

УДК 616.24-036.12:616-002-008.953-092:576.32/.36

DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-31-39

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ КАНАЛОВ TRPV1, TRPV4, TRPM8 И TRPA1 В МАКРОФАГАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

И.Ю.Сугайло, О.О.Котова, Д.А.Гассан, Д.Е.Наумов, Е.Ю.Афанасьева, Т.А.Мальцева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр
физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ. Введение. Макрофаги – ключевые клетки врожденной иммунной системы, обладающие большой функциональной пластичностью. Прежде на макрофагах были идентифицированы некоторые каналы с транзитным рецепторным потенциалом (TRP), в том числе, являющиеся рецепторами сигаретного дыма и пылевых частиц, что может играть важное значение в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). **Цель.** Изучить экспрессию генов каналов TRPV1, TRPV4, TRPM8 и TRPA1 в макрофагах, дифференцированных из моноцитов больных ХОБЛ, в условиях стимуляции липополисахаридами (ЛПС) и интерфероном-гамма (ИФН γ) или интерлейкином 4 (ИЛ-4). **Материалы и методы.** Макрофаги дифференцировали *in vitro* из моноцитов, полученных от больных ХОБЛ, в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Концентрацию цитокинов определяли в супернатанте культуральной среды после проведенной стимуляции методом мультиплексного анализа. Экспрессию генов TRP в макрофагах определяли на уровне мРНК методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. **Результаты.** Действие ЛПС/ИФН γ сопровождалось продукцией как провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12p70, IP-10, ФНО α), так и некоторых противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10 и TGF β 1). ИЛ-4 значимо увеличивал концентрацию ИЛ-17A. Стимуляция макрофагов ЛПС/ИФН γ увеличивала экспрессию *TRPA1* в 5,6 раза ($p=0,01$), но вызывала down-регуляцию *TRPV1* и *TRPV4* в 8,5 ($p=0,007$) и 3,2 ($p=0,03$) раза, соответственно. ИЛ-4 не оказывал влияния на экспрессию генов TRP. **Заключение.** Полученные результаты могут свидетельствовать о дисрегуляции иммунного ответа у больных ХОБЛ, прежде всего, за счет снижения противовоспалительного потенциала макрофагов. Наблюдаемые ЛПС-индуцированные изменения экспрессии TRP каналов, по-видимому, носят компенсаторный характер, и направлены на ограничение воспалительного ответа клеток.

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, TRP каналы, воспаление, сигаретный дым, ХОБЛ.

PECULIARITIES OF TRPV1, TRPV4, TRPM8 AND TRPA1 EXPRESSION IN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES FROM COPD PATIENTS

I.Yu.Sugaylo, O.O.Kotova, D.A.Gassan, D.E.Naumov, E.Yu.Afanas'eva, T.A.Maltseva

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk,
675000, Russian Federation

SUMMARY. Introduction. Macrophages are key cells of the innate immune system possessing high functional plasticity. Previously, some transient receptor potential (TRP) channels were identified on macrophages, including those that are receptors for cigarette smoke and particulate matter, which may play an important role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Aim.** The aim of this study was to investigate the expression of *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8*, and *TRPA1* in monocyte-derived macrophages from COPD patients under stimulation with lipopolysaccharides (LPS) and interferon-gamma (IFN γ) or interleukin 4 (IL-4). **Materials and methods.** Macrophages were differentiated *in*

Контактная информация

Ивана Юрьевна Сугайло, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22; E-mail: ivanka_888@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Ivana Yu. Sugaylo, Assistant Researcher, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: e-mail: ivanka_888@mail.ru

Для цитирования:

Сугайло И.Ю., Котова О.О., Гассан Д.А., Наумов Д.Е., Афанасьева Е.Ю., Мальцева Т.А. Особенности экспрессии каналов TRPV1, TRPV4, TRPM8 и TRPA1 в макрофагах, полученных из моноцитов больных хронической обструктивной болезнью легких // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2020. Вып.78. С.31–39. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-31-39

For citation:

Sugaylo I.Yu., Kotova O.O., Gassan D.A., Naumov D.E., Afanas'eva E.Yu., Maltseva T.A. Peculiarities of TRPV1, TRPV4, TRPM8 and TRPA1 expression in monocyte-derived macrophages from COPD patients. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2020; (78):31–39 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-31-39

in vitro in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from monocytes obtained from COPD patients. The concentration of cytokines was determined in the supernatant of the culture medium after stimulation by multiplex analysis. The expression of TRP genes in macrophages was evaluated at mRNA level by quantitative PCR with reverse transcription. **Results.** The effect of LPS/IFN γ was accompanied by the production of both proinflammatory (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IP-10, TNF α) and some anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and TGF β 1). IL-4 significantly increased the concentration of IL-17A. Stimulation of macrophages with LPS/IFN γ increased the expression of *TRPA1* by 5.6 times ($p = 0.01$) but caused down-regulation of *TRPV1* and *TRPV4* by 8.5 ($p = 0.007$) and 3.2 ($p = 0.03$) times, respectively. IL-4 did not exert any effect on the TRP gene expression. **Conclusions.** The results obtained may indicate dysregulation of the immune response in patients with COPD, primarily due to a decrease of anti-inflammatory potential of macrophages. The observed LPS-induced changes in the expression of TRP channels apparently have a compensatory nature and are aimed at the limitation of the cellular inflammatory response.

Key words: monocytes, macrophages, TRP channels, inflammation, cigarette smoke, COPD.

С момента открытия макрофагов И.И.Мечниковым в 1882 году, представления о них претерпели существенные изменения, прежде всего, за счет понимания выдающейся морфофункциональной пластичности данных клеток. Согласно упрощенной классификации, выделяют М1 и М2 фенотипы макрофагов, иначе именуемые как про- и противовоспалительные [1]. Выраженные различия между данными фенотипами можно отметить даже микроскопически: если для первых характерна округлая морфология, то вторые отличаются вытянутой, веретенообразной формой [2]. На молекулярном уровне, классически-активированные М1 клетки характеризуются повышенной экспрессией таких маркеров, как iNOS, CD80, CD86, MHC-II, а также секрецией провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α , ИЛ-12, ИЛ-23, и, соответственно, наилучшим образом приспособлены для фагоцитоза микробных и опухолевых клеток, с последующим вовлечением в иммунный ответ Т- и В-клеточного звена иммунитета. Для альтернативно-активированных М2 макрофагов, напротив, типична экспрессия CD163, CD206, CD209 рецепторов и продукция цитокинов ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-10, а также TGF β . Их способность производить презентацию антигенов с вовлечением в ответ системы адаптивного иммунитета ограничена, но хорошо просматривается возможность участия в фагоцитозе апоптотических клеток и клеточного дебриса (эффероцитозе), подавлении воспалительного процесса, стимуляции тканевой репарации и ремоделирования [3]. В последние годы традиционная классификация фенотипов макрофагов была расширена за счет дополнительного разделения противовоспалительного фенотипа на М2a, М2b, М2c и М2d [4]. Тем не менее, в условиях живого организма фенотип макрофагов чаще не имеет выраженной поляризации, а расположен на определенном участке непрерывного «континуума», с преобладанием тех или иных морфофункциональных характеристик, в зависимости от условий клеточного и гуморального микроокружения [5].

Учитывая столь широкие функциональные возможности макрофагов, делающие их вероятными участниками большого числа как физиологических, так и патологических процессов, протекающих в организме, большой научный и практический интерес вызывает

возможность модуляции функционального состояния этих клеток [3]. Так, макрофаги могут играть важную роль в патогенезе такого распространенного заболевания, как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). Показано, что в респираторном тракте больных ХОБЛ количество этих клеток существенно увеличено, тем не менее, они не способны эффективно осуществлять фагоцитоз и эффероцитоз, что, по-видимому, вносит вклад в формирование хронического воспаления и ремоделирования в дыхательных путях [6]. Интересно, что при ХОБЛ не отмечается однонаправленной поляризации макрофагов. По данным разных авторов, наряду с М0, обнаруживаются М1, М2 и даже клетки, экспрессирующие комбинированный набор маркеров [6]. Это может быть следствием как дисрегуляции иммунной системы, так и особенностей распределения разных субпопуляций в различных отделах респираторного тракта, либо отражать фенотипические изменения в клетках, происходящие со временем, на фоне циклических обострений и ремиссий ХОБЛ.

Известно, что сигаретный дым и пылевые частицы являются основными этиологическими факторами развития ХОБЛ [7]. При этом, хорошо исследовано их патогенное действие в отношении функциональной активности макрофагов. В экспериментальной модели у мышей сигаретный дым вызывал дозозависимое угнетение эффероцитоза, которое в случае высоких концентраций дыма носило необратимый характер [8]. С данных позиций перспективным может быть изучение функциональной роли рецепторов, опосредующих действие сигаретного дыма и аэрополлютантов на макрофаги. Исследования последних лет продемонстрировали, что в числе таких рецепторов могут находиться некоторые представители семейства каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP), а именно – TRPV1, TRPV4, TRPM8 и TRPA1 [9]. Все эти каналы были ранее обнаружены на макрофагах, однако вопрос их предназначения остается по-прежнему открытым. На сегодняшний день известно, что экспрессия TRPM8 может увеличиваться при ХОБЛ [10], а полиморфизмы *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* и *TRPA1* способны влиять на предрасположенность к данному заболеванию и модулировать степень бронхиальной обструкции [11–14].

Целью настоящего исследования было оценить экспрессию генов *TRPV1*, *TRPV4*, *TRPM8* и *TRPA1* в мак-

рофагах, дифференцированных из моноцитов больных ХОБЛ в M1- или M2-подобный фенотип в условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Периферическая венозная кровь в объеме 18 мл была получена от пяти больных ХОБЛ. При проведении исследования руководствовались 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. Все лица подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике.

Кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие K_3 ЭДТА. Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из полученных лейкоцитов стандартным методом, путем центрифугирования на градиенте плотности фикола 1,077 г/мл (ООО «Биолот», Россия) при 400g в течение 40 минут. После центрифугирования полученные клетки трижды отмывали стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и помещали во флаконы T25 (Corning Inc., США), содержащие 5 мл RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина. МПК инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 2 часов. По окончании инкубации клетки трижды промывали ФСБ для удаления лимфоцитов, а прикрепившиеся моноциты снимали с пластика 0,3% раствором коллагеназы (ООО «Биолот», Россия). Отмытые моноциты ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Германия) и определяли концентрацию и жизнеспособность клеток на автоматическом счетчике Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея). После подсчета клетки рассевали в лунки 12-луночного культурального планшета (Corning Inc., США), содержащие 600 мкл RPMI-1640, 10% сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина и 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ, BioLegend, США), из расчета 8×10^5 клеток на лунку. 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* 056:B6 (ЛПС) 100 нг/мл + рекомбинантный человеческий интерферон гамма (ИФН γ) 20 нг/мл, либо интерлейкин 4 (ИЛ-4) 20 нг/мл, соответственно. Клеткам в контрольной лунке также проводили замену среды, но стимулирующие поляризацию факторы не добавляли. Спустя сутки супернатант культуральной среды отбирали в пробирки 1,5 мл и замораживали при -80°C. Клетки растворяли в буфере RL (Qiagen, Германия) и

хранили при -80°C.

Выделение РНК производили наборами RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Экспрессию генов TRP каналов определяли методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США), используя наборы ОТ-1 (Синтол, Россия) и ПЦР-РВ (Синтол, Россия). В качестве референсного использовали ген *B2M*. Смесь для ПЦР включала в себя: кДНК-матрица 100 нг; 10x ПЦР-буфер 2,5 мкл, MgCl₂ 2,5 mM; dNTP 0,25 mM, праймеры – по 0,2 мкМ каждого, Hot Start Taq-полимераза – 1 ЕД, вода – до 25 мкл. Амплификацию проводили в режиме: предварительная денатурация – 95°C/3 мин., 45 циклов – денатурация 95°C/20 сек., отжиг при 62°C/30 сек. (для *B2M*, *TRPA1*, *TRPV4*) и 65°C/30 сек. (для *TRPM8*, *TRPV1*), элонгация 72°C/30 сек., финальная элонгация – 72°C/5 мин. Для каждого образца амплификацию выполняли в трехкратных повторях, с последующим вычислением среднего арифметического пороговых циклов (Cq). Использованные последовательности праймеров: *TRPV1* – прямой 5'-TCAACAAGATCGCACAGGAGAGC-3', обратный 5'-CTGCCTGAAACTCTGCTTGACCG-3'; *TRPV4* – прямой 5'-TGGTGCTTCAGGGTGGATGA-3', обратный 5'-GAAGGCACTGCTGAAATGCG-3', *TRPM8* – прямой 5'-CATGGAGTCTTCTGTCTGCTGTTTC-3', обратный – 5'-GTGTCGTTGGCTTTTGTGTTGAT-3', *TRPA1* – прямой 5'-AGAGTCCTTCCTAGAACCA-TATCTGAG-3', обратный 5'-GCCAACTGCCAA-ACCAATAAGTAA-3', *B2M* – прямой 5'-CCGTGTGAACCATGTGACTTTGT-3', обратный 5'-TGCGGCATCTTCAAACCTCC-3'.

Концентрацию цитокинов в культуральной среде измеряли с помощью мультиплексного анализа на проточном цитометре FACSCanto II (BD, США), используя набор LEGENDplex™ HU Essential Immune Response Panel (13-plex) (BioLegend, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистические расчеты выполняли в программном пакете Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные представлены в формате Me (Q1-Q3) – медиана и межквартильный интервал. Оценку значимости межгрупповых различий для количественных переменных выполняли с помощью критерия U Манна-Уитни. Анализ экспрессии выполняли в программе REST 2009 V2.0.13 (Qiagen, Германия). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью обобщенной характеристики результатов поляризации макрофагов с ЛПС+ИФН γ или с ИЛ-4 в супернатанте культуральной среды были определены уровни основных цитокинов – ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12p70, ИЛ-17A, ИФН γ , ИФН γ -индуцированный белок 10 (IP-10), фактор некроза опухоли α (ФНО α), моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1) и свободный трансформирующий

фактор роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) (рис.). Можно заметить, что стимуляция ЛПС+ИФН γ приводила к достоверному увеличению продукции большинства провоспалительных цитокинов, типичных для M1 фенотипа (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12p70, IP-10, ФНО α). Тем не менее, мы также отметили значимый прирост концентрации ИЛ-4, ИЛ-10 и TGF $\beta 1$, что в целом нехарактерно для классически активированных макрофагов. Вопреки ожиданиям, клетки, подвергшиеся воздействию ИЛ-4, не секретировали больших количеств ИЛ-10 или TGF $\beta 1$, но реагировали на стимуляцию существенным приростом провоспалительного ИЛ-17A. Кроме того, в данных условиях отмечалась тенденция к снижению

продукции MCP-1. Анализ концентрации ИФН γ в супернатанте M1 клеток, а также анализ секреции ИЛ-4 в M2 макрофагах был неинформативен – уровни данных цитокинов были значимо увеличены ввиду того, что их добавляли в среду экзогенно. Таким образом, полученные данные лишь условно свидетельствуют о классической и альтернативной поляризации макрофагов, что, вероятно, является отражением искаженного иммунного ответа больных ХОБЛ. При действии ЛПС/ИФН γ ответ клеток был смешанным, а действие ИЛ-4 не сопровождалось секрецией традиционных противовоспалительных цитокинов, но усиливало продукцию ИЛ-17A.

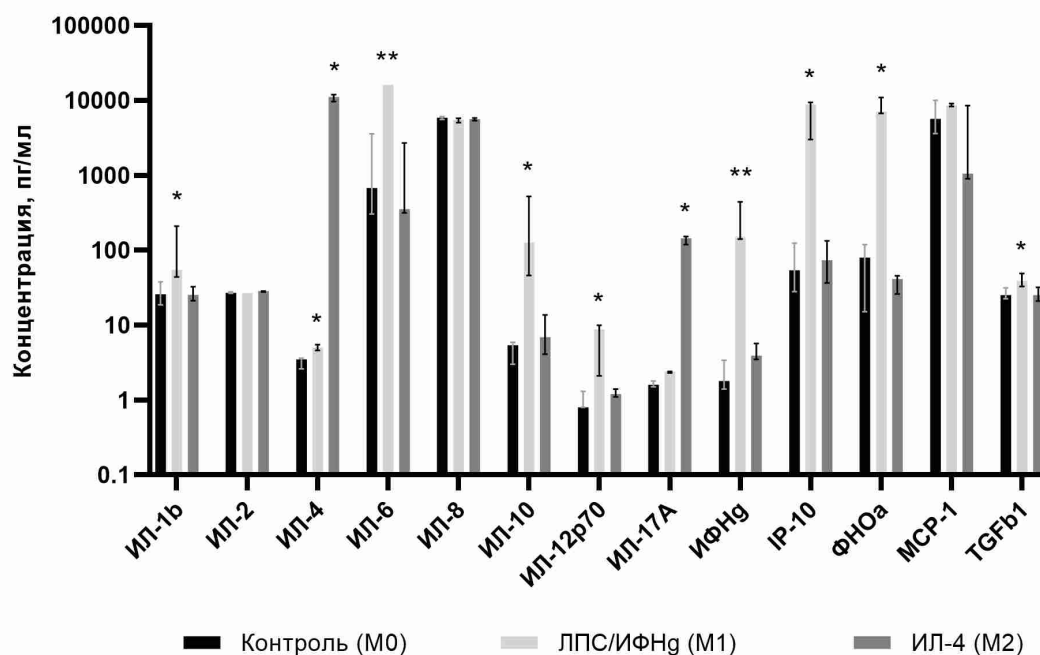


Рис. Концентрация цитокинов в супернатанте культуральной среды макрофагов после стимуляции ЛПС/ИФН γ или ИЛ-4, по сравнению с контрольными клетками. Значимость различий: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Согласно относительной интенсивности экспрессии мРНК в контрольных клетках, TRP каналы располагались в порядке $TRPV1 > TRPV4 > TRPA1 > TRPM8$. Стимуляция ЛПС/ИФН γ приводила к значимому увеличению экспрессии $TRPA1$ в 5,6 раза ($p = 0,01$), но угнетала экспрессию $TRPV1$ и $TRPV4$ в 8,5 ($p = 0,007$) и 3,2 ($p = 0,03$) раза, соответственно. Экспрессия $TRPM8$ на фоне действия ЛПС/ИФН γ достоверно не изменялась. В отличие от ЛПС/ИФН γ , ИЛ-4 не оказывал эффекта на экспрессию изучаемых TRP каналов.

Известно, что дисрегуляция иммунного ответа типична для больных ХОБЛ. Показано, что сигаретный дым способен модулировать ответ макрофагов на стимуляцию ЛПС или ИЛ-4 [15]. Обнаруженные нами особенности секреции иммуносупрессивного цитокина ИЛ-10 в условиях M1 и M2 стимуляции также находят определенные литературные подтверждения. По всей видимости, специфичность ИЛ-10 как маркера M2 макрофагов у больных ХОБЛ снижена. С одной

стороны, показано, что даже у здоровых лиц ЛПС способны увеличивать экспрессию ИЛ-10 [15], с другой – есть данные, что макрофаги, полученные из моноцитов больных ХОБЛ, утрачивают функциональную пластичность и сохраняют провоспалительный фенотип вне зависимости от условий стимуляции [16]. В частности, макрофаги больных ХОБЛ секретировали низкие количества ИЛ-10 в ответ на стимуляцию ИЛ-4, по сравнению с клетками здоровых доноров [16]. По всей видимости, это может относиться и к другим противовоспалительным цитокинам, которые обычно ассоциированы с M2 фенотипом.

В нашей работе мы впервые наблюдали секрецию ИЛ-17A макрофагами больных ХОБЛ под действием ИЛ-4. Данные многих исследований свидетельствуют о повышении уровня данного цитокина при ХОБЛ, тяжелой бронхиальной астме и оверлап синдроме астма-ХОБЛ [17]. В экспериментальной модели ХОБЛ, мыши, нокаутные по гену рецептора ИЛ-17A, были за-

щищены от воспаления и фиброза [18]. Кроме этого, известно, что продукция ИЛ-17 ассоциирована с нейтрофильным воспалением, более выраженной бронхиальной обструкцией и резистентностью к терапии глюкокортикоидами у больных ХОБЛ [19]. В свою очередь, ИЛ-4, являющийся маркером Th2-воспаления, не характерного для ХОБЛ, может увеличиваться при обострении заболевания, одновременно со снижением соотношения Th1/Th2 и ростом продукции ИЛ-17 [20]. Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что помимо Th17 клеток, макрофаги также могут служить важным дополнительным источником ИЛ-17 при обострениях ХОБЛ.

В настоящее время достоверная интерпретация наблюдаемых изменений экспрессии каналов TRP на макрофагах затруднена, во многом ввиду относительно ограниченной информации о функциональной роли данных белков. Кроме того, поскольку эксперимент был проведен только на клетках, полученных от больных ХОБЛ, мы не можем судить, связаны ли особенности экспрессии с проявлением заболевания или являются универсальной реакцией, не зависящей от наличия патологии. Также известно, что ЛПС способны не только влиять на экспрессию, но могут и непосредственно активировать TRPV1, TRPV4, TRPA1 и TRPM8 (при снижении температуры до 25°C) [21].

Имеющиеся данные свидетельствуют, что несмотря на то, что TRPA1 опосредует нейрогенное и не-нейрогенное воспаление [22], его активация на макрофагах, по-видимому, сопровождается угнетением M1 поляризации клеток [23]. Следовательно, наблюдаемое нами повышение экспрессии *TRPA1* может являться проявлением механизма отрицательной обратной связи, сдерживающего избыточную продукцию провоспалительных медиаторов. Снижение экспрессии *TRPV1* и *TRPV4* при стимуляции клеток ЛПС/ИФНγ также указывает на компенсаторный характер наблюдаемых изменений, и, вероятно, также направлено на ограничение провоспалительного потенциала макро-

фагов. TRPV1 и TRPV4, в отличие от TRPA1, ассоциированы с провоспалительным ответом макрофагов. Так, блокирование TRPV1 селективными антагонистами снижало ЛПС-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-18 и экспрессию циклооксигеназы-2 [24]. Также, макрофаги, полученные от TRPV1-нокаутных мышей, демонстрировали снижение способности к фагоцитозу при стимуляции ЛПС [25]. Аналогичные эффекты были отмечены для TRPV4. Активация TRPV4 на макрофагах сопровождалась увеличением продукции активных форм кислорода и азота [26], а сам рецептор был необходим для ЛПС-стимулированного фагоцитоза *E. coli* и латексных частиц [27].

Таким образом, в результате эксперимента мы показали, что действие ЛПС/ИФНγ сопровождается увеличением экспрессии *TRPA1*, но снижением *TRPV1* и *TRPV4*, а ИЛ-4 не влияет на экспрессию указанных рецепторов. Несмотря на то, что ЛПС-индуцированные изменения экспрессии TRP каналов, в целом, оправданы и нацелены на ограничение воспалительной реакции, их степень выраженности может быть далека от оптимальной. Дальнейшие исследования должны быть направлены на уточнение взаимосвязи экспрессии и активности TRP каналов с фагоцитарной способностью макрофагов, а также включать сравнительный анализ изучаемых феноменов у больных ХОБЛ и здоровых лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Источники финансирования

Исследование проводилось без участия спонсоров

Funding Sources

This study was not sponsored

ЛИТЕРАТУРА

1. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // J. Immunol. 2000. Vol.164, №12. P.6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166
2. Gao J., Scheenstra M.R., van Dijk A., Veldhuizen E.J.A., Haagsman H.P. A new and efficient culture method for porcine bone marrow-derived M1- and M2-polarized macrophages // Vet. Immunol. Immunopathol. 2018. Vol.200. P.7–15. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.04.002
3. Poltavets A.S., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Sukhikh G.T., Fatkhudinov T.K. Macrophage Modification Strategies for Efficient Cell Therapy // Cells. 2020. Vol.9, №6. Article number 1535. doi: 10.3390/cells9061535
4. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms // Mediators Inflamm. 2015. Vol.2015. Article number 816460. doi: 10.1155/2015/816460
5. Xue J., Schmidt S.V., Sander J., Draffehn A., Krebs W., Quester I., De Nardo D., Gohel T.D., Emde M., Schmidleithner L., Ganesan H., Nino-Castro A., Mallmann M.R., Labzin L., Theis H., Kraut M., Beyer M., Latz E., Freeman T.C., Ulas T., Schultze J.L. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation // Immunity. 2014. Vol.40, №2. P.274–288. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006
6. Yamasaki K., Eeden S.F.V. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol.19, №2. Article number 582. doi: 10.3390/ijms19020582
7. Yoshida T., Tudor R.M. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease // Physiol.

Rev. 2007. Vol.87, №3. P.1047–1082. doi: 10.1152/physrev.00048.2006

8. Richens T.R., Linderman D.J., Horstmann S.A., Lambert C., Xiao Y.Q., Keith R.L., Boé D.M., Morimoto K., Bowler R.P., Day B.J., Janssen W.J., Henson P.M., Vandivier R.W. Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009. Vol.179, №11. P.1011–1021. doi: 10.1164/rccm.200807-1148OC

9. Сугайло И.Ю., Наумов Д.Е. Современные представления о роли каналов с транзиторным рецепторным потенциалом в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (обзор литературы) // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2019. Вып.74. С.119–130. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2019-74-119-130>

10. Li M., Li Q., Yang G., Kolosov V.P., Perelman J.M., Zhou X.D. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. Vol.128, №3. P.626–634.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.032

11. Zhu G.; ICGN Investigators, Gulsvik A., Bakke P., Ghatta S., Anderson W., Lomas D.A., Silverman E.K., Pillai S.G. Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease // *Hum. Mol. Genet.* 2009. Vol.18, №11. P.2053–2062. doi: 10.1093/hmg/ddp111

12. Xiong M., Guo M., Huang D., Li J., Zhou Y. TRPV1 genetic polymorphisms and risk of COPD or COPD combined with PH in the Han Chinese population // *Cell Cycle.* 2020. Vol.19, №22. P.3066–3073. doi: 10.1080/15384101.2020.1831246

13. Naumov D., Kotova O., Gassan D., Sheludko E., Afanaseva E., Maltseva T., Sugaylo I. Role of TRPM8 polymorphisms in predisposition to COPD development in smokers // *Eur. Respir. J.* 2020. Vol.56, Suppl.64. Article number 1128. doi: 10.1183/13993003.congress-2020.1128

14. Naumov D., Gassan D., Kotova O., Afanaseva E., Sheludko E., Sugaylo I., Perelman J. Effect of TRPA1 and TRPM8 polymorphisms on lung function in COPD // *Eur. Respir. J.* 2020. Vol.56, Suppl.64. Article number 1129. doi: 10.1183/13993003.congress-2020.1129

15. da Silva C.O., Gicquel T., Daniel Y., Bártholo T., Vène E., Loyer P., Pôrto L.C., Lagente V., Victoni T. Alteration of immunophenotype of human macrophages and monocytes after exposure to cigarette smoke // *Sci. Rep.* 2020. Vol.10, №1. Article number 12796. doi: 10.1038/s41598-020-68753-1

16. Day A., Barnes P., Donnelly L. COPD monocytes differentiate into pro-inflammatory macrophages regardless of environment // *Eur. Respir. J.* 2013. Vol.42, Suppl.57. Article number 3873.

17. Soodaeva S., Postnikova L., Boldina M., Kubysheva N., Li T., Kilimanov I., Nikitina L. Serum IL-17 and IL-18 levels in asthma-COPD overlap syndrome patients // *Eur. Respir. J.* 2015. Vol.46, Suppl.59. PA4886. doi: 10.1183/13993003.congress-2015.PA4886

18. Yanagisawa H., Hashimoto M., Minagawa S., Takasaka N., Ma R., Moermans C., Ito S., Araya J., Budelsky A., Goodsell A., Baron J.L., Nishimura S.L. Role of IL-17A in murine models of COPD airway disease // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2017. Vol.312, №1. P.L122–L130. doi: 10.1152/ajplung.00301.2016

19. Christenson S.A., van den Berge M., Faiz A., Inkamp K., Bhakta N., Bonser L.R., Zlock L.T., Barjaktarevic I.Z., Barr R.G., Bleecker E.R., Boucher R.C., Bowler R.P., Comellas A.P., Curtis J.L., Han M.K., Hansel N.N., Hiemstra P.S., Kaner R.J., Krishnanm J.A., Martinez F.J., O'Neal W.K., Paine R. 3rd, Timens W., Wells J.M., Spira A., Erle D.J., Woodruff P.G. An airway epithelial IL-17A response signature identifies a steroid-unresponsive COPD patient subgroup // *J. Clin. Invest.* 2019. Vol.129, №1. P.169–181. doi: 10.1172/JCI121087

20. Wei B., Sheng Li C. Changes in Th1/Th2-producing cytokines during acute exacerbation chronic obstructive pulmonary disease // *J. Int. Med. Res.* 2018. Vol.46, №9. P.3890–3902. doi: 10.1177/0300060518781642

21. Boonen B., Alpizar Y.A., Sanchez A., López-Requena A., Voets T., Talavera K. Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels // *Cell Calcium.* 2018. Vol.73. P.72–81. doi: 10.1016/j.ceca.2018.04.004

22. Nassini R., Pedretti P., Moretto N., Fusi C., Carnini C., Facchinetti F., Viscomi A.R., Pisano A.R., Stokesberry S., Brunmark C., Svitacheva N., McGarvey L., Patacchini R., Damholt A.B., Geppetti P., Materazzi S. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation // *PLoS One.* 2012. Vol.7, №8. e42454. doi: 10.1371/journal.pone.0042454

23. Wang Q., Chen K., Zhang F., Peng K., Wang Z., Yang D., Yang Y. TRPA1 regulates macrophages phenotype plasticity and atherosclerosis progression // *Atherosclerosis.* 2020. Vol.301. P.44–53. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.04.004

24. Ninomiya Y., Tanuma S.I., Tsukimoto M. Differences in the effects of four TRPV1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and COX-2 expression in murine macrophages // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. Vol.484, №3. P.668–674. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.173

25. Fernandes E.S., Liang L., Smillie S.J., Kaiser F., Purcell R., Rivett D.W., Alam S., Howat S., Collins H., Thompson S.J., Keeble J.E., Rizzo-Vasquez Y., Bruce K.D., Brain S.D. TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome // *J. Immunol.* 2012. Vol.188, №11. P.5741–5751. doi: 10.4049/jimmunol.1102147

26. Hamanaka K., Jian M.Y., Townsley M.I., King J.A., Liedtke W., Weber D.S., Eyal F.G., Clapp M.M., Parker J.C.

TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010. Vol.299, №3. P.L353–362. doi: 10.1152/ajplung.00315.2009

27. Scheraga R.G., Abraham S., Niese K.A., Southern B.D., Grove L.M., Hite R.D., McDonald C., Hamilton T.A., Olman M.A. TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis // *J. Immunol.* 2016. Vol.196, №1. P.428–436. doi: 10.4049/jimmunol.1501688

REFERENCES

1. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000; 164(12):6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166
2. Gao J., Scheenstra M.R., van Dijk A., Veldhuizen E.J.A., Haagsman H.P. A new and efficient culture method for porcine bone marrow-derived M1- and M2-polarized macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018; 200:7–15. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.04.002
3. Poltavets A.S., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Sukhikh G.T., Fatkhudinov T.K. Macrophage Modification Strategies for Efficient Cell Therapy. *Cells* 2020; 9(6):1535. doi: 10.3390/cells9061535
4. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:816460. doi: 10.1155/2015/816460
5. Xue J., Schmidt S.V., Sander J., Draffehn A., Krebs W., Quester I., De Nardo D., Gohel T.D., Emde M., Schmidleithner L., Ganesan H., Nino-Castro A., Mallmann M.R., Labzin L., Theis H., Kraut M., Beyer M., Latz E., Freeman T.C., Ulas T., Schultze J.L. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014; 40(2):274–288. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006
6. Yamasaki K., Eeden S.F.V. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(2):582. doi: 10.3390/ijms19020582
7. Yoshida T., Tudor R.M. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87(3):1047–1082. doi: 10.1152/physrev.00048.2006
8. Richens T.R., Linderman D.J., Horstmann S.A., Lambert C., Xiao Y.Q., Keith R.L., Boé D.M., Morimoto K., Bowler R.P., Day B.J., Janssen W.J., Henson P.M., Vandivier R.W. Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179(11):1011–1021. doi: 10.1164/rccm.200807-1148OC
9. Sugaylo I.Yu., Naumov D.E. Modern concepts of the role of transient receptor potential channels in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis (review). *Бюллетень физиологии и патологии дыхания* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2019; (74):119–130 (in Russian). <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2019-74-119-130>
10. Li M., Li Q., Yang G., Kolosov V.P., Perelman J.M., Zhou X.D. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128(3):626–634.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.032
11. Zhu G.; ICGN Investigators, Gulsvik A., Bakke P., Ghatta S., Anderson W., Lomas D.A., Silverman E.K., Pillai S.G. Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18(11): 2053–2062. doi: 10.1093/hmg/ddp111
12. Xiong M., Guo M., Huang D., Li J., Zhou Y. TRPV1 genetic polymorphisms and risk of COPD or COPD combined with PH in the Han Chinese population. *Cell Cycle* 2020; 19(22):3066–3073. doi: 10.1080/15384101.2020.1831246
13. Naumov D., Kotova O., Gassan D., Sheludko E., Afanaseva E., Maltseva T., Sugaylo I. Role of TRPM8 polymorphisms in predisposition to COPD development in smokers. *Eur. Respir. J.* 2020; 56(Suppl.64):1128. doi: 10.1183/13993003.congress-2020.1128
14. Naumov D., Gassan D., Kotova O., Afanaseva E., Sheludko E., Sugaylo I., Perelman J. Effect of TRPA1 and TRPM8 polymorphisms on lung function in COPD. *Eur. Respir. J.* 2020; 56(Suppl.64): 1129. doi: 10.1183/13993003.congress-2020.1129
15. da Silva C.O., Gicquel T., Daniel Y., Bártholo T., Vène E., Loyer P., Pôrto L.C., Lagente V., Victoni T. Alteration of immunophenotype of human macrophages and monocytes after exposure to cigarette smoke. *Sci. Rep.* 2020; 10(1):12796. doi: 10.1038/s41598-020-68753-1
16. Day A., Barnes P., Donnelly L. COPD monocytes differentiate into pro-inflammatory macrophages regardless of environment. *Eur. Respir. J.* 2013; 42(Suppl.57):3873.
17. Soodaeva S., Postnikova L., Boldina M., Kubysheva N., Li T., Kilimanov I., Nikitina L. Serum IL-17 and IL-18 levels in asthma-COPD overlap syndrome patients. *Eur. Respir. J.* 2015; 46(Suppl.59): PA4886. doi: 10.1183/13993003.congress-2015.PA4886
18. Yanagisawa H., Hashimoto M., Minagawa S., Takasaka N., Ma R., Moermans C., Ito S., Araya J., Budelsky A., Goodsell A., Baron J.L., Nishimura S.L. Role of IL-17A in murine models of COPD airway disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2017; 312(1):L122–L130. doi: 10.1152/ajplung.00301.2016
19. Christenson S.A., van den Berge M., Faiz A., Inkamp K., Bhakta N., Bonser L.R., Zlock L.T., Barjaktarevic I.Z.,

Barr R.G., Bleecker E.R., Boucher R.C., Bowler R.P., Comellas A.P., Curtis J.L., Han M.K., Hansel N.N., Hiemstra P.S., Kaner R.J., Krishnan J.A., Martinez F.J., O'Neal W.K., Paine R. 3rd, Timens W., Wells J.M., Spira A., Erle D.J., Woodruff P.G. An airway epithelial IL-17A response signature identifies a steroid-unresponsive COPD patient subgroup. *J. Clin. Invest.* 2019; 129(1):169–181. doi: 10.1172/JCI121087

20. Wei B., Sheng Li C. Changes in Th1/Th2-producing cytokines during acute exacerbation chronic obstructive pulmonary disease. *J. Int. Med. Res.* 2018; 46(9):3890–3902. doi: 10.1177/0300060518781642

21. Boonen B., Alpizar Y.A., Sanchez A., López-Requena A., Voets T., Talavera K. Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. *Cell Calcium* 2018; 73:72–81. doi: 10.1016/j.ceca.2018.04.004

22. Nassini R., Pedretti P., Moretto N., Fusi C., Carnini C., Facchinetti F., Viscomi A.R., Pisano A.R., Stokesberry S., Brunmark C., Svitacheva N., McGarvey L., Patacchini R., Damholt A.B., Geppetti P., Materazzi S. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One* 2012; 7(8):e42454. doi: 10.1371/journal.pone.0042454

23. Wang Q., Chen K., Zhang F., Peng K., Wang Z., Yang D., Yang Y. TRPA1 regulates macrophages phenotype plasticity and atherosclerosis progression. *Atherosclerosis* 2020; 301:44–53. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.04.004

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

25. Fernandes E.S., Liang L., Smillie S.J., Kaiser F., Purcell R., Rivett D.W., Alam S., Howat S., Collins H., Thompson S.J., Keeble J.E., Riffo-Vasquez Y., Bruce K.D., Brain S.D. TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome. *J. Immunol.* 2012; 188(11):5741–5751. doi: 10.4049/jimmunol.1102147

26. Hamanaka K., Jian M.Y., Townsley M.I., King J.A., Liedtke W., Weber D.S., Eyal F.G., Clapp M.M., Parker J.C. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010; 299(3): L353–362. doi: 10.1152/ajplung.00315.2009

27. Scheraga R.G., Abraham S., Niese K.A., Southern B.D., Grove L.M., Hite R.D., McDonald C., Hamilton T.A., Olman M.A. TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. *J. Immunol.* 2016; 196(1):428–436. doi: 10.4049/jimmunol.1501688

Информация об авторах:

Ивана Юрьевна Сугайло, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: ivanka_888@mail.ru

Олеся Олеговна Котова, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Дина Анатольевна Гассан, канд. мед. наук., научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dani-shi@mail.ru

Денис Евгеньевич Наумов, канд. мед. наук, зав. лабораторией, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: denn1985@bk.ru

Евгения Юрьевна Афанасьева, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: evgeniyananev@yandex.ru

Author information:

Ivana Yu. Sugaylo, Assistant Researcher, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: ivanka_888@mail.ru

Olesya O. Kotova, MD, Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Dina A. Gassan, MD, PhD (Med.), Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dani-shi@mail.ru

Denis E. Naumov, MD, PhD (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: denn1985@bk.ru

Evgeniya Yu. Afanas'eva, MD, Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: evgeniyananev@yandex.ru

Татьяна Анатольевна Мальцева, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: malta-82@mail.ru

Tatyana A. Maltseva, MD, PhD (Med.), Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: malta-82@mail.ru

Поступила 16.11.2020

Принята к печати 30.11.2020

Received November 16, 2020

Accepted November 30, 2020
