа полиморфизмов и их краткая характеристика приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Полиморфизмы, отобранные для исследования

Ген	Полиморфизм	Позиция	Регион
1	2	3	4
<i>TRPM8</i>	rs10166942 с.-990Т>С	chr2:23391644 8	5'-фланкирующий регион
	rs7577262 g.234818869G>A	chr2:23391022 4	5'-фланкирующий регион
	rs11562975 с.750G>С p.Leu250=	chr2:23394590 6	экзон
	rs17868387 с.752A>G p.Tyr251Cys	chr2:23394590 8	экзон
	rs58514553 с.*727_*728insTTAT	chr2:23401798 3-234017987	3'-нетранслируемый регион
	rs2052030 с.*1710C>G	chr2:23401896 6	3'-нетранслируемый регион
	rs17865682 с.*2325A>G	chr2:23401958 1	3'-фланкирующий регион
<i>TRPA1</i>	rs920829 с.535G>A p.Glu179Lys	chr8:72065468	экзон
	rs7819749 с.558A>C p.Lys186Asn	chr8:72063566	экзон
	rs4738202 с.2937+1275Т>С	chr8:72028626	интрон
	rs959976 с.3053A>G p.His1018Arg	chr8:72023910	экзон
	rs959974 с.3149+210C>A	chr8:72023604	интрон

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>TRPA1</i>	rs6996723 с.*1509G>A	chr8:72021397	3'-нетранслируемый регион
<i>TRPV1</i>	rs460716 с.-121T>C	chr17:3608514	5'-нетранслируемый регион
	rs222749 с.271C>T p.Pro91Ser	chr17:3592080	экзон
	rs222747 с.945G>C p.Met315Ile	chr17:3589906	экзон
	rs8065080    с.1753A>G p.Ile585Val	chr17:3577153	экзон
<i>TRPV4</i>	rs6606743 g.109841374G>A	chr12:1098413 74	5'-фланкирующий регион
	rs7139451 g.109838274A>T	chr12:1098382 74	5'-фланкирующий регион
	rs11068434 с.-31-2338A>C	chr12:1098171 65	интрон
	rs3825394 с.670A>C p.Arg224=	chr12:1098030 33	экзон

Полиморфизмы генотипировали методом асимметричной LATE (Linear-After-the-Exponential) ПЦР с анализом плавления зондов «molecular beacon». Реакционная смесь включала: ДНК-матрица 50 нг, 1x ПЦР-буфер, MgCl<sub>2</sub> 2,5 мМ, dNTP 0,25 мМ, праймеры и флуоресцентно-меченые зонды «molecular beacon» – в концентрациях, указанных в таблице 2, Hot Start Taq-полимераза, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 25 микролитров (мкл). Амплифика-

ция проводилась в режиме: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., первый блок: 25 циклов – денатурация 92°C/1 секунду (сек.), отжиг/элонгация при температуре, указанной в таблице 2 (Ta) – 15 сек., второй блок: 45 циклов – денатурация 92°C/1 сек., отжиг/элонгация при температуре, указанной в таблице 2 (Ta) – 15 сек., финальная элонгация - 72°C/5 мин. Анализ плавления зондов выполнялся по протоколу: предварительная денатурация при 90°C/3 мин., гибридизация - 30°C/3 мин., плавление с градиентным повышением температуры от 30°C до 70°C с шагом 0,5°C. На графиках, отражающих зависимость -dF/dT (изменение уровня флуоресценции от температуры), регистрировались кривые плавления. Наблюдаемые пики плавления либо их комбинации отражали наличие отдельных аллельных вариантов гена [131].

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

Ген	Поли-морфизм	Последовательности праймеров и зондов	Конц., мкМ	Ta°C
1	2	3	4	5
<i>TRPM8</i>	rs10166942	FWD 5'- ТАСТТАСТАССТАААССТТГ-ГС-3'	0,5	64/58
		REV 5'- TGAGCAAGGTCTGAA- AGGAAGGATAGGG-3'	0,02	
		5'-FAM- CGCGTAAACAAAGA- GAGACAAAAGCGCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs7577262	FWD 5'- CCTCAAAAGCCCAG- TTCCCСТААССТСА-3'	0,02	65/62
		REV 5'- GTAAAGAATCAG- TAAATGTGAАССАСТ-3'	0,5	
		5'-FAM-CTCCGAATGCAG- TTTCCTCTCGGAG-BHQ1-3'	0,5	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPM8</i>	rs11562975 rs17868387	FWD 5'- CCAGTACCTTATGGATG- ACTT-3'	0,5	62/58
		REV 5'- GGAGCTTT- GCTTCGACAGTGGGAT-3'	0,02	
		5'-FAM- CGGCCAGGATATACAG- TGGAGCCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs58514553	5'-CTTGAAAGGCCTACTGACTT- TGTTCTTAT-3'	0,02	62/57
		5'-GAAATTGTTAGCAGTGATTACC- 3'	0,5	
		5'-FAM- CGCGTACTCCTCTTATTTAT- TATTCGCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs2052030	5'-GGAGAGATTATCTTACTGAA- CAC-3'	0,5	62/58
		5'-TCACTACTGCCAGACAAAA- GGAAAA-3'	0,02	
		5'-FAM- CGGCTCAAATACGACCACT-GCCG - BHQ1-3	0,5	
<i>TRPA1</i>	rs17865682	5'-GAATTGTCATGTGTTGCTTTTG- 3'	0,5	62/60
		5'-AGAGAAGTCAGTTCATGTAAC- TCTGGGA-3'	0,02	
		5'-FAM- CCGGAAGTGAATCTGA- CCGG-BHQ1-3'	0,5	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPA1</i>	rs920829	FWD 5`- TGAATAAAAGATAAACAGA- CATGGTCCCT-3`	0,02	60/58
		REV 5`-AGAAAGCAGACAGATAT- GACA-3` 5`-FAM-CTGGCACCACAAATAATA- GCGAGCCAG-BHQ1-3`	0,5	
			0,5	
	rs7819749	FWD 5`- GCGATTTGGGGTTTAACTG- GTGTCAT-3`	0,02	63/61
		REV 5`- GCAGCTTGGTGAATAGGGA-3` 5`-FAM-CTTGCTTAACAAAGGAG- CAAG-BHQ1-3`	0,5	
			0,5	
	rs4738202	FWD 5`-GCCTACTTAGCACACCAG- 3`	0,5	63/60
		REV 5`- TTCCAATCGCTCTGTGTCTC- TGTATAATA-3` 5`-FAM- CCGGTCATAGAACATAGAA- TCCGG-BHQ1-3`	0,02	
			0,5	
	rs959976	FWD 5`- TAGCAGATTGTGGGTTCTT- GAGGGCATA-3`	0,02	66/60

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPA1</i>	rs959976	REV 5`- AGATTTATCAGCATTTGGTA- TTTCTTG-3` 5`-FAM- CGCGTTTTTTATCCGACAGC- ATACGCG-BHQ1-3`	0,5	66/60
		FWD 5`- AACATATTTGCCACTATTC- ACCAATCAGTT-3` REV 5`- T TACTCCAGGGATCTTCAG-3` 5`-FAM-CCGGGCCTTCCAATCATA- ACCGG-BHQ1-3`	0,02	
	0,5			
	rs6996723	FWD 5`- AATCACTATACAGAAGCAA- TATCC-3` REV 5`- TTCTTGGCACTCAGTGAATG- TTGACT-3` 5`-FAM-CCTCCCCCTTGTCTTTATG- GAGG-BHQ1-3`	0,5	62/57
		0,02		
		0,5		
	rs460716	FWD 5`-GCATTGTTCTGAGCA- GTGTGATGGAGAGTC-3` REV 5`-GGTTTCTCTTTGGCATAT- CCGA-3` 5`-FAM-CGCGTCCCTGTGTTCCCC- ACGCG-BHQ1-3`	0,02	66/63
		0,5		
		0,5		

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPV1</i>	rs222749	FWD 5`- AGACCCCCTGGATGGAGAC- CCTAAC-3`	0,02	66/63
		REV 5`- CCCCTGGCTTTGTGACATTT-3`	0,5	
		5`-FAM-CGCTGAGACGGCCCCA- CAGCG-BHQ1-3`	0,5	
	rs222747	FWD 5`-GCCGACAACACGAAGTTT- 3`	0,5	67/61
		REV 5`- GCCTGAGCCGAAGCCCCCT-3`	0,02	
		FAM-CTCGCCCCAGCATCAGAAG- CGAG-BHQ1-3`	0,5	
	rs8065080	FWD 5`-ATGATCCTGAGAGA- CCTGTGCCGTTTC-3`	0,02	65/64
		REV 5`-TGCCTACCCAGTGCCTTC- 3`	0,5	
		5`-FAM-CCGCTACATCGTCTTCTT- GCGG-BHQ1-3`	0,5	
<i>TRPV4</i>	rs6606743	FWD 5`- TTTTGGTCTAAGAACAGGG- GAAGT-3	0,5	66/63
		REV 5`- AATTGTGAGGGGGTGAGGG- AGCAC-3	0,02	
		5`-FAM-CGGCCACAGGAGCGATG- CCG-BHQ1-3`	0,5	

## Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
<i>TRPV4</i>	rs7139451	FWD 5'- GCATGACTCAGTAAC- CATTCATTTTATTGC-3'	0,02	62/58
		REV 5'- TGAGAACTTACGTCCA- TAGAA-3'	0,5	
		5'-FAM- CGCGATAGTATTCCTTT- GTGTGCGCG-BHQ1-3'	0,5	
	rs11068434	FWD 5'- GGAGAGTCTAATCCACCTC-3`	0,5	62/58
		REV 5'- TAGTAGGACCTCTGGAGAC- ACGAAGT-3	0,02	
		5`-FAM- CCGAGATTTGGGCTTTGCTC-GG- BHQ1-3`	0,5	
	rs3825394	FWD 5'- TGAGGAAACAGGCTTGGAG- AGGAGAT-3`	0,02	64/61
		REV 5'- GTAGATGTCACGGAAGGGC-3`	0,5	
		5`-FAM- CGGTCGCAACATGAGGGAG- GACCG-BHQ1-3`	0,5	

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

Выделение РНК из макрофагов проводили с использованием наборов Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Канада) согласно протоколу производителя. Оценку качества РНК производили методом электрофореза образца в 1% агарозном геле с дальнейшим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией на трансиллюминаторе. В качественных образцах отмечалась хорошая визуализация 28S и 18S рРНК с соотношением интенсивности полос 2:1. Качественные образцы РНК, не имеющие признаков существенной деградации, подвергали обратной транскрипции с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ-1) (Синтол, Россия) согласно протоколу производителя. Для проведения обратной транскрипции смесь 5 мкл РНК (1-2 мкг тотальной РНК), воды и комбинации праймеров Олиго(dT)15 и Random(6) в рекомендуемом объеме инкубировали в течение 5 мин. при температуре 65°C, а затем охлаждали на льду 1 мин. После этого смесь инкубировали при температуре 25 °С еще 10 минут, а затем добавляли 2,5X реакционную смесь и ревертазу MMLV-RT. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Пробирки помещали в амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США) и инкубировали при температуре 42°C 1 час, после чего следовало повышение температуры до 92°C в течение 3 мин для инактивации MMLV. Обратную транскрипцию образцов, предназначенных для анализа экспрессии *TRPM8*, проводили с ген-специфическим праймером в следующих условиях. Смесь 5 мкл РНК (1-2 мкг тотальной РНК), раствора трегалозы, и комбинации Олиго(dT)15 и ген-специфического праймеров инкубировали в течение 5 мин. при температуре 65°C и охлаждали на льду 1 мин. Затем добавляли 2,5X реакционную смесь и ревертазу MMLV-RT. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Трегалозу добавляли в раствор до достижения конечной концентрации 0,6М, ген-специфический праймер – до 0,2 мкМ, праймер Олиго(dT)15 – в количестве, рекомендованном производителем набора. Пробирки помещали в ам-

плификатор и инкубировали при температуре 60°C 1 час, после чего увеличивали температуру до 92°C на 3 мин. Полученную комплементарную ДНК (кДНК) хранили при -20°C до момента анализа.

Исследование экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen (Синтол, Россия). В качестве референсного использовали ген В2М (бета-2-микроглобулин). Смесь для ПЦР включала в себя: кДНК-матрица 100 нг; 1x ПЦР-буфер, содержащий EvaGreen, MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мМ, dNTP 0,25 мМ, праймеры – по 0,2 мкМ прямого и обратного, Hot Start Taq-полимераза, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 25 мкл. Амплификацию проводили в режиме: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., 45 циклов – денатурация 95°C/5 сек., отжиг при специфичной для каждого гена праймеров температуре/10 сек., элонгация 72°C/10 сек. Последовательности праймеров и температура отжига для, использованные при анализе экспрессии каждого гена, указаны в таблице 1. Дизайн праймеров исключал амплификацию с геномной ДНК. ПЦР для каждого образца проводили в трехкратных повторах. Из трех полученных значений пороговых циклов (Ct) вычисляли среднее арифметическое для каждого случая.

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

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

Продолжение таблицы 3

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

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

## 2.6 Иммунофлуоресцентные методы исследования

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

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

США) и выражали в виде процента положительно окрашенных клеток или нормализованной медианной интенсивности флуоресценции (nMFI).

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

## 2.7 Статистические методы исследования

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

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

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

Критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность использовали для анализа ассоциаций между качественными признаками. Анализ количе-

ственных переменных с нормальным распределением проводился методом ANOVA (при множественных сравнениях) и t-Стьюдента. В случае распределения, отличного от нормального использовался ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (для множественных сравнений), для парных сравнений использовался тест Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического  $\rho$  критерия Спирмена.

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

## **2.8 Клиническая характеристика обследованного контингента**

Всего в исследование было включено 238 человек. Из них 104 курящих человека с отсутствием обструкции были включены в контрольную группу, а 134 человека проходили клинико-функциональное обследование и амбулаторное лечение с диагнозом ХОБЛ (GOLD II, III, IV) на базе ДНЦ ФПД с 2019 г. по 2022 г. включительно. Все пациенты находились в стадии ремиссии ХОБЛ и других хронических заболеваний. Диагноз ХОБЛ выставлен согласно Международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10), GOLD (пересмотр 2017, 2021 гг.); Федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению ХОБЛ Российского респираторного общества (2021 г.), Национального руководства по пульмонологии под редакцией Чучалина А.Г. (2009 г.). Пациенты с ХОБЛ в качестве базисной терапии чаще применяли комбинацию длительнодействующих  $\beta_2$ -агонистов и глюкокортикостероидов в одном ингаляторе (формотерол\будесонид, сальметерол/флутиказон). Приверженность к лечению наблюдалась у 56% больных ХОБЛ.

У всех пациентов получено информированное согласие на включение в исследование. В основную группу были включены пациенты обоих полов в

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

Всем пациентам был проведен весь спектр клинико-функциональных обследований. Через 12 месяцев каждый пациент с ХОБЛ был повторно приглашен на обследование. По результатам спирографии было выявлено, что у части пациентов в течение года снизились показатели функции легких. В результате динамического наблюдения и критерия прогрессирования бронхиальной обструкции [117, 166], пациенты с ХОБЛ были разделены на 2 группы (рисунок 1): группа без прогрессирования бронхиальной обструкции ( $n=75$ ) и группа с прогрессированием бронхиальной обструкции ( $n=59$ ).



Рисунок 1 - Дизайн исследования.

### 2.8.1 Клиническая характеристика основной и контрольной групп

При сравнении основной группы (пациенты с ХОБЛ) с контрольной (курящие лица) выяснилось, что пациенты из основной группы значительно старше ( $60,9 \pm 0,6$  лет против  $43,2 \pm 1,3$  лет),  $p < 0,001$ . Среди пациентов основной группы доля мужчин была выше, чем среди курящих лиц контрольной группы: 86% против 74%,  $p = 0,02$ . ИК в группе с ХОБЛ превышал таковой у курящих лиц более чем в 2 раза ( $40[26;47]$  против  $15[7;21]$ ,  $p < 0,001$ ). Подавляющее большинство (91%) испытуемых из группы больных ХОБЛ были злостными курильщиками (с ИК  $> 20$  пачка-лет), а в контрольной группе только 34%, ( $p < 0,001$ ). В контрольной группе показатели спирографии были в пределах нормы:  $ОФВ_{16} = 108,5 \pm 2,18\%$ ,  $ОФВ_{16}/ФЖЕЛ_6 = 80,0 \pm 0,89\%$ , а у пациентов с ХОБЛ наблюдалось резкое снижение бронхиальной проходимости. В частности,  $ОФВ_{16}$  составлял  $50,4 \pm 1,57\%$ , а соотношение  $ОФВ_{16}/ФЖЕЛ_6$  равнялось  $47,5 \pm 0,94\%$  (таблица 4).

Таблица 4 - Характеристика основной и контрольной групп

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

Продолжение таблицы 4

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

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

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

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

В общей группе из 134 человек с ХОБЛ присутствовало 115 (85,8%) мужчин и 19 (14,2%) женщин в возрасте от 38 до 81 года (средний возраст 60±0,78 лет). При сравнении пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции и без прогрессирования бронхиальной обструкции обращает на себя внимание разница в возрасте испытуемых. Средний возраст пациентов из группы с прогрессированием бронхиальной обструкции составил 62,2±0,97 лет, в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции испытуемые были несколько

моложе -  $59,6 \pm 0,99$  лет,  $p=0,049$ . При распределении пациентов по полу и возрасту учитывалась классификация возрастов (таблица 5), принятая Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, 2022г) [223].

Таблица 5 - Распределение больных по полу и возрасту

Возраст (годы)	Группа пациентов без прогрессирующей бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессирующей бронхиальной обструкцией, n (%)
Молодой возраст (18-44)		
Мужчины	3 (4,0)	2 (3,4)
Женщины	1 (1,4)	0 (0,0)
Средний возраст (45-59)		
Мужчины	27 (36)	14 (23,7)
Женщины	1 (1,3)	1 (1,7)
Пожилой возраст (60-74)		
Мужчины	32 (42,7)	35 (59,3)
Женщины	9 (12,0)	6 (10,2)
Старческий возраст (75-90)		
Мужчины	1 (1,3)	1 (1,7)
Женщины	1 (1,3)	0 (0,0)
Всего:		
Мужчины	63 (84)	52 (88)
Женщины	12 (16)	7 (12)

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

В группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией преобладали более тяжелые стадии заболевания. Так, на долю тяжелой и крайне тяжелой

ХОБЛ приходилось 76,3% (n=45), против 48% (n=36) при сравнении с испытуемыми без прогрессирования бронхиальной обструкции (таблица 6).

Таблица 6 - Стадии ХОБЛ групп испытуемых

Стадия ХОБЛ по GOLD	Группа пациентов без прогрессирования бронхиальной обструкции, n (%)	Группа пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции, n (%)	Значимость
II	39 (52)	14 (23,7)	$\chi^2=11,0$ p=0,004
III	25 (33,3)	32 (54,3)	
IV	11 (14,7)	13 (22)	

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

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

лет, что было больше, чем в группе без прогрессирования обструкции ( $33,8 \pm 1,5$ ),  $\chi^2=0,04$ ,  $p < 0,05$  (таблица 7).

Таблица 7 - Анамнез курения в группах исследования

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

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

Среди сопутствующей патологии у обследованных преобладали гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, заболевания верхних дыхательных путей, хронические заболевания пищеварительной системы. Сахарный диабет и ишемическая болезнь сердца в группе с прогрессирующей бронхиаль-

ной обструкцией встречались чаще, чем в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции (таблица 8).

Таблица 8 - Сопутствующая патология пациентов с ХОБЛ

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

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

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

При обращении к врачу-пульмонологу пациенты предъявляли разнообразные респираторные жалобы. Жалобы на одышку беспокоили подавляющее большинство пациентов. Более половины испытуемых из группы с прогрессирующей бронхиальной обструкцией страдали от тяжелой и очень тяжелой одышки. В группе без прогрессирования бронхиальной обструкции преобладала средняя степень одышки (таблица 9).

Таблица 9 - Степень одышки в группах исследования

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

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

При анализе оценочного теста САТ обращает на себя внимание большая разница баллов в группах: 28[10;36] в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции против 11[8;33] в группе без прогрессирования бронхиальной

обструкции, ( $p < 0,001$ ). ИМТ в сравниваемых группах не отличался: 24,7[22,1;30,0] в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 25,3[22,6;30,7] в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции,  $p=0,6$ .

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

Таблица 10 – Категории пациентов по GOLD

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

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

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

грессированием бронхиальной обструкции, однако статистической значимости не отмечалось (таблица 11).

Таблица 11 - Характеристика жалоб исследованного контингента

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

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

Среди показателей объективного обследования пациентов существенной разницы при сравнении групп не прослеживалось (таблица 12). В обеих группах значение медианы насыщаемости крови кислородом (SpO<sub>2</sub>) составило 93%, медианное значение частоты сердечных сокращений (ЧСС) - 86 в минуту. Подсчитано, что средняя частота дыхания (ЧД) составила 22, этот показатель был за пределами нормы и свидетельствовал об одышке. В группе без прогрессирования бронхиальной обструкции медиана систолического артериального давления (САД) составила 120мм рт. ст., медиана диастолического артериального давления (ДАД) – 80 мм рт. ст. В группе с прогрессированием бронхиальной обструкции цифры были несколько больше (125 и 80 мм рт. ст. соответственно), различия между группами были незначимы.

Таблица 12 - Показатели объективного обследования пациентов

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

Примечание: Ме – медиана, Q<sub>1</sub> и Q<sub>3</sub> – нижний (25%) и верхний (75%) квартили соответственно.

Коробочный перкуторный звук регистрировался примерно у половины пациентов: 48,2%(n=40) в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 49,1% (n=27) в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции. Аускультативно выслушивалось ослабленное везикулярное дыхание у 41% (n=34) без прогрессирования бронхиальной обструкции, в группе с прогресси-

рованием бронхиальной обструкции этот показатель встречался в 60% (n=33) случаев. Жесткое дыхание в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции встречалось в 12,7% (n=7). В группе без прогрессирования бронхиальной обструкции - несколько реже – в 9,6% (n=8). Тоны сердца у всех испытуемых были приглушенные. При изучении клинического и биохимического анализов крови разницы по показателям между группами пациентов не прослеживалось. В группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией чаще встречались гиперфибриногенемия и лейкоцитоз (таблица 12).

Таблица 13 - Показатели крови пациентов из обследованных групп

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

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

При проведении электрокардиографии выявлены признаки перегрузки правых отделов сердца у 71,08% (n=59) в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и 81,82% (n=45) в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции,  $\chi^2=2,05, p=0,15$ . По результатам компьютерной томографии выявлено, что эмфизема диагностировалась в трети случаев в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции и с прогрессированием бронхиальной обструкции: 33,4% (n=28) и 34,5% (n=19) соответственно. Хронический брон-

хит встречался у подавляющего большинства испытуемых, несколько чаще в группе с прогрессирующей бронхиальной обструкцией: 81,7% (n=49) против 70,5% (n=55). Значимость была невысокой ( $\chi^2=2,55$ ,  $p=0,64$ ). Анамнестически выявлено, что предыдущие обострения происходили на фоне грибковых и бактериальных инфекций. При посеве мокроты ранее выявлялись *Candida albicans* в 41,6% (n=25) в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции и 23,1% (n=18) в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции,  $\chi^2=5,60$ ,  $p=0,018$ . Также высевались *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Различий по частоте встречаемости тех или иных микроорганизмов между группами не выявлено.

При проведении спирографии выявлено, что исходно ОФВ<sub>16</sub> в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции составлял  $56,1 \pm 2,5\%$  от должного, а в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции значительно ниже,  $45,7 \pm 2,6\%$  от должного,  $p < 0,001$ . Спустя год ОФВ<sub>16</sub> в группе без прогрессирования бронхиальной обструкции практически не изменился ( $55,0 \pm 2,2\%$  от должного), а в группе с прогрессированием бронхиальной обструкции значения ОФВ<sub>16</sub> резко снизились:  $36,1 \pm 2,2\%$  от должного,  $p < 0,001$ . Отличия по другим спирометрическим показателям также были статистически значимы (таблица 14). Среди обследованных отсутствие реакции на бронхолитик было отмечено в 40% случаев заболевания.

Таблица 14 - Показатели спирографии обследуемого контингента

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

Продолжение таблицы 14

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

Примечание:  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – стандартная ошибка среднего. Спирометрические показатели измеряются в процентах от должного, кроме ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ и ОФВ<sub>16</sub>/ФЖЕЛ<sub>6</sub>, измеряемых в %.

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

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

**3.1 Общая характеристика исследованных полиморфизмов**

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

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

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

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5
<i>TRPM8</i>	rs11562975	CC	1	p>0,05
	rs17868387	AA	88	p>0,05
		AG	11	
		GG	1	
	rs58514553	II	58	p>0,05
		ID	35	
		DD	7	
	rs2052030	CC	52	p>0,05
		CG	40	
		GG	8	
	rs17865682	AA	72	p>0,05
		AG	25	
GG		3		
<i>TRPA1</i>	rs920829	GG	73	p>0,05
		AG	25	
		AA	2	
	rs7819749	GG	45	p>0,05
		GT	46	
		TT	9	
	rs4738202	AA	5	p>0,05
		AG	37	
		GG	58	
	rs959976	AA	61	p>0,05
AG		34		
GG		5		
rs959974	GG	19	p>0,05	

<i>TRPA1</i>	rs959974	GT	50	p>0,05	
		TT	31		
	rs6996723	GG	74	p>0,05	
		GA	25		
		AA	1		
<i>TRPV1</i>	rs460716	CC	56	p>0,05	
		CT	38		
		TT	6		
	rs222749	CC	90	p>0,05	
		CT	10		
		TT	-		
	rs222747	CC	54	p>0,05	
		CG	38		
		GG	8		
	rs8065080	AA	37	p>0,05	
		AG	46		
		GG	17		
	<i>TRPV4</i>	rs6606743	AA	27	p>0,05
			AG	50	
			GG	23	
<i>TRPV4</i>	rs7139451	AA	21	p>0,05	
		AT	49		
		TT	30		
	rs11068434	TT	50	p>0,05	
		TG	41		
		GG	9		
	rs3825394	AA	18	p>0,05	
		AC	49		
		CC	33		

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

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

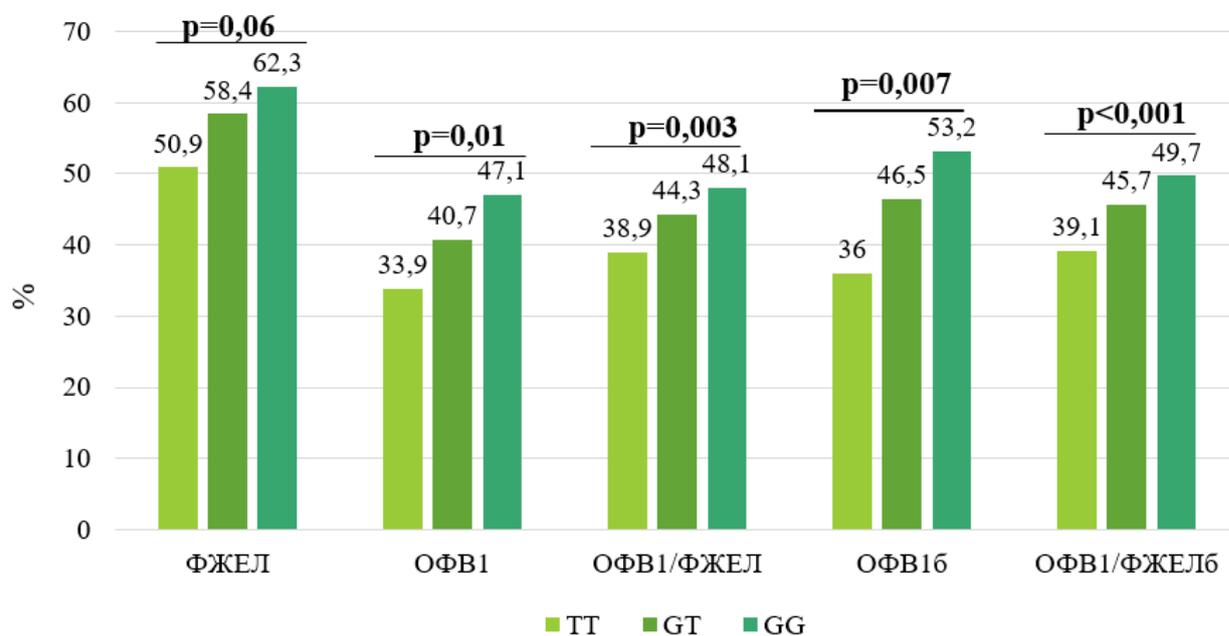
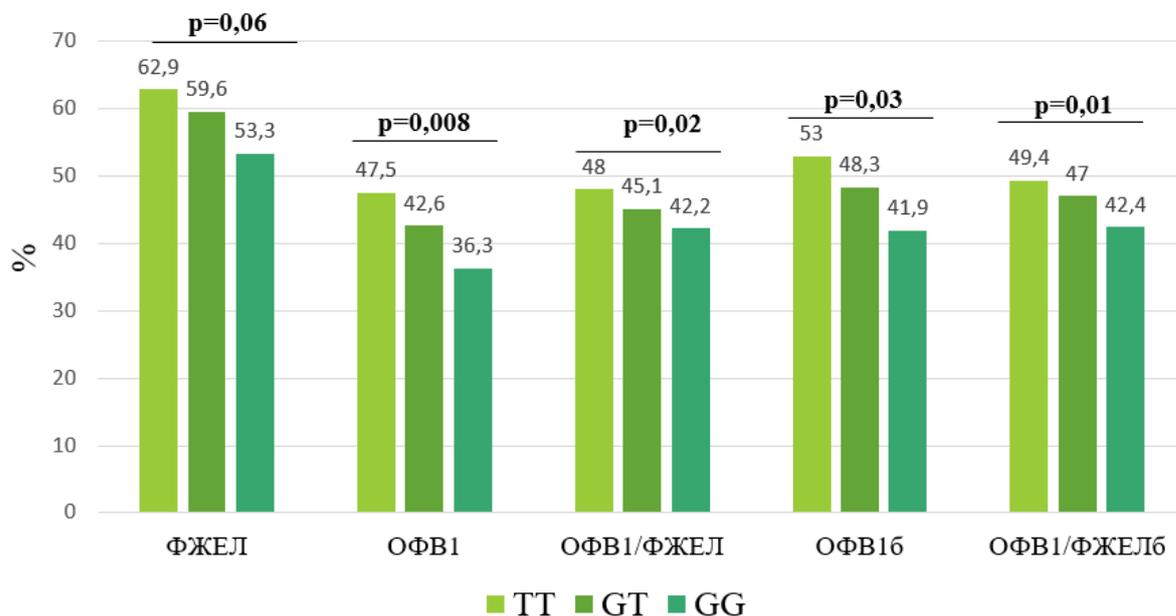


Рисунок 2 - Влияние полиморфизма *TRPA1* rs7819749 на функцию легких у больных ХОБЛ.

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

Аналогичная взаимосвязь со степенью нарушений вентиляционной функции легких была установлена для полиморфизма *TRPA1* rs959974 (рисунок 3). Очевидно, что носители генотипа ТТ по полиморфизму rs959974 имели наиболее высокие значения бронхиальной проходимости, для гетерозиготных больных были характерны промежуточные значения, а для гомозигот GG наруше-

ния вентиляционной функции легких были выражены в наибольшей степени. Статистически значимые различия были отмечены исключительно при сравнении спирометрических параметров между носителями ТТ и GG генотипов.



rs959974 гена *TRPA1* на функцию легких у больных ХОБЛ.

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

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

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

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

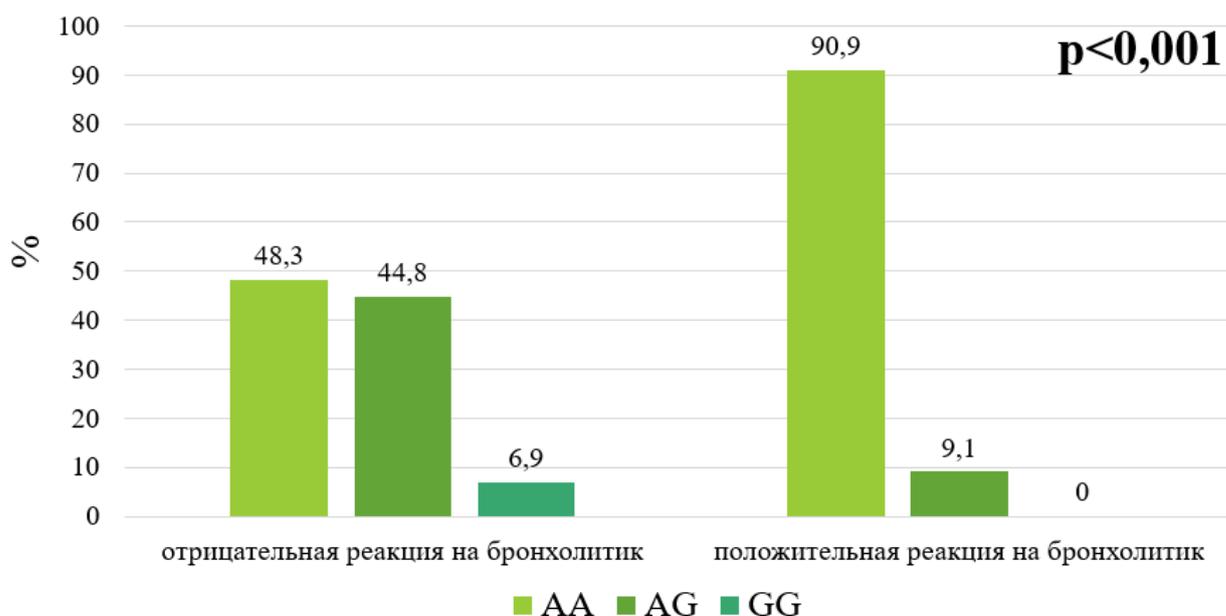


Рисунок 4 - Ассоциация полиморфизма *TRPM8* rs17865682 с реакцией на бронхолитик у больных ХОБЛ.

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

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



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

Носительство G аллеля (генотипы CG или GG) по полиморфизму *TRPM8* rs2052030 сопровождалось снижением проходимости дыхательных путей у больных ХОБЛ. Различия были значимы для показателей ОФВ<sub>1</sub> и ФЖЕЛ, при этом для ЖЕЛ, ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ, ОФВ<sub>16</sub>, ОФВ<sub>16</sub>/ФЖЕЛ<sub>6</sub> отмечались статистически незначимые тенденции (рисунок 6).

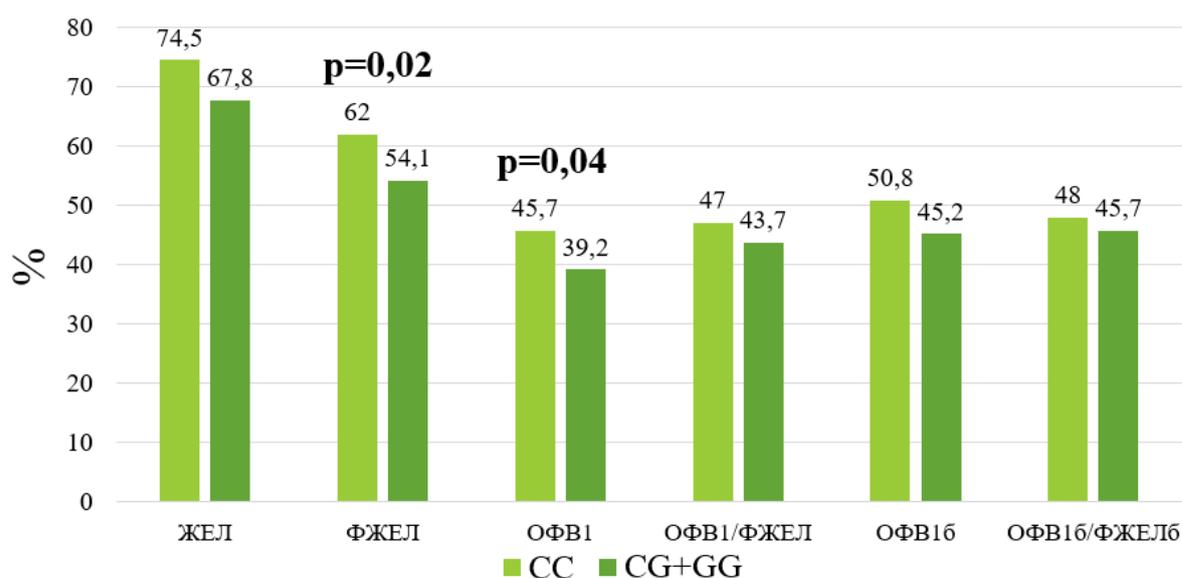


Рисунок 6 - Влияние полиморфизма rs2052030 гена *TRPM8* на функцию легких у больных ХОБЛ.

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

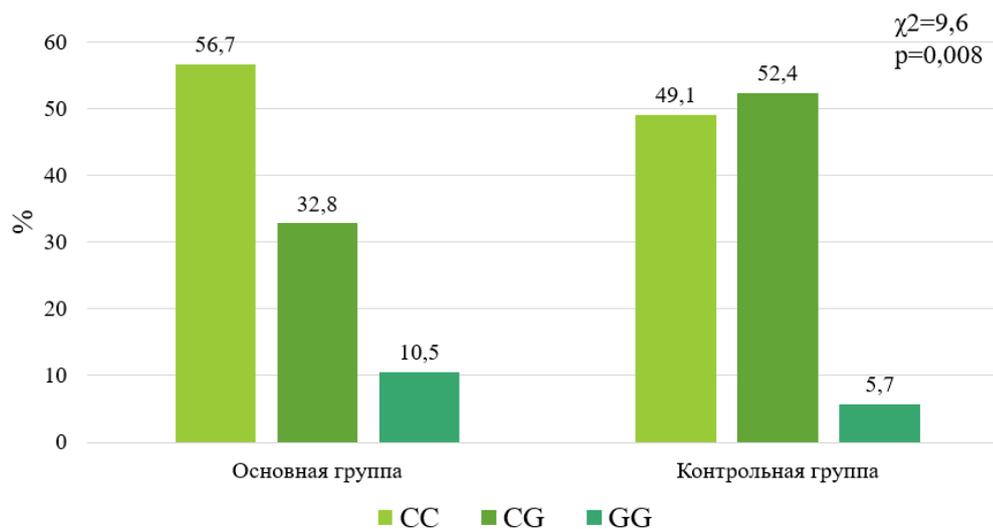


Рисунок 7 - Частота встречаемости генотипов полиморфизма rs2052030 гена *TRPM8* в основной и контрольной группах.

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

ОНП *TRPM8* rs11562975 был проанализирован в доминантной модели наследования (GG против GC+CC), ввиду редкой встречаемости гомозиготных носителей С аллеля. Было установлено, что носители аллеля С в гетеро- и гомозиготном состоянии отличались более низкими значениями спирометрических показателей. Однако отличия были статистически значимыми только для ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ исходно и на фоне действия бронхолитика (рисунок 8).

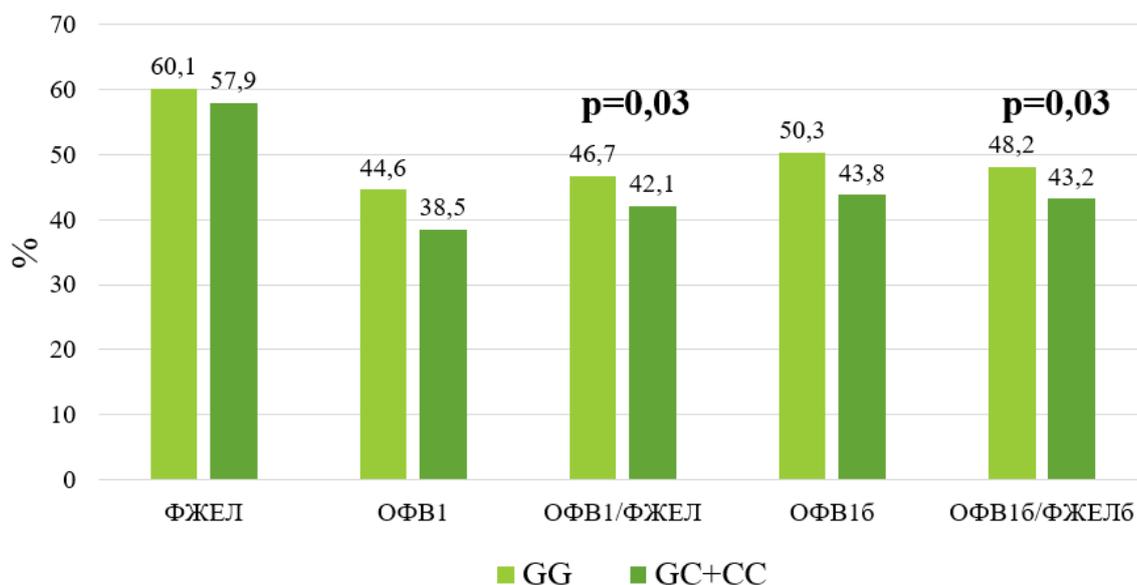


Рисунок 8 - Влияние полиморфизма rs11562975 *TRPM8* на функцию легких у больных ХОБЛ.

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

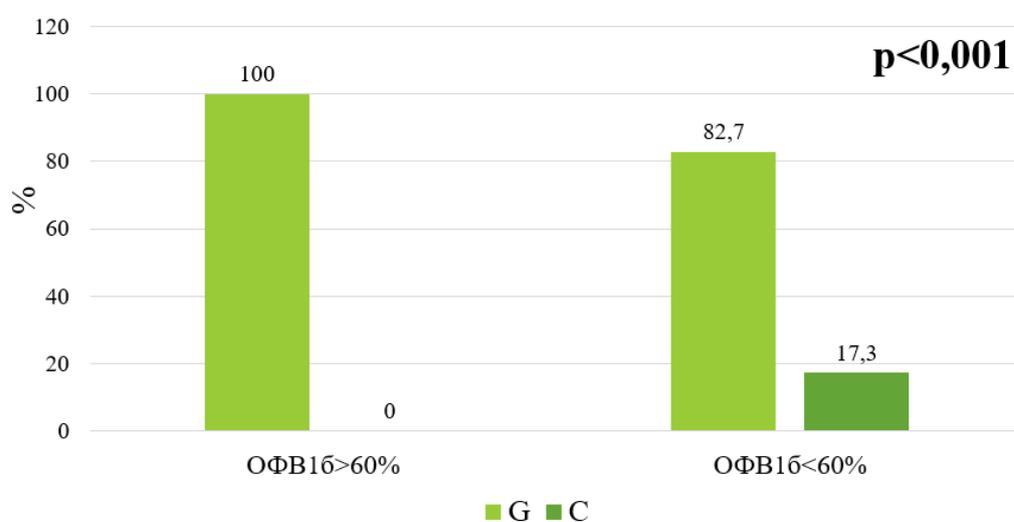


Рисунок 9 - Ассоциация полиморфизма *TRPM8* rs11562975 с  $ОФВ_{16} < 60\%$  у больных ХОБЛ.

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

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

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

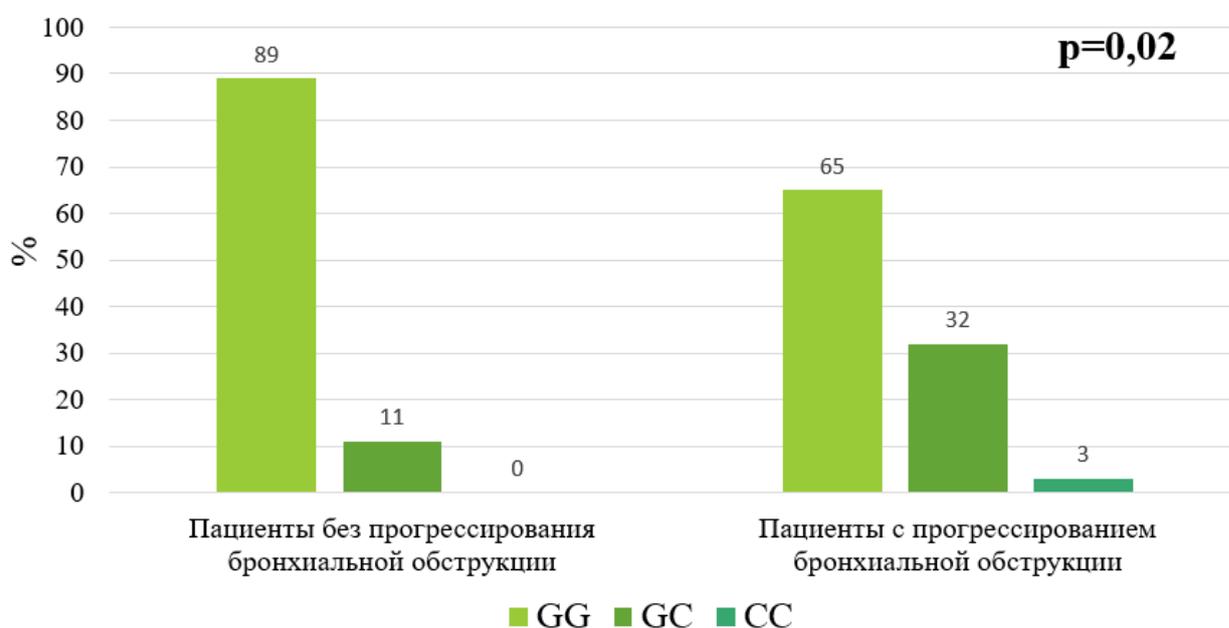


Рисунок 10 - Эффект полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8* на прогрессирование бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.

Носители аллеля С (генотипы GC+CC) отличались более существенным снижением ОФВ<sub>16</sub> в течение года по сравнению с больными, имевшими генотип GG: -0,12[-0,34;-0,03] л против -0,02[-0,13;0,04] л,  $p=0,002$  (рисунок 12).

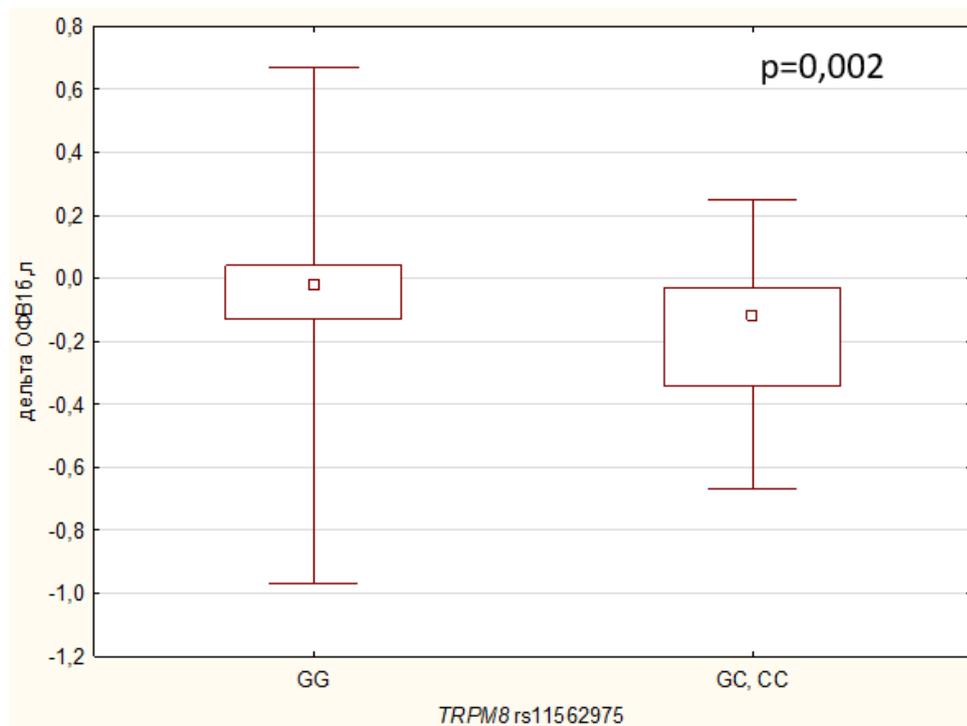


Рисунок 11 - Снижение ОФВ<sub>16</sub> (в литрах) в течение года у носителей G и C аллелей rs11562975 гена *TRPM8*.

Можно сделать вывод, что носительство С аллеля (генотипы GC+CC) по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8* является фактором риска более тяжелого течения ХОБЛ, которое характеризуется прогрессирующим снижением ОФВ<sub>16</sub>.

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

В частности, вне зависимости от пола, возраста и анамнеза курения гетерозиготный генотип по полиморфизму *TRPM8* rs2052030 являлся протективным в отношении ХОБЛ, тогда как при носительстве генотипов CC или GG ве-

роятность наличия заболевания была выше. Учитывая расположение rs2052030 в 3' нетранслируемой области *TRPM8*, его эффект может быть опосредован влиянием на стабильность образующихся мРНК и, соответственно, уровнем экспрессии гена.

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

Прочие полиморфизмы *TRPM8*, несмотря на отсутствие взаимосвязи с ХОБЛ как нозологией, оказывали значимый эффект на показатели вентиляционной функции легких. В качестве одного из наиболее важных результатов – удалось верифицировать модулирующее воздействие полиморфизма rs11562975 *TRPM8* на формирование бронхиальной обструкции под действием курения. Больные ХОБЛ носители аллеля С в гетеро- и гомозиготном вариантах отличались достоверным снижением проходимости дыхательных путей как исходно, так и на фоне действия бронхолитика, по сравнению с больными, имевшими генотип GG. В настоящем исследовании полиморфизм rs11562975 оказался независимым предиктором снижения постбронходилатационного значения ОФВ<sub>1</sub> менее 60% от должного у больных ХОБЛ, что хорошо согласуется с полученными ранее аналогичными результатами для больных БА, злоупотребляющих курением [5]. При изучении данного полиморфизма выяснилось, что носительство С аллеля (генотипы GC+CC) является фактором риска более тяжелого течения ХОБЛ, характеризующегося прогрессированием бронхиальной обструкции. В ходе исследования выяснилось, что С аллель также чаще встречался среди пациентов с прогрессированием бронхиальной обструкции. CC и GC генотипы по rs11562975 гена *TRPM8* характеризовались более существен-

ным снижением  $ОФВ_{16}$  в течение гола по сравнению с носителями GG генотипа.

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

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

## ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TRP КАНАЛОВ НА МАКРОФАГАХ

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

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

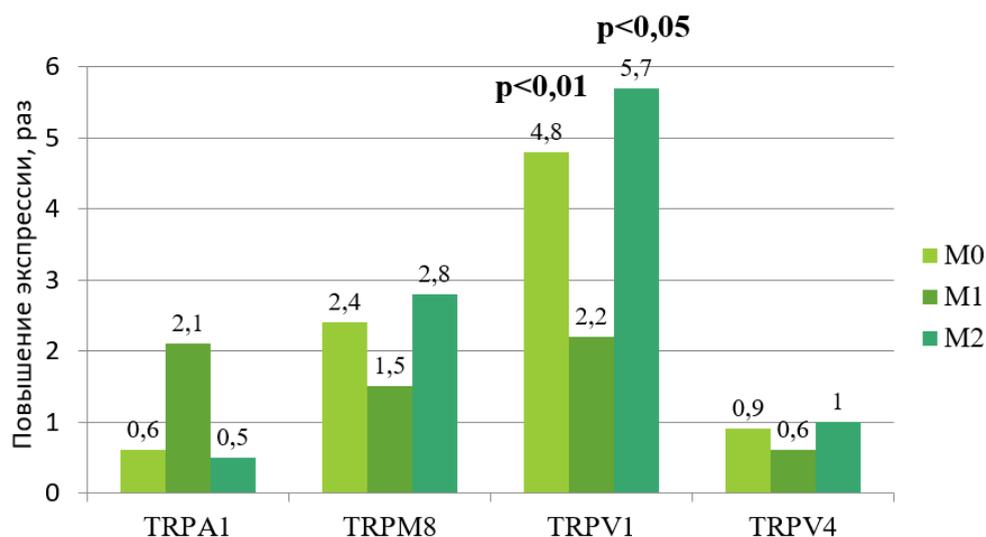


Рисунок 12 – Различия в экспрессии генов TRP на уровне мРНК в макрофагах больных ХОБЛ, по сравнению с макрофагами здоровых лиц.

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

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

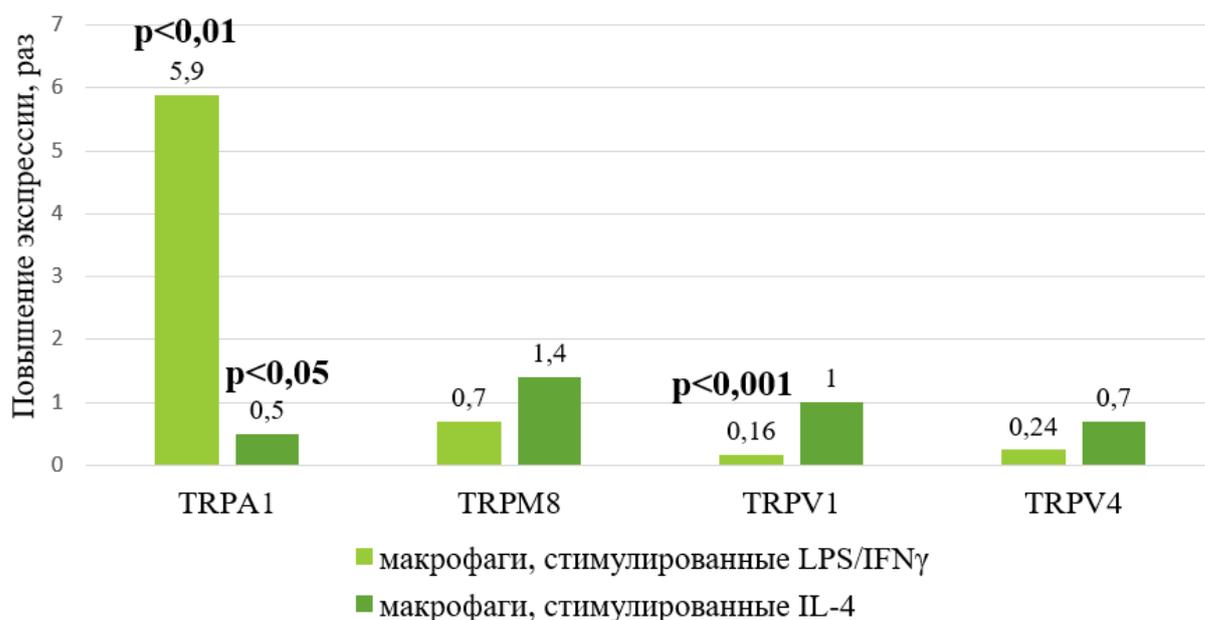


Рисунок 13 – Различия в экспрессии генов TRP на уровне мРНК в макрофагах больных ХОБЛ, стимулированных LPS/IFN- $\gamma$  или IL-4, по сравнению с M0 контрольными клетками, не получавших соответствующей стимуляции.

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

Макрофаги больных ХОБЛ были более чувствительны к основным факторам, вызывающим поляризацию – LPS/IFN- $\gamma$  и IL-4, и реагировали на LPS/IFN- $\gamma$  снижением экспрессии *TRPV1* и *TRPV4*, но увеличением *TRPA1* и *TRPM8*. При этом экспозиция с IL-4 снижала экспрессию *TRPA1*, но не влияла на каналы *TRPV*. По имеющимся данным, активация *TRPA1* на макрофагах сопровождается угнетением поляризации в M1-фенотип [221]. Подобным эффектом обладает и *TRPM8*: в эксперименте ментол подавлял продукцию TNF- $\alpha$  макрофагами и способствовал синтезу IL-10 [121]. Тем не менее, *TRPM8* был необходим для осуществления эффективного фагоцитоза, при его блокаде фагоцитарная активность клеток падала. В отличие от *TRPA1* и *TRPM8*, *TRPV1* и *TRPV4* ассоциированы с провоспалительным ответом макрофагов. Так, блокирование *TRPV1* селективными антагонистами снижало LPS-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 и экспрессию циклооксигеназы-2 [163]. Также, макрофаги, полученные от *TRPV1*-нокаутных мышей, демонстрировали снижение способности к фагоцитозу при стимуляции LPS [83]. Аналогичные эффекты были отмечены для *TRPV4*. Активация этого канала на макрофагах сопровождалась увеличением продукции активных форм кислорода и азота [100], а сам рецептор был необходим для LPS-стимулированного фагоцитоза *E. coli* и латексных частиц [192]. Таким образом, при действии провоспалительного стимула, клетки компенсаторно начинали экспрессировать TRP с противовоспалительной активностью, тогда как в условиях экспозиции с противовоспалительным IL-4, экспрессия *TRPA1* и *TRPM8*, напротив, увеличивалась.

## 4.2 Особенности экспрессии TRP на макрофагах мокроты

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

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

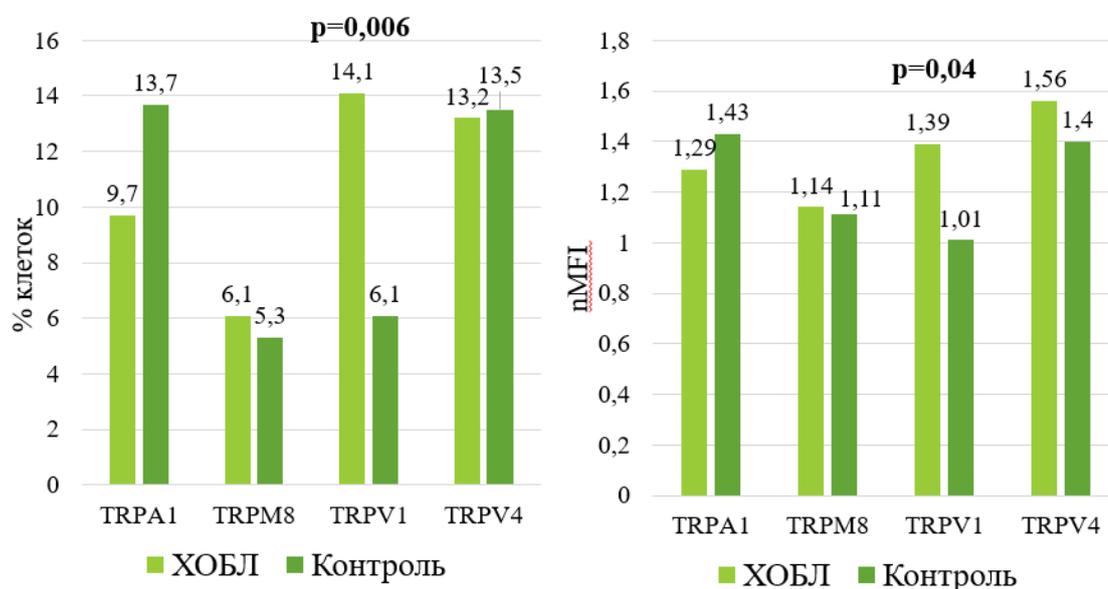


Рисунок 14 – Экспрессия белка каналов TRP в макрофагах мокроты больных ХОБЛ и лиц контрольной группы.

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

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

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

Не обнаружена взаимосвязь экспрессии TRP с индексом курения, однако экспрессия TRPV4 была значимо выше среди активных курильщиков, по сравнению с лицами, курившими в прошлом, либо никогда не курившими. Различие было значимо, как для экспрессии, выраженной в процентах (15,2 [9,3;23,6] % против 9,7 [3,7;13,1] %,  $p=0,006$ ), так и для значений nMFI (1,64 [1,44;1,86] против 1,41 [1,22;1,64],  $p=0,03$ ).

Экспрессия TRPA1 и TRPM8 имела прямую корреляцию с некоторыми показателями бронхиальной проходимости (таблица 17). Так, ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ коррелировал с TRPA1 и TRPM8. Вторым показателем, взаимосвязанным с экспрессией данных TRP был СОС<sub>25-75</sub>, его корреляции с TRPA1 и TRPM8 также были значимы.

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

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

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

#### **4.2.1 Особенности экспрессии TRP каналов у больных с прогрессированием бронхиальной обструкции**

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

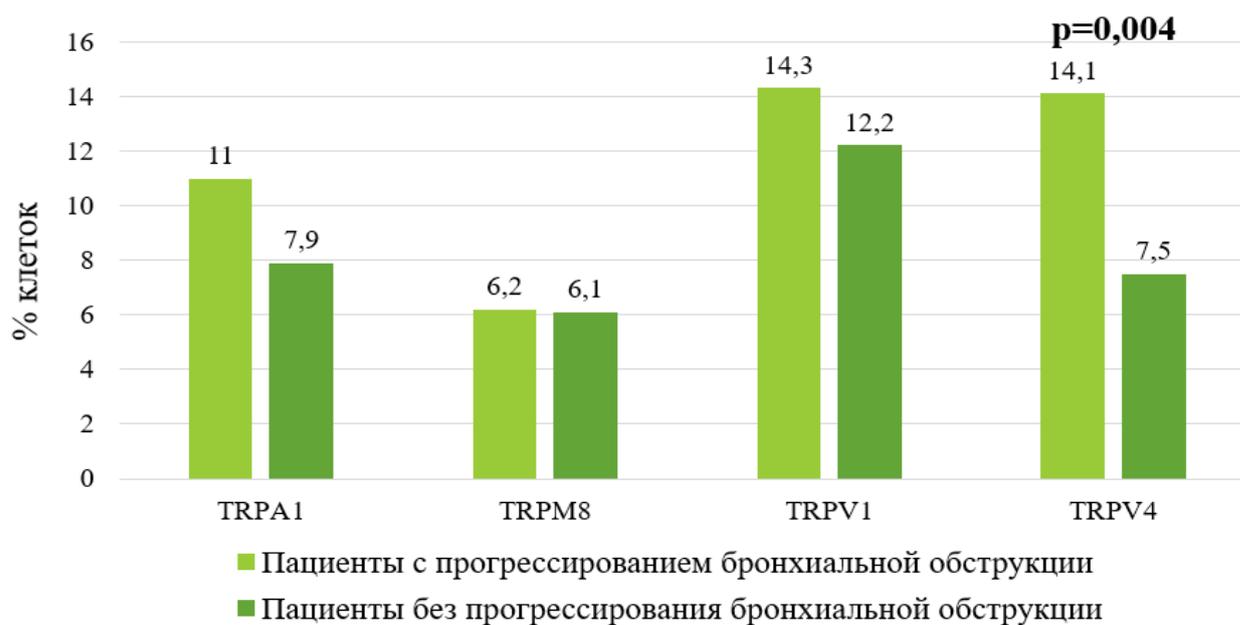


Рисунок 15 - Процентное соотношение макрофагов, экспрессирующих каналы TRP в образцах мокроты больных с прогрессирующей обструкцией и без прогрессирующей обструкцией.

Можно предположить, что высокая экспрессия TRPV4 приводит к прогрессирующей обструкцией за счет процессов ремоделирования дыхательных путей у больных ХОБЛ [116, 33], интенсивность которых, вероятно, превалирует в группе с прогрессирующей обструкцией. Есть данные, что активация канала TRPV4 играет важную роль в развитии легочной гипертензии [205]. Показано, что TRPV4 опосредует провоспалительную гибель клеток, вызванную воздействием сигаретного дыма [181]. Эти данные согласуются с полученными в настоящем исследовании. Поскольку при изучении взаимосвязи курения с уровнем TRP рецепторов вновь статистически значимым оказался канал TRPV4.

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

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

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

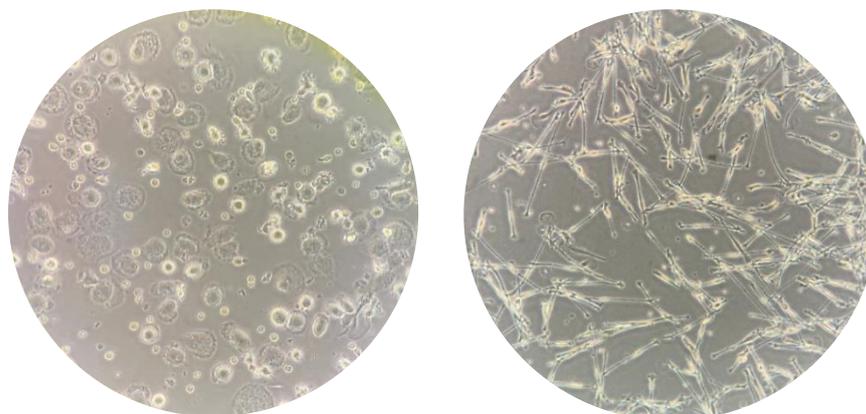


Рисунок 16 – Морфология макрофагов, полученных культивированием с GM-CSF и стимуляцией LPS/IFN- $\gamma$  (M1-поляризация, слева), либо стимуляцией IL-4 (M2-поляризация, справа). Фазовый контраст. Увеличение: 10x20.

При изучении изменения концентрации цитокинов в культуральной среде выяснилось, что в ответ на стимуляцию макрофагов LPS/IFN- $\gamma$  происходил достоверный рост продукции CXCL10, IL-10, IL-4, IL-1b, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, TGFb1. Концентрация IL-2, IL-8 и MCP-1 в ответ на стимуляцию макрофагов LPS/IFN- $\gamma$  существенно не изменялась. Уровень IL-2 был низким и не реаги-

вал на стимуляцию, тогда как IL-8 исходно определялся в концентрациях около 5 нг/мл, а в ответ на LPS/IFN- $\gamma$  происходило его снижение. Продукция MCP-1 также была исходно высокой и достоверно не изменялась под действием LPS/IFN- $\gamma$ . Обращал на себя внимание относительно более высокий прирост уровня CXCL10 у больных ХОБЛ, тогда как в контрольной группе медианное значение его концентрации после стимуляции LPS/IFN- $\gamma$  было более, чем в два раза ниже. В то же время продукция противовоспалительного цитокина IL-10 более существенно возрастала среди лиц контрольной группы, несмотря на то, что исходные концентрации цитокина были сопоставимы в обеих группах (рисунок 17).

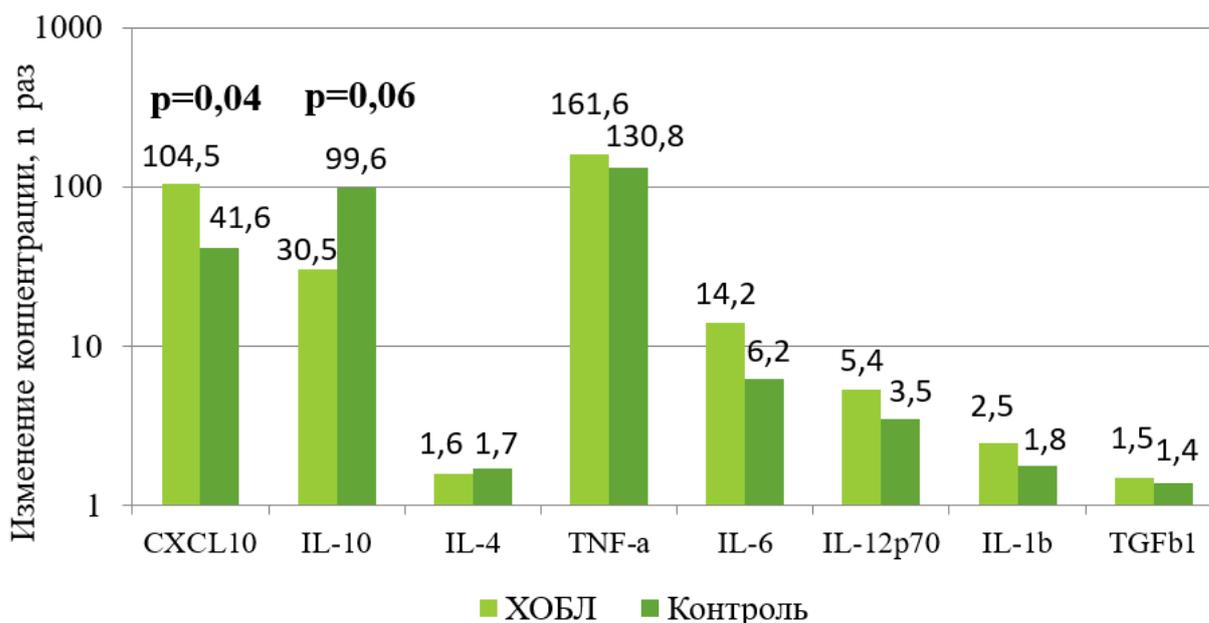


Рисунок 17 – Кратность изменения концентрации цитокинов в культуральной среде в ответ на стимуляцию макрофагов LPS/IFN- $\gamma$  по сравнению с исходным уровнем.

Взаимоотношения исходной экспрессии TRPM8 с продукцией цитокинов под действием LPS/IFN- $\gamma$  характеризовались отрицательной корреляцией с IL-4, CXCL10, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1. Для TRPA1 выявлялась прямая взаимосвязь с реакцией TNF- $\alpha$  и IL-17a. TRPV4 демонстрировал прямую корреляцию с IL-12p70 и

обратную с TGF- $\beta$ 1, для TRPV1 корреляции с цитокинами под действием LPS/IFN- $\gamma$  не выявлено (рисунок 18).

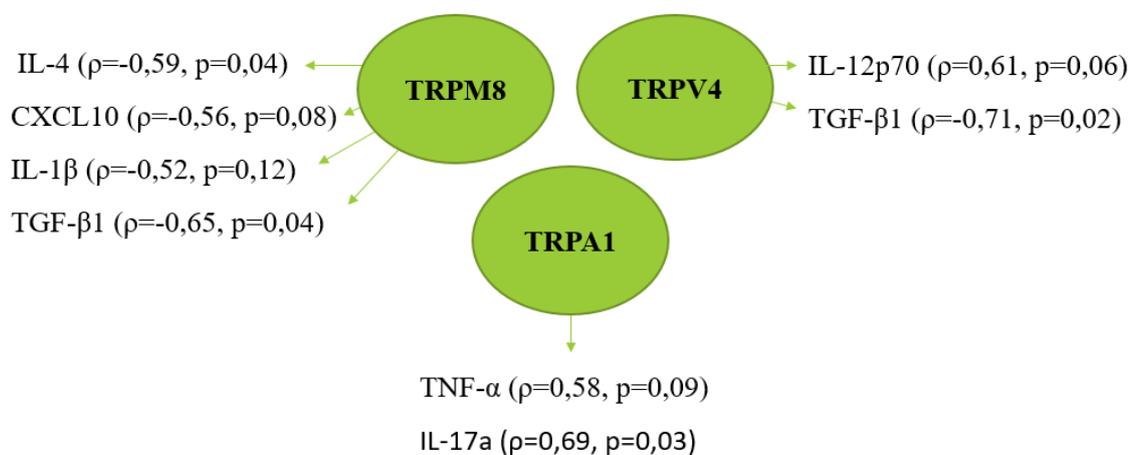


Рисунок 18 – Корреляции экспрессии TRP с продукцией цитокинов под действием LPS/IFN- $\gamma$ .

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

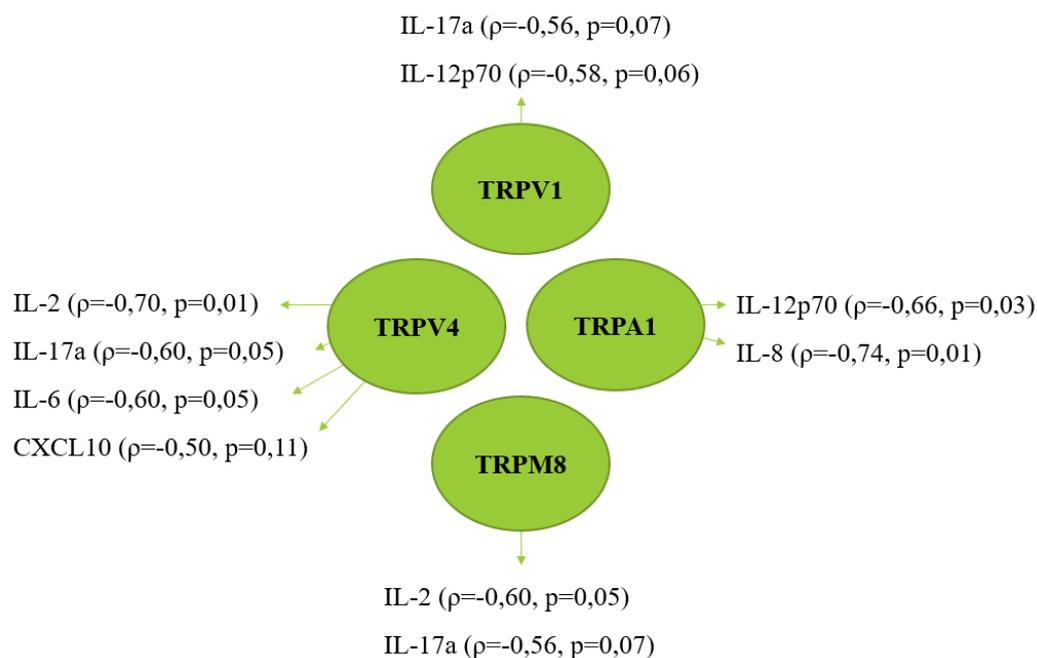


Рисунок 19 - Корреляции экспрессии TRP с продукцией цитокинов под действием IL-4.

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

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

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

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

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

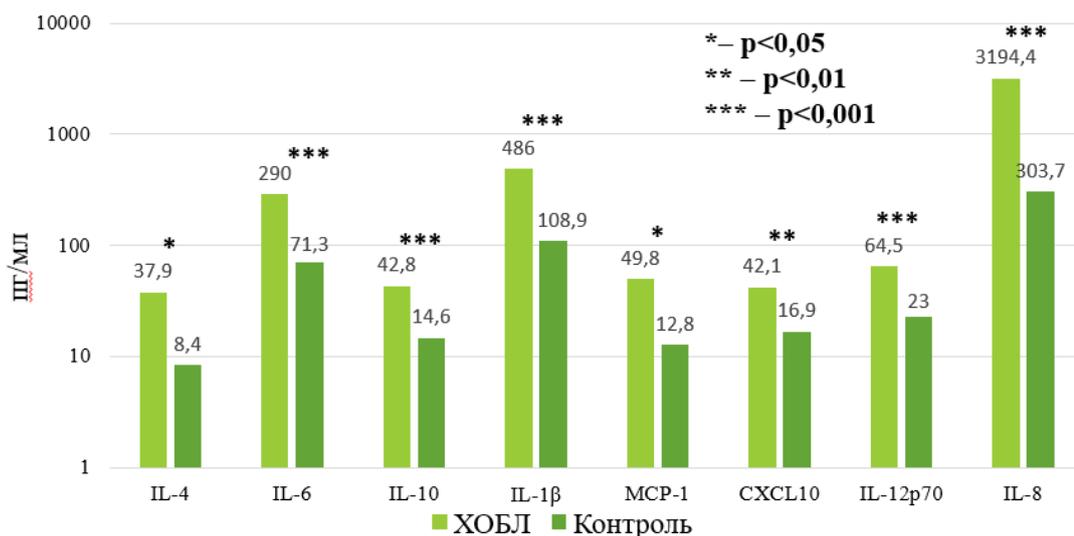


Рисунок 20 – Концентрация цитокинов и факторов ремоделирования в мокроте больных ХОБЛ и лиц контрольной группы.

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

Наибольшее число корреляционных взаимосвязей с концентрацией цитокинов и факторов ремоделирования было обнаружено для канала TRPV4. Его экспрессия была взаимосвязана с уровнями IL-4, CXCL10, MCP-1, TGF- $\beta$ 1, EGF. Дополнительно, для TRPV1 была найдена взаимосвязь с TNF- $\alpha$  и TIMP-1, для TRPM8 – с IL-8 (рисунок 21).

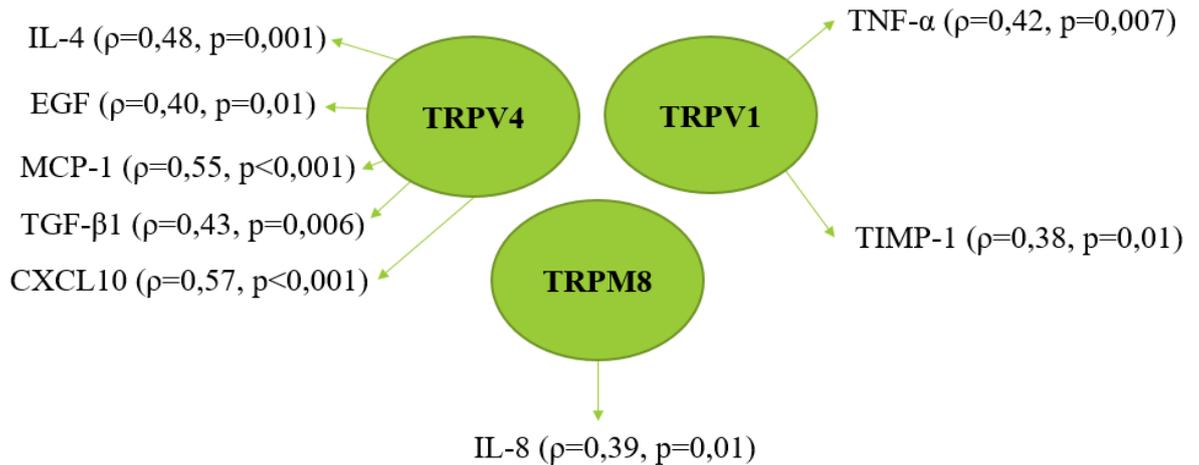


Рисунок 21 - Взаимосвязь концентрации цитокинов и факторов ремоделирования с каналами TRP.

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

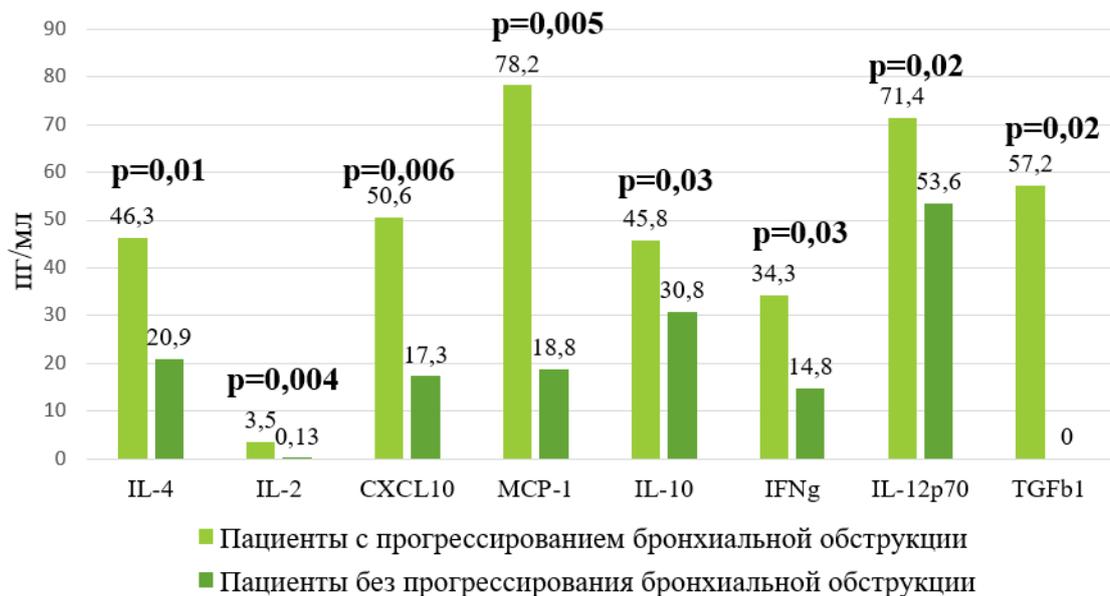


Рисунок 22 - Особенности цитокинового профиля у пациентов с прогрессирующей обструкцией и без прогрессирования бронхиальной обструкции.

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

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

MCP-1 коррелировал с тяжестью ХОБЛ [176]. Предполагается, что TGF $\beta$ -1 является медиатором фиброза периферических дыхательных путей у больных ХОБЛ, а IFN- $\gamma$  ответственен за активацию макрофагов [86].

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

Таким образом, больные ХОБЛ характеризуются высоким уровнем воспаления в дыхательных путях, о чем говорят повышенные концентрации цитокинов в мокроте. Удалось установить некоторые взаимосвязи экспрессии TRP каналов с воспалительными маркерами. Так TRPV1, который был гиперэкспрессирован на макрофагах больных ХОБЛ, был также взаимосвязан с уровнем TNF- $\alpha$ . Экспрессия TRPV4, увеличенная у курящих лиц, коррелировала с концентрациями некоторых цитокинов, в том числе противовоспалительными (IL-4 и TGF- $\beta$ 1) и провоспалительными (CXCL10, MCP-1, IFN- $\gamma$ ). TRPM8 был взаимосвязан с уровнем провоспалительного IL-8. Уровни цитокинов в мокроте не

были взаимосвязаны с показателями функции внешнего дыхания у обследованных больных ХОБЛ. Таким образом, предполагаемое влияние TRP на бронхиальную проходимость не обязательно опосредовано продукцией изученного спектра цитокинов, а может быть вызвано какими-либо неучтенными факторами.

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

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

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

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

Вид разработанного прогностического уравнения:

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

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

ВОЗР – переменная, отражающая возраст в годах;

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

рассчитывают вероятность (P) формирования ХОБЛ по формуле:

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

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

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

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

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

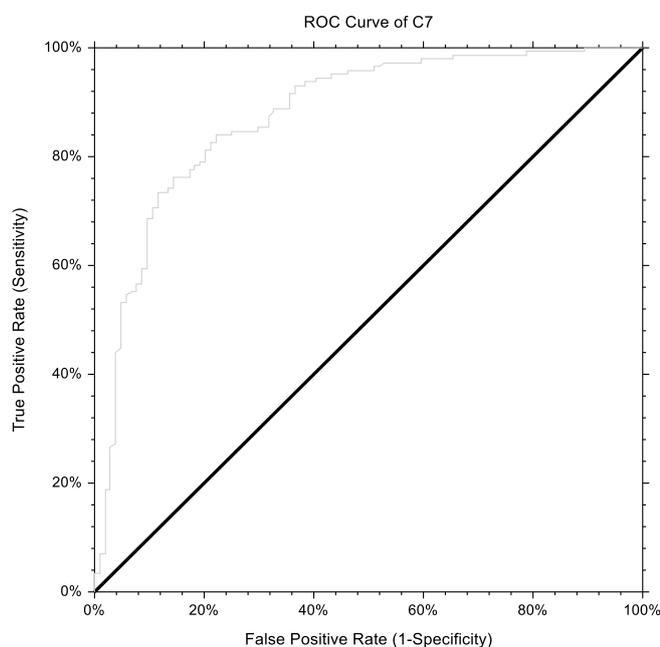


Рисунок 23 - ROC – кривая, построенная на основании математического уравнения по прогнозированию риска формирования ХОБЛ среди курящих лиц в зависимости от ОНП rs2052030 гена *TRPM8*, возраста пациента и индекса курения.

Ниже приведены примеры использования предложенного способа:

Пример 1. Пациент М., 51 год. Первично обследован во время прохождения профилактического осмотра. Из анамнеза - курит с 20 лет по 10 сигарет в день. Показатели спирометрии в пределах нормы:  $ОФВ_1$  – 88,5%,  $ОФВ_1/ФЖЕЛ$

– 72,1%. Произведен забор крови для генетического анализа, по результатам был выявлен генотип СС по полиморфизму rs2052030 гена *TRPM8*. Проведена беседа о необходимости отказа от курения.

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

$$\text{Возраст через 5 лет} = 51 + 5 = 56 \text{ лет.}$$

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

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

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

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

Несмотря на рекомендации, в течение последующих 5 лет пациент не отказался от курения и не сократил число выкуриваемых сигарет в день. При повторном визите – жалобы на регулярный продуктивный кашель и одышку (степень I по шкале mMRC). По результатам спирометрического исследования выявлено снижение  $\text{ОФВ}_1$  до 68,8% и  $\text{ОФВ}_1/\text{ФЖЕЛ}$  – до 62,3%. На фоне действия бронхолитика  $\text{ОФВ}_1$  – 87,9%,  $\text{ОФВ}_1/\text{ФЖЕЛ}$  – 67,2%, что соответствует диагнозу ХОБЛ с вентиляционными нарушениями легкой степени (GOLD stage I). Таким образом, сделанный прогноз оказался верным.

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

Расчетная вероятность наличия ХОБЛ на момент обращения:

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

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

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

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

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

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

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

Вид разработанного прогностического уравнения:

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

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

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

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

*CAT* – результат теста оценки ХОБЛ, выраженный в баллах.

Вычисление вероятности прогрессирования бронхиальной обструкции производится по формуле:

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

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

$F$  – значение, полученное вычислением по формуле.

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

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

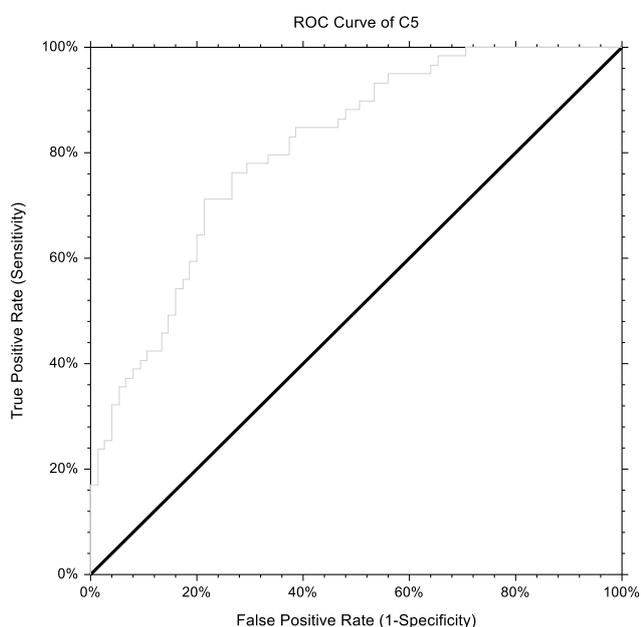


Рисунок 24 – ROC-кривая, построенная на основании математического уравнения по прогнозированию прогрессирующей обструкции у пациентов с ХОБЛ в зависимости от генотипа по ОНП rs11562975 гена *TRPM8*,  $ОФВ_{16}$ , частоты обострений, *CAT*.

Ниже приводятся примеры использования разработанного способа прогнозирования течения ХОБЛ.

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

Вне обострения произведен забор крови для генетического анализа, в результате был выявлен генотип GC по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8*; при проведении спирографии  $ОФВ_{16}$  равен 42% (1,45л). За предшествующий год произошло 3 обострения ХОБЛ. Результат тестирования САТ – 28 баллов.

На основании разработанного способа прогнозирования прогрессирующей обструкции произведен расчет:

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

Поскольку полученное значение  $P$  (0,801) больше 0,71, можно предположить о наличии у пациента высокого риска прогрессирующей обструкции. При повторной спирометрии через 12 месяцев  $ОФВ_{16}$  составило 34,6% (1,18л). Таким образом, в течение года  $ОФВ_{16}$  уменьшился на 270мл, что значительно превышает порог в 50мл. Сделанный прогноз оказался верным.

Пример 2. Пациент Т., 64 г. Диагноз: Хроническая обструктивная болезнь легких, смешанный тип, тяжелой степени тяжести, ремиссия. ДН I. ИК 48 пачка-лет. Вне обострения проведено дополнительное обследование: в результате генотипирования по ОНП rs11562975 гена *TRPM8* выявлено носительство CC генотипа; при проведении спирографии  $ОФВ_{16}$  составил 30,3% (1,03л). За последний год зафиксировано 4 обострения ХОБЛ. Результат тестирования САТ – 23 балла.

На основании разработанного способа прогнозирования прогрессирующей обструкции произведен расчет:

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

$$+ 0,15464 \times \text{САТ} = - 5,20318 + 0,89733 \times 1 + 0,05320 \times 30,3 + \\ + 0,67048 \times 1 + 0,15464 \times 23 = 1,793$$

$$P = 1 / (1 + e^{-F}) = 1 / (1 + 2,718^{-1,793}) = 0,857.$$

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

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

На основании разработанного способа прогнозирования прогрессирующей обструкции произведен расчет:

$$F = - 5,20318 + 0,89733 \times \text{rs11562975} + 0,05320 \times \text{ОФВ}_{16} + 0,67048 \times \text{ЧО} + \\ + 0,15464 \times \text{САТ} = - 5,20318 + 0,89733 \times 0 + 0,05320 \times 40 + \\ + 0,67048 \times 0 + 0,15464 \times 24 = 0,356$$

$$P = 1 / (1 + e^{-F}) = 1 / (1 + 2,718^{-0,356}) = 0,588.$$

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

Получены данные, указывающие на способность некоторых ОНП генов *TRPM8* и *TRPA1* влиять на развитие ХОБЛ у курящих лиц, а также оказывать эффект на степень бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ. Гомозиготные генотипы GG и CC ОНП rs2052030 гена *TRPM8* служат предиктором формирования ХОБЛ у курящих. В свою очередь, генотип CG является протективным в возникновении данного заболевания.

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

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

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

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

В ходе исследования установлена взаимосвязь TRP рецепторов и про- и противовоспалительных цитокинов. Альвеолярные макрофаги у больных ХОБЛ отличаются смешанным воспалительным фенотипом, однако провоспалительный компонент воспаления преобладает, что находит свое отражение в высоких концентрациях провоспалительных цитокинов *in vivo* и *in vitro*.

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

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

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

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

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

## ВЫВОДЫ

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

2. Больные ХОБЛ, имеющие генотипы GC или CC по полиморфизму rs11562975 гена TRPM8, находятся в группе риска по прогрессированию бронхиальной обструкции; величина ежегодного снижения ОФВ<sub>1</sub> у данных пациентов значимо больше, по сравнению с носителями генотипа GG.

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

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

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

6. Использование комплекса биомаркеров, включая генотип по полиморфизму rs2052030 гена TRPM8, возраст и индекс курения, в составе разработанной математической модели позволяет прогнозировать риск формирования ХОБЛ среди курящих лиц.

7. Разработанный способ, одновременно учитывающий генотип по полиморфизму rs11562975 гена TRPM8, частоту обострений, выраженность

симптомов согласно тесту САТ и значение  $ОФВ_{16}$ , позволяет прогнозировать наличие прогрессирующей бронхиальной обструкции у пациентов с ХОБЛ.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

ВОЗР – переменная, отражающая возраст в годах;

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

рассчитывают вероятность (P) формирования ХОБЛ по формуле:

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

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

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

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

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

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

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

ОФВ<sub>16</sub> – количественная переменная, отражающая постбронходилатационный объем форсированного выдоха за 1 секунду, выражаемая в процентах от должного.

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

САТ – тест оценки ХОБЛ, выраженный в баллах.

Вычисление вероятности прогрессирования бронхиальной обструкции производится по формуле:

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

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

$F$  – значение, полученное вычислением по формуле.

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

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

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

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

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Авдеев, С. Н. Легочная гиперинфляция у больных ХОБЛ. / С. Н. Авдеев // Практическая пульмонология. - 2006. – 2. – С. 11-17.
2. Анаев, Э.Х. Биологические маркеры при хронической обструктивной болезни легких. / Э.Х. Анаев // Практическая пульмонология. – 2018. - 1. – С. 26-32.
3. Андреева, Е. А. Ранняя диагностика хронической обструктивной болезни легких - миф или реальность? / Е. А. Андреева, О. Ю. Кузнецова, М. А. Похазникова. // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. -2011. -3 (4). – С. 136-140.
4. Архипов, В.В. Частота встречаемости отдельных фенотипов хронической обструктивной болезни легких в Российской Федерации, их характеристики и подходы к лечению. / В.В. Архипов, Д.Е. Архипова, Е.Ю. Стукалина // Практическая пульмонология. - 2016. - 3. - С.20–25.
5. Гассан, Д.А. Полиморфизм гена TRPM8 и курение как факторы формирования тяжелой бронхиальной обструкции у больных бронхиальной астмой. / Д.А. Гассан, Д.Е. Наумов, О.О. Котова, А.Г. Приходько, В.П. Колосов // Бюлл. физиол. патол. дыхания. – 2017. – 65. – С.24–30.
6. Зыков, К.А. Фенотипические характеристики пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, имеющих стаж курения, в Российской Федерации: данные исследования POPE-study. / К.А. Зыков, С.И. Овчаренко, С.Н. Авдеев и др. // Пульмонология. – 2020. - 30 (1). – С.42-52. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-1-42-52
7. Казиминова, О. В. Эволюция взглядов на проблему ХОБЛ. / О. В. Казиминова, М. А. Газалиева. // Медицина и экология. – 2017. – 83. - С. 29-37.
8. Карнаушкина, М.А. Клинический случай тромбоэмболии легочной артерии у пациента с эозинофильным фенотипом хронической обструктивной болезни легких. / М.А.Карнаушкина, Р.С. Данилов // Медицинский алфавит. - 2019. - 3(29). – С.40-45. [https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-3-29\(404\)-40-45](https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-3-29(404)-40-45)

9. Козлов, Е. В. Депрессивные расстройства у больных с хронической обструктивной болезнью легких в условиях коморбидности. / Е.В. Козлов, Е.В. Деревянных, Н.А. Балашова [и др.] // Russian Journal of Education and Psychology, 2022. – 13. – 2. – С. 126-144.
10. Концевая, А.В. Экономический ущерб от болезней органов дыхания и хронической обструктивной болезни легких в Российской Федерации в 2016 году / А.В. Концевая, Д.К. Муканеева, Ю.А. Баланова // Пульмонология. – 2019. - 29(2) – С.159-166. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2019-29-2-159-166>.
11. Котляров, С.Н. Физическая слабость как фенотип ХОБЛ. / С.Н. Котляров, К.А. Мотынга / Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2020. – 8. – 4. - С. 599-608.
12. Котова, О.О. Влияние полиморфизмов гена *TRPA1* на предрасположенность к формированию бронхиальной астмы. / О.О. Котова, Д.А. Гассан, Д.Е. Наумов, Е.Г. Шелудько // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2019. - 73. - С.27–33. doi: 10.36604/1998-5029-2019-73-27-33.
13. Котова, О.С. Влияние профессионального фактора риска на качество жизни при хронической обструктивной болезни легких. / О.С. Котова, Л.А. Шпагина, С.А. Кармановская [и др.] // Медицина труда и промышленная экология. - 2015. -9. – С.77-78.
14. Методические руководства Российского респираторного общества. Спирометрия. / А.Г.Чучалин [и др.] // 2021г. - С.29-34. <http://spulmo.ru/obrazovatelnye-resursy/federalnye-klinicheskie-rekomendatsii>.
15. Мукатова, А.М. Коморбидные состояния при ХОБЛ. / А.М. Мукатова, М.А. Жанузаков, В.П. Селедцов [и др.] // Наука о жизни и здоровье. - 2014. - 3. – С. 94-97.
16. Наумов, Д.Е. Особенности экспрессии рецептора TRPM8 в респираторном тракте больных бронхиальной астмой. / Д.Е. Наумов, Д.А. Гассан, К.Ф. Килимиченко [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2018. – 69. – С.19-24.

17. Никонова, А. А. Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких. / А. А. Никонова, М.Р. Хаитов, Р.М. Хаитов // Медицинская иммунология. - 2017. - 19 (6). – С. 657-672.
18. Раджабова, Г.Б. Качество жизни у больных хронической обструктивной болезнью легких с нарушениями сна. / Г.Б. Раджабова, М.Б. Джаббарова // Биология и интегративная медицина. 2022. - 2 (55). - С.72-83.
19. Респираторная медицина: руководство: в 3 т. / под ред. А. Г. Чучалина. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Литтерра. - 2017. - Т. 1. – С.194. 1.
20. Сарбаева, Н.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. / Н.Н. Сарбаева, Ю.В. Пономарева, М.Н. Милякова // Гены и клетки. - 2016. - 11 (1). –С. 9-17.
21. Со, А.К. Предикторы неблагоприятного исхода при обострении хронической обструктивной болезни легких. / А.К. Со, С.Н. Авдеев, Г.С. Нуралиева [и др.] // Пульмонология. – 2018. - 28 (4). – С.446-452. DOI: 10.18093/0869-0189-2018-28-4-446-452
22. Танченко, О.А. Ожирение, метаболические нарушения и артериальная гипертония у больных хронической обструктивной болезнью легких: современные представления о коморбидности (обзор литературы). / О.А. Танченко, С. В. Нарышкина // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2016. - 59. - С.109-118.
23. Трофименко, И. Н. Сравнительная клинико-функциональная характеристика бронхитического и эмфизематозного фенотипов хронической обструктивной болезни лёгких. / И. Н. Трофименко, Б. А. Черняк // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). - 2011. - 105 (6). – С. 59-63.
24. Трушенко, Н.В. Фенотипы хронической обструктивной болезни легких - путь к персонализированной терапии. / Н.В. Трушенко, М.И. Сопова, В.И. Сопова // Практическая пульмонология. – 2019. - 3. - С. 32-39.
25. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по хронической обструктивной болезни легких. / А.Г.Чучалин,

С.Н. Авдеев, З.Р. Айсанов [и др.] // 2021г. - С.10. <http://spulmo.ru/obrazovatelnye-resursy/federalnye-klinicheskie-rekomendatsii>.

26. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по бронхиальной астме. / А.Г.Чучалин [и др.] // 2021г. - С.21. <http://spulmo.ru/obrazovatelnye-resursy/federalnye-klinicheskie-rekomendatsii>.

27. Шапорова, Н.Л. ХОБЛ: роль инфекционных обострений и их профилактики. / Н.Л. Шапорова, В.Н. Марченко, В.Н. Яблонская // Медицинский совет. -2014. – 17. – С. 8-9.

28. Шмелев, Е. И. Свежий взгляд на ХОБЛ. / Шмелев, Е. И. // Практическая пульмонология. – 2011. – 4. – С. 51-54.

29. Шпагина, ЛА. Обострения хронической обструктивной болезни легких, ассоциированной с воздействием промышленных аэрозолей или курением табака, вызванные вирусной, бактериальной или вирусно-бактериальной инфекцией. / ЛА Шпагина, ОС Котова, ИС Шпагин [и др.] // Пульмонология. – 2022. - 32(2). – С.189-198. DOI: 10.18093/0869-0189-2022-32-2-189-198.

30. Adeloye, D. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. // D Adeloye, P Song, Y Zhu, H Campbell. / Lancet Respir Med 2022; [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00511-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00511-7)

31. Agustí, A. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. / A Agustí, LD Edwards, SI Rennard et al. // PLoS One. – 2012. - 7(5). - e37483.

32. Akata, K. Lung Macrophage Functional Properties in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / K. Akata, S.F. van Eeden // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – 21. – С.853. doi: 10.3390/ijms21030853.

33. Al-Azzam, N. Transient Receptor Potential Vanilloid channel regulates fibroblast differentiation and airway remodeling by modulating redox signals through NADPH Oxidase 4. / N. Al-Azzam, L.R. Teegala, S. Pokhrel [et al.] // Sci Rep. – 2020. -10. – С.9827. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66617-2>.

34. Almaraz, L. TRPM8 Handb./ L Almaraz, J-A Manenschijn, E de la Peña, F Viana. // *Exp. Pharmacol.* - 2014. - 222. - C. 547–579. 10.1007/978-3-642-54215-2\_22.
35. Andersson, D.A. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. / D.A. Andersson, C. Gentry, S. Moss. // *J. Neurosci.* - 2008. - 28. - C.2485-2494
36. Andrè, E. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. / E Andrè, B Campi, S Materazzi [et al.] // *J. Clin. Invest.* - 2008. - 118. - C.2574–2582. 10.1172/JCI34886.
37. Annesi-Maesano, I. Call to action: air pollution, asthma, and allergy in the exposome era. / I. Annesi-Maesano, CN Maesano, B Biagioni, G D'Amato, L Cecchi. // *J Allergy Clin Immunol.* - 2021. - 148. - C.70-72
38. Arif, R. Treatment of pulmonary hypertension associated with COPD: a systematic review./ R Arif, A Pandey, Y Zhao, K Arsenault-Mehta, D Khoujah, S Mehta. // *ERJ Open Research.* - 2022. - 8. - 00348-2021; DOI: 10.1183/23120541.00348-2021.
39. Arora, S. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. / S. Arora, K. Dev, B. Agarwal [et al.] // *Immunobiology.* - 2018. - 223. - C.383–396. doi: 10.1016/j.imbio.2017.11.001.
40. Barnes, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease. / Barnes P.J., Burney P.G., Silverman E.K. [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primers.* - 2015. - 1. - 15076. doi: 10.1038/nrdp.2015.76
41. Barnes, P.J. Oxidative stress-based therapeutics in COPD. / P.J. Barnes // *Redox Biol.* - 2020. - 33. - 101544. doi: 10.1016/j.redox.2020.101544.
42. Barnes, P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. / Barnes P.J. // *J. Clin. Investig.* - 2008. - 118. - C. 3546–3556. doi: 10.1172/JCI36130.
43. Barroso, M.V. Propolis reversed cigarette smoke-induced emphysema through macrophage alternative activation independent of Nrf2. / M.V. Barroso, I.

Cattani-Cavaliere, L. de Brito-Gitirana [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2017. – 25. – C.5557–5568. doi: 10.1016/j.bmc.2017.08.026.

44. Baxter, M. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. / M Baxter, S Eltom, B Dekkak, L Yew-Booth, ED Dubuis, SA Maher, MG Belvisi, MA Birrell. // *Thorax.* – 2014. – 69. – C.1080–1089. 10.1136/thoraxjnl-2014-205467.

45. Bazzan, E. Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity. / E. Bazzan, G. Turato, M. Tine et al. // *Respir. Res.* – 2017. – 18. – C.40. doi: 10.1186/s12931-017-0522-0.

46. Bazzan, E. Symptomatic smokers without COPD have physiological changes heralding the development of COPD. / E Bazzan, U Semenzato, G Turato [et al.] // *ERJ Open Research.* – 2022. – 8 (2). – 00202-2022; DOI: 10.1183/23120541.00202-2022.

47. Belchamber, K.B.R. Macrophage Dysfunction in Respiratory Disease. / K.B.R. Belchamber, L.E. Donnelly // *Results Probl. Cell Differ.* – 2017. – 62. – C.299–313. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0\_12.

48. Benjafield, A. An estimate of the European prevalence of COPD in 2050. / A Benjafield, D Tellez, M Barrett [et al.] // *European Respiratory Journal.* – 2021. – 58. - OA2866; DOI: 10.1183/13993003.congress-2021.OA2866

49. Bewley, M.A. Impaired Mitochondrial Microbicidal Responses in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Macrophages. / M.A. Bewley, J.A. Preston, M. Mohasin [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2017. – 196. – C.845–855. doi: 10.1164/rccm.201608-1714OC.

50. Bhatt, SP. Association between functional small airway disease and FEV1 decline in chronic obstructive pulmonary disease. / SP Bhatt, X Soler, X Wang [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2016. – 194. – C.178–184. <https://doi.org/10.1164/rccm.201511-2219OC>.

51. Bhatt, SP. Smoking duration alone provides stronger risk estimates of chronic obstructive pulmonary disease than pack-years. / S.P. Bhatt, Y.I. Kim, K.F.

Harrington. // *Thorax*. – 2018. – 73(5). – C.414-421. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210722. PMID: 29326298; PMCID: PMC5903957.

52. Biener, A. Prevalence and treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the United States. / Biener A, Decker SL, Rohde F. // *JAMA*. – 2019. – 322. – C. 602. doi:[10.1001/jama.2019.10241](https://doi.org/10.1001/jama.2019.10241)

53. Birrell, M.A. TRPA1 agonists evoke coughing in guinea-pig and human volunteers. / M.A. Birrell [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2009. – 180. – C. 1042–1047.

54. Bonvini, S.J. Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 and airway sensory afferent activation: Role of adenosine triphosphate. / S.J. Bonvini [et al.] // *J Allergy Clin Immunol*. – 2016. – 138(1). – C.249–261.

55. Bucchioni, E. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. / E. Bucchioni, S.A. Kharitonov, L. Allegra, P.J. Barnes // *Respir. Med*. – 2003. – 97. – C.1299–1302. doi: 10.1016/j.rmed.2003.07.008.

56. Büch, T.R. Functional expression of the transient receptor potential channel TRPA1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells. / T.R. Büch, E.A. Schäfer, M.T. Demmel [et al.] // *Chem. Biol. Interact*. – 2013. – 206(3). – C.462–471.

57. Bui, DS. Childhood predictors of lung function trajectories and future COPD risk: a prospective cohort study from the first to the sixth decade of life. / DS Bui, CJ Lodge, JA Burgess, AJ Lowe, J Perret, MQ Bui [et al.] // *Lancet Respir Med*. – 2018. – 6. – C.535–544.

58. Butler, CC. C-reactive protein testing to guide antibiotic prescribing for COPD exacerbations. / CC Butler, D Gillespie, P White [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 2019. – 381(2). – C.111–120.

59. Byrne, A.J. Pulmonary macrophages: Key players in the innate defence of the airways. / A.J. Byrne, S.A. Mathie, L.G. Gregory, C.M. Lloyd // *Thorax*. – 2015. – 70. – C.1189–1196. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207020.

60. Canistro, D. E-cigarettes induce toxicological effects that can raise the cancer risk. / D Canistro, F Vivarelli, S Cirillo [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – 7. – C. 2028. doi:10.1038/s41598-017-02317-8
61. Cazzola, M. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. / M Cazzola, W MacNee, FJ Martinez [et al.] // *Eur Respir J.* - 2008. – 31. – C.416-469.
62. Celli, B.R. Emphysema and extrapulmonary tissue loss in COPD: a multi-organ loss of tissue phenotype. / B R. Celli, N Locantore, R Tal-Singer. // *ERJ.* - 2018. - 51 (2). - 1702146; DOI: 10.1183/13993003.02146-2017.
63. Celli, B.R. Emphysema and extrapulmonary tissue loss in COPD: a multi-organ loss of tissue phenotype./ BR Celli, N Locantore, R Tal-Singer et al. // *Eur Respir J.* – 2018. – 51. – C. 1-10.
64. Celli, B.R. Update on Clinical Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / B.R Celli, J.A Wedzicha. // *N. Engl. J. Med.* - 381. – C. 1257–1266.
65. Chapman, D.G. The effect of flavored e-cigarettes on murine allergic airways disease. / DG Chapman, DT Casey, JL Ather [et al.] // *Sci Rep* – 2019. – 9. - 13671. doi:10.1038/s41598-019-50223-y.
66. Chen, P. Cinnamic aldehyde Inhibits lipopolysaccharide-Induced chondrocyte inflammation and reduces cartilage degeneration by blocking the nuclear factorKappa B signaling pathway. / P. Chen, A. Ruan, J. Zhou [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2020. – 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00949>.
67. Christenson, S A. Chronic obstructive pulmonary disease. / S A Christenson, B M Smith, M Bafadhel, N Putcha. // *Lancet.* – 2022. – 399. – 10342. - C. 2227-2242, ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00470-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00470-6).
68. Cosio, M.G. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. / M.G. Cosio, M. Saetta, A. Agusti // *N. Engl. J. Med.* – 2009. - 360(23). – C.2445–2454. doi: 10.1056/NEJMra0804752.
69. Criner, GJ. COPD Advanced Patient Management. / GJ Criner, M Dreher, CM D'Ambrosio [et al.] // *Chest.* – 2018. - 153(6). – C.1497-1498. doi: 10.1016/j.chest.2018.03.054. PMID: 29884254.

70. de Groot, L.E.S. Oxidative stress and macrophages: Driving forces behind exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease? / L.E.S. de Groot, T.A. van der Veen, F.O. Martinez [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2019. – 316. – C.369–384. doi: 10.1152/ajplung.00456.2018.

71. Dean, J. Clinical characteristics of COPD patients with tidal expiratory flow limitation. / J Dean, U Kolsum, P Hitchen [et al.] // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2017. – 12. – C. 1503–1506. doi:10.2147/COPD.S137865.

72. Deering-Rice, CE. Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) is a mediator of lung toxicity for coal fly ash particulate material. / Deering-Rice CE, Johansen ME, Roberts JK [et al.] // *Mol Pharmacol.* 2012. - 81(3). – C. 411-419. doi: 10.1124/mol.111.076067.

73. Dietrich, A. Modulators of transient receptor potential (TRP) channels as therapeutic options in lung disease. / A Dietrich. // *Pharmaceuticals (Basel).* - 2019. – 12. 10.3390/ph12010023.

74. Divo, MJ Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as a disease of early aging: evidence from the EpiChron Cohort. /Divo MJ, Celli BR, Poblador-Plou B, et al. // *PLoS One.* – 2018. - 13(2). - e0193143.

75. Divo, MJ. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. / MJ Divo, C Cote, JP de Torres [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2012. – 186. – C.155-161.

76. Du, Q. The role of transient receptor potential vanilloid 1 in common diseases of the digestive tract and the cardiovascular and respiratory system. / Q. Du, Q. Liao, C. Chen [et al.] // *Front. Physiol.* – 2019. - 10. – C.1064. doi: 10.3389/fphys.2019.01064

77. Ducharme-Smith, K. Lung function, COPD and Alternative Healthy Eating Index in US adults. / K Ducharme-Smith, G Mora-Garcia, F de Castro Mendes, M Stephany Ruiz-Diaz, A Moreira, R Villegas, V Garcia-Larsen. // *ERJ Open Research* 2021. - 7. - 00927-2020; DOI: 10.1183/23120541.00927-2020.

78. Ellingsen, J. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, blood eosinophils and COPD exacerbations: a cohort study. /J Ellingsen, C Janson, K Bröms, K Lisspers, B

Ställberg, M Högman, A Malinowski. // ERJ Open Research. - 2021. – 7. - 00471-2021; DOI: 10.1183/23120541.00471-2021.

79. Engel, R M. Predictors of chronic obstructive pulmonary disease in women who have never smoked: a cohort study. / R M Engel, Luca K, Graham P L, Farshchi M K, Vemulapad S, J. Byles // ERJ Open Research Apr. 2022. - 8 (2) - 00532-2021. DOI: 10.1183/23120541.00532-2021.

80. Fabbri, LM. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? /LM Fabbri, Rabe KF. // Lancet. - 2007. – 370. – C.797-799.

81. Facchinetti, F. Alpha, beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages. / F Facchinetti, F Amadei, P Geppetti et al. // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2007. - 37(5). – C.617-623. doi: 10.1165/rcmb.2007-0130OC.

82. Faiz, A. Single-nucleotide polymorphism rs2070600 regulates AGER splicing and the sputum levels of the COPD biomarker soluble receptor for advanced glycation end-products. / A Faiz, Senani N.H. Rathnayake, Nick H.T. ten Hacken, V Guryev, M van den Berge, S D. Pouwels. // ERJ Open Research Apr. - 2021. - 7 (2). - 00947-2020; DOI: 10.1183/23120541.00947-2020.

83. Fernandes, E.S. TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome. / E.S.Fernandes, L.Liang, S.J. Smillie [et al.] // J. Immunol. – 2012. – 188(11). – C.5741–5751.

84. Ferrera, MC. Advances in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / MC Ferrera, WW Labaki, MK Han. // Annu Rev Med. – 2021. – 72. – C.119-134. doi: 10.1146/annurev-med-080919-112707. Finicelli, M. The Emerging Role of Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The Potential Impact of Oxidative Stress and Extracellular Vesicle on Macrophage Polarization and Function. / M Finicelli, FA Digilio, U Galderisi, G. Peluso // Antioxidants (Basel). – 2022. - 11(3). – C.464. doi: 10.3390/antiox11030464.

85. Fletcher C. The natural history of chronic airflow obstruction. / C Fletcher, R. Peto // Br Med J. – 1977. - 1(6077). – C.1645-1648. doi: 10.1136/bmj.1.6077.1645.

86. Forsslund, H. Gender differences in the T-cell profiles of the airways in COPD patients associated with clinical phenotypes. / H Forsslund, M Yang, M Mikko. [et al.] // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2016 – 12. – C.35-48. doi: 10.2147/COPD.S113625. PMID: 28053515; PMCID: PMC5191844.
87. Foster, W.M. Mucociliary transport and cough in humans. / W.M. Foster // *Pulm. Pharmacol. Ther.* - 2002. - 15(3). - C.277–282. doi: 10.1006/pupt.2002.0351.
88. Froghi, S. New Insights on the Role of TRP Channels in Calcium Signaling and Immunomodulation: Review of Pathways and Implications for Clinical Practice. / S. Froghi, C.R. Grant, R. Tandon [et al.] // *Clinic Rev Allerg Immunol.* - 2021. – 60. – C.271–292. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08824-3>.
89. Frost, F. Inpatient smoking cessation during COVID-19: a highly teachable moment. / F Frost, K Maitland, T Green [et al.] // *Eur Respir J.* – 2021. – 58. – 65. - OA2581. 10.1183/13993003.congress-2021.OA2581
90. Fujii, W. Alveolar macrophage transcriptomic profiling in COPD shows major lipid metabolism changes. / W Fujii, T S. Kapellos, K Baßler, K Händler // *ERJ Open Research.* - 2021. - 7 (3). - 00915-2020; DOI: 10.1183/23120541.00915-2020.
91. Geppetti, P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. / P Geppetti, S Materazzi, P Nicoletti. // *Eur. J. Pharmacol.* - 2006. – 533. – C.207–214. 10.1016/j.ejphar.2005.12.063.
92. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for Prevention, Diagnosis and Management of COPD (Online), 2021. <https://goldcopd.org/2021-gold-reports/>.
93. Goldenberg, N.M. TRPV4: Physiological role and therapeutic potential in respiratory diseases. / N.M. Goldenberg, K. Ravindran, W.M. Kuebler // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm.* – 2015. – 388. – C.421–436. doi: 10.1007/s00210-014-1058-1.

94. Golpe, R. Mortality in COPD patients according to clinical phenotypes / R. Golpe, M. Suárez-Valor, I. Martín-Robles [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* - 2018. - 13. - C.1433–1439. doi: 10.2147/COPD.S159834.
95. Grace, M.S. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: Role in airway disease. / M.S. Grace [et al.] // *Br J Pharmacol.* - 2014. - 171(10). - C. 2593–2607.
96. Grahn, K. Occupational exposure to particles and increased risk of developing chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A population-based cohort study in Stockholm, Sweden. / K Grahn, P Gustavsson, T Andersson [et al.] // *Environmental Research.* - 2021. - 200. -111739. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111739>.
97. Gu, Q. TRP channels in airway sensory nerves. /Q Gu, LY Lee. // *Neurosci Lett.* - 2021. - 748. - 135719. doi: 10.1016/j.neulet.2021.135719.
98. Guiedem, E. Cytokine profile in the sputum of subjects with post-tuberculosis airflow obstruction and in those with tobacco related chronic obstructive pulmonary disease. / E Guiedem, EW Pefura-Yone, GM Ikomey. // *BMC Immunol.* - 2020. - 21(1). - C.52. doi: 10.1186/s12865-020-00381-w.
99. Gundry, S. COPD 1: Pathophysiology, diagnosis and prognosis. / S Gundry. // *Nurs. Times.* - 2019. - 116. - C.27–30.
100. Hamanaka, K. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury. / K. Hamanaka, M.Y. Jian, M.I. Townsley [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* - 2010. - 299(3). - C.353–362.
101. Hanania, R. Classically activated macrophages use stable microtubules for matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion. / R. Hanania, H.S. Sun, K. Xu [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2012. - 287. - C.8468–8483. doi: 10.1074/jbc.M111.290676.
102. Hancox, RJ. Does COPD start in the nursery? / RJ Hancox, X Zhang. // *Respirology.* - 2021 - 26(12). - C.1096-1097. doi: 10.1111/resp.14163. PMID: 34605119.
103. Hao, W. Severity of chronic obstructive pulmonary disease with 'exacerbator with emphysema phenotype' is associated with potential biomarkers. / W Hao,

M Li, Y Zhang, C Zhang, P Wang. // *Postgrad Med J.* – 2020. - 96(1131). – C.28-32. doi: 10.1136/postgradmedj-2019-136599.

104. He, Y. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Severe COVID-19 and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). / Y He, M Xie, J Zhao, X Liu. // *Med Sci Monit.* – 2020. - 26. - e927212. doi: 10.12659/MSM.927212.

105. Hiemstra, P.S. Macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease: The many faces of notch signalling. / Hiemstra P.S. // *EBioMedicine.* – 2019. -43. – C.22–23. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.04.035.

106. Higham, A. The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions. /A Higham , AM Quinn , JED Cançado et al. // *Respir Res.* – 2019. – 20. – C. 49. doi:[10.1186/s12931-019-1017-y](https://doi.org/10.1186/s12931-019-1017-y)

107. Hogg, JC. The contribution of small airway obstruction to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. / JC Hogg , PD Paré , TL Hackett . // *Physiol Rev.* - 2017. – **97**. – C. 529–552. doi:[10.1152/physrev.00025.2015](https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2015).

108. Huang, H. Interleukin-6 is a Strong Predictor of the Frequency of COPD Exacerbation Within 1 Year. / H. Huang, X. Huang, K. Zeng [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2021. –16. – C.2945–2951.

109. Hunninghake, GM. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. / GM Hunninghake, MH Cho, Y Tesfaigzi [et al.] // *N Engl J Med.* – 2009. – **361**. – C. 2599–2608. doi:[10.1056/NEJMoa0904006](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904006)

110. Iheanacho, I. Economic Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Systematic Literature Review. / I Iheanacho, S Zhang, D King, M Rizzo, AS Ismaila. // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* - 2020 – 15. – C.439-460. doi: 10.2147/COPD.S234942.

111. Jang, J.G. Incidence and prognostic factors of respiratory viral infections in severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. / J.G. Jang, J.H. Ahn, H.J. Jin // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* - 2021. - 16. – C.1265-1273. DOI: 10.2147/COPD.S306916.

112. Janson, C. Bronchodilator reversibility in asthma and COPD: findings from three large population studies / C. Janson, A. Malinovschi, A.F.S. Amaral [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2019. – 54 (3). – 1900561.
113. Janson, C. The impact of COPD on health status: findings from the BOLD study. / C Janson, G Marks, S Buist [et al.]// *European Respiratory Journal.* - 2013. - 42 (6). – C. 1472-1483; DOI: 10.1183/09031936.00153712.
114. Jarenbäck, L. Single-nucleotide polymorphisms in the sulfatase-modifying factor 1 gene are associated with lung function and COPD. / L. Jarenbäck, S Frantz, J Weidner [et al.] // *ERJ Open Research Apr.* – 2022. - 8 (2). - 00668-2021; DOI: 10.1183/23120541.00668-2021.
115. Jenkins, CR. Improving the management of COPD in women. / CR Jenkins KR Chapman, JF Donohue. // *Chest.* - 2017. -151 – C. 686–696. doi:10.1016/j.chest.2016.10.031.
116. Ji, C. TRPV4 integrates matrix mechanosensing with Ca<sup>2+</sup> signaling to regulate extracellular matrix remodeling. / C Ji, CA McCulloch. // *FEBS J.* - 2021 - 288(20). – C.5867-5887. doi: 10.1111/febs.15665.
117. Johns, D.P. Diagnosis and early detection of COPD using spirometry / D.P. Johns [et al.] // *J. Thorac. Dis.* - 2014. – 6 (11). - C.1557-1569.
118. Jubrail, J. Macrophage phagocytosis cracking the defect code in COPD. / J. Jubrail, N. Kurian, F. Niedergang // *Biomed. J.* - 2017. – 40(6). – C.305–312. doi: 10.1016/j.bj.2017.09.004
119. Kanezaki, M. Effect of olfactory stimulation by L-menthol on laboratory-induced dyspnea in COPD. / M Kanezaki, K Terada, S Ebihara. // *Chest.* – 2020. – 157. – C.1455–1465. doi:10.1016/j.chest.2019.12.028
120. Kerkhof, M. Association between COPD exacerbations and lung function decline during maintenance therapy. / M. Kerkhof, J. Voorham, P. Dorinsky [et al.] // *Thorax.* – 2020. - 75 (9). – C.744-753. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2019-214457
121. Khalil, M. Transient receptor potential melastatin 8 ion channel in macrophages modulates colitis through a balance-shift in TNF-alpha and interleukin-10

production / A.M. Khalil, Babes, R. Lakra [et al.] // *Mucosal. Immunol.* – 2016. – 9(6). – C.1500–1513.

122. Kichko, T.I. Cigarette smoke has sensory effects through nicotinic and TRPA1 but not TRPV1 receptors on the isolated mouse trachea and larynx. / TI Kichko, G Kopal, PW Reeh. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2015. – 309(8). – C. 812-20. doi: 10.1152/ajplung.00164.2015.

123. Kichko, TI. Irritant volatile anesthetics induce neurogenic inflammation through TRPA1 and TRPV1 channels in the isolated mouse trachea. / TI Kichko, F Niedermirtl, A Leffler, PW Reeh. // *Anesth. Analg.* – 2015. – 120. – C.467–471. 10.1213/ANE.0000000000000568.

124. Kim, J. Which bronchodilator reversibility criteria can predict severe acute exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease patients? / J. Kim, W.J. Kim, C.H. Lee [et al.] // *Respir. Res.* – 2017. – 18(1). – C.107.

125. Kim, M D. Persistence of airway inflammation in smokers who switch to electronic cigarettes. M D. Kim, N Baumlin, A Guerrero-Cignarella [et al.] *ERJ.* - 2022. - 8 (2). - 00117-2022; DOI: 10.1183/23120541.00117-2022

126. Kim, M.E. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. / Kim M.E., Na J.Y., Lee J.S. // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* - 2018. – 40(3). C.219–224. doi: 10.1080/08923973.2018.1424902.

127. Klont, F. A fully validated liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of the soluble receptor of advanced glycation end-products (sRAGE) in serum using immunopurification in a 96-well plate format. / F Klont, S D. Pouwels, J Hermans. N C van de Merbel. // *Talanta.* - 2018. – 182. – C.414–421. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.015

128. Kohler, J.B. Microenvironmental stimuli induce different macrophage polarizations in experimental models of emphysema. / J.B. Kohler, D.A.B. Cervilha, A. Riani Moreira [et al.] // *Biol. Open.* – 2019. – 8. - bio040808. doi: 10.1242/bio.040808.

129. Koivisto, AP. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. / AP. Koivisto, M.G. Belvisi, R. Gaudet et al. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2022. – 21. – C. 41–59. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00268-4>.
130. Koo, HK. Sex-specific associations with DNA methylation in lung tissue demonstrate smoking interactions. / HK Koo, J Morrow, P Kachroo [et al.] // *Epigenetics.* – 2021. – 16. – C.692-703.
131. Kytikova, O.Y. Thermosensory Transient Receptor Potential Ion Channels and Asthma. / O.Y. Kytikova, T.P. Novgorodtseva, Y.K. Denisenko, D.E. Naumov. // *Biomedicines.* – 2021. – 9(7). – C. 816. doi: 10.3390/biomedicines9070816.
132. Lakhdar, R. Role of accelerated aging in limb muscle wasting of patients with COPD. / R Lakhdar, D McGuinness, EM Drost [et al.] // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2018. – 13. – C.1987-1998 <https://doi.org/10.2147/COPD.S155952>.
133. Landini, L. TRPA1 Role in Inflammatory Disorders: What Is Known So Far? / L Landini, S M de Araujo D, M Titiz. [et al.] // *Int J Mol Sci.* - 2022 - 23(9). - 4529. doi: 10.3390/ijms23094529.
134. Le Quement, C. The selective MMP-12 inhibitor, AS111793 reduces airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke. / C. Le Quement, I. Guenon, J.Y. Gillon [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – 154. – C.1206–1215. doi: 10.1038/bjp.2008.180.
135. Lee, J.W. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. / J.W. Lee, W. Chun, H.J. Lee [et al.] // *Cells.* – 2021. – 10. – C.897. doi: 10.3390/cells10040897.
136. Lee, LY. Reflex bronchoconstriction evoked by inhaled nicotine aerosol in guinea pigs: role of the nicotinic acetylcholine receptor. / LY Lee, RL Lin, M Khosravi, F Xu. // *J. Appl. Physiol.* – 2018. – 125. – C.17–123. 10.1152/jappphysiol.01039.2017.
137. Lee, LY. Role of TRPV1 in inflammation-induced airway hypersensitivity. / LY Lee, Q Gu. // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2009. – 9. – C. 243–249. 10.1016/j.coph.2009.02.002.

138. Lee, SC. Impact of COPD on COVID-19 prognosis: A nationwide population-based study in South Korea. / SC Lee, KJ Son, CH Han, SC Park, JY Jung. // *Sci Rep.* – 2021. - 11(1). – C.3735. doi: 10.1038/s41598-021-83226-9. PMID: 33580190;

139. Lenoir, A. Clinical characteristics, mortality rates and causes of death in non-exacerbating COPD patients. A longitudinal cohort analysis of UK primary care data. / A Lenoir, HR Whittaker, A Gayle [et al.] // *Eur Respir J.* – 2021. – 58. – 65. - OA2871. doi:10.1183/13993003.congress-2021.OA2871

140. Li, M. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism / M. Li, Q. Li, G. Yang, V.P. Kolosov, J.M. Perelman et al. // *J. Allergy. Clin. Immunol.* – 2011. – 128. - 3.- C. 626–634.

141. Li, M.C. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats. / M.C. Li, Yang G., X.D. Zhou, S.S. Tseluyko, J.M. Perelman // *Int. J. Mol. Med.* – 2014. – 33(1). – C.83–90.

142. Lin, A-H. Lung epithelial TRPA1 transduces the extracellular ROS into transcriptional regulation of lung inflammation induced by cigarette smoke: the role of influxed Ca<sup>2+</sup>. / A-H Lin, M-H Liu, H-K Ko [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2015. - 148367. 10.1155/2015/148367.

143. Lin, YJ. A synergistic effect of simultaneous TRPA1 and TRPV1 activations on vagal pulmonary C-fiber afferents. / YJ Lin, RL Lin, T Ruan, M Khosravi, LY Lee. // *J. Appl. Physiol.* – 2015. – 118. – C. 273–281. 10.1152/jappphysiol.00805.2014.

144. Liu, S. Long-term air pollution and road traffic noise exposure and COPD: the Danish Nurse Cohort. / S Liu, Y-H Lim, M Pedersen [et al.] // *ERJ.* – 2021. - 58 (6). - 2004594; DOI: 10.1183/13993003.04594-2020

145. Liu, W. Impact of exercise capacity upon respiratory functions, perception of dyspnea, and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary

disease. / W Liu, Y Liu, X Li. // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2021. – 16 – C. 1529–1534. doi:10.2147/COPD.S311221.

146. Lorenzo, I.M. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. / I.M. Lorenzo, W. Liedtke, M.J. Sanderson, M.A. Valverde // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – 105. – C.12611–12616. doi: 10.1073/pnas.0803970105.

147. Lozano, R. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. / R Lozano, M Naghavi, K Foreman [et al.] // *Lancet.* – 2012. – **380.** - 2095–2128. doi:[10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0).

148. Lu, H.L. Activation of M1 macrophages plays a critical role in the initiation of acute lung injury. / H.L. Lu, X.Y. Huang, Y.F. Luo [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2018. – 38. - BSR20171555. doi: 10.1042/BSR20171555.

149. Lundbäck, B. Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. Not 15 but 50% of smokers develop COPD? Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. / Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M [et al.] // *Respir Med.* – 2003. - 97(2). – C.115-122. doi: 10.1053/rmed.2003.1446. PMID: 12587960.

150. Luostarinen, S. The inflammatory regulation of TRPA1 expression in human A549 lung epithelial cells. / S Luostarinen, M Hämäläinen, N Hatano. // *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* – 2021. – 70. – 102059, ISSN 1094-5539, <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2021.102059>.

151. Mandal, A. TRP Channels, Oxidative Stress and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / A. Mandal, A. Srivastava, T. Chakraborti, S. Chakraborti. // Springer, Singapore. - 2020. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9366-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9366-3_10)

152. Mannino, D. Plasma fibrinogen as a biomarker for mortality and hospitalized exacerbations in people with COPD. / D Mannino, R Tal-Singer, D Lomas [et al.] // *Chronic Obstr. Pulm.* - 2014. - 2(1). – C.23–34.

153. Menezes, AM. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. / AM Menezes, R Perez-Padilla, JR Jardim [et al.] // *Lancet*. – 2005. – 366. – C. 1875–1881.
154. Michalick, L. TRPV4-A Missing Link Between Mechanosensation and Immunity. / L Michalick, WM Kuebler. // *Front Immunol*. - 2020 – 11. – C.413. doi: 10.3389/fimmu.2020.00413.
155. Mitra, A. Association of Elevated Serum GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-4, and TNF- $\alpha$  Concentration with Tobacco Smoke Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a South Indian Population. / A Mitra, S Vishweswaraiah, T A Thimraj [et al.] // *International Journal of Inflammation*. – 2018. Article ID 2027856, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/2027856>.
156. Mitzel, H. Patient-Centered Discussion on End-of-Life Care for Patients with Advanced COPD. / H Mitzel, D Brown, M Thomas [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2022. - 58(2). – C.254. doi: 10.3390/medicina58020254.
157. Mohsen, S.M. Body mass index in COPD: what relationship? / S.M. Mohsen, S. Chakroun, A. Chaker [et al.] // *ERJ*. – 2020. - 56. – C. 2439. DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.2439.
158. Mukhopadhyay, I. Blocking TRPA1 in respiratory disorders: Does it hold a promise? / I Mukhopadhyay, A Kulkarni, N Khairatkar-Joshi. // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2016. - 9. 10.3390/ph9040070.
159. Nassenstein, C. Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. / C Nassenstein, K Kwong, T Taylor-Clark, M Kollarik, DM Macglashan, A Braun, BJ Udem. // *J. Physiol*. – 2008. – 586. – C.1595–1604. 10.1113/jphysiol.2007.148379.
160. Naumov, D. Sex-dependent effect of TRPM8 rs10166942 polymorphism on cold-induced air-way hyperresponsiveness. / D. Naumov, O. Kotova, D. Gassan, A. Prikhodko, V. Kolosov. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2019. – 199. – 3823.
161. Nguyen, T-N. Diverse Roles of TRPV4 in Macrophages: A Need for Unbiased Profiling. / T-N Nguyen, G Siddiqui, N A. Veldhuis [et al.] // *Front*.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.828115>

162. Nie, Y. Cigarette smoke extract (CSE) induces transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) expression via activation of HIF1 $\alpha$  in A549 cells. / Y. Nie, C. Huang, S. Zhong [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* - 2016. - 99. - C.498–507. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.028.

163. Ninomiya, Y. Differences in the effects of four TRPV1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and COX-2 expression in murine macrophages / Y. Ninomiya, S.I. Tanuma, M. Tsukimoto // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2017. – 484(3). – C.668–674. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.173.

164. Nishimura, K. Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD. / K Nishimura , T Izumi , M Tsukino [et al.] // *Chest.* - 2002. – **121**. - C.1434–1440. doi:[10.1378/chest.121.5.1434](https://doi.org/10.1378/chest.121.5.1434).

165. Okada, Y. Loss of TRPV4 Function Suppresses Inflammatory Fibrosis Induced by Alkali-Burning Mouse Corneas. / Y. Okada, K. Shirai, M. Miyajima [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, No. 12. – C. 0167200.

166. Oldham, PD. Decline of FEV1. / Oldham PD. // *Thorax.* – 1987. - 42(3). – C.161-164. doi: 10.1136/thx.42.3.161.

167. Olloquequi, J. COVID-19 Susceptibility in chronic obstructive pulmonary disease. / J. Olloquequi // *Eur J Clin Invest.* – 2020. - 50(10). - e13382. doi: 10.1111/eci.13382.

168. Olofson, J. Prediction of COPD by the single-breath nitrogen test and various respiratory symptoms. / Olofson J, Bake B, Bergman B, Vanfleteren L, Svärdsudd K. // *ERJ Open Research.* - 2021. - 7 (3). - 00383-2021; DOI: 10.1183/23120541.00383-2021.

169. Ortega, V.E. The effects of rare SERPINA1 variants on lung function and emphysema in SPIROMICS. / V.E. Ortega, X. Li, W.K. O'Neal [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2020. – 201 - C. 540-554.

170. Osei, E.T. Current perspectives on the role of interleukin-1 signalling in the pathogenesis of asthma and COPD. / E.T. Osei, C.A. Brandsma, W. Timens [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2020. – 55. - 2. – C.1900563.

171. Osinibi, M. Increased exposure to tobacco smoke for children during the COVID-19 era. / M Osinibi, A Gupta, K Harman [et al.] // *Eur Respir J.* - 2021. - 58. - 65. - OA2579. 10.1183/13993003.congress-2021.OA2579

172. Parenti, A. What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? / A. Parenti [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2016. - 173(6). – C.953–969.

173. Pascoe, S. Blood eosinophils and treatment response with triple and dual combination therapy in chronic obstructive pulmonary disease: analysis of the IMPACT trial. / S Pascoe, N Barnes, G Brusselle [et al.] // *Lancet Respir. Med.* - 2019. - 7(9). – C.745–56

174. Patial, S. Lung macrophages: current understanding of their roles in Ozone-induced lung diseases. / S Patial, Y Saini. // *Crit Rev Toxicol.* – 2020. - 50(4). – C.310-323. doi: 10.1080/10408444.2020.1762537.

175. Pereira, I. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Expression on Peripheral Blood Leukocytes from Rheumatoid Arthritic Patients and Correlation with Pain and Disability. / I Pereira, SJ Mendes, DM Pereira [et al.] // *Front Pharmacol.* - 2017. - 8. – C. 53. doi: 10.3389/fphar.2017.00053.

176. Perret, J. Elevated serum interleukin-5 levels in severe chronic obstructive pulmonary disease, / J Perret, C McDonald, V Apostolopoulos. // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* – 2017. – 49(6). - C.560–563, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx030>

177. Petersen, H. The course of lung function in middleaged heavy smokers: incidence and time to early onset of chronic obstructive pulmonary disease. / H Petersen, A Sood, F Polverino. // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2018. – 198. – C.1449-1451.

178. Polverino, F. B cells in chronic obstructive pulmonary disease: moving to center stage. / F. Polverino, L.J. Seys, K.R. Bracke, C.A. Owen // *Am. J. Physiol.*

Lung Cell. Mol. Physiol. – 2016. - 311(4). – C.687–695. doi: 10.1152/ajplung.00304.2016.

179. Prieur, G. Short-term effects of menthol on walking dyspnoea in patients with COPD: a randomised, single blinded, cross-over study. / G Prieur, M Beaumont, M Delorme [et al.] // ERJ Open Research. – 2021. - 7 (4). - 00450-2021; DOI: 10.1183/23120541.00450-2021.

180. Ramírez-Venegas, A. FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass exposure. / A Ramírez-Venegas, RH Sansores, RH Quintana-Carrillo, M Velázquez-Uncal [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2014. - 190(9). – C. 996-1002. doi: 10.1164/rccm.201404-0720OC.

181. Rao, Y. Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4 Mediates Pyroptosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / Y Rao, X Gai, J Xiong, Y Le, Y Sun. // Front. Physiol. – 2021. - Sec. Redox Physiology <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.783891>.

182. Rees, P.A. Chemokines in Wound Healing and as Potential Therapeutic Targets for Reducing Cutaneous Scarring. / P.A. Rees, N.S. Greaves, M. Baguneid, A. Bayat // Adv. Wound Care (New Rochelle). – 2015. – 4. - 11. – C.687–703.

183. Rennard, SI. COPD: the dangerous underestimate of 15%. / SI Rennard, J Vestbo. // Lancet. – 2006. – 367. – C.1216–1219. doi:[10.1016/S0140-6736\(06\)68516-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68516-4).

184. Riley, CM. Diagnosis and Outpatient Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Review. / CM Riley, FC Sciruba. // JAMA. – 2019. - 321(8). – C.786-797. doi: 10.1001/jama.2019.0131.

185. Robinson, RK. Mechanistic link between diesel exhaust particles and respiratory reflexes. / RK Robinson, MA Birrell, JJ Adcock et al. // J. Allergy Clin. Immunol. – 2018. – 141. – C. 1074–1084. 10.1016/j.jaci.2017.04.038.

186. Rodriguez-Roisin, R. Chronic respiratory symptoms with normal spirometry: a reliable clinical entity? / R Rodriguez-Roisin, MK Han, J Vestbo, JA Wedzicha, PG Woodruff, FJ Martinez. // Am J Respir Crit Care Med. - 2017. – 195. – C. 17-22.

187. Roh, J.S. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. / J.S. Roh, D.H. Sohn // *Immune Netw.* - 2018. - 18(4). - C.27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27.
188. Russell, R.E. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. / R.E. Russell, S.V. Culpitt, C. DeMatos [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 2002. - 26. - C.602–609. doi: 10.1165/ajrcmb.26.5.4685.
189. Salvi, SS. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. / Salvi SS, Barnes PJ. // *Lancet.* - 2009 - 374 - C.733–743.
190. Saradna, A. Macrophage polarization and allergic asthma. / A.Saradna, D.C. Do, S. Kumar [et al.] // *Transl. Res.* - 2018. - 191. - C. 1–14. doi: 10.1016/j.trsl.2017.09.002.
191. Scheerens, C. The impact of personal and outdoor temperature exposure during cold and warm seasons on lung function and respiratory symptoms in COPD. / C Scheerens, L Nurhussien, A Aglan, A.J.Synn, BA Coull, Koutrakis P, M B. Rice. // *ERJ Open Research.* - 2022. - 8. - 00574 -2021; DOI: 10.1183/23120541.00574-2021.
192. Scheraga, R.G. TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. / R.G. Scheraga, S. Abraham, K.A. Niese [et al.] // *J. Immunol.* - 2016. - 196(1). - C.428–436.
193. Scioscia, G. Different dyspnoea perception in COPD patients with frequent and infrequent exacerbations. / G Scioscia, I Blanco, E Arismendi [et al.] // *Thorax.* - 2017. - **72**. - C. 117–121. doi:[10.1136/thoraxjnl-2016-208332](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208332).
194. Sethi, S. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. / S. Sethi, J. Maloney, L. Grove, C. Wrona, C.S. Berenson // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2006. - 173(9). - C.991–998.
195. Shah, C H. Association between lung function and future risks of diabetes, asthma, myocardial infarction, hypertension and all-cause mortality. / C

H. Shah, M R Reed, Y Liang, Z Zafari. // ERJ Open Research. – 2021. - 7 (3). - 00178-2021; DOI: 10.1183/23120541.00178-2021.

196. Shapiro, D. Activation of transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) in lung cells by wood smoke particulate material. / Shapiro D, Deering-Rice CE, Romero EG [et al.] // Chem Res Toxicol. – 2013. - 26(5). – C.750-758. doi: 10.1021/tx400024h.

197. Shaykhiev, R. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / R Shaykhiev, A Krause, J Salit, Y Strulovici-Barel. // The Journal of Immunology. – 2009. - 183 (4). – C. 2867-2883; DOI: 10.4049/jimmunol.0900473.

198. Shrine, N. New genetic signals for lung function highlight pathways and chronic obstructive pulmonary disease associations across multiple ancestries. / N. Shrine, A.L. Guyatt, A.M. Erzurumluoglu [et al.] // Nat Genet. - 2019. - 51. – C. 481-493.

199. Silverman, EK. Alpha1 - antitrypsin deficiency. / EK Silverman, RA Sandhaus. // N Engl J Med. – 2009. - 360. – C. 2749-2757.

200. Singh, D. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019. / D Singh, A Agusti, A Anzueto [et al.] // Eur Respir J. – 2019. – 53. - 1900164. doi: 10.1183/13993003.00164-2019

201. Singh, K.P. Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries / K. P. Singh, G Lawyer, T Muthumalage [et al.] // ERJ Open Research. - 2019. - 5 (4). - 00182-2019; DOI: 10.1183/23120541.00182-2019.

202. Singh, R. Defective monocyte-derived macrophage phagocytosis is associated with exacerbation frequency in COPD. / R. Singh, K.B.R. Belchamber, P.S. Fenwick [et al.] // Respir. Res. – 2021. – 22. – C.113. doi: 10.1186/s12931-021-01718-8.

203. Sun, L. Dual role of interleukin-10 in the regulation of respiratory syncytial virus (RSV)-induced lung inflammation. / L Sun, TT Cornell, A LeVine [et al.] // *Clin Exp Immunol.* – 2013. – 172. – C.263–279.

204. Sun, L. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. / L. Sun, M.C. Louie, K.M. Vannella [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2011. – 300. - 3. – C.341–353.

205. Suresh, K. Reactive oxygen species induced Ca(2+) influx via TRPV4 and microvascular endothelial dysfunction in the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension. / K. Suresh, L. Servinsky, H.Jiang [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2018. – 314. - C.893–907. doi: 10.1152/ajplung.00430.2017.

206. Suzuki, M. Asthma-like features and clinical course of chronic obstructive pulmonary disease: an analysis from the Hokkaido COPD Cohort Study. / M Suzuki, H Makita, S Konno [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2016. – 194. – C.1358-1365.

207. Svartengren, M. Long-term clearance from small airways decreases with age. / M. Svartengren, R. Falk, K. Philipson // *Eur. Respir. J.* - 2005. - .26(4). - C.609–615. doi: 10.1183/09031936.05.00002105.

208. Takiguchi, H. Macrophages with reduced expressions of classical M1 and M2 surface markers in human bronchoalveolar lavage fluid exhibit pro-inflammatory gene signatures. / H. Takiguchi, C.X. Yang, C.W.T. Yang [et al.] // *Sci. Rep.* - 2021. – 11. - 8282. doi: 10.1038/s41598-021-87720-y.

209. Tarique, AA. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. / AA Tarique, J Logan, E Thomas, [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2015. - 53(5). – C.676-688. doi: 10.1165/rcmb.2015-0012OC.

210. Toelle, BG. Respiratory symptoms and illness in older Australians: the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) study. / BG Toelle, W Xuan, TE Bird. // *Med J Aust.* – 2013. - 198. – C.144–148. doi:10.5694/mja11.11640.

211. Tóth, B.I. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. / B.I. Tóth, S. Benko, A.G. Szölösi [et al.] // *FEBS Lett.* – 2009. – 583(10). – C.1619–1624. doi: 10.1016/j.febslet.2009.04.031

212. Tran, H.B. Oxidative stress decreases functional airway mannose binding lectin in COPD. / H.B. Tran, J. Ahern, G. Hodge [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – 9. – e98571. doi: 10.1371/journal.pone.0098571.

213. Vanker, A. Indoor air pollution and tobacco smoke exposure: impact on nasopharyngeal bacterial carriage in mothers and infants in an African birth cohort study. / A Vanker, P M. Nduru, W Barnett [et al.] // *ERJ Open Research.* – 2019. – 5 (1). – 00052-2018; DOI: 10.1183/23120541.00052-2018

214. Viegi, G. Global Burden of Chronic Respiratory Diseases. / G Viegi, S Maio, S Fasola, S Baldacci. // *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* – 2020. – 33(4). – C.171-177. doi: 10.1089/jamp.2019.1576. PMID: 32423274.

215. Vizza, CD. Pulmonary Hypertension in Patients With COPD: Results From the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERA). / CD Vizza, MM Hoepfer, D Huscher, D Pittrow, N Benjamin [et al.] // *Chest.* – 2021. – 160(2). – C.678-689. doi: 10.1016/j.chest.2021.02.012. PMID: 33581097.

216. Vos, T. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. / T Vos, AD Flaxman, M Naghavi [et al.] // *Lancet.* – 2012. – **380.** – C. 2163–2196. doi:[10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2).

217. Wallace, H. Airway Pathogenesis Is Linked to TRP Channels. In: *Neurobiology of TRP Channels.* / H. Wallace // CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL). – 2017.

218. Wang, J. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-based mechanisms underlie both the cold temperature-induced inflammatory reactions and the synergistic effect of cigarette smoke in human bronchial epithelial (16HBE) cells.

/ J. Wang, G. Yang, M. Li, X. Zhou // Front. Physiol. - 2019. - 10. - C.285. doi: 10.3389/fphys.2019.00285.

219. Wang, M. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke -induced airway epithelial cell injury model. / M. Wang, Y. Zhang, M. Xu [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2019. – 134. – C.229–238. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.004.

220. Wang, Q. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. / Q. Wang, H. Ni, L. Lan [et al.] // Cell Res. – 2010. – 20. – C.701–712. doi: 10.1038/cr.2010.52.

221. Wang, Q. TRPA1 regulates macrophages phenotype plasticity and atherosclerosis progression. / Q. Wang, K. Chen, F. Zhang [et al.] // Atherosclerosis. – 2020. – 301. – C.44–53.

222. Wang, Z. NF- $\kappa$ B feedback control of JNK1 activation modulates TRPV1-induced increases in IL-6 and IL-8 release by human corneal epithelial cells. / Z Wang, Y Yang, H Yang [et al.] // Mol Vis. – 2011. – 17. – C. 3137-3146.

223. WHO. Obesity and overweight. 2022 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-andoverweight>

224. World Health Organization. Chronic respiratory diseases. [www.who.int/health-topics/chronic-respiratory-diseases](http://www.who.int/health-topics/chronic-respiratory-diseases).

225. Wronski, S. Rhinovirus-induced human lung tissue responses mimic COPD and asthma gene signatures. / Wronski S., Beinke S., Obernolte H. [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2021. - 65 (5). – C.544-554. DOI: 10.1165/rcmb.2020-0337OC.

226. Xiao, M. Interleukin-1B-31T/C promoter polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis. / M. Xiao, L. Guo, T.Wang [et al.] // Arch. Med. Sci. – 2014. – 10 (3). – C.434–438.

227. Xing, H. TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway. / H Xing, JX Ling, M Chen, RD Johnson, M Tominaga, C-Y Wang, Gu J. // Mol. Pain. – 2008. – 4. – C. 22. 10.1186/1744-8069-4-22.

228. Xiong, M. TRPM8 genetic variations associated with COPD risk in the Chinese Han population. / M.Xiong, J. Wang, M. Guo, Q. Zhou // *International Journal of COPD*. - 2016. - 11(1). – C.2563-2571. DOI:10.2147/COPD.S109026.
229. Xiong, M. TRPV1 Genetic Polymorphisms and Risk of COPD or COPD Combined with PH in the Han Chinese Population. / M. Xiong, M. Guo, D. Huang [et al.] // *Cell Cycle*. - 2020. - 19 (22). – C.3066–3073. doi:10.1080/15384101.2020.1831246
230. Xu, M. TRPV1 and TRPA1 in lung inflammation and airway hyperresponsiveness induced by fine particulate matter (PM2.5). / M. Xu, Y. Zhang, M. Wang [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2019. - 7450151. doi: 10.1155/2019/7450151
231. Yamasaki, K. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. / K. Yamasaki, S.F.V. Eeden // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – 19. – C.582. doi: 10.3390/ijms19020582.
232. Yin, P. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study. / P. Yin, C.Q. Jiang, K.K. Cheng [et al.] // *Lancet*. – 2007.
233. Zatloukal, J. Chronic obstructive pulmonary disease - diagnosis and management of stable disease; a personalized approach to care, using the treatable traits concept based on clinical phenotypes. Position paper of the Czech Pneumological and Phthysiological Society. / J Zatloukal, K Brat, K Neumannova, E Volakova. // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* – 2020. - 164(4). – C.325-356. doi: 10.5507/bp.2020.056.
234. Zhang, J. The Significance of Serum Interleukin-8 in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / J. Zhang, C. Bai // *Tanaffos*. – 2018. – 17. 1. – C.13–21.
235. Zhang, L. Macrophages: Friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? / L. Zhang, Y. Wang, G. Wu [et al.] // *Respir. Res.* – 2018. – 19. - 170. doi: 10.1186/s12931-018-0864-2.

236. Zhang, L. The Incidence and Prevalence of Pulmonary Hypertension in the COPD Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. / L Zhang, Y Liu, S Zhao, Z Wang [et al.] // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2022. – 2022(17). - C.1365—1379 <https://doi.org/10.2147/COPD.S359873>.
237. Zhu, G. Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. / G Zhu, A Gulsvik, P Bakke, S Ghata [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2009. – 18. – C. 2053–2062. 10.1093/hmg/ddp111.
238. Zider, AD. Reduced COPD Exacerbation Risk Correlates With Improved FEV1: A Meta-Regression Analysis. / AD Zider, X Wang, RG Buhr [et al.] // *Chest*. – 2017. - 152(3). - C.494-501. doi: 10.1016/j.chest.2017.04.174. PMID: 28483609; PMCID: PMC6026240
239. Zinellu, E. Oxidative Stress Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: A Systematic Review. / E. Zinellu, A. Zinellu, A.G. Fois [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – 10. - 710. doi: 10.3390/antiox10050710.
240. Zou, J. Distributions and trends of the global burden of COPD attributable to risk factors by SDI, age, and sex from 1990 to 2019: a systematic analysis of GBD 2019 data. / J. Zou, T. Sun, X. Song [et al.] // *Respir Res*. - 2022. – 23. - C.90. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02011-y>