

УДК 616.248:613.84:575.174.015.3

DOI: 10.12737/article\_59acaae9dad902.64338769

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

Целью исследования было определить роль полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8* в формировании тяжелой бронхиальной обструкции у больных бронхиальной астмой во взаимосвязи с курением табака. Для этого было обследовано 416 пациентов с бронхиальной астмой различной степени тяжести. Дизайном исследования подразумевалось проведение стандартной спирометрии, генотипирование по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8* и оценка статуса и продолжительности курения. По результатам исследования выявлено неблагоприятное влияние курения на функцию внешнего дыхания у больных с индексом пачка/лет  $\geq 10$ . Полиморфизм rs11562975 оказывал модулирующее влияние на эффект курения у больных БА. Влияние курения  $\geq 10$  пачка/лет на формирование тяжелой бронхиальной обструкции было более выражено среди носителей генотипа GC, по сравнению пациентами, имеющими генотип GG. В случае злостного курения генотип GC достоверно увеличивал риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции у обследованных пациентов.

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, *TRPM8*, табачный дым, генетический полиморфизм, бронхиальная обструкция.

**SUMMARY****TRPM8 GENE POLYMORPHISM AND SMOKING AS THE FACTORS OF SEVERE BRONCHIAL OBSTRUCTION IN PATIENTS WITH ASTHMA****D.A.Gassan, D.E.Naumov, O.O.Kotova, A.G.Prikhodko, J.M.Perelman, V.P.Kolosov***Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The aim of the study was to determine the role of rs11562975 polymorphism of *TRPM8* gene and tobacco smoking in the formation of severe bronchial obstruction in asthma patients. According to this aim, 416 patients with varying severity of asthma were examined. The study design included standard spirometry, genotyping of rs11562975 *TRPM8* gene polymorphism and evaluation of the status and duration of smoking. The study revealed the detrimental effect of smoking on the respiratory function in patients with a pack/year index  $\geq 10$ . rs11562975 polymorphism had a modulating effect on the smoking in patients with asthma. The influence of smoking  $\geq 10$  packs-years on the formation of severe

bronchial obstruction was more pronounced among carriers of GC genotype, compared to patients with GG genotype. In case of pack-year history  $\geq 20$ , the GC genotype significantly increased the risk of severe bronchial obstruction in the examined patients.

*Keywords:* asthma, *TRPM8*, cigarette smoke, genetic polymorphism, bronchial obstruction.

Тяжелая бронхиальная астма (БА) представляет собой одну из сложнейших проблем современной пульмонологии, так как является заболеванием, требующим тщательной диагностики и лечения. Составляя не более 10% от всех случаев БА, тяжелая астма обуславливает более половины расходов здравоохранения на лечение больных БА в целом [4]. Причины тяжелого течения астмы гетерогенны и до конца не установлены. Тем не менее, вне зависимости от формы заболевания, отчетливо прослеживается эффект курения на многие клинико-функциональные показатели. Курение у больных БА тесно связано с активацией воспаления и развитием необратимых морфологических изменений в дыхательных путях, с формированием воздушных ловушек и нарушением функции легких. Курение сопровождается более выраженной персистирующей симптоматикой БА [1, 18], ускоренными темпами снижения функции легких [2, 10], повышенной частотой госпитализаций [17] и сниженным ответом на терапию ингаляционными [5, 19] и пероральными глюкокортикостероидами [6]. Наряду с активным, пассивное курение также сопряжено со снижением функции легких, увеличением частоты обострений, госпитализаций и бронхиальной гиперреактивности у больных БА [7].

Помимо курения, дополнительный эффект на тяжесть заболевания могут оказывать неблагоприятные факторы окружающей среды, а в частности климатические факторы и аэрополлютанты. В этом аспекте внимание привлекают каналы с транзиторным рецепторным потенциалом *TRPM8*, эспрессированные в дыхательных путях. Доказано, что *TRPM8* могут выступать в качестве рецепторов низких температур [3] и продуктов сгорания угля [8]. Более того, была обнаружена прямая взаимосвязь между курением и степенью экспрессии *TRPM8* [11]. Данный факт также косвенно подтверждается тем, что в дыхательных путях больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) экспрессия *TRPM8* существенно выше, по сравнению со здоровыми лицами [12].

Установленная к настоящему времени взаимосвязь генетических полиморфизмов *TRPM8* с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей [14] и ХОБЛ

[20], позволяет всерьез рассматривать вариации последовательности данного гена как возможные факторы формирования тяжелой бронхиальной обструкции у больных БА, в особенности среди лиц, злоупотребляющих курением табака.

Целью настоящего исследования было определить роль полиморфизма гена *TRPM8* в формировании тяжелой бронхиальной обструкции, взаимосвязь его эффекта на функцию легких с курением.

#### Материалы и методы исследования

Было обследовано 416 больных БА, проживающих на территории Амурской области, и проходивших комплексное обследование в Дальневосточном научном центре патологии и физиологии дыхания с 2007 по 2017 годы. Из них у 16 человек (3,8%) был установлен диагноз легкой интермиттирующей БА, у 118 человек (28,4%) – легкой, 196 (47,1%) – средней тяжести и 86 (20,7%) – тяжелой персистирующей БА. Исследование проводилось согласно «Этическим принципам проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками от 2008 года и нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом №200 от 01.04.2016 МЗ РФ. Перед включением в исследование все пациенты подписывали информированное согласие, в соответствии с протоколом, одобренным этическим комитетом центра.

Средний возраст обследованных составил  $38,5 \pm 0,62$  лет, 41% больных составляли мужчины, 59% – женщины. Статус курения оценивался согласно рекомендациям ВОЗ 2011 г. Исследование функции внешнего дыхания проводилось методом спирометрии при форсированном выдохе с анализом кривой поток-объем на аппарате «FlowScreen» (Erich-Jaeger, Германия). Параметры функции внешнего дыхания, определяемые при спирометрии, включали объем форсированного выдоха за первую секунду ( $ОФВ_1$ ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), индекс Тиффно (ИТ), пиковую объемную скорость (ПОС), мгновенную объемную скорость после выдоха 50% ФЖЕЛ ( $МОС_{50}$ ) и 75% ФЖЕЛ ( $МОС_{75}$ ), а также параметр  $МОС_{50-75}$ , дающий интегральную оценку проходимости средних и мелких бронхов. Критерием наличия тяжелой бронхиальной обструкции служил уровень  $ОФВ_1$  менее 60% от должного.

Кровь для генетических исследований забиралась из локтевой вены в пробирку, содержащую ЭДТА. Выделение ДНК из образцов периферической венозной крови проводилось коммерческим набором для экстракции ДНК «ДНК-Экстран-1» (ЗАО «Синтол», Россия).

Однонуклеотидный полиморфизм гена *TRPM8* с. 750G>C (rs11562975) был генотипирован методом LATE-ПЦР [16] с анализом плавления зондов типа «molecular beacon» (молекулярные маяки). Смесь для LATE-ПЦР включала в себя: ДНК-матрица 100 нг, 1х ПЦР-буфер,  $MgCl_2$  2,5 мМ, dNTP 0,25 мМ, праймеры – прямой (5'-CCAGTACCTTATGGATGACTT-3') 0,5

мкМ, обратный (5'-GGAGCTTTGCTTC-GACAGTGGGAT-3') 0,02 мкМ, зонд с флуоресцентной меткой и тушителем (5'-FAM-CGGCCAGGATAT-ACAGTGGAGCCG-BHQ1-3') 0,5 мкМ, Taq-полимераза HotStart, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 25 мкл. Амплификация проводилась в режиме: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., первый блок ПЦР: 25 циклов – денатурация 92°C/1 сек., отжиг/элонгация при 62°C/15 сек., второй блок ПЦР: 45 циклов – денатурация 92°C/1 сек., отжиг/элонгация при температуре 58°C/15 сек., финальная элонгация 72°C/1 мин. Анализ плавления включал этапы предварительной денатурации при 95°C/1 мин., гибридизации – 40°C/1 мин., и градиентного повышения температуры от 40°C до 70°C с шагом 0,5°C/0,2 мин. На графиках, отражающих зависимость  $-dF/dT$  (изменение уровня флуоресценции) от температуры, регистрировались кривые плавления. Наблюдаемые пики с температурой плавления 54,5°C, 44°C, либо их комбинация, отражали наличие аллельных вариантов гена. В ряде образцов отмечалось дополнительное изменение профилей кривых плавления, по отношению к ожидаемым, что было обусловлено наличием дополнительных вариаций гена в регионе отжига зонда. В этих случаях генотип по полиморфизму rs11562975 также был дополнительно верифицирован методом ПЦР с анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ). ПЦР-смесь для ПДРФ анализа включала: ДНК-матрица 100 нг, 1х ПЦР-буфер,  $MgCl_2$  2,5 мМ, dNTP 0,25 мМ, праймеры – прямой (5'-TGGATGACTTCACAAGAGATC-GACT-3', подчеркнутый нуклеотид был изменен для создания сайта рестрикции) и обратный (5'-AGCAGCAAATGTGTGTGGTTGTTGT-3') – по 0,2 мкМ каждого, Taq-полимераза HotStart, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 12,5 мкл. Амплификация проводилась в режиме: предварительная денатурация – 95°C/1,5 мин., 40 циклов – денатурация при 92°C/10 сек., отжиг при 62°C/15 сек., элонгация при 72°C/15 сек., финальная элонгация 72°C/1 мин. Продукт ПЦР длиной 61 п.н. инкубировали с 10ЕД эндонуклеазы рестрикции *HinfI* (ООО «СибЭнзим», Россия) в течение 16 ч. при 37°C. Гидролиз продукта проходил при наличии С аллеля с образованием фрагментов длиной 22 п.н. и 36 п.н. с «липкими» концами по 3 нуклеотида. Разделение фрагментов проводили методом электрофореза в 4% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием 0,1% бромистым этидием. Таким образом, в случае генотипа GG визуализировался фрагмент 61 п.н. в случае генотипа CC – фрагменты 22 и 36 п.н., в случае гетерозиготного генотипа – все три указанных фрагмента.

Статистические расчеты выполнялись в программном пакете Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., 2011) с использованием параметрических и непараметрических методов. Анализ количественных переменных с нормальным распределением проводился методом ANOVA (при множественных сравнениях) и t-Стьюдента. В случае распределения, отличного от нормального использовался ранговый дисперсионный анализ

Краскела-Уоллиса (для множественных сравнений) и U критерий Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического R критерия Спирмена. Для ассоциативного анализа номинальных переменных использовался критерий  $\chi^2$  Пирсона или точный критерий Фишера. Данные представлены в виде  $M \pm m$  для нормально распределенных переменных и  $Me [Q1; Q3]$  – для переменных с распределением, отличным от нормального.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Согласно проведенному опросу в обследованной когорте пациентов когда-либо курили 34% респондентов. Среди них 58,4% курили в прошлом, а 41,6% являлись активными курильщиками. Также среди лиц, когда-либо злоупотреблявших курением, 61% больных имели стаж курения 10 п/лет и более, а 37,6% пациентов являлись злостными курильщиками ( $\geq 20$  п/лет).

Взаимосвязь снижения функции внешнего дыхания

с курением была очевидна во всех статистических моделях. Так, средние показатели вентиляционной функции легких среди больных БА, куривших более 10 п/лет, были существенно ниже, по сравнению с пациентами, курившими менее 10 п/лет или отрицающими курение ( $p < 0,001$  для большинства показателей). Например, у больных в категории  $\geq 10$  п/лет фиксировались наиболее низкие значения  $ОФВ_1$  ( $67,6 \pm 2,58\%$ ,  $p < 0,001$ ), тогда как значения  $ОФВ_1$  у пациентов со стажем менее 10 п/лет и теми, кто никогда не курил, практически не отличались ( $88,8 \pm 3,35\%$  и  $85,3 \pm 1,44\%$ ,  $p > 0,05$ ). Аналогичным образом, стаж курения менее 10 п/лет не оказывал существенного влияния на другие показатели функции легких (рис. 1). Кроме этого, среди куривших больных БА отмечалась достоверная обратная корреляционная взаимосвязь между стажем курения и показателями спирометрии ( $ОФВ_1$   $R = -0,42$ ,  $p < 0,001$ ;  $ФЖЕЛ$   $R = -0,30$ ,  $p = 0,002$ ;  $ИТ$   $R = -0,39$ ,  $p < 0,001$ ).

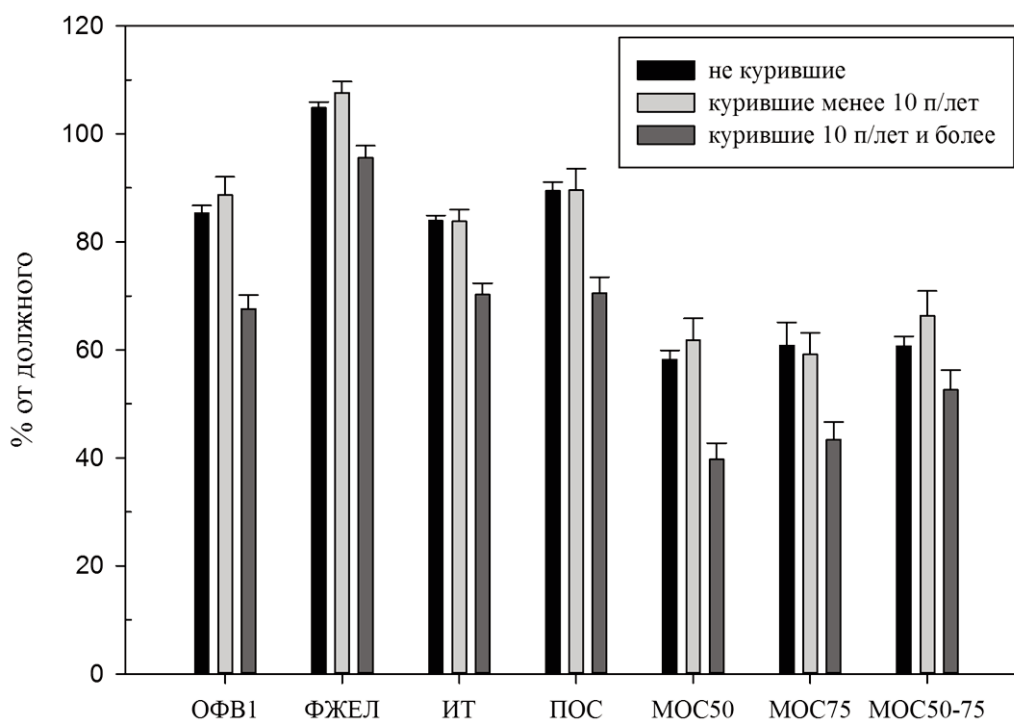


Рис. 1. Сравнение параметров функции внешнего дыхания среди больных БА с различным стажем курения ( $M \pm m$ ).

Кроме показателей спирометрии, эффект курения был напрямую взаимосвязан с тяжестью заболевания – процент лиц со стажем 10 п/лет и более стремительно возрастал среди больных средней (20,3%) и тяжелой (39,5%) персистирующей БА. При этом число курильщиков ( $\geq 10$  п/лет) среди больных с легкими формами заболевания было существенно ниже (13,3% при интермиттирующей и 7,5% при легкой персистирующей БА),  $p < 0,001$ .

Полученные частоты генотипов для полиморфизма rs11562975 находились в равновесии Харди-Вайнберга и соответствовали данным литературы для европейской популяции (GG – 83,1%, GC – 15,4%, CC – 1,5%). Анализируя полученные данные, мы не обнаружили статистически значимого влияния полиморфизма на

функцию внешнего дыхания у больных БА, несмотря на наличие определенных тенденций. Предположительно, это было вызвано редкой встречаемостью гомозиготного CC генотипа, эффект которого был наибольшим. Несмотря на отсутствие достоверных различий, спирометрические показатели у CC гомозигот и гетерозигот были в целом ниже, по сравнению с гомозиготами GG (табл.).

Полиморфизм rs11562975 также не оказывал влияния на предрасположенность больных к курению и не был связан с тяжестью заболевания, либо тяжелой бронхиальной обструкцией, как качественным признаком.

Наиболее интересное наблюдение было сделано при анализе влияния курения на функцию легких у

больных БА с различными генотипами по исследуемому полиморфизму. Так, корреляционная взаимосвязь между стажем курения и показателями функции внешнего дыхания (например,  $ОФВ_1$ ), описанная ранее, была менее выражена у носителей генотипа GG, по сравнению с общей группой ( $R=-36,0, p<0,001$ ), однако в случае носительства генотипа GC ее сила заметно возросла ( $R=-66,0, p<0,001$ ). Кроме того, несмотря на отсутствие статистической значимости, среди больных

БА с анамнезом курения 10 п/лет и более гетерозиготный генотип ассоциировался со сниженными значениями спирометрических показателей, по сравнению с гомозиготным генотипом GG. При этом, у не куривших пациентов (либо со стажем курения менее 10 п/лет) существенной тенденции влияния генотипа на функцию внешнего дыхания не прослеживалось (рис. 2).

Таблица

Показатели функции внешнего дыхания у больных БА, носителей различных генотипов по полиморфизму *TRPM8* rs11562975

Показатель	Генотип GG	Генотип GC	Генотип CC
$ОФВ_1, \%$	83,0±1,34	81,4±2,82	73,6±8,68
ФЖЕЛ, %	103,9±1,00	105,1±2,23	98,5±7,68
ИТ, %	81,9±0,95	78,7±2,07	78,8±6,59
ПОС, %	86,6±1,48	83,5±3,49	70,2±9,02
$МОС_{50}, \%$	56,1±1,57	52,3±3,39	54,9±10,04
$МОС_{75}, \%$	56,1±1,54	68,7±17,99	48,7±7,56
$МОС_{50-75}, \%$	61,5±1,67	56,4±3,59	40,9±11,06

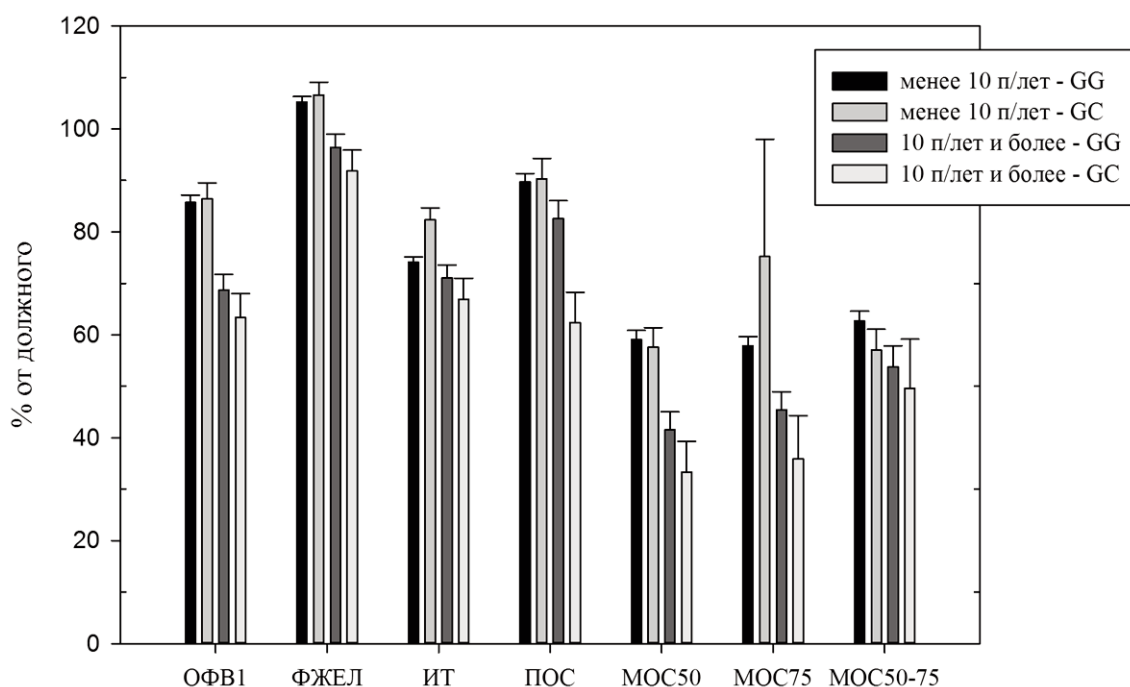


Рис. 2. Влияние генотипов по полиморфизму *TRPM8* rs11562975 на показатели функции внешнего дыхания ( $M\pm m$ ) среди больных БА, с анамнезом курения менее 10 п/лет (либо не куривших) и куривших, с анамнезом 10 п/лет и более.

Тяжелая бронхиальная обструкция формировалась у 41,5% куривших больных со стажем  $\geq 10$  п/лет, имевших GG генотип, и у 58,3% курильщиков с GC генотипом. Относительный риск развития тяжелой бронхиальной обструкции при стаже курения более 10 п/лет и носительстве GG генотипа по полиморфизму rs11562975 гена *TRPM8* составил 2,6 95%ДИ [1,61-4,2] ( $p<0,001$ ), тогда как в случае носительства генотипа GC относительный риск был в 1,8 раза выше (4,7 95%ДИ [1,76-12,52],  $p=0,002$ ). Еще более выраженный эффект

генотипа на формирование тяжелой бронхиальной обструкции наблюдался при злостном курении – в этом случае носительство генотипа GC достоверно повышало риск формирования тяжелой бронхиальной обструкции в 1,8 раза (95%ДИ [1,02-3,13]) по сравнению с генотипом GG,  $p=0,04$ .

Данные, позволяющие достоверно и однозначно объяснить наблюдаемый феномен, в литературе отсутствуют. Тем не менее, можно сформулировать как минимум две рабочие гипотезы. Так, в исследовании,

проведенном *in vivo* на лабораторных животных, доказано, что сигаретный дым является фактором, увеличивающим экспрессию *TRPM8* в эпителии дыхательных путей [11]. Принимая во внимание, что *TRPM8* выполняет важную функцию в рецепции низких температур, а его полиморфизм rs11562975 (GC генотип) ассоциирован с холодной гиперреактивностью дыхательных путей у больных БА [14], можно предположить, что иррегуляция *TRPM8* сигаретным дымом у носителей GC генотипа служит фактором, дополнительно увеличивающим чувствительность дыхательных путей к действию низких температур. В неблагоприятных сезонных климатических условиях, характерных для Дальневосточного региона, такие больные испытывают широкий спектр холод-индуцированных респираторных реакций, включая гиперсекрецию, воспаление и бронхоспазм, что, в конечном счете, приводит к более тяжелому течению заболевания.

Другое объяснение не затрагивает эффект температуры вдыхаемого воздуха и основано на данных о содержании ментола – известного агониста *TRPM8* – в большинстве выпускаемых сигарет, даже в случаях, когда этот факт не указывается производителем [15]. Известно, что количество ментола в таких сигаретах является достаточным для активации *TRPM8*, экспрессированных в респираторном тракте [15]. Последние данные указывают, что пары ментола, содержащиеся в сигаретном дыме, дополнительно усугубляют воспалительную реакцию в бронхах, индуцированную другими компонентами дыма [13]. Причем как действие ментола, так и эффекты активных форм кислорода, образующихся при вдыхании сигаретного дыма, в заметной степени реализуются именно через *TRPM8* [13]. Возможно, что носительство гетерозиготного генотипа по полиморфизму rs11562975, помимо большей чувствительности к холоду, также обуславливает более выраженный ответ на ментол, содержащийся в сигаретах, либо на возникающий оксидативный стресс. На первый взгляд, эта гипотеза входит в противоречие с ранее полученными результатами, согласно которым генотип GC ассоциирован с большей чувствительностью *TRPM8* к холоду, но не к ментолу [9]. Однако, необходимо учитывать, что эффект ментола на чувствительность *TRPM8* оценивался авторами не напрямую, а косвенно, по ментол-опосредованной десенсибилизации рецептора по отношению к холодовому воздействию. Кроме того, можно заметить, что, несмотря на то, что носители GC варианта медленнее реагировали на ментол, результирующий эффект воздействия у них был более выраженным, по сравнению с лицами, имевшими GG генотип.

Таким образом, в дополнение к результатам, продемонстрировавшим неблагоприятное влияние курения на формирование бронхиальной обструкции у больных БА в целом, что согласуется с данными мировой литературы, в настоящем исследовании впервые продемонстрирована возможная роль полиморфизма rs11562975 гена катионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом *TRPM8* как фактора, дополнительно мо-

дулирующего эффект сигаретного дыма на респираторный тракт. У носителей генотипа GC (и, вероятно, CC) при достаточно интенсивном либо продолжительном курении может увеличиваться темп прогрессирующего снижения функции легких и формироваться более выраженная бронхиальная обструкция, по сравнению с лицами, имеющими генотип GG.

Перспективными задачами для будущих исследований представляются определение влияния полиморфизма rs11562975 на чувствительность рецептора к ментолу, а также дополнительная верификация полученных результатов на группе больных БА со стажем курения  $\geq 10$  п/лет с целью более точной оценки эффекта носительства GC, и, в особенности, редкого CC генотипа. Кроме того, перспективной представляется оценка эффектов полиморфизма *TRPM8* у больных ХОБЛ, для которых курение является важнейшим фактором риска развития заболевания.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Althuis M, Sexton M, Prybylski D. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics // *J. Asthma*. 1999. Vol.36, №3. P.257–264.
2. Apostol G., Jacobs Jr, Tsai A., Crow R., Williams O., Townsend M., Beckett W. Early life factors contribute to the decrease in lung function between ages 18 and 40 // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2002. Vol.166, №2. P.166–172.
3. Bautista D., Siemens J., Glazer J.M, Tsuruda P.R, Basbaum A.I, Stucky C.L, Jordt S.E, Julius D. The menthol receptor *TRPM8* is the principal detector of environmental cold // *Nature*. 2007. Vol.448, №7150. P.204–208.
4. Bousquet J., Mantzouranis E., Cruz A., Ait-Khaled N., Baena-Cagnani C., Bleecker E., Brightling C., Burney P., Bush A., Busse W., Casale T., Chan-Yeung M., Chen R., Chowdhury B., Chung K., Dahl R., Drazen J., Fabbri L., Holgate S., Kauffmann F., Haahntela T., Khaltayev N., Kiley J., Masjedi M., Mohammad Y., O'Byrne P., Partridge M., Rabe K., Togias A., van Weel C., Wenzel S., Zhong N., Zuberbier T. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010. Vol.126, №5. P.926–938.
5. Chalmers G., Macleod K., Little S., Thomson L., McSharry C., Thomson N. Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma // *Thorax*. 2002. Vol.57, №3. P.226–230.
6. Chaudhuri R., Livingston E., McMahon A., Thomson L., Borland W., Thomson N. Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2003. Vol.168, №. P.1308–1311.
7. Comhair S., Gaston B., Ricci K., Hammel J., Dweik R., Teague W., Meyers D., Ampleford E., Bleecker E., Busse W., Calhoun W., Castro M., Chung K., Curran-Everett D., Israel E., Jarjour W., Moore W., Peters S., Wen-

zel S., Hazen S., Erzurum S. Detrimental effects of environmental tobacco smoke in relation to asthma severity // *PLoS One*. 2011. Vol.6, №5. e18574.

8. Deering-Rice C., Johansen M., Roberts J., Thomas K., Romero E., Lee J., Yost G., Veranth J., Reilly C. Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) is a mediator of lung toxicity for coal fly ash particulate material // *Mol. Pharmacol.* 2012. Vol.81, №3. P.411–419.

9. Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ya., Potapova T.A., Romashchenko A.G., Voevoda M.I. Single-nucleotide polymorphism rs11562975 of the thermosensitive ion channel TRPM8 gene and human sensitivity to cold and menthol // *Human Physiology*. 2011. Vol.37, №2. P.188–192.

10. Lange P., Parner J., Vestbo J., Schnohr P., Jensen G. A 15 year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma // *N. Engl. J. Med.* 1998. Vol.339, №17. P.1194–1200.

11. Li M., Yang G., Xiang-Dong Zhou, Tselluiko S., Perelman J. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats // *Int. J. Mol. Med.* 2014. Vol.33, №1. P.83–90.

12. Li M., Li Q., Yang G., Kolosov V., Perelman J., Zhou X. 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.

13. Lin A.H., Liu M.H., Ko H.B., Perng D.W., Lee T.S., Kou Y.R. Inflammatory Effects of Menthol vs. Non-menthol Cigarette Smoke Extract on Human Lung Epithelial Cells: A Double-Hit on TRPM8 by Reactive Oxygen Species and Menthol // *Front. Physiol.* 2017. №8. P.263.

14. Naumov D., Perelman J., Kolosov V., Potapova T., Maksimov V., Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8-gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma // *Respirology*. 2015. Vol.20, №8. P.1192–1197.

15. Paschke M., Tkachenko A., Ackermann K., Hutzler C., Henkler F., Luch A. Activation of the cold-receptor TRPM8 by low levels of menthol in tobacco products // *Toxicol. Lett.* 2017. №271. P.50–57.

16. Sanchez J.A., Pierce K.E., Rice J.E., Wangh L.J. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol.101, №7. P.1933–1938.

17. Silverman R., Boudreaux E., Woodruff P., Clark S., Camargo C. Cigarette smoking among asthmatic adults presenting to 64 emergency departments // *Chest*. 2003. Vol.123, №5. P.1472–1479.

18. Siroux V., Pin I., Oryszczyn M., Le Moual N., Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study // *Eur. Respir. J.* 2000. Vol.15, №3. P.470–477.

19. Tomlinson J.E.M., McMahon A., Chaudhuri R., Thompson J., Wood S., Thomson N. Efficacy of low and high dose inhaled corticosteroid in smokers versus non-smokers with mild asthma // *Thorax*. 2005. Vol.60, №4.

P.282–287.

20. Xiong M., Wang J., Guo M., Zhou Q., Lu W. TRPM8 genetic variations associated with COPD risk in the Chinese Han population // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2016. №11. P.2563–2571.

## REFERENCES

1. Althuis M, Sexton M, Prybylski D. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics. *J. Asthma* 1999; 36(3):257–264.

2. Apostol G., Jacobs Jr, Tsai A., Crow R., Williams O., Townsend M., Beckett W. Early life factors contribute to the decrease in lung function between ages 18 and 40. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166(2):166–172.

3. Bautista D., Siemens J., Glazer J.M, Tsuruda P.R, Basbaum A.I, Stucky C.L, Jordt S.E, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 2007; 448(7150):204–208.

4. Bousquet J., Mantzouranis E., Cruz A., Ait-Khaled N., Baena-Cagnani C., Bleecker E., Brightling C., Burney P., Bush A., Busse W., Casale T., Chan-Yeung M., Chen R., Chowdhury B., Chung K., Dahl R., Drazen J., Fabbri L., Holgate S., Kauffmann F., Haahtela T., Khaltayev N., Kiley J., Masjedi M., Mohammad Y., O'Byrne P., Partridge M., Rabe K., Togias A., van Weel C., Wenzel S., Zhong N., Zuberbier T. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126(5):926–938.

5. Chalmers G., Macleod K., Little S., Thomson L., McSharry C., Thomson N. Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma. *Thorax* 2002; 57(3):226–230.

6. Chaudhuri R., Livingston E., McMahon A., Thomson L., Borland W., Thomson N. Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168(11):1308–1311.

7. Comhair S., Gaston B., Ricci K., Hammel J., Dweik R., Teague W., Meyers D., Ampleford E., Bleecker E., Busse W., Calhoun W., Castro M., Chung K., Curran-Everett D., Israel E., Jarjour W., Moore W., Peters S., Wenzel S., Hazen S., Erzurum S. Detrimental effects of environmental tobacco smoke in relation to asthma severity. *PLoS One* 2011; 6(5):e18574.

8. Deering-Rice C., Johansen M., Roberts J., Thomas K., Romero E., Lee J., Yost G., Veranth J., Reilly C. Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) is a mediator of lung toxicity for coal fly ash particulate material. *Mol. Pharmacol.* 2012; 81(3):411–419.

9. Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ya., Potapova T.A., Romashchenko A.G., Voevoda M.I. Single-nucleotide polymorphism rs11562975 of the thermosensitive ion channel TRPM8 gene and human sensitivity to cold and menthol. *Human Physiology* 2011; 37(2):188–192.

10. Lange P., Parner J., Vestbo J., Schnohr P., Jensen G. A 15 year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339(17):1194–1200.

11. Li M., Yang G., Xiang-Dong Zhou, Tselluiko S.,

Perelman J. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats. *Int. J. Mol. Med.* 2014; 33(1):83–90.

12. Li M., Li Q., Yang G., Kolosov V., Perelman J., Zhou X. 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.

13. Lin A.H., Liu M.H., Ko H.B., Perng D.W., Lee T.S., Kou Y.R. Inflammatory Effects of Menthol vs. Non-menthol Cigarette Smoke Extract on Human Lung Epithelial Cells: A Double-Hit on TRPM8 by Reactive Oxygen Species and Menthol. *Front. Physiol.* 2017; 8:263.

14. Naumov D., Perelman J., Kolosov V., Potapova T., Maksimov V., Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8-gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *Respirology* 2015; 20(8):1192–1197.

15. Paschke M., Tkachenko A., Ackermann K., Hutzler C., Henkler F., Luch A. Activation of the cold-receptor TRPM8 by low levels of menthol in tobacco products. *Toxi-*

*col. Lett.* 2017; 271:50–57.

16. Sanchez J.A., Pierce K.E., Rice J.E., Wang L.J. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(7):1933–1938.

17. Silverman R., Boudreaux E., Woodruff P., Clark S., Camargo C. Cigarette smoking among asthmatic adults presenting to 64 emergency departments. *Chest* 2003; 123(5):1472–1479.

18. Siroux V., Pin I., Oryszczyn M., Le Moual N., Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEEA study. *Eur. Respir. J.* 2000; 15(3):470–477.

21. Tomlinson J.E.M., McMahon A., Chaudhuri R., Thompson J., Wood S., Thomson N. Efficacy of low and high dose inhaled corticosteroid in smokers versus non-smokers with mild asthma. *Thorax* 2005; 60(4):282–287.

22. Xiong M., Wang J., Guo M., Zhou Q., Lu W. TRPM8 genetic variations associated with COPD risk in the Chinese Han population. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2016; 11:2563–2571.

Поступила 29.05.2017

Контактная информация

Денис Евгеньевич Наумов,

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

E-mail: denn1985@bk.ru

Correspondence should be addressed to

Denis E. Naumov,

MD, PhD, Senior Staff Scientist,

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

E-mail: denn1985@bk.ru