

DOI: 10.20514/2226-6704-2023-13-3-213-223

УДК [616.24-002-036.12-06:616.13-004.6]-07

EDN: PKZRCJ



С.Н. Котляров*, И.А. Сучков, О.М. Урясьев,
А.А. Котлярова

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Россия

АНАЛИЗ БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ В СОЧЕТАНИИ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

S.N. Kotlyarov*, I.A. Suchkov, O.M. Uryasev,
A.A. Kotlyarova

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Analysis of Inflammation Biomarkers in Exhaled Breath Condensate in Patients with COPD Combined with Peripheral Arterial Disease

Резюме

Актуальность. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одной из наиболее значимых респираторных патологий, что связано с ее высокой распространенностью и влиянием на прогноз. Частота обострений и коморбидность — важные факторы, влияющие на течение ХОБЛ. Считается, что локальное и системное воспаление могут лежать в основе гетерогенного течения ХОБЛ. В этой связи оценка активности локального воспаления в дыхательных путях может быть полезна для оценки течения ХОБЛ. **Цель.** Изучить молекулярные механизмы ХОБЛ и оценить биомаркеры воспаления в конденсате выдыхаемого воздуха у пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями в сочетании с периферическим атеросклерозом. **Материалы и методы.** Проведен биоинформационный анализ данных из Gene Expression Omnibus (GEO) с целью изучения геной онтологии дифференциально экспрессируемых генов при ХОБЛ. Далее проведено исследование провоспалительных цитокинов интерлейкина — 1 бета (interleukin (IL)-1 β) и фактора некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha (TNF α)) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) у пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями без сопутствующих атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (АССЗ) и у пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК) в сравнении со здоровым контролем. **Результаты.** Дифференциально экспрессируемые гены вовлечены в биологические процессы и сигнальные пути по Киотской энциклопедии генов и геномов (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG пути), связанные с иммунным ответом, которые могут связывать развитие и прогрессирование ХОБЛ и атеросклероза. У пациентов с ХОБЛ в сочетании с атеросклерозом наблюдались более высокие значения IL-1 β и TNF α в КВВ, по сравнению с контролем ($p < 0,001$). У пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями и ОААНК были обнаружены наиболее высокие уровни IL-1 β и TNF α в КВВ в сравнении с пациентами без АССЗ ($p = 0,0038$ и $p = 0,0005$ соответственно). **Вывод.** У пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями и ОААНК повышены уровни TNF α и IL1 β в КВВ, что может свидетельствовать о наличии локального воспаления в дыхательных путях, выраженность которого связана с клиническим течением ХОБЛ.

Ключевые слова: ХОБЛ, воспаление, конденсат выдыхаемого воздуха, иммунная система, цитокины

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что данная работа, её тема, предмет и содержание не затрагивают конкурирующих интересов

*Контакты: Станислав Николаевич Котляров, e-mail: SKMR1@yandex.ru

*Contacts: Stanislav N. Kotlyarov, e-mail: SKMR1@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7083-2692>

Источники финансирования

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования

Статья получена 06.03.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Для цитирования: Котляров С.Н., Сучков И.А., Урясьев О.М. и др. АНАЛИЗ БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ В СОЧЕТАНИИ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ. Архив внутренней медицины. 2023; 13(3): 213-223. DOI: 10.20514/2226-6704-2023-13-3-213-223. EDN: PKZRCJ

Abstract

Background. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the most significant diseases due to its high prevalence and impact on prognosis. The frequency of exacerbations and comorbidity are important factors influencing the course of COPD. It is believed that local and systemic inflammation may underlie this heterogeneous course of COPD. In this regard, assessment of local inflammation activity in the respiratory tract may be useful to assess the course of COPD. **Aim.** To study molecular mechanisms of COPD and assess inflammation biomarkers in the exhaled breath condensate (EBC) in patients with COPD with the phenotype of frequent exacerbations combined with peripheral atherosclerosis. **Materials and Methods.** Bioinformatic analysis of data from Gene Expression Omnibus (GEO) was performed to examine gene ontology of differentially expressed genes in COPD. Proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) in EBC in COPD patients without concomitant atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) in the stable course phase, in patients with COPD with the phenotype of frequent exacerbations and peripheral artery disease (PAD) compared with healthy controls were examined. **Results.** Differentially expressed genes are involved in biological processes and signaling pathways according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG pathway) associated with the immune response that may link the development and progression of COPD and atherosclerosis. Patients with COPD combined with atherosclerosis had higher values of IL-1 β and TNF α in EBC compared with controls ($p < 0.001$). COPD patients with frequent exacerbations and PAD had the highest levels of IL-1 β and TNF α in EBC compared with patients without ASCVD ($p = 0.0038$ and $p = 0.0005$, respectively). **Conclusion.** TNF α and IL-1 β levels in EBC are elevated in COPD patients with frequent exacerbations and PAD, which may indicate the presence of local inflammation in the airways, the severity of which is associated with the clinical course of COPD.

Key words: COPD, inflammation, exhaled breath condensate, immune system, cytokines

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests

Sources of funding

The authors declare no funding for this study

Article received on 06.03.2023

Accepted for publication on 17.05.2023

For citation: Kotlyarov S.N., Suchkov I.A., Uryasev O.M. et al. Analysis of Inflammation Biomarkers in Exhaled Breath Condensate in Patients with COPD Combined with Peripheral Arterial Disease. The Russian Archives of Internal Medicine. 2023; 13(3): 213-223. DOI: 10.20514/2226-6704-2023-13-3-213-223. EDN: PKZRCJ

BODE — В — body mass index (индекс масс тела), О — obstruction (обструкция) D — dyspnea (одышка), E — exercise tolerance (толерантность к физической нагрузке), BP — Biological Processes, CC — Cellular Components, FDR — false discovery rate, GEO — The Gene Expression Omnibus, GO — GENE ONTOLOGY, GOLD — Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, IL-1 β — Interleukin1 β , интерлейкин1 β , KEGG — Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, MCODE — Molecular Complex Detection, MF — Molecular Functions, mMRC — шкала Modified Medical Research Council Dyspnea Scale, NCBI — The National Center for Biotechnology Information, PAD — peripheral artery disease, PPI — Protein-Protein Interaction, STRING — Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes database, TLR — Toll-like receptor, TNF α — Tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли альфа, ACC3 — атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания, ДИ — доверительный интервал, ИБС — ишемическая болезнь сердца, КВВ — конденсат выдыхаемого воздуха, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ОААНК — облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, ОФV₁ — объем форсированного выдоха за 1-ю секунду, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких

Введение

Актуальность проблемы сочетанного течения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (АССЗ) обусловлена их большой медицинской и социальной значимостью, а также экономическим бременем, которое они несут как для пациентов и их семей, так и систем здравоохранения в целом. Эти заболевания характеризуются высокой распространенностью, входят в число ведущих причин стойкой нетрудоспособности и смертности [1]. Оба состояния имеют несколько общих факторов риска, таких как курение и старение, связаны с более высоким риском неблагоприятных исходов. Эти причины обуславливают необходимость поиска новых диагностических

инструментов, которые позволят повысить эффективность раннего выявления и ведения пациентов. В последние годы растет интерес к клиническому значению коморбидной ХОБЛ и облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей (ОААНК), поскольку пациенты с этими заболеваниями могут иметь повышенный риск смертности и заболеваемости. Исследования показали, что пациенты с сопутствующей ХОБЛ и ОААНК имеют значительно более высокий риск смертности, чем пациенты с любым из этих состояний по отдельности. Считается, что повышенный риск смертности обусловлен общими факторами риска и влиянием этих состояний на сердечно-сосудистую систему. Пациенты с сопутствующей ХОБЛ и ОААНК также подвергаются более высокому риску госпитализации

и имеют более низкое качество жизни. Понимание клинической значимости этих двух состояний и их общих факторов риска важно для разработки эффективных стратегий ведения и улучшения результатов лечения пациентов [2]. Важно отметить, что проблема коморбидного течения ХОБЛ и ОААНК нередко недооценивается терапевтами, которые в большей степени ориентированы на другие локализации атеросклероза, такие как ишемическая болезнь сердца.

Патогенез атеросклероза и ХОБЛ включает множество различных механизмов, имеющих сложные пути регуляции [3–5]. В патогенезе как ХОБЛ, так и атеросклероза важная роль отводится воспалению, анализу биомаркеров которого посвящены многочисленные работы [6]. Известно, что ХОБЛ развивается у курильщиков и характеризуется прогрессирующим течением, связанным с хроническим воспалением в дыхательных путях. В этом воспалении участвуют различные иммунные клетки, такие как макрофаги и нейтрофилы. Они продуцируют широкий спектр хемокинов и воспалительных цитокинов, которые способствуют рекрутированию новых иммунных клеток и усиливают воспаление [6]. Помимо локального воспаления в бронхах, воспаление при ХОБЛ имеет также системный компонент, который лежит в основе коморбидных связей с другими заболеваниями, такими как атеросклероз [7]. Растущее число доказательств усиливает понимание того, что воспаление, протекающее в сосудистой стенке, играет важную роль в атерогенезе. Эндотелиальные клетки, которые монослоем выстилают стенки артерий, выполняют множество функций, в том числе обеспечивают барьерную функцию, регулируют сосудистую гемодинамику и поведение других клеток в сосудистой стенке и кровотоке [8,9]. Эндотелиальная дисфункция считается ключевым ранним событием атерогенеза [10]. Системное воспаление, характерное для ХОБЛ, способствует развитию эндотелиальной дисфункции, рекрутированию иммунных клеток из кровотока в сосудистую стенку и прогрессированию атеросклероза. Окислительный стресс, связанный с курением, является еще одним важным фактором, способствующим атерогенезу при ХОБЛ [11]. Макрофаги, которые дифференцируются в сосудистой стенке из привлеченных моноцитов и тканевых предшественников макрофагов, участвуют в поглощении липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), что приводит к образованию пенных клеток [12]. Макрофаги в атеросклеротической бляшке имеют различную поляризацию, в том числе имеют провоспалительный фенотип, который характеризуется продукцией провоспалительных цитокинов, способствующих усилению воспаления [13].

Учитывая данные о роли воспаления в дыхательных путях при ХОБЛ, представляют интерес данные по оценке биомаркеров воспаления в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) [14]. Известно, что выдыхаемый воздух насыщен водяными парами, которые могут быть конденсированы при охлаждении. И хотя большая часть конденсата состоит из водяного пара, он также содержит аэрозоли различных частиц из нижнего

отдела дыхательных путей. Таким образом, локальное воспаление в бронхах при ХОБЛ является источником воспалительных агентов в КВВ. Биомаркеры воспаления в КВВ могут представлять большой клинический интерес, так как отражают локальные процессы в бронхах и являются ценным источником диагностической информации [15].

КВВ — это полученный неинвазивным методом биоматериал, содержащий множество различных биомолекул, включая цитокины, которые могут дать представление о патофизиологии воспаления дыхательных путей [16]. Биомаркеры в КВВ были предложены в качестве чувствительных и специфических индикаторов легочного воспаления и окислительного стресса, и могут предоставить важную информацию о патогенезе и клиническом течении ХОБЛ. Такие провоспалительные цитокины как фактор некроза опухоли-альфа (TNF α) и интерлейкин (IL)-1 β , были обнаружены в КВВ пациентов с ХОБЛ и могут быть связаны с характером течения ХОБЛ [14]. Предполагается, что выраженность локального воспаления может быть обусловлена системным воспалением и развитием коморбидных заболеваний [6]. Обострения ХОБЛ связаны с усилением воспаления и являются важными факторами, влияющим на течение ХОБЛ.

Таким образом, молекулярные механизмы, лежащие в основе развития и прогрессирования ХОБЛ, а также механизмы, которые связывают ХОБЛ и ОААНК представляют большой исследовательский и клинический интерес.

Целью настоящего исследования является оценка биомаркеров воспаления в КВВ у пациентов с ХОБЛ с фенотипом частых обострений и ОААНК.

Материалы и методы

Идентификация молекулярных механизмов патогенеза ХОБЛ

Проводился анализ набора данных GSE5058, включающего данные об уровнях экспрессии генов в образцах эпителия бронхов пациентов с ХОБЛ, полученных из The Gene Expression Omnibus (GEO), The National Center for Biotechnology Information (NCBI), полученных методом волоконно-оптической бронхоскопии у 12 здоровых некурящих и 6 курильщиков с ХОБЛ [17]. Данные были получены с использованием платформы GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Нормализация данных проводилась с использованием метода нормализации Mas5. GEO является международным публичным хранилищем, которое архивирует и свободно распространяет данные микрочипов, секвенирования следующего поколения и других форм высокопроизводительных данных функциональной геномики, представленных исследовательским сообществом [18].

Для оценки дифференциально экспрессируемых генов проведен биоинформационный анализ в группах сравнения с использованием пакета limma в Bioconductor, R (v. 4.0.2) [19]. При анализе проводилась

нормализация данных, включая \log_2 трансформацию и квантильную нормализацию. Для корректировки уровня статистической значимости при проведении множественных сравнений применялся алгоритм Benjamini & Hochberg (англ. false discovery rate, FDR). Условиями для скрининга дифференциально экспрессируемых генов были абсолютное значение $\log_{FC} > 1$ и значения p , удовлетворяющие условию $FDR \leq 5\%$.

Оценка молекулярных (белок-белковых) взаимодействий (англ. Protein-Protein Interaction, PPI) белковых продуктов общих дифференциально экспрессируемых генов проведена с использованием онлайн-инструмента Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes database (STRING) [20]. Взаимосвязи между дифференциально экспрессируемыми генами были проанализированы с помощью подключаемого модуля Network Analyzer программного обеспечения Cytoscape [21]. Кроме того, для поиска кластеров генов в сети PPI применялось определение молекулярных комплексов (Molecular Complex Detection, MCODE v. 2.0.2) [22].

Наиболее важные гены в сети были идентифицированы с помощью приложения cytoHubba в программном обеспечении Cytoscape (версия 3.9.1) [23]. Плагин Cytoscape cytoHubba использовался для ранжирования узлов в сети по их сетевым характеристикам. Для анализа, прогнозирования и визуализации основных белков в сетях молекулярного PPI взаимодействия использовался алгоритм топологического анализа Maximal Clique Centrality (MCC). Идентификация биологических процессов Gene Ontology (GO) и путей KEGG для наиболее важных генов в сети был выполнен с помощью инструментов GEO2Enrichr [24], ShinyGO v0.741 [25] и g:Profiler [26] были выполнены анализ геной онтологии (gene ontology, GO), в соответствии с их биологическими процессами, полученными из базы консорциума генов THE GENE ONTOLOGY RESOURCE [27], идентификация сигнальных путей по Киотской энциклопедия генов и геномов KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [28,29] и базе Reactome [30], а также их функциональное обогащение и визуализация с помощью Weishengxin. Скорректированное с помощью алгоритма Benjamini & Hochberg значение $p < 0,05$ было установлено как порог для идентификации биологических процессов и путей.

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

В соответствии с целью исследования были сформированы следующие группы: 20 пациентов с частыми обострениями ХОБЛ без АССЗ (мужчины, средний возраст 60,55 (95 % ДИ 57,21; 63,89) лет), 20 пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями и ОААНК (мужчины, средний возраст 63,9 (95 % ДИ 61,54; 66,26) лет) и контрольная группа, представленная 20 здоровыми лицами (мужчины, средний возраст 62,85 (95 % ДИ 61,6; 64,1) лет).

Все участники исследования дали добровольное информированное согласие на участие, соответствовали критериям включения и не имели критериев исключения из него.

Критерии включения в первую группу (пациенты с ХОБЛ без АССЗ):

1. ХОБЛ вне периода обострения
2. Отсутствие клинически манифестированных АССЗ

Критерии включения во вторую группу (пациенты с ХОБЛ и ОААНК):

1. ХОБЛ вне периода обострения
2. Клинически манифестированные формы ОААНК

Критерии включения в группу контроля (здоровые лица):

1. Отсутствие бронхообструктивных заболеваний
2. Отсутствие клинически манифестированных АССЗ

Критерии исключения:

1. Острые инфекционные заболевания
2. Острые формы ишемической болезни сердца (ИБС)
3. Почечная и печеночная недостаточность
4. Онкологические заболевания
5. Нарушения психики
6. Постоянный прием противовоспалительных средств, системных глюкокортикостероидов
7. Бронхиальная астма

Диагностика ХОБЛ осуществлялась на основе клинико-anamnestических сведений и данных спирометрии в соответствии с критериями Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) [31]. Обострения заболевания определялись в соответствии с критериями Anthonisen N.R. [32] В соответствии с клиническими рекомендациями по хронической обструктивной болезни легких, одобренных Научно-практическим Советом Минздрава РФ, частыми считаются обострения, которые отмечаются 2 и более раз в год. Пациенты, включенные в текущее исследование, имели 3 и более обострений в год. ОААНК соответствовал стадии ПБ по классификации А.В. Покровского–Fontaine и был установлен на основе данных клинического и ультразвукового обследования в соответствии с Национальными рекомендациями по диагностике и лечению заболеваний артерий нижних конечностей [33].

Одышка оценивалась с помощью шкалы mMRC (modified Medical Research Council Dyspnea Scale), коморбидные заболевания оценивались в соответствии с индексом коморбидности Чарльсона [34]. Также рассчитывался индекс BODE, который является многомерным индексом и включает следующие показатели: В — body mass index (индекс массы тела), О — obstruction (обструкция) D — dyspnea (одышка), E — exercise tolerance (толерантность к физической нагрузке) [35].

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Получение КВВ

Сбор КВВ осуществляли с помощью портативного устройства R-Tube (Respiratory Research, США) в соответствии с методикой производителя. Исследование осуществляли в первой половине дня после тщательного ополаскивания полости рта дистиллированной водой. Образцы КВВ собирали в течение 10 мин с использованием предварительно охлажденной до -20°C RTube. Собранные пробы были помещены в полипропиленовые пробирки, заморожены и хранились в морозильнике при -80°C до проведения анализа.

Таблица 1. Характеристика групп сравнения
Table 1. Characteristics of comparison groups

Показатель/ Parameter	Контрольная группа/ Control group (n=20)	Пациенты с ХОБЛ без АССЗ/ Patients with COPD without ASCVD (n=20)	Пациенты с ХОБЛ и ОААНК/ Patients with COPD and PAD (n=20)	P
Возраст, лет/ Age, years	62,85 (95 % ДИ 61,6; 64,1)	60,55 (95 % ДИ 57,21; 63,89)	63,9 (95 % ДИ 61,54; 66,26)	p ^{1,2} = 0,1877 p ^{1,3} = 0,4344 p ^{2,3} =0,1033
Курят на момент включения/ Smokers	0	100 %	100 %	-
Индекс пачек-лет/ Pack-years index	0	35,8 (95 % ДИ 31,09; 40,51)	39,2 (95 % ДИ 35,4; 43)	p= 0,0861
ОФВ ₁ , % от должных/ FEV ₁ , % predicted	98,58 (95 % ДИ 97,82; 99,34)	44,96 (95 % ДИ 36,97; 52,96)	44,21 (95 % ДИ 38,28; 50,15)	p ^{1,2} <0,001 p ^{1,3} <0,001 p ^{2,3} =0,4516
Стадия ХОБЛ/ COPD stage	-	2,85 (95 % ДИ 2,54; 3,16)	3,0 (95 % ДИ 2,66; 3,34)	p= 0,4528
Одышка/ Dyspnea, MRC	0,65 (95 % ДИ 0,27; 1,03)	2,85 (95 % ДИ 2,47; 3,23)	3,15 (95 % ДИ 2,77; 3,53)	p ^{1,2} <0,001 p ^{1,3} <0,001 p ^{2,3} = 0,1339
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	26,04 (95 % ДИ 25,04; 27,05)	28,15 (95 % ДИ 26,32; 29,98)	26,93 (95 % ДИ 25,44; 28,42)	p ^{1,2} = 0,0231 p ^{1,3} = 0,2706 p ^{2,3} = 0,2706
Индекс коморбидности Чарльсон/ Charlson Comorbidity Index	1,45 (95 % ДИ 0,8; 2,1)	4,6 (95 % ДИ 3,87; 5,33)	7,4 (95 % ДИ 6,37; 8,43)	p ^{1,2} <0,001 p ^{1,3} <0,001 p ^{2,3} <0,001
Гипертоническая болезнь/ Arterial hypertension	9 (45 %)	11 (55 %)	19 (95 %)	p ^{1,2} =0,593 p ^{1,3} <0,001 p ^{2,3} =0,0027
ИБС/ Coronary artery disease	0	0	20 (100 %)	-
ХСН/ Chronic heart failure	0	3 (15 %)	10 (50 %)	p ^{2,3} <0,001
Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/l	4,68 (95 % ДИ 4,47; 4,89)	4,83 (95 % ДИ 4,27; 5,39)	6,27 (95 % ДИ 5,81; 6,72)	p ^{1,2} = 0,6142 p ^{1,3} <0,001 p ^{2,3} <0,001
ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/l	2,7 (95 % ДИ 2,47; 2,93)	2,85 (95 % ДИ 2,49; 3,21)	3,96 (95 % ДИ 3,61; 4,31)	p ^{1,2} = 0,5054 p ^{1,3} <0,001 p ^{2,3} <0,001
Глюкоза крови, ммоль/л Blood glucose, mmol/l	4,43 (95 % ДИ 4,16; 4,7)	5,02 (95 % ДИ 4,59; 5,45)	6,14 (95 % ДИ 5,38; 6,9)	p ^{1,2} = 0,0427 p ^{1,3} <0,001 p ^{2,3} = 0,0093

Иммуноферментный анализ

Уровни TNF α и IL-1 β в КВВ определяли с использованием соответствующих наборов ELISA. Для определения концентрации цитокинов использовали наборы Cloud-Clone Corp. (США). Набор High Sensitive ELISA Kit for TNF α и набор ELISA Kit for IL-1 β имели чувствительность 0,52 пг/мл и 0,49 пг/мл соответственно.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных полученных проводилась с помощью программного обеспечения MedCalc (версия 20.1.4) и пакетов для R (версия 4.2.2). Категориальные данные сравнивали между подгруппами с использованием хи-квадратного теста и непрерывных переменных с использованием t-теста Стьюдента или U-теста Манна-Уитни, анализа дисперсии

(ANOVA) или ANOVA Крускала-Уоллиса после оценки критериев использования параметрических тестов. Различия значений считалось статистически значимыми при p<0,05. При представлении данных указывался 95 % доверительный интервал (ДИ) среднего значения.

Этическое одобрение

Клиническая часть исследования проведена в соответствии с этическими принципами «Надлежащей клинической практики» (Good Clinical Practice), Хельсинской декларации, нормативно-правовых актов, регламентирующих оказание медицинской помощи в России, и получила одобрение локального этического

комитета ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Все пациенты получили детальную информацию об участии в исследовании и подтвердили согласие на участие в исследовании.

Результаты

Идентификация дифференциально экспрессируемых генов и анализ их генной онтологии

Проведенный биоинформационный анализ позволил идентифицировать 1355 дифференциально экспрессируемых генов с повышенной экспрессией и 370 дифференциально экспрессируемых генов с пониженной экспрессией (рис. 1).

Полученные дифференциально экспрессируемые гены с повышенной экспрессией использовались для построения сети белок-белковых взаимодействий, в которой с помощью плагина MCODE были идентифицированы 35 кластеров. Для дальнейшего анализа был выбран наиболее значимый кластер из общей подсети, имеющий показатель MCODE 16,857 и имеющий 36 узлов (рис. 2). С помощью плагина cytoHubba в выбранном кластере были идентифицированы следующие гены концентраторы (рис. 3).

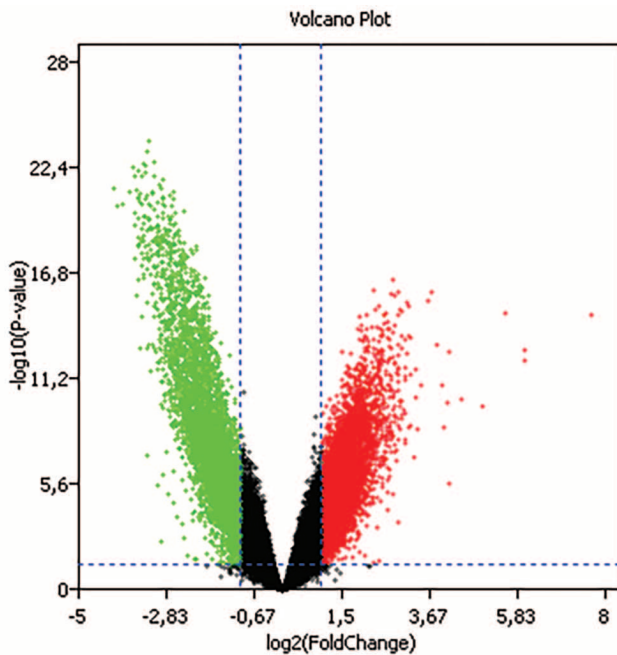


Рисунок 1. График Volcano, характеризующий дифференциально экспрессируемые гены

Figure 1. Volcano plot characterizing differentially expressed genes

Примечание: цветные точки на графике показывают гены, демонстрирующие разницу в экспрессии с $|\log_2 FC| > 1$ и $p < 0,05$, в то время как черные точки не соответствуют этим критериям. Красные точки указывают на дифференциально экспрессируемые гены с повышенной регуляцией и отображаются в правой части графика, а зеленые — на дифференциально экспрессируемые гены с пониженной регуляцией (они отображаются на противоположной стороне).

Note: The colored dots in the graph indicate genes that show differential expression with $|\log_2 FC| > 1$ and $p < 0,05$, while the black dots do not meet these criteria. Red dots indicate differentially expressed genes with up-regulation and are displayed on the right side of the graph, and green dots indicate differentially expressed genes with down-regulation (they are displayed on the opposite side).

Анализ функционального обогащения по биологическим процессам идентифицированных генов-концентраторов в модулях был в основном связан с иммунной системой (рис. 4).

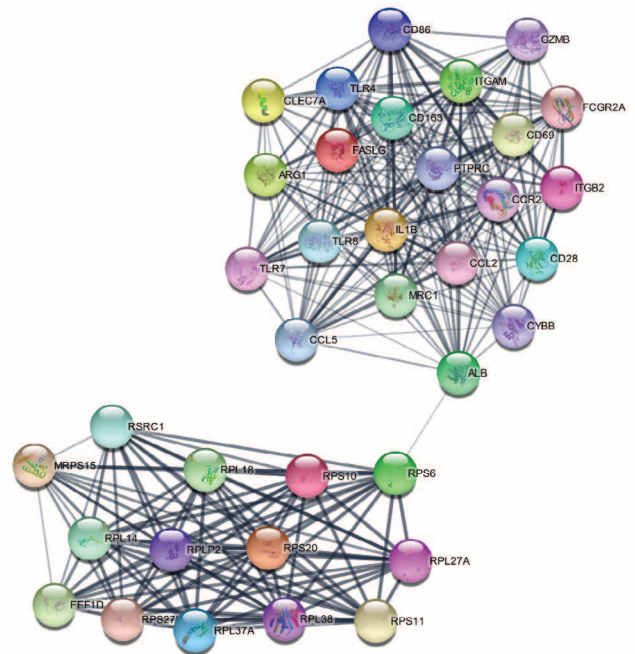


Рисунок 2. Кластер 1, идентифицированный в сети белок-белковых взаимодействий, полученных из дифференциально экспрессируемых генов при ХОБЛ
Figure 2. Cluster 1 identified in a network of protein-protein interactions derived from differentially expressed genes in COPD

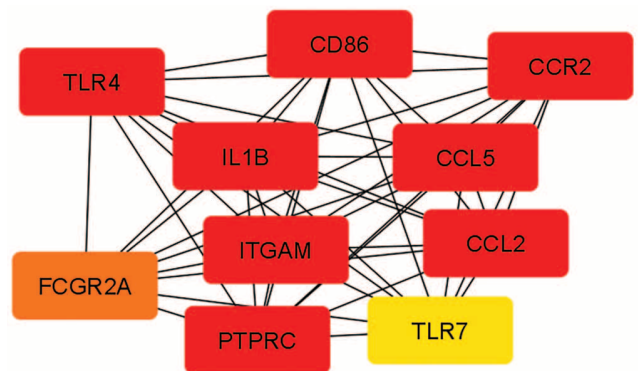


Рисунок 3. Наиболее важные гены, оцененные в сети белок-белковых взаимодействий с использованием алгоритма топологического анализа MCC в CytoHubba

Figure 3. The most important genes identified in the PPI network using the MCC algorithm in CytoHubba

Примечание: наиболее важные гены ранжированы следующим образом: наиболее значимые гены выделены красным цветом, менее значимые — оранжевым, еще менее значимые — желтым
Note: The hub genes are ranked as follows: the most important genes are highlighted in red, the least important genes are highlighted in orange, and the least important genes are highlighted in yellow

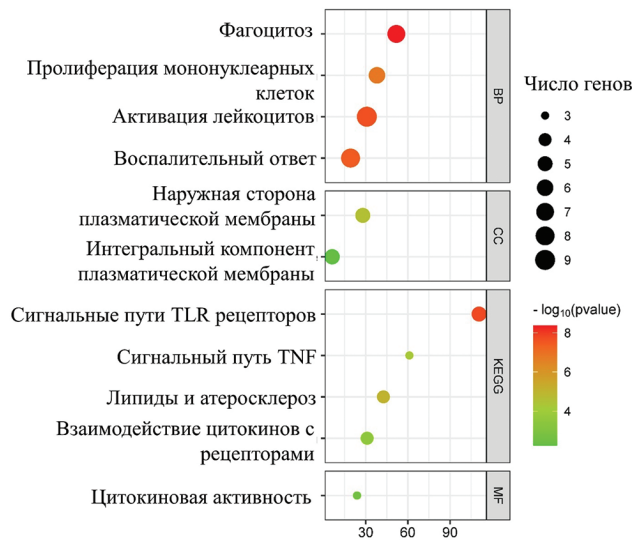


Рисунок 4. Биологические процессы (BP), KEGG пути (KEGG), клеточные компоненты (CC) и молекулярные функции (MF), в которые вовлечены гены концентраторы. Данные ранжированы по значениям Fold Enrichment

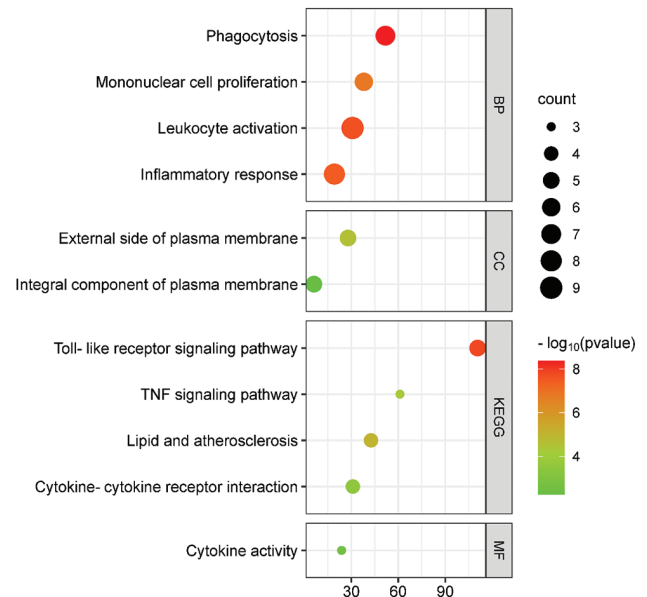


Figure 4. Biological Processes (BP), KEGG Pathways (KEGG), Cellular Components (CC), and Molecular Functions (MF) in which Hub genes are involved. The data are ranked by Fold Enrichment values

Анализ функционального обогащения этих генов-концентраторов по KEGG путям был в основном связан: с сигнальными путями TLR рецепторов (hsa04620); сигнальным путем TNF (hsa04668); взаимодействием цитокинов с рецепторами (hsa04060) и сигнальным путем липидов и атеросклероза (hsa05417), что характеризует наличие общих молекулярных связей ХОБЛ с коморбидностью (рис. 4). Молекулярные функции генов концентраторов были связаны с цитокиновой активностью, тогда как функциональное обогащение генов по клеточным компонентам было связано с плазматической мембраной клеток.

Таким образом, полученные данные позволили идентифицировать цели для дальнейшего экспериментального исследования. Было установлено, что воспаление в дыхательных путях при ХОБЛ характеризуется вовлеченностью врожденной иммунной системы с участием цитокинов, таких как IL-1 β и TNF α .

Результаты анализа цитокинов в КВВ

Результаты исследования показали, что в группе пациентов с ХОБЛ отмечались более высокие уровни IL-1 β и TNF α в КВВ по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). При этом в группе пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями и ОААНК обнаружены более высокие показатели уровня TNF α , по сравнению как с контрольной группой, так и группой ХОБЛ без АССЗ (рис. 5).

Уровни IL-1 β в КВВ показали корреляцию средней силы с частотой обострений ($r = 0,612$ (95% ДИ 0,453; 0,733), при $p < 0,0001$), а также значениями ОФВ1 от должных значений ($r = -0,650$ (95% ДИ -0,761; -0,503), при $p < 0,0001$) и высокую корреляцию с индексом VODE ($r = 0,711$ (95% ДИ 0,582; 0,805), при $p < 0,0001$). При этом уровни TNF α в КВВ выявили корреляцию средней силы с частотой обострений ($r = 0,557$ (95% ДИ 0,384; 0,692 при $p < 0,0001$), значениями ОФВ1 от

должных значений ($r = -0,646$ (95% ДИ -0,758; -0,497), при $p < 0,0001$) и высокую корреляцию с индексом VODE ($r = 0,757$ (95% ДИ 0,645; 0,838), при $p < 0,0001$).

Таким образом, анализ биомаркеров воспаления в КВВ показал, что ХОБЛ характеризуется выраженностью локального воспаления, при этом пациенты с ХОБЛ в сочетании с ОААНК имеют более высокие уровни биомаркеров воспаления, которые могут быть связаны с выраженностью системного воспаления и более тяжелым течением заболевания.

Обсуждение

В представленном исследовании нами был проведен биоинформационный анализ данных, полученных из GEO, которые позволили идентифицировать сигнальные пути, в которые были вовлечены дифференциально экспрессируемые гены с повышенной экспрессией в эпителии дыхательных путей при ХОБЛ в сравнении с контрольной группой, представленной здоровыми некурящими. С учетом полученных данных была проведена оценка провоспалительных биомаркеров в КВВ у пациентов с ХОБЛ, имеющих гетерогенное течение. В исследование были включены пациенты с ХОБЛ без сопутствующих клинически манифестированных АССЗ. Группу сравнения составили пациенты с ХОБЛ и ОААНК. Данные из обеих групп сравнивались со здоровыми добровольцами, не имеющими ХОБЛ и клинически манифестированных АССЗ, не курящих ранее и сопоставимых с основными группами по возрасту. У пациентов с ХОБЛ и у здоровых лиц из группы контроля получали конденсат выдыхаемого воздуха с помощью устройства RTube в соответствии с протоколом производителя с целью оценки провоспалительных цитокинов с помощью иммуноферментного анализа.

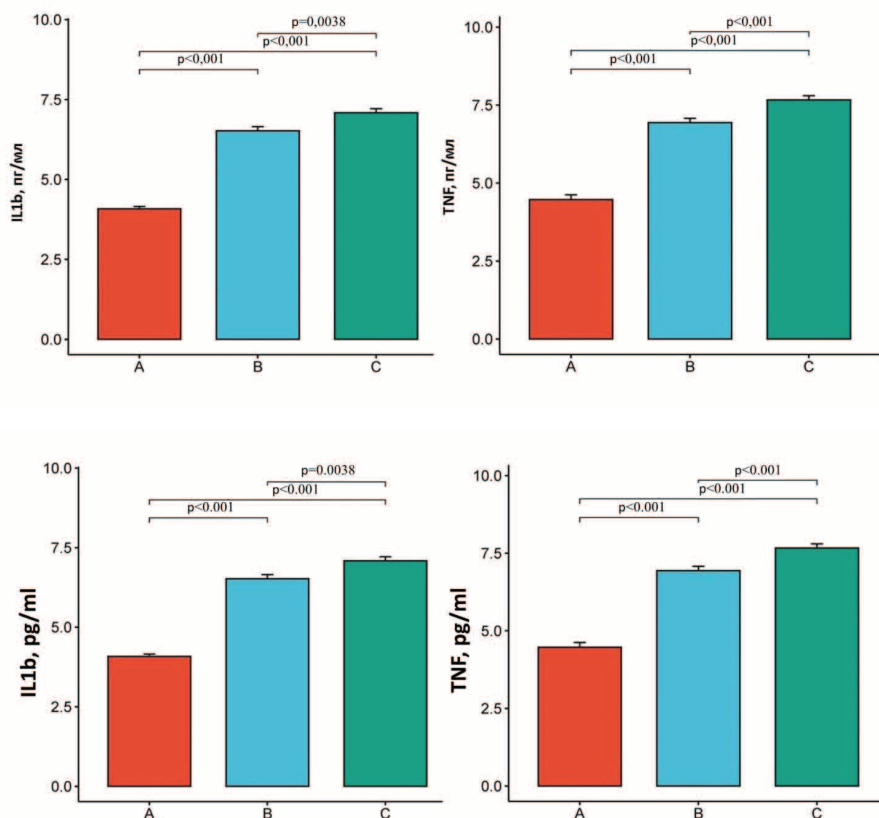


Рисунок 5. График изменений уровней TNFα и IL-1β в КВВ в группах сравнения

Примечание: А — уровни цитокинов в группе контроля; В — уровни цитокинов в группе пациентов ХОБЛ с частыми обострениями без АССЗ; С — уровни цитокинов в группе пациентов ХОБЛ с частыми обострениями и ОААНК

Figure 5. Plot of changes in TNFα and IL-1β levels in the EBC in the comparison groups.

Note: A — cytokine levels in the control group; B — cytokine levels in the group of COPD patients with frequent exacerbations without ASCVD; C — cytokine levels in the group of COPD patients with frequent exacerbations and PAD.

Было установлено, что дифференциально экспрессируемые гены из клеток эпителия бронхов при ХОБЛ были связаны с врожденной иммунной системой, а именно с сигнальными путями TLR, TNF, взаимодействием цитокинов, таких как IL-1β. У пациентов с ХОБЛ отмечались более высокие уровни TNFα и IL-1β в КВВ по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о наличии локального воспаления при ХОБЛ. При этом у пациентов с ХОБЛ и ОААНК обнаружены более высокие уровни TNFα и IL-1β в КВВ по сравнению как с группой контроля, так и группой ХОБЛ без АССЗ. Эти данные демонстрируют участие локального воспаления в бронхах в патогенезе ХОБЛ и его клинически гетерогенном течении.

Полученные в настоящем исследовании данные расширяют понимание роли воспаления в прогрессировании коморбидного течения ХОБЛ. В предыдущих исследованиях было показано, что ХОБЛ ассоциирована с повышенным риском заболевания периферических артерий и смертности [36,37]. При этом иммунные биологические процессы и сигнальные пути, могут связывать развитие и прогрессирование ХОБЛ и атеросклероза [38].

Известно, что ХОБЛ — это заболевание, в основе которого лежит хроническое воспаление в дыхательных путях, связанное с длительным воздействием компонентов табачного дыма. Это воспаление протекает с участием многих клеток, которые продуцируют различные цитокины. Воспаление при ХОБЛ имеет локальный и системный компоненты, характеризующиеся повышением уровней цитокинов, включая TNFα и IL-1β, которые связаны с тяжестью заболевания [39, 40].

Выраженность воспаления и продукция цитокинов усиливаются при обострениях ХОБЛ, которые являются важной клинической характеристикой заболевания. Ранее было показано, что обострения ХОБЛ приводили к значительному повышению цитокинов IL-1β и TNFα в КВВ по сравнению со стабильной ХОБЛ [41]. Системное воспаление и циркулирующие в кровотоке цитокины являются важным связующим звеном между ХОБЛ и атеросклерозом, в том числе ОААНК. При этом высокие уровни цитокинов могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров для прогнозирования прогрессирования атеросклероза [42]. Недавние исследования продемонстрировали наличие связей между обострениями ХОБЛ и увеличением риска острых сердечно-сосудистых событий. При этом предотвращение обострений может снизить риск последующих сердечно-сосудистых катастроф [43, 44]. Интересно, но наличие даже одного умеренного обострения у пациентов с ХОБЛ с высокой симптоматической нагрузкой увеличивает вероятность последующих обострений и смерти в течение трех последующих лет [45].

IL-1β является важным цитокином врожденной иммунной системы и рассматривается в качестве важного биомаркера воспаления. Растущее число доказательств усиливают понимание значимости этого цитокина в развитии ХОБЛ [46]. Кроме того, IL-1β вовлечен в патогенез атеросклероза, что было показано в клинических исследованиях канакинумаба CANTOS (Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study) [47]. IL-1β вырабатывается различными типами клеток, включая моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки,

в ответ на различные стимулы, такие как бактериальные и вирусные инфекции, окисленные липопротеины и локальные нарушения гемодинамики. Было показано, что IL-1 β способствует атерогенезу через несколько механизмов, включая индукцию провоспалительных генов, стимуляцию выработки реактивных форм кислорода и активацию эндотелиальных клеток. IL-1 β может активировать и привлекать иммунные клетки к месту воспаления, включая моноциты и Т-клетки, которые способствуют образованию атеросклеротических бляшек [48]. Имеются данные, что IL-1 β стимулирует выработку других провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α и интерлейкин-6 (IL-6), которые могут еще больше усилить воспалительный ответ. Помимо своего провоспалительного действия, IL-1 β может непосредственно способствовать развитию атеросклеротических бляшек. Исследования показали, что IL-1 β способен стимулировать экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, способствуя прикреплению и миграции моноцитов в субэндотелиальное пространство [49, 50].

TNF α является другим провоспалительным цитокином, который имеет множество функций и демонстрирует вовлеченность в патогенез различных заболеваний. Уровни TNF α могут быть связаны с мышечной слабостью, вызванной саркопенией и кахексией у пациентов с ХОБЛ [51]. TNF α является цитокином, который играет важную роль в атерогенезе [52].

Таким образом, системное воспаление является значимым фактором, способствующим развитию атеросклероза у пациентов с ХОБЛ. При этом высокая частота обострений может быть связана с усилением локального и системного воспаления при ХОБЛ, что является одним из механизмов прогрессирования заболевания и наличия сердечно-сосудистой коморбидности [6].

Клиническая оценка биомаркеров воспаления, таких как IL-1 β и TNF α при ХОБЛ возможна с использованием доступных методов, включая определение их в сыворотке крови, индуцированной мокроте или КВВ. В последние годы усилился интерес к КВВ как неинвазивному инструменту для определения биомаркеров, отражающих течение хронических респираторных заболеваний [14]. Литературные данные свидетельствуют, что КВВ, основу которого составляет вода, содержащаяся в выдыхаемом воздухе, включает большое количество растворенных веществ, в том числе множество биологически активных органических веществ [16]. Было показано, что КВВ может использоваться для диагностики и мониторинга течения бронхиальной астмы и ХОБЛ [53, 54]. Полученные нами данные продемонстрировали, что исследование КВВ может применяться для мониторинга течения ХОБЛ. Высокая частота обострений ХОБЛ ассоциируется с усилением локального воспаления, биомаркеры которого могут быть определены в КВВ. В целом, эти исследования показывают, что уровни цитокинов в КВВ могут служить полезными биомаркерами для оценки тяжести ХОБЛ, мониторинга терапевтических вмешательств и выявления пациентов с более тяжелым течением.

Следует отметить, что настоящее исследование имеет ряд ограничений, связанных с небольшой выборкой, участием в исследовании только пациентов мужского пола. Кроме того, исследование не включало анализ других факторов, способствующих продукции провоспалительных цитокинов. С другой стороны, настоящее исследование подчеркивает значимость воспаления в коморбидном течении ХОБЛ и ОААНК. С целью лучшего понимания коморбидных взаимосвязей необходимы дальнейшие исследования, включающие более детальный многомерный анализ клинических данных, позволяющий учесть многофакторность повышения провоспалительных цитокинов. Перспективными направлениями будущих исследований также являются анализ биомаркеров воспаления с учетом клинической гетерогенности ХОБЛ, идентификация коморбидных связей различных эндотипов воспаления при ХОБЛ.

Таким образом, наши результаты дополняют данные, полученные в предыдущих исследованиях, которые продемонстрировали роль системного воспаления при ХОБЛ в развитии коморбидного атеросклероза. При этом наше исследование дает новое представление о диагностической значимости биомаркеров, определяемых в конденсате выдыхаемого воздуха для оценки коморбидного течения ХОБЛ. Эти результаты имеют важное клиническое значение, поскольку позволяют предположить, что диагностика и коррекция системного воспаления может быть важной стратегией для профилактики и лечения прогрессирования ОААНК у пациентов с ХОБЛ. Проведение комплексной клинико-иммунологической оценки течения ХОБЛ с ранним выявлением биомаркеров воспаления и применение соответствующих терапевтических стратегий может рассматриваться в качестве перспективных целей для улучшения течения и прогноза заболевания.

Выводы

Таким образом, уровни IL-1 β и TNF α были повышены в КВВ у пациентов с ХОБЛ, причем ХОБЛ с сопутствующим ОААНК была ассоциирована с еще более высокими уровнями провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о выраженности локального бронхиального воспаления при ХОБЛ и коморбидности. Полученные данные демонстрируют важную роль воспаления в коморбидном течении ХОБЛ и ОААНК. Это свидетельствует о необходимости повышения качества диагностики обострений ХОБЛ и анализа их клинико-иммунологических характеристик в мониторинге течения ХОБЛ. При этом определение иммунных биомаркеров в конденсате выдыхаемого воздуха является эффективным неинвазивным клиническим инструментом мониторинга течения ХОБЛ.

Вклад авторов:

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией
Котляров С.Н. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7083-2692>): проведение исследования, обработка данных, написание текста статьи, ответственный за все аспекты работы

Сучков И.А. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1292-5452>): проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование текста статьи

Уряшев О.М. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8693-4696>): проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование текста статьи

Котлярова А.А. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0676-7558>): проведение биохимических исследований, анализ и интерпретация данных

Author Contribution:

All the authors contributed significantly to the study and the article, read and approved the final version of the article before publication

Kotlyarov S.N. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7083-2692>): conducting the study; data processing, writing the text of the article; responsible for all aspects of the work

Suchkov I.A. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1292-5452>): verification of critical intellectual content, editing the text of the paper

Uryashev O.M. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8693-4696>): verification of critical intellectual content, editing the text of the paper

Kotlyarova A.A. (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0676-7558>): conducting biochemical studies, data analysis and interpretation

Список литературы / References:

- Aursulesei Onofrei V., Ceasovschi A., Marcu DTM. et al. Mortality Risk Assessment in Peripheral Arterial Disease—The Burden of Cardiovascular Risk Factors over the Years: A Single Center's Experience. *Diagnostics*. 2022; 12(10): 2499. doi:10.3390/diagnostics12102499
- Tuleta I., Farrag T., Busse L. et al. High prevalence of COPD in atherosclerosis patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017; 12: 3047-3053. doi:10.2147/COPD.S141988
- Калинин Р.Е., Сучков И.А., Чобанян А.А. Перспективы прогнозирования течения облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(2): 274-282. doi:10.23888/НМЈ201972274-282
Kalinin R.E., Suchkov I.A., Chobanyan A.A. Prospects for forecasting the course of obliterating atherosclerosis of lower limb arteries. *NAUKA MOLODYKH Erud Juvenium*. 2019; 7(2): 274-282. doi:10.23888/НМЈ201972274-282 [in Russian]
- Калинин Р.Е., Сучков И.А., Климентова Э.А. и др. Биомаркеры апоптоза и пролиферации клеток в диагностике прогрессирования атеросклероза в различных сосудистых бассейнах. *Российский Медико-Биологический Вестник Им Академика ИП Павлова*. 2022; 30(2): 243-252.
Kalinin R.E., Suchkov I.A., Klimentova E.A., Egorov A.A., Karpov V.V. Biomarkers of Apoptosis and Cell Proliferation in Diagnosing the Progression of Atherosclerosis in Different Vascular Pools. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2022; 30(2): 243-252. doi:10.17816/PAVLOVJ88938 [in Russian]
- Калинин Р.Е., Сучков И.А., Климентова Э.А. и др. Роль различных маркеров прогрессирования атеросклеротического процесса после открытых вмешательств на артериях нижних конечностей. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2022; 15(2): 151-158.
Kalinin R.E., Suchkov I.A., Klimentova EA. et al. The role of different markers in progression of atherosclerotic lesions after open interventions for lower extremity peripheral artery disease. *Kardiologiya Serdechno-Sosud Khirurgiya*. 2022;15(2):151. doi:10.17116/kardio202215021151 [in Russian]
- Kotlyarov S. Involvement of the Innate Immune System in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(2): 985. doi:10.3390/ijms23020985
- Brassington K., Selemidis S., Bozinovski S. et al. Chronic obstructive pulmonary disease and atherosclerosis: common mechanisms and novel therapeutics. *Clin Sci Lond Engl*. 2022; 136(6): 405-423. doi:10.1042/CS20210835
- Kotlyarov S. Immune Function of Endothelial Cells: Evolutionary Aspects, Molecular Biology and Role in Atherogenesis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):9770. doi:10.3390/ijms23179770
- Mussbacher M., Schossleitner K., Kral-Pointner J.B. et al. More than Just a Monolayer: the Multifaceted Role of Endothelial Cells in the Pathophysiology of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2022; 24(6): 483-492. doi:10.1007/s11883-022-01023-9
- Botts S.R., Fish J.E., Howe K.L. Dysfunctional Vascular Endothelium as a Driver of Atherosclerosis: Emerging Insights Into Pathogenesis and Treatment. *Front Pharmacol*. 2021; 12. doi: 10.3389/fphar.2021.787541
- Trinkmann F., Saur J., Borggreffe M. Cardiovascular Comorbidities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)—Current Considerations for Clinical Practice. *J Clin Med*. 2019; 8(1): 69. doi:10.3390/jcm8010069
- Bobryshev Y.V., Ivanova E.A., Chistiakov D.A. et al. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *BioMed Res Int*. 2016; 2016: 9582430. doi:10.1155/2016/9582430
- Eshghjoo S., Kim D.M., Jayaraman A. et al. Macrophage Polarization in Atherosclerosis. *Genes*. 2022; 13(5): 756. doi:10.3390/genes13050756
- Ghelli F., Panizzolo M., Garzaro G. et al. Inflammatory Biomarkers in Exhaled Breath Condensate: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 29; 23(17): 9820. doi:10.3390/ijms23179820
- Patsiris S., Papanikolaou I., Stelios G. et al. Exhaled Breath Condensate and Dyspnea in COPD. In: *Vlamos P, ed. GeNeDis 2020*. Springer International Publishing; 2021: 339-344.
- Szunerits S., Dörfler H., Pagneux Q. et al. Exhaled breath condensate as bioanalyte: from collection considerations to biomarker sensing. *Anal Bioanal Chem*. 2023; 415(1): 27-34. doi:10.1007/s00216-022-04433-5
- Carolan B.J., Heguy A., Harvey B.G. et al. Up-regulation of expression of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 gene in human airway epithelium of cigarette smokers. *Cancer Res*. 2006; 66(22): 10729-10740. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2224
- Barrett T., Wilhite S.E., Ledoux P. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(D1): D991-D995. doi:10.1093/nar/gks1193
- Ritchie M.E., Phipson B., Wu D. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(7): e47-e47. doi:10.1093/nar/gkv007
- Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D. et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1): D607-D613. doi:10.1093/nar/gky1131
- Shannon P., Markiel A., Ozier O. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003; 13(11): 2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303
- Bader G.D., Hogue C.W.V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*. 2003; 4: 2. doi:10.1186/1471-2105-4-2
- Chin C.H., Chen S.H., Wu H.H. et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol*. 2014; 8(4): S11. doi:10.1186/1752-0509-8-S4-S11
- Gundersen G.W., Jones M.R., Rouillard A.D., et al. GEO2Enrich: browser extension and server app to extract gene sets from GEO and analyze them for biological functions. *Bioinforma Oxf Engl*. 2015; 31(18): 3060-3062. doi:10.1093/bioinformatics/btv297

25. Ge S.X., Jung D., Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. 2020; 36(8): 2628-2629. doi:10.1093/bioinformatics/btz931
26. Raudvere U., Kolberg L., Kuzmin I., et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(W1): W191-W198. doi:10.1093/nar/gkz369
27. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000; 25(1): 25-29. doi:10.1038/75556
28. Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y. et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2023; 51(D1): D587-D592. doi:10.1093/nar/gkac963
29. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(1): 27-30. doi:10.1093/nar/28.1.27
30. Mi H., Muruganujan A., Ebert D. et al. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1): D419-D426. doi:10.1093/nar/gky1038
31. Venkatesan P. GOLD report: 2022 update. *Lancet Respir Med*. 2022; 10(2): e20. doi:10.1016/S2213-2600(21)00561-0
32. Anthonisen N.R., Manfreda J., Warren C.P.W. et al. Antibiotic Therapy in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Intern Med*. 1987; 106(2): 196-204. doi:10.7326/0003-4819-106-2-196
33. Сапелкин С.В., Кузнецов М.Р., Калашников В.Ю. и др. Национальные рекомендации по диагностике и лечению заболеванию артерий нижних конечностей. [Электронный ресурс]. URL: https://www.angiolsurgery.org/library/recommendations/2019/recommendations_LLA_2019.pdf?ysclid=lhrk3lst1l961510992. (дата обращения: 01.03.2023). Sapelkin S.V., Kuznetsov M.R., Kalashnikov V.Yu. et al. National recommendations on diagnosis and treatment of lower limb arterial disease. [Electronic resource]. URL: https://www.angiolsurgery.org/library/recommendations/2019/recommendations_LLA_2019.pdf?ysclid=lhrk3lst1l961510992. (Date of the application: 01.03.2023) [in Russian]
34. Charlson M.E., Pompei P., Ales K.L. et al. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987; 40(5): 373-383. doi:10.1016/0021-9681(87)90171-8
35. Celli B.R., Cote C.G., Marin J.M. et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004; 350(10): 1005-1012. doi:10.1056/NEJMoa021322
36. Tschopp J., Dumont P., Hayoz D. True prevalence of COPD and its association with peripheral arterial disease in the internal medicine ward of a tertiary care hospital. *Swiss Med Wkly*. 2017; 147: w14460. doi:10.4414/sm.w.2017.14460
37. Terzikhan N., Lahousse L., Verhamme K.M.C, et al. COPD is associated with an increased risk of peripheral artery disease and mortality. *ERJ Open Res*. 2018; 4(4): 00086-02018. doi:10.1183/23120541.00086-2018
38. Kotlyarov S. Analysis of differentially expressed genes and signaling pathways involved in atherosclerosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Biomol Concepts*. 2022; 13(1): 34-54. doi:10.1515/bmc-2022-0001
39. Shyam Prasad Shetty B., Chaya S.K., Kumar V.S. et al. Inflammatory Biomarkers Interleukin 1 Beta (IL-1 β) and Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Are Differentially Elevated in Tobacco Smoke Associated COPD and Biomass Smoke Associated COPD. *Toxics*. 2021; 9(4):72. doi:10.3390/toxics9040072
40. Долинина Л.Ю., Делиева А.Н., Каклюгин А.П. и др. Сравнительный анализ уровня провоспалительных цитокинов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в зависимости от стадии заболевания. *Архивъ Внутренней Медицины*. 2012; (1): 64-67. Dolinina L.Yu., Delieva A.N., Kaklyugin A.P. et al. Comparative analysis of the level of pro-inflammatory cytokines in patients with chronic obstructive pulmonary disease depending on the stage of the disease. *The Russian Archives of Internal Medicine*. 2012; (1): 64-67. [In Russian]. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2012-0-1-64-67>
41. Gessner C., Scheibe R., Wötzel M., et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2005; 99(10): 1229-1240. doi:10.1016/j.rmed.2005.02.041
42. Luo X., Zhao C., Wang S., et al. TNF- α is a Novel Biomarker for Predicting Plaque Rupture in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Inflamm Res*. 2022; 15: 1889-1898. doi:10.2147/JIR.S352509
43. Løkke A., Hilberg O., Lange P., et al. Exacerbations Predict Severe Cardiovascular Events in Patients with COPD and Stable Cardiovascular Disease-A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2023; 18: 419-429. doi:10.2147/COPD.S396790
44. Müllerová H., Marshall J., de Nigris E., et al. Association of COPD exacerbations and acute cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis*. 2022; 16: 17534666221113648. doi:10.1177/17534666221113647
45. Løkke A., Hilberg O., Lange P., et al. Disease Trajectories and Impact of One Moderate Exacerbation in Gold B COPD Patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2022; 17: 569-578. doi:10.2147/COPD.S344669
46. Osei E.T., Brandsma C.A., Timens W. et al. Current perspectives on the role of interleukin-1 signalling in the pathogenesis of asthma and COPD. *Eur Respir J*. 2020; 55(2): 1900563. doi:10.1183/13993003.00563-2019
47. Ridker P.M., Everett B.M., Thuren T., et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017; 377(12): 1119-1131. doi:10.1056/NEJMoa1707914
48. Qamar A., Rader D.J. Effect of interleukin 1 β inhibition in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Dec; 23(6): 548-53. doi: 10.1097/MOL.0b013e328359b0a6
49. Takahashi M., Ikeda U., Masuyama J.I. et al. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*. 1996; 8(11): 817-821. doi:10.1006/cyto.1996.010
50. O'Carroll S.J., Kho D.T., Wiltshire R. et al. Pro-inflammatory TNF α and IL-1 β differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells. *J Neuroinflammation*. 2015; 12(1): 131. doi:10.1186/s12974-015-0346-0
51. Ma K., Huang F., Qiao R. et al. Pathogenesis of sarcopenia in chronic obstructive pulmonary disease. *Front Physiol*. 2022; 13: 850964. doi:10.3389/fphys.2022.850964
52. Tousoulis D., Oikonomou E., Economou E.K. et al. Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches. *Eur Heart J*. 2016; 37(22): 1723-1732. doi:10.1093/eurheartj/ehv759
53. Maniscalco M., Paris D., Melck D.J. et al. Differential diagnosis between newly diagnosed asthma and COPD using exhaled breath condensate metabolomics: a pilot study. *Eur Respir J*. 2018; 51(3): 1701825. doi:10.1183/13993003.01825-2017
54. Maniscalco M., Fuschillo S., Paris D. et al. Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases. *Adv Clin Chem*. 2019; 88: 121-149. doi:10.1016/bs.acc.2018.10.002