

УДК 616-002-008.953-092:613.84:577.29

DOI: 10.36604/1998-5029-2021-82-28-36

## TRPA1-ОПОСРЕДОВАННЫЕ ЭФФЕКТЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ СИГАРЕТНОГО ДЫМА И ЦИННАМАЛЬДЕГИДА

И.Ю.Сугайло, Д.Е.Наумов, О.О.Котова, Д.А.Гассан, Я.Г.Горчакова

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

**РЕЗЮМЕ. Введение.** Являясь основной причиной развития ХОБЛ, курение представляет серьезную проблему для здравоохранения. Попадая в дыхательные пути, сигаретный дым вступает в контакт с различными клетками, в том числе макрофагами, на поверхности которых экспрессированы рецепторы TRPA1, чувствительные к основным патогенным соединениям, образующимся при сгорании табака. **Цель.** Изучить функциональную активность каналов TRPA1 на макрофагах в аспекте формирования реакции клеток на сигаретный дым и агонист TRPA1 – циннамальдегид (ЦА). **Материалы и методы.** Экспериментальные условия включали воздействие на макрофаги, дифференцированные из моноцитов, ЦА (100 мкМ), 4% экстракта сигаретного дыма (ЭСД) и 4% ЭСД после предварительной экспозиции с селективным антагонистом TRPA1 (HC-030031 100 мкМ). Концентрацию цитокинов в культуральной среде, экспрессию TRPA1 на поверхности клеток, а также фагоцитарную активность макрофагов анализировали методом проточной цитометрии. **Результаты.** Мы обнаружили, что 60,2 (49,6; 71,8)% клеток экспрессировали TRPA1, и их число возрастало после экспозиции с ЦА. ЭСД значительно угнетал продукцию CXCL10 с 1121,3 (295,7; 3154,6) пг/мл до 187,9 (113,8; 398,3) пг/мл ( $p=0,04$ ), что частично предотвращалось блокированием TRPA1 (692,4 [428,6; 2916,6] пг/мл,  $p=0,04$ ). ЦА также вызывал снижение концентрации CXCL10 подобно ЭСД (189,2 [111,7; 311,3] пг/мл,  $p=0,03$ ). Среди прочих наблюдений было увеличение концентрации IL-1 $\beta$  при действии HC-030031, а также снижение содержания TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-12p70 при действии ЦА. ЭСД вызывал небольшое угнетение числа фагоцитирующих клеток, которое не предотвращалось блокированием TRPA1. При этом ЦА, напротив, увеличивал фагоцитарную активность макрофагов. Исходная экспрессия TRPA1 имела отрицательную корреляцию с динамикой CXCL10 в ответ на ЭСД и ЦА, но положительную – с числом фагоцитирующих клеток после экспозиции с ЦА ( $p=0,81$ ,  $p=0,005$ ). **Заключение.** TRPA1, экспрессированные на макрофагах, по-видимому, опосредуют противовоспалительный эффект в аспекте продуцируемых цитокинов, однако, способствуют увеличению фагоцитарной активности клеток. TRPA1 также являются основными рецепторами, участвующими в снижении продукции CXCL10 макрофагами под действием сигаретного дыма.

**Ключевые слова:** макрофаги, TRPA1, курение, цитокины, фагоцитоз, воспаление.

## TRPA1-MEDIATED EFFECTS ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES UNDER THE EXPOSURE WITH CIGARETTE SMOKE AND CINNAMALDEHYDE

I.Yu.Sugaylo, D.E.Naumov, O.O.Kotova, D.A.Gassan, Ya.G.Gorchakova

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

**SUMMARY. Introduction.** Being the leading cause of COPD, smoking represents a major health problem. Upon entering the respiratory tract, cigarette smoke comes into contact with various cells, including macrophages expressing on their surface TRPA1 receptors, which are sensitive to the main pathogenic compounds formed during tobacco combustion.

### Контактная информация

Ивана Юрьевна Сугайло, аспирант, 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, PhD Student, 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., Наумов Д.Е., Котова О.О., Гассан Д.А., Горчакова Я.Г. TRPA1-опосредованные эффекты на функциональную активность макрофагов при действии сигаретного дыма и циннамальдегида // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2021. Вып. 82. С. 28–36. DOI: 10.36604/1998-5029-2021-82-28-36

### For citation:

Sugaylo I.Yu., Naumov D.E., Kotova O.O., Gassan D.A., Gorchakova Ya.G. TRPA1-mediated effects on the functional activity of macrophages under the exposure with cigarette smoke and cinnamaldehyde. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2021; (82):28–36. (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2021-82-28-36

**Aim.** To study the functional activity of TRPA1 channels on macrophages in terms of cell responses to cigarette smoke and the TRPA1 agonist cinnamaldehyde (CA). **Materials and methods.** The experimental conditions included exposure of monocyte-derived macrophages to CA (100  $\mu$ M), 4% cigarette smoke extract (CSE) and 4% CSE after pretreatment with TRPA1 selective antagonist (HC-030031 100  $\mu$ M). The concentration of cytokines in the culture medium, the expression of TRPA1 on the cell surface, as well as the phagocytic activity of macrophages were analyzed by flow cytometry. **Results.** We found that 60.2 (49.6; 71.8)% of cells expressed TRPA1 and their number increased after exposure with CA. CSE significantly inhibited CXCL10 production from 1121.3 (295.7; 3154.6) pg/ml to 187.9 (113.8; 398.3) pg/ml ( $p=0.04$ ), which was partially prevented by blocking TRPA1 (692.4 [428.6; 2916.6] pg/ml,  $p=0.04$ ). Similar to CSE, CA also caused a decrease in CXCL10 concentration (189.2 [111.7; 311.3] pg/ml,  $p=0.03$ ). Among other observations, there was an increase in the concentration of IL-1 $\beta$  after the exposition with HC-030031, as well as a decrease in TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 after the treatment with CA. CSE caused a minor inhibition in phagocytic cells number, which was not prevented by TRPA1 blocking. CA, on the contrary, increased the phagocytic activity of macrophages. The initial expression of TRPA1 had a negative correlation with the dynamics of CXCL10 in response to CSE and CA but a positive correlation with the number of phagocytic cells after exposition with CA ( $p=0.81$ ,  $p=0.005$ ). **Conclusions.** TRPA1 expressed on macrophages apparently mediate an anti-inflammatory effect in terms of produced cytokines but increase phagocytic activity of the cells. TRPA1 are also major receptors involved in the diminished CXCL10 production by macrophage under exposition with cigarette smoke.

*Key words: macrophages, TRPA1, smoking, phagocytosis, inflammation.*

Курение является известным фактором, неблагоприятно влияющим на состояние здоровье человека. По состоянию на 2015 год, эта вредная привычка занимала второе место среди ведущих причин преждевременной смертности и инвалидности. Согласно отчету по результатам исследования глобального бремени заболеваний (Global Burden of Disease Study, 2015) в среднем мировая распространенность курения, стандартизированная по возрасту, составляла 25% среди мужчин и 5,4% у женщин. Несмотря на то, что вводимые меры позволили достичь существенного снижения данных показателей по сравнению с 1990 годом (на 28,4 и 34,4%, соответственно), в 2015 году 11,5% процентов зарегистрированной смертности во всем мире (около 6,4 млн случаев) были связаны с курением. Кроме того, за прошедшие 25 лет заметно увеличилось число стран, где курение входит в 5 ведущих причин утраты лет жизни, скорректированных по нетрудоспособности (DALYs) [1]. Показатели распространенности курения в России на 2019 год оставались выше, по сравнению с мировыми, и составляли среди трудоспособного населения около 50% для мужчин и 20% для лиц женского пола. Зафиксированная смертность от причин, связанных с курением, составила 226,5 тыс. случаев. При этом в структуре смертности преобладали сердечно-сосудистые заболевания, злокачественные новообразования, инсульты и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [2]. Заболеваемость ХОБЛ вызывает наибольшую озабоченность, поскольку для данной нозологии курение и вдыхание аэрополлютантов являются основными причинами. Высокая мировая распространенность ХОБЛ, по некоторым данным превышающая 552 млн человек [3], а также существенный вклад в показатели инвалидности и смертности обуславливают необходимость дальнейшего совершенствования мероприятий, направленных на сокращение распространенности курения. В новых реалиях пандемии COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, курение также усугубляет тяжесть

течения инфекции, сопровождаясь быстро прогрессирующим поражением легких и высокой смертностью [4].

Рассматривая респираторный тракт как первичную мишень для токсичных компонентов сигаретного дыма, особое внимание привлекают бронхиальные и альвеолярные макрофаги, которые, наряду с эпителием, выстилающим поверхность дыхательных путей, находятся в числе клеток, вступающих в непосредственный контакт с патогенными факторами. В свою очередь, макрофаги, как и другие клетки, экспрессируют различные типы рецепторов, реагирующие на сигаретный дым и аэрополлютанты, в том числе каналы с транзитным рецепторным потенциалом TRPA1 [5]. В частности, установлено, что TRPA1 особенно чувствительны к таким составляющим сигаретного дыма, как кротональдегид и акролеин. Экспрессия TRPA1 на уровне мРНК в макрофагах, дифференцированных из моноцитов больных ХОБЛ, была показана нами ранее [6]. Имеющиеся данные указывают на преимущественно ингибирующий эффект сигаретного дыма на функциональную активность макрофагов, что сопровождается общим ослаблением иммунной защиты от вирусных и бактериальных инфекций. Так, отмечается угнетение экспрессии паттерн-распознающих рецепторов, таких как TLR2, TLR4, снижение способности к фагоцитозу, эффероцитозу, способности к инаktivации фагоцитированных микроорганизмов [7]. Сигаретный дым также ослабляет экспрессию TLR3, которые являются рецепторами двухцепочечной РНК вирусов, и снижает продукцию CXCL10 – хемокина, который играет важную роль в хемотаксисе, привлекая нейтрофилы, макрофаги, Т-лимфоциты и NK-клетки к месту вирусной репликации [8].

Функциональная роль рецепторов TRPA1, экспрессированных на макрофагах, остается изучена недостаточно. Сделанные наблюдения свидетельствуют, что нокаут *Trpa1* приводит к увеличению экспрессии M1 маркеров, но снижению M2. Агонист TRPA1 цинна-

мальдегид (ЦА) напротив, способствует сдвигу поляризации клеток в сторону M2 фенотипа. Несмотря на это, полученные результаты характеризуются определенной противоречивостью, что, вероятно, вызвано использованием различных экспериментальных объектов, включая первичные макрофаги различной локализации, макрофаги, дифференцированные из моноцитов или клеток костного мозга, макрофагальные клеточные линии. Таким образом, противовоспалительный эффект активации TRPA1 на макрофагах до настоящего времени остается предметом дискуссии [9].

Целью настоящего исследования было дать функциональную характеристику каналам TRPA1 на макрофагах, дифференцированных из моноцитов здоровых лиц, в том числе, в аспекте эффектов, вызываемых экспозицией с экстрактом сигаретного дыма (ЭСД).

### Материалы и методы исследования

В экспериментах были использованы макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови, полученные от десяти здоровых некурящих добровольцев мужского пола со средним возрастом  $34 \pm 1,03$  года. 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.

Выделение моноцитов, дифференцировку и культивирование макрофагов проводили согласно протоколу, подробно описанному ранее [6, 10]. Моноциты получали из мононуклеаров периферической крови лиц, включенных в исследование, методом адгезии к пластике. Клетки культивировали в течение 10 суток в среде RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Германия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, Франция), 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина (ООО «Биолот», Россия) и 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (BioLegend, США) для дифференцировки в макрофаги. В целях эксперимента дифференцированные клетки, полученные от каждого донора, были разделены на 4 группы (по типу экспериментального воздействия): клетки первой группы оставались интактными и выступали в качестве контроля, клеткам второй группы добавляли ЭСД в конечной концентрации 4% на 24 часа, клеткам третьей группы дополнительно вносили селективный блокатор каналов TRPA1 (HC-030031 (HC), 100 мкМ) за один час до добавления 4% ЭСД, а клеткам четвертой группы проводили экспозицию с ЦА (100 мкМ) в течение 24 часов.

После проведения эксперимента определяли фагоцитарную активность клеток путем инкубации с флуоресцентными латексными частицами диаметром 2 мкм (Sigma Chemical Co., Германия) в течение 1 часа. Образцы супернатанта культуральной среды отбирали и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Клетки открепляли раствором коллагеназы для дальнейшего исследования методом проточной цитометрии.

ЭСД получали с помощью оригинальной установки, основной частью которой являлся шприцевой насос с цифровым управлением. Дым двух сигарет марки «Winston Blue» с фильтром (содержание смолы – 6 мг, никотина – 0,5 мг, монооксида углерода – 6 мг), аспирируемый со скоростью 8 мл/сек, пропускали через 20 мл среды RPMI-1640, нагретой до температуры  $37^{\circ}\text{C}$ . У полученного ЭСД измеряли pH и оптическую плотность на длине волны 326 нм с целью стандартизации. Оптическую плотность доводили до 2 ОЕ, pH – до нейтрального значения (7,3–7,4). После этого ЭСД стерилизовали фильтрованием через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию исходного ЭСД принимали за 100%.

Для определения экспрессии белка TRPA1 макрофаги инкубировали с первичными кроличьими поликлональными антителами к TRPA1 (Alomone Labs, Израиль) и вторичными антителами к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (Abcam, Великобритания). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью окраски пропидия йодидом. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Процент клеток, экспрессирующих TRPA1, определяли по сравнению с изотипическим контролем.

Концентрации цитокинов IL-4, IL-2, CXCL10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-17A, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-8, TGF- $\beta$ 1 в супернатанте культуральной среды определяли с помощью мультиплексного анализа коммерческими наборами LEGENDplex HU Essential Immune Response Panel (BioLegend, США) на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США).

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 рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса и критерия U Манна-Уитни для апостериорных сравнений. Поиск взаимосвязи между переменными проводили с использованием рангового корреляционного анализа Спирмена. С целью введения поправки на множественные сравнения использовали метод Бенджамини-Хохберга. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение



Макрофаги, полученные из моноцитов всех доноров, экспрессировали TRPA1. Исходно процент клеток, экспрессирующих рецептор, был подвержен индивидуальной вариабельности с колебаниями в широком диапазоне – от 35,7 до 79,5%, но в среднем составлял 60,2 (49,6; 71,8)%. При действии ЭСД экспрессия TRPA1 несколько увеличивалась, при этом данное увеличение не было статистически значимым и не зависело от блокирования канала селективным антагонистом. Процент клеток, экспрессирующих TRPA1, во второй (ЭСД) и третьей (ЭСД + НС) экспериментальных группах составил 64,3 (57,5; 68,6)% и 65,7 (59,0; 67,6)%, соответственно. Действие ЦА приводило к более существенной апрегуляции TRPA1 (до 71,7 [69,9; 85,6]%), которая, однако, также не являлась значимой по сравнению с контролем ( $p=0,09$ ).

Согласно результатам проведенного рангового дисперсионного анализа, экспериментальные воздействия приводили к значимым изменениям концентраций следующих цитокинов: CXCL10 ( $p=0,007$ ), IL-1 $\beta$  ( $p<0,001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0,004$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0,04$ ) и IL-12p70 ( $p=0,04$ ) (рис.).

Исходная концентрация CXCL10 составляла 1121,3 (295,7; 3154,6) пг/мл, при этом действие ЭСД снижало его продукцию до 187,9 (113,8; 398,3) пг/мл. Блокирование TRPA1 частично предотвращало снижение CXCL10, вызываемое ЭСД (692,4 [428,6; 2916,6] пг/мл), а ЦА вызывал снижение, аналогичное наблюдаемому при действии ЭСД (189,2 [111,7; 311,3] пг/мл). Подавление продукции CXCL10 при действии ЭСД было значимым по сравнению как с интактными клетками ( $p=0,04$ ), так и клетками, которым был добавлен антагонист TRPA1 ( $p=0,04$ ). Действие ЦА также приводило к значимому снижению уровня CXCL10 по сравнению с контролем ( $p=0,03$ ) и клетками, TRPA1 на которых был заблокирован ( $p=0,03$ ).

Концентрация IL-1 $\beta$  в культуральной среде интактных макрофагов составляла 21,9 (16,9; 31,0) пг/мл. Воздействие ЭСД не приводило к существенным изменениям данного интерлейкина (21,5 [15,7; 24,7]), а ЦА вызывал небольшую тенденцию к снижению его уровня (16,4 [15,6; 19,8] пг/мл,  $p=0,1$ ). При этом блокирование TRPA1 достоверно увеличивало продукцию IL-1 $\beta$  до 33,0 (27,4; 41,0) пг/мл, по сравнению как с исходным уровнем ( $p=0,04$ ), так и уровнем, наблюдаемым при действии ЭСД ( $p=0,004$ ) и ЦА ( $p<0,001$ ).

Основное наблюдение, сделанное в отношении TNF- $\alpha$ , заключалось в подавлении секреции данного цитокина макрофагами при действии ЦА (4,0 [1,4; 7,4] пг/мл), которое было значимо как по сравнению с контролем (106,2 [3,8; 364,1],  $p=0,01$ ), так и по сравнению с клетками, которым был добавлен ЭСД (98,8 [16,0; 230,2] пг/мл,  $p=0,001$ ) либо ЭСД+НС (34,1 [9,2; 111,5],  $p=0,001$ ). В наших экспериментальных условиях мы не зафиксировали какого-либо влияния ЭСД на уровень TNF- $\alpha$ .

Определенные концентрации IFN- $\gamma$  и IL-12p70

были крайне низкими (единицы пг/мл) и находились на пределе чувствительности метода. Тем не менее, изменение уровней данных цитокинов при экспериментальных воздействиях в некоторой степени напоминало особенности реакции CXCL10. Так, концентрация IFN- $\gamma$ , исходно составлявшая 2,1 (1,6; 6,3) пг/мл, снижалась при действии ЭСД (1,4 [1,0; 2,2] пг/мл) и ЦА (1,2 [0,9; 1,6] пг/мл). При этом, в случае блокирования TRPA1, эффект ЭСД на IFN- $\gamma$  был менее выражен (1,8 [1,1; 2,9] пг/мл). После проведения коррекции на множественные сравнения значимость всех различий терялась, и лишь снижение IFN- $\gamma$  в ответ на ЦА по сравнению с контролем имело пограничный уровень значимости ( $p=0,05$ ).

IL-12p70 снижался с 1,0 (0,6; 1,2) пг/мл до 0,7 (0,5; 0,8) пг/мл при действии ЭСД, и до 0,6 (0,5; 0,8) пг/мл при действии ЦА. В отличие от IFN- $\gamma$ , антагонист TRPA1 никак не влиял на уровень данного интерлейкина (0,7 [0,5; 0,8] пг/мл). Так же, как и в случае с IFN- $\gamma$ , значимых различий выявлено не было, и лишь эффект ЦА демонстрировал пограничный уровень значимости ( $p=0,05$ ) по сравнению с контролем.

Результаты рангового дисперсионного анализа также были значимы при анализе влияния экспериментальных условий на фагоцитоз ( $p=0,01$ ). Согласно сделанным наблюдениям, процент фагоцитирующих клеток в контрольных условиях составлял 47,2 (41,2; 48,4)%. ЭСД несколько снижал данный показатель (40,2 [35,1; 43,4]%), однако применение антагониста TRPA1 не оказывало на фагоцитоз существенного влияния (42,0 [39,8; 46,6]%). Эффект ЦА, напротив, приводил к увеличению числа фагоцитирующих макрофагов (55,0 [50,5; 59,6]%), которое было значимо по сравнению клетками, находившимися под действием ЭСД ( $p=0,01$ ). Различия в фагоцитозе между экспериментальной группой, имевшей экспозицию с ЦА, и контролем были значимы лишь до проведения коррекции на множественные сравнения ( $p=0,04$ ).

Проведенный корреляционный анализ подтвердил вклад TRPA1 в некоторые ранее найденные особенности реакции клеток на ЦА. В частности, мы обнаружили обратную корреляцию базальной экспрессии TRPA1 с концентрацией цитокинов IL-1 $\beta$  ( $r=-0,73$ ,  $p=0,01$ ) и TNF- $\alpha$  ( $r=-0,62$ ,  $p=0,05$ ) в клетках контрольной группы, а также тенденции к взаимосвязи TRPA1 с IL-17A ( $r=-0,57$ ,  $p=0,08$ ) и IFN- $\gamma$  ( $r=-0,59$ ,  $p=0,07$ ). Несмотря на то, что значимых корреляций TRPA1 с уровнями CXCL10 не было найдено, мы обнаружили признаки зависимости относительной динамики ( $\Delta$ ) CXCL10 в ответ на ЭСД и ЦА от исходной экспрессии TRPA1, измеренной в клетках контрольной группы ( $r=-0,62$ ,  $p=0,05$  и  $r=-0,56$ ,  $p=0,08$  для реакции CXCL10 на ЭСД и ЦА, соответственно). Таким образом, высокая экспрессия TRPA1 сопровождалась более существенным относительным снижением CXCL10 под действием ЭСД и ЦА.

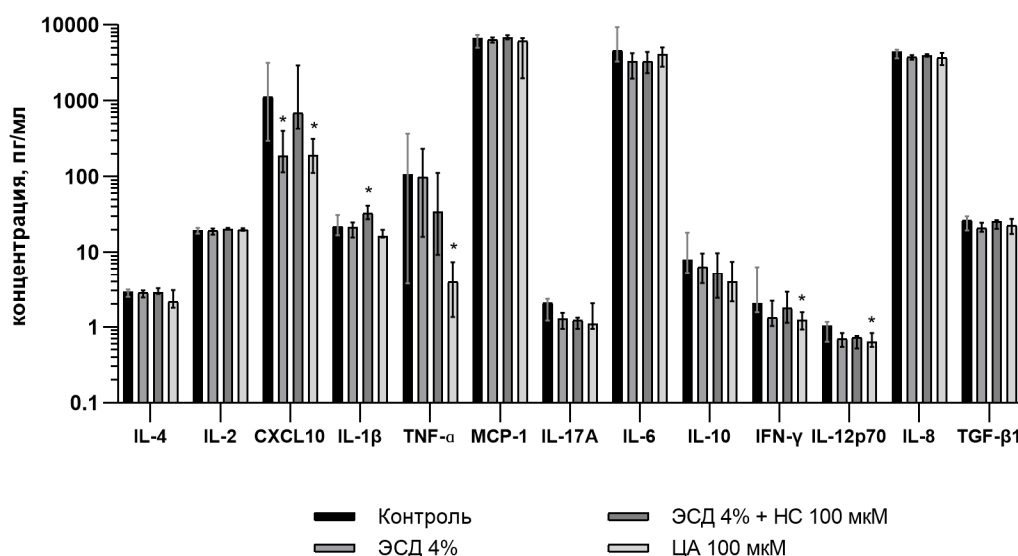


Рис. Влияние экспериментальных условий на продукцию цитокинов макрофагами. Значимость различий по сравнению с контролем: \* –  $p \leq 0,05$ .

Наблюдаемые изменения фагоцитирующей способности макрофагов под действием ЦА также нашли отражение в прямой корреляционной взаимосвязи между исходной экспрессией TRPA1 и числом фагоцитирующих клеток, находившихся в среде с ЦА ( $p=0,81$ ,  $p=0,005$ ).

Ввиду многокомпонентного состава, действие сигаретного дыма на клетки отличается комплексным характером, и, кроме того, зависит от типа самих клеток. При этом установлено, что 90% цитотоксичности сигаретного дыма в его газовой фазе обусловлено лишь тремя соединениями: акролеином, кротональдегидом и формальдегидом. Цитотоксичные соединения, представленные в фазе твердых частиц, остаются в существенной степени неидентифицированными до конца. Тем не менее, известно, что гидрохинон, катехол, 2-этилгидрохинон, формальдегид, 2-метилгидрохинон, пальмитиновая кислота, 2,3-диметилгидрохинон, 2,6-диметил-гидрохинон, 3-метилкатехол и 4-метилкатехол формируют около 40% общей цитотоксичности соединений твердой фазы [11].

В нашем исследовании мы сосредоточили свое внимание на каналах TRPA1, поскольку именно они являются рецепторами основных трех цитотоксичных соединений газовой фазы сигаретного дыма [12]. TRPA1 экспрессирован на многих клетках иммунной системы, включая эозинофилы, тучные клетки, Т- и В-лимфоциты, а также макрофаги [9]. Нами была впервые обнаружена экспрессия белка TRPA1 на макрофагах, дифференцированных *in vitro* из моноцитов здоровых лиц, хотя ранее данные рецепторы уже были найдены на самих моноцитах, а также на макрофагах, дифференцированных из моноцитарной линии клеток THP-1 [9]. Кроме того, в ходе эксперимента нами было отмечено, что ЭСД, и, в особенности, ЦА

имеют свойство увеличивать экспрессию TRPA1. Прежде подобные наблюдения были сделаны только для бронхиального эпителия, при этом сигаретный дым вызывал дозо- и времязависимую апрегуляцию TRPA1 в первичной культуре клеток [13].

Экспозиция с ЭСД продемонстрировала угнетающее действие сигаретного дыма на функциональную активность макрофагов. Концентрации большинства исследованных маркеров в культуральной среде снижались, что было особенно заметно в отношении CXCL10, уровень которого становился значимо ниже по сравнению с контрольными клетками. CXCL10, также именуемый IP-10 – провоспалительный хемокин, оказывающий свой эффект за счет активации рецептора CXCR3, и привлекающий различные лейкоциты, включая нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, макрофаги, Т-лимфоциты и NK-клетки, в очаг воспаления. Источником CXCL10 могут служить многие типы клеток, в том числе, напрямую не связанные с выполнением иммунологического надзора – эпителий дыхательных путей, сосудистый эндотелий, гладкомышечные клетки, которые, как правило, секретируют его в ответ на стимуляцию IFN- $\gamma$  или липополисахаридами. CXCL10 играет важную роль в снижении восприимчивости организма к патогенам и их быстрой элиминации в случае вирусных, бактериальных, грибковых и протозойных инфекций [14]. Ранее уже было продемонстрировано негативное влияние сигаретного дыма на продукцию CXCL10 альвеолярными макрофагами у курящих лиц [8], однако в настоящей работе мы впервые показали, что данный феномен опосредован активацией TRPA1. Согласно сделанным наблюдениям, селективный антагонист TRPA1 предотвращал снижение уровня CXCL10 в ответ на действие ЭСД, а агонист TRPA1 – ЦА, напро-

тив, имитировал эффект ЭСД на клетки.

В целом, полученные данные о функциональной роли TRPA1 на макрофагах дают основание предполагать его противовоспалительную активность. Об этом свидетельствует обнаруженное увеличение продукции IL-1 $\beta$  при ингибировании канала, а также снижение концентрации таких провоспалительных цитокинов, как TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-12p70 при действии агониста – ЦА. При этом, основное отличие нашего эксперимента от выполненных прежде состоит в том, что эффект ЦА на клетки исследовали изолированно, в отсутствие дополнительной стимуляции липополисахаридами, классическими агентами, вызывающими воспалительный ответ. Тем не менее, полученные результаты находят подтверждение в ранее опубликованных работах. Так, транс-ЦА ослаблял секрецию IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ , а также подавлял экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота под действием липополисахаридов в линии мышинных макрофагов RAW 264.7 [15]. ЦА также снижал продукцию IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-13 в модели индуцированного липополисахаридами острого повреждения легких у мышей. Кроме того, в этом же эксперименте ЦА угнетал экспрессию TLR4, а также активность фактора NF- $\kappa$ B и миелопероксидазы. Бронхоальвеолярный лаваж мышей, получивших ЦА, также отличался меньшей клеточностью и содержал существенно сниженное количество нейтрофилов и макрофагов [16]. Необходимо иметь в виду, что, по всей видимости, спектр TRPA1-опосредованных реакций может зависеть от лиганда, либо используемые лиганды (такие как ЦА или акролеин) не являются строго селективными в отношении рецептора. Примером этому служит увеличение продукции TNF- $\alpha$  и IL-8 макрофагами под действием акролеина, чего не наблюдается в условиях экспозиции с ЦА [17].

Функции фагоцитоза и презентации антигенов являются основными для макрофагов и ключевыми при определении пути дальнейшей активации иммунного ответа. Хорошо известно, что курение сопровождается снижением способности макрофагов к фагоцитозу и эффероцитозу (фагоцитозу разрушенных клеток, преимущественно нейтрофилов и эпителия), что было показано в многочисленных экспериментах, как *in vitro*, так и *in vivo* [7]. В нашем исследовании мы обнаружили некоторое снижение процента фагоцитирующих макрофагов после экспозиции с 4% ЭСД, что согласуется с данными других работ. При этом, эффект TRPA1 на фагоцитоз был неожиданным. Впервые было показано, что ЦА вызывает умеренное увеличение (в среднем, около +20%) интенсивности фагоцитоза в макрофагах, дифференцированных из моноцитов здоровых лиц. Из 10 полученных клеточных культур, клетки лишь одного донора продемонстрировали снижение фагоцитарной активности после обработки ЦА. Мы обратили внимание, что в интактном состоянии данные макрофаги отличались наиболее высокой способностью к фагоцитозу, среди остальных образцов. В

ранее проведенном исследовании В.Н. Kim et al. [18] не обнаружили существенного влияния ЦА на фагоцитоз декстрана клетками RAW 264.7. Таким образом, полученные данные указывают на малую вероятность участия TRPA1 в ингибирующем эффекте сигаретного дыма на фагоцитоз, хотя не исключено, что причина наблюдаемых особенностей заключается в ином типе активирующего лиганда (например, акролеин), либо наличии определенного «биохимического фона», создаваемого компонентами сигаретного дыма, и модулирующего эффект активации TRPA1.

Обнаруженные обратные корреляции экспрессии TRPA1 с концентрацией провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и динамикой CXCL10 также подтверждают предположения о функциональной роли TRPA1 в регуляции их продукции макрофагами. Прямая взаимосвязь исходной экспрессии TRPA1 с увеличением фагоцитарной активности клеток в ответ на ЦА косвенно указывает на то, что наблюдаемый эффект ЦА действительно имеет место быть, и опосредован именно TRPA1, а не другими, до настоящего времени неизученными механизмами.

### Выводы

Резюмируя, можно сделать вывод о том, что изучение функции каналов TRP, и, в частности, TRPA1 на клетках иммунной системы является перспективным направлением, открывающим дополнительные возможности влиять на их функциональную активность в рамках терапевтической коррекции различных патологических состояний. Проведенное исследование демонстрирует важную роль TRPA1 в отрицательной регуляции продукции провоспалительных цитокинов макрофагами. Установлено, что именно TRPA1 опосредует подавление синтеза хемокина CXCL10, играющего важную роль в иммунной защите респираторного тракта от инфекций, под действием сигаретного дыма. В определенное противоречие с этими данными входят результаты, указывающие на стимулирующий эффект TRPA1 в отношении фагоцитоза. Для разрешения данной проблемы дальнейшие эксперименты должны ставить задачей комплексную характеристику влияния TRPA1 на фагоцитоз, включая оценку экспрессии scavenger-рецепторов, рецепторов к иммуноглобулинам G и рецепторов комплемента, определение фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных частиц и бактерий, а также анализ завершенности фагоцитоза.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных 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. GBD 2015 Tobacco Collaborators. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990-2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015 // *Lancet*. 2017. Vol.389, Iss.10082. P.1885–1906. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30819-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30819-X)
2. Халтурина Д.А., Замятникова Е.С., Зубкова Т.С. Вклад курения в смертность в России в 2019 году // *Демографическое обозрение*. 2021. Т.8, №1. С.81–105. <https://doi.org/10.17323/demreview.v8i1.12394>
3. Hammond E.E., McDonald C.S., Vestbo J., Denning D.W. The global impact of Aspergillus infection on COPD // *BMC Pulm. Med*. 2020. Vol.20, Iss.1. Article number: 241. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-01259-8>
4. Sanchez-Ramirez D.C., Mackey D. Underlying respiratory diseases, specifically COPD, and smoking are associated with severe COVID-19 outcomes: A systematic review and meta-analysis // *Respir. Med*. 2020. Vol.171. Article number: 106096. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106096>
5. Wang M., Zhang Y., Xu M., Zhang H., Chen Y., Chung K.F., Adcock I.M., Li F. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke-induced airway epithelial cell injury model // *Free Radic. Biol. Med*. 2019. Vol.134. P.229–238. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.004>
6. 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. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2020-78-31-39>
7. Lugg S.T., Scott A., Parekh D., Naidu B., Thickett D.R. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease // *Thorax*. 2021. Article number: thoraxjnl-2020-216296. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-216296>
8. Todt J.C., Freeman C.M., Brown J.P., Sonstein J., Ames T.M., McCubbrey A.L., Martinez F.J., Chensue S.W., Beck J.M., Curtis J.L. Smoking decreases the response of human lung macrophages to double-stranded RNA by reducing TLR3 expression // *Respir. Res*. 2013. Vol.14, Iss.1. Article number: 33. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-33>
9. Naert R., López-Requena A., Talavera K. TRPA1 Expression and Pathophysiology in Immune Cells // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. Vol.22, Iss.21. Article number: 11460. <https://doi.org/10.3390/ijms222111460>
10. Гассан Д.А., Котова О.О., Наумов Д.Е., Сугайло И.Ю., Горчакова Я.Г., Синюк А.А. Сравнительная характеристика условий выделения моноцитов методом адгезии для экспериментов in vitro // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2020. Вып.78. С.128–134. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2020-78-128-134>
11. Stabbert R., Dempsey R., Diekmann J., Euchenhofer C., Hagemester T., Haussmann H.J., Knorr A., Mueller B.P., Pospisil P., Reininghaus W., Roemer E., Tewes F.J., Veltel D.J. Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays // *Toxicol. In Vitro*. 2017. Vol.42. P.222–246. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.003>
12. Jin L., Lorkiewicz P., Xie Z., Bhatnagar A., Srivastava S., Conklin D.J. Acrolein but not its metabolite, 3-Hydroxypropylmercapturic acid (3HPMA), activates vascular transient receptor potential Ankyrin-1 (TRPA1): Physiological to toxicological implications // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2021. Vol.426. Article number: 115647. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115647>
13. Lin A.H., Liu M.H., Ko H.K., Perng D.W., Lee T.S., Kou Y.R. 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> // *Mediators Inflamm*. 2015. Vol.2015. Article number: 148367. <https://doi.org/10.1155/2015/148367>
14. Liu M., Guo S., Hibbert J.M., Jain V., Singh N., Wilson N.O., Stiles J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011. Vol.22, Iss.3. P.121–130. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>
15. Kim M.E., Na J.Y., Lee J.S. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation // *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 2018. Vol.40, Iss.3. P.219–224. <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1424902>
16. Huang H., Wang Y. The protective effect of cinnamaldehyde on lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2017. Vol.63, Iss.8. P.58–63. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.8.13>
17. Facchinetti F., Amadei F., Geppetti P., Tarantini F., Di Serio C., Dragotto A., Gigli P.M., Catinella S., Civelli M., Patacchini R. Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2007. Vol.37, Iss.5. P.617–623. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0130OC>
18. Kim B.H., Lee Y.G., Lee J., Lee J.Y., Cho J.Y. Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses // *Mediators Inflamm*. 2010. Vol.2010. Article number: 529359. <https://doi.org/10.1155/2010/529359>

## REFERENCES

1. GBD 2015 Tobacco Collaborators. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and terri-



- tories, 1990-2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2017; 389(10082):1885–1906. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30819-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30819-X)
2. Khaltourina D.A., Zamiatnina E.S., Zubkova T.S. The impact of smoking on mortality in Russia in 2019. *Demograficheskoe obozrenie = Demographic Review* 2021; 8(1):81–105. <https://doi.org/10.17323/demreview.v8i1.12394>
3. Hammond E.E., McDonald C.S., Vestbo J., Denning D.W. The global impact of Aspergillus infection on COPD. *BMC Pulm. Med.* 2020; 20(1):241. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-01259-8>
4. Sanchez-Ramirez D.C., Mackey D. Underlying respiratory diseases, specifically COPD, and smoking are associated with severe COVID-19 outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Respir. Med.* 2020; 171:106096. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106096>
5. Wang M., Zhang Y., Xu M., Zhang H., Chen Y., Chung K.F., Adcock I.M., Li F. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke -induced airway epithelial cell injury model. *Free Radic. Biol. Med.* 2019; 134:229–238. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.004>
6. 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. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2020-78-31-39>
7. Lugg S.T., Scott A., Parekh D., Naidu B., Thickett D.R. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease. *Thorax* 2021; thoraxjnl-2020-216296. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-216296>
8. Todt J.C., Freeman C.M., Brown J.P., Sonstein J., Ames T.M., McCubbrey A.L., Martinez F.J., Chensue S.W., Beck J.M., Curtis J.L. Smoking decreases the response of human lung macrophages to double-stranded RNA by reducing TLR3 expression. *Respir. Res.* 2013; 14(1):33. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-33>
9. Naert R., López-Requena A., Talavera K. TRPA1 Expression and Pathophysiology in Immune Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(21):11460. <https://doi.org/10.3390/ijms222111460>
10. Gassan D.A., Kotova O.O., Naumov D.E., Sugaylo I.Yu., Gorchakova Y.G., Sinyuk A.A. Comparative characteristics of monocytes isolation conditions by adhesion method for in vitro experiments. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2020; (78):128–134. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2020-78-128-134>
11. Stabbert R., Dempsey R., Diekmann J., Euchenhofer C., Hagemeister T., Haussmann H.J., Knorr A., Mueller B.P., Pospisil P., Reininghaus W., Roemer E., Tewes F.J., Veltel D.J. Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicol. In Vitro* 2017; 42:222–246. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.003>
12. Jin L., Lorkiewicz P., Xie Z., Bhatnagar A., Srivastava S., Conklin D.J. Acrolein but not its metabolite, 3-Hydroxypropylmercapturic acid (3HPMA), activates vascular transient receptor potential Ankyrin-1 (TRPA1): Physiological to toxicological implications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2021; 426:115647. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115647>
13. Lin A.H., Liu M.H., Ko H.K., Perng D.W., Lee T.S., Kou Y.R. 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>. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:148367. <https://doi.org/10.1155/2015/148367>
14. Liu M., Guo S., Hibbert J.M., Jain V., Singh N., Wilson N.O., Stiles J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22(3):121–130. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>
15. Kim M.E., Na J.Y., Lee J.S. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2018; 40(3):219–224. <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1424902>
16. Huang H., Wang Y. The protective effect of cinnamaldehyde on lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2017; 63(8):58–63. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.8.13>
17. Facchinetti F., Amadei F., Geppetti P., Tarantini F., Di Serio C., Dragotto A., Gigli P.M., Catinella S., Civelli M., Patacchini R. Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2007; 37(5):617–623. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0130OC>
18. Kim B.H., Lee Y.G., Lee J., Lee J.Y., Cho J.Y. Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:529359. <https://doi.org/10.1155/2010/529359>

**Информация об авторах:**

Ивана Юрьевна Сугайло, аспирант, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: ivanka\_888@mail.ru

**Author information:**

Ivana Yu. Sugaylo, PhD Student, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: ivanka\_888@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

**Denis E. Naumov**, 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

**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

**Olesya O. Kotova**, 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

**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

**Dina A. Gassan**, 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

**Яна Геннадьевна Горчакова**, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com

**Yana G. Gorchakova**, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com

---

*Поступила 10.11.2020  
Принята к печати 29.11.2020*

*Received November 10, 2020  
Accepted November 29, 2020*

---