

Статья

Анализ чувствительности к COVID-19 у курильщиков на основании АПФ2

Цзинь Ван¹, Цюлин Луо¹, Руи Чен², Тао Чэнь¹ и Цзянь-Сян Ли^{1*}

¹ Департамент токсикологии, Школа общественного здравоохранения, Медицинский колледж, Университет Сучжоу, г. Сучжоу, 215123, Китай.

² Отделение респираторной медицины, вторая дочерняя больница университета Сучжоу, г. Сучжоу, 215004, Китай;

* Адрес для корреспонденции: aljxcr@suda.edu.cn; Тел.: +86-0512-65881038

Резюме

Введение: курение сигарет является глобальной проблемой для общественного здравоохранения и фактором высокого риска для различных заболеваний. В декабре 2019 года в г. Ухане, Китай, был обнаружен новый коронавирус (COVID-19). Поскольку ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) 2 идентифицировали как рецептор COVID-19, мы предполагаем, что курение влияет на характер экспрессии АПФ2 в дыхательных путях, и это объясняет различия в восприимчивости к данному вирусу.

Методы: три массива данных (по результатам исследований GSE994, GSE17913 и GSE18344) были загружены из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO). Для оценки функции АПФ2 провели корреляционный анализ и анализ обогащения. Также провели анализ различных уровней экспрессии АПФ2 в разных группах из трех массивов данных. **Результаты:** Гены, связанные с АПФ2, были обогащены важными биологическими процессами, такими как вирусные процессы и иммунный ответ. Повышенный уровень АПФ2 обнаружили во внутрилегочных дыхательных путях (в исследовании GSE994), а также в эпителиальных клетках ротовой полости (в исследовании GSE17913) курильщиков, но не обнаружили у некурящих людей или бывших курильщиков. В тканях легких мышей наблюдались значительные зависимости от дозы и времени между курением и экспрессией АПФ2, и было показано, что длительные периоды без курения приводят к значительному снижению экспрессии АПФ2.

Выводы: на основании данных, полученные как у человека, так и у крыс, подтвердили, что курение может приводить к повышению уровня АПФ2 в дыхательных путях, и это указывает на то, что курильщики более восприимчивы к COVID-19.

Ключевые слова: сигаретный дым; АПФ2; COVID-19; восприимчивость.

1. Введение

Курение является глобальной проблемой общественного здравоохранения. В мире имеется около 1,3 миллиарда курильщиков, и около трети из них живут в Китае, и это напрямую угрожает здоровью курильщиков и пассивных курильщиков [1]. Проблемы со здоровьем, вызванные курением, являются важной проблемой, вызывающей общественное беспокойство, но с данной проблемой по-прежнему трудно справиться, поскольку она затрагивает личные жизненные привычки. Курение может вызвать рак легких и проблемы с сердечно-сосудистой и репродуктивной системами [2]. По результатам исследований показали, что курильщики являются чувствительными к коронавирусу ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [3].

Коронавирусы могут инфицировать людей, различных птиц и млекопитающих во всем мире. В феврале и марте 2003 года во многих странах произошли крупные вспышки тяжелого острого респираторного синдрома, или атипичной пневмонии (SARS). На момент 31 июля 2003 года зарегистрировали 8098 вероятных случаев заболевания, при этом число погибших составило 774 (9,6 %) [4]. В период с марта 2012 года по ноябрь 2015 года вспышка MERS произошло в нескольких странах, включая Саудовскую Аравию (1255 случаев и 539 смертельных исходов), Южную Корею (185 случаев и 36 смертельных исходов) и Объединенные Арабские Эмираты (81 случай и 11 смертельный исход) [5]. В декабре 2019 года новый коронавирус (2019-nCoV, COVID-19) обнаружили в г. Ухань, провинция Хубэй, Китай. По состоянию на 23 февраля 2020 года COVID-19 заразил 77262 человека и привел к 2595 смертельным случаям в Китае, при этом число случаев заболевания по всему миру быстро растет. Люди всех возрастов могут быть заражены новым коронавирусом (COVID-19). Пожилые люди и люди с уже существующими заболеваниями, такими как астма, диабет и болезни сердца, видимо, являются более восприимчивыми к вирусу или имеют более серьезные симптомы [6]. Также отмечали значительную гендерную разницу в заболеваемости: 0,31 мужчин по сравнению с 0,27 у женщин на 100 000 человек [7]. Данная разность может быть обусловлена курением.

Геном COVID-19 на ~ 80 % идентичен SARS-CoV и на ~ 96 % идентичен коронавирусу летучей мыши [8]. По результатам структурного анализа на атомном уровне установили взаимодействие между рецептор-связывающим доменом (РСД) гликопротеина (S-белка) SARS-CoV и его рецептором, ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2), которые способствуют передаче SARS-CoV между видами и от человека к человеку [9,10]. Было показано, что белок S вируса COVID-19, аналогичный белку SARS-CoV, может использовать АПФ2 для инфицирования хозяина [11-13]. В одном недавнем исследовании предположили, что сродство между АПФ2 и РСД COVID-19 в 10–20 раз выше, чем РСД SARS-CoV [13]. Уровень экспрессии АПФ2 может отражать восприимчивость к COVID-19.

В данном исследовании мы провели анализ закономерности экспрессии АПФ2 в тканях дыхательных путей людей и мышей с различным статусом курения на основе трех массивов данных *Gene Expression Omnibus* (GEO) [Дайджест Экспрессии Генов]. Нашей целью было определить, является ли курение сигарет фактором восприимчивости к COVID-19.

2. Материалы и методы

2.1 Источник данных

Три массива данных GEO из исследований GSE994, GSE17913 и GSE18344, были получены из базы данных GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Образцы в исследовании GSE994 отбирали из внутрилегочных дыхательных путей от обычных курящих и некурящих добровольцев (включая 34 субъектов, курящих в настоящее время, 23 никогда не куривших и 18 бывших курильщиков). Общий дизайн исследования GSE17913 включал получение образцов методом биопсии из ротовой полости у 40 курящих в настоящее время и у 40 никогда не куривших субъектов, стратифицированных по возрасту и полу. Мы также извлекли 55 образцов из 14 различных групп в массиве данных исследования GSE18344, включая имитационную группу (плацебо) и группу воздействия. Мышей в группе воздействия постоянно подвергали воздействию сигаретного дыма (курение сигарет, общее содержание твердых частиц: 750 пг/л) в течение 2, 3 или 4 ч/день (наши группы с низкой, средней и высокой дозой, соответственно). Время воздействия составило 1 день, 2 месяца и 5 месяцев, а также 5 месяцев + 1 день восстановления и 5 месяцев + 13 дней восстановления (только средняя доза). В каждой группе исследования GSE18344 анализ проводили в четырех повторностях.

2.2 Корреляционный и обогащающий анализ

Программное обеспечение R применяли для идентификации и импорта списка генов, связанных с АПФ2, в массивах данных исследований GSE994 и GSE17913. Затем данные родственные

гены импортировали в онлайн-инструмент DAVID для проведения анализа обогащения генной онкологии (ГО).

2.3 Анализ экспрессии АПФ2 у пациентов с различным анамнезом курения

Все образцы в массивах данных в исследовании GSE994 и исследования GSE17913 были сгруппированы в соответствии с анамнезом курения. Исследование GSE994 включало три группы: (1) никогда не курившие (никогда), (2) курящие в настоящее время (текущие) и (3) бывшие курильщики (бывшие); исследование GSE17913 включало две группы: (1) никогда не курившие (никогда) и (2) курящие в настоящее время (текущие). Оценку различий в изменениях уровня экспрессии АПФ2 между группами провели в указанных массивах данных.

2.4 Статистические анализы и графики

В корреляционном анализе гены с коэффициентом корреляции $I > 0,3$ и $P < 0,05$ считали достоверно родственными генами. Для анализа корреляции между анамнезом курения и экспрессией гена АПФ2 в массивах данных в исследовании GSE994 и исследования GSE17913, а также для оценки различий в экспрессии генов между различными группами лечения в массиве данных исследования GSE18344 использовали Т-критерий в программном обеспечении *GraphPad Prism 7*. Статистически значимым считали $P < 0,05$.

3. Результаты

3.1. Функциональное обогащение генов, связанных с АПФ2

Всего 1370 положительно и 1871 отрицательно связанных с АПФ2 генов идентифицировали в массиве данных для внутрилегочных дыхательных путей в исследовании GSE994, и 544 положительно и 182 отрицательно родственных гена обнаружили в массиве данных для эпителиальных клеток ротовой полости в исследовании GSE17913 (Таблицы 1, 2). Гены в исследовании GSE994 были значительно обогащены в основных биологических процессах, включая клеточную адгезию, вирусные процессы, вирусную транскрипцию, внутриклеточный транспорт вирусов и сигнальный путь рецептора TGF- β (Рис. 1А). В исследовании GSE17913 гены были значительно обогащены в биологических процессах, включая иммунный ответ, вирусные процессы, Т-клеточный иммунитет и апоптоз (Рис. 1В).

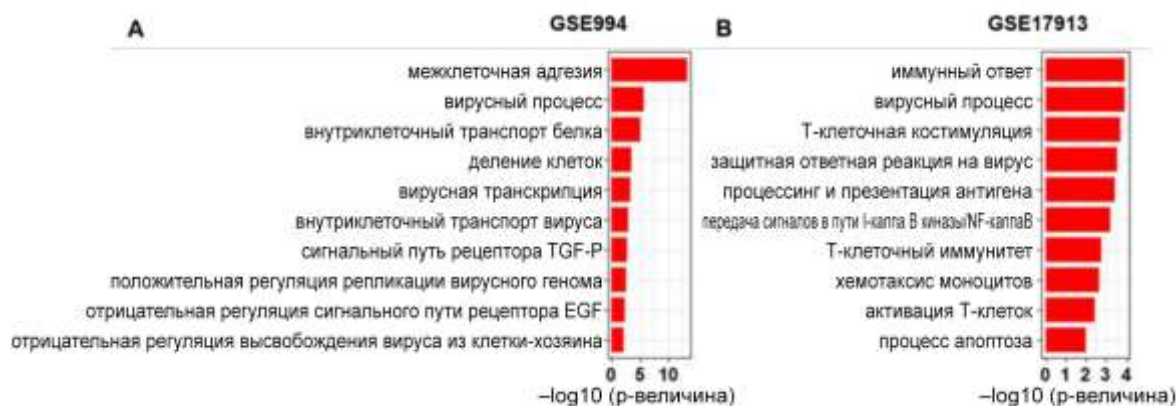
Таблица 1 Краткое описание генов, связанных с экспрессией АПФ2 в двух массивах данных

Массивы данных	Положительный результат	Отрицательный результат
GSE994	1370	1871
GSE17913	544	182

Таблица 2 Главные 20 генов, связанных с экспрессией АПФ2 в двух массивах данных

GSE994			GSE17913		
Символ гена	Р-величина	R	Символ гена	Р-величина	R
CBX3	6.45E-11	0,667	SECTM1	1.71E-08	0,583
PHKB	1.34E-10	0,659	APOL1	4.28E-08	0,570
PPP1CC	4.16E-10	0,645	CLPX	6.65E-07	0,525
GOLGA7	5.83E-10	0,641	RUNX3	7.65E-07	0,523
CDC123	1.50E-09	0,629	BTN3A3	1.32E-06	0,513
RAP1B	2.32E-09	0,623	EDC3	2.16E-06	0,504
PPT1	4.17E-09	0,616	PSMB9	8.02E-06	0,479
PAIP1	8.23E-09	0,606	TLCD2	9.34E-06	0,476
TSPAN31	1.60E-08	0,597	MSRB1	9.74E-06	0,475
CASP7	1.63E-08	0,596	S100A12	1.02E-05	0,474
TM9SF3	2.05E-08	0,593	CORO1A	1.31E-05	0,469
COPB1	2.09E-08	0,593	CEACAM7	0.000014	0,468
APOBEC3G	2.15E-08	0,592	NKG7	1.62E-05	0,464
CCDC6	2.33E-08	0,591	TAP1	1.78E-05	0,462
PSMD7	2.81E-08	0,589	ITGAL	2.17E-05	0,458
PARP1	3.14E-08	0,587	GZMB	2.18E-05	0,458
ADO	3.21E-08	0,587	CUX1	2.21E-05	0,458
SAT1	3.35E-08	0,586	TTC39C	2.59E-05	0,454
THOC7	3.39E-08	0,586	PAOX	2.91E-05	0,452
DERA	4.53E-08	0,581	ATP10B	3.29E-05	0,449
SEPW1	1.10E-12	-0,709	C7	7.17E-05	-0,432
CRIP1	1.66E-12	-0,705	BUB1	1.02E-04	-0,423
SCAMP4	2.59E-12	-0,701	CHRM5	1.38E-04	-0,416
CNOT3	6.50E-12	-0,691	RALA	1.51E-04	-0,414
CLDN3	7.30E-12	-0,690	VPS29	1.56E-04	-0,413
STRN4	1.78E-11	-0,681	CADM3-AS1	2.00E-04	-0,407
CABIN1	3.49E-11	-0,674	KIAA1456	2.55E-04	-0,400
ITGA3	3.61E-11	-0,673	LOC101929002	2.70E-04	-0,399
MFSD10	4.01E-11	-0,672	KIRREL3-AS2	3.13E-04	-0,395
BAG6	4.89E-11	-0,670	OR111	4.28E-04	-0,387
BDH1	9.34E-11	-0,663	RAB4A	4.32E-04	-0,387
NPIPA1	9.88E-11	-0,662	LOC200830	4.40E-04	-0,386
ABHD11	1.89E-10	-0,655	GRK5	4.57E-04	-0,385
CST3	2.20E-10	-0,653	RP11-214K3.19	4.85E-04	-0,384
MED12	2.59E-10	-0,651	ANXA2	5.36E-04	-0,381
RNH1	2.95E-10	-0,649	RP11-354I10.1	6.03E-04	-0,378
MORN1	3.09E-10	-0,649	AGAP11	6.27E-04	-0,376
TJP3	4.07E-10	-0,645	ZNF582-AS1	6.54E-04	-0,375
PYY	4.92E-10	-0,643	FKSG49	6.63E-04	-0,375
GLB1L2	6.76E-10	-0,639	PEG3	6.75E-04	-0,374

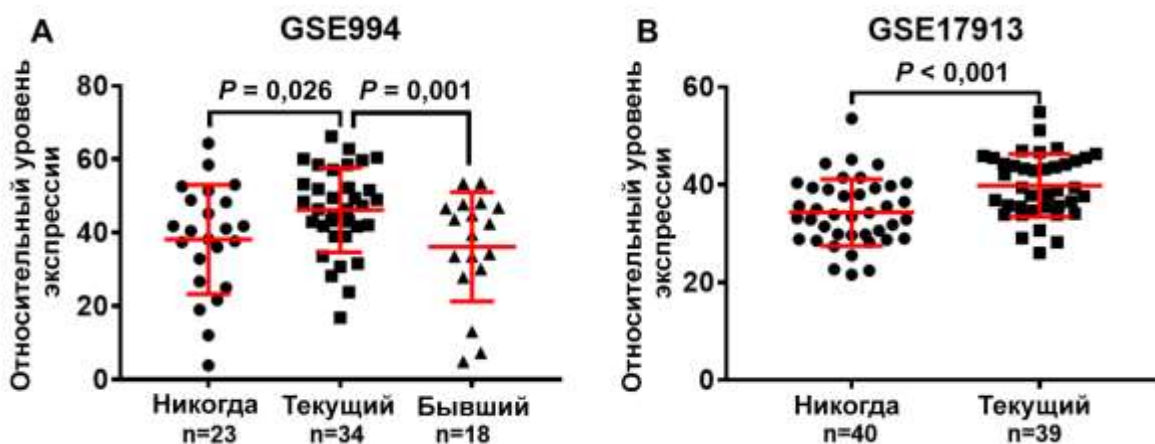
Рис. 1. Гистограмма генного онтологического анализа обогащения генов, связанных с экспрессией АПФ2, в массивах данных (А) исследования GSE994 и (В) исследования GSE17913.



3.2. Экспрессия АПФ2 и корреляция с анамнезом курения

В массиве данных для легочных дыхательных путей в исследовании GSE994 уровень экспрессии АПФ2 у курящих в настоящее время был значительно выше по сравнению с никогда не курившими ($t = 2295$; $P = 0,026$) (Рис. 2А). Существенные различия между никогда не курившими и бывшими курильщиками отсутствовали. Кроме того, у бросивших курить уровень экспрессии АПФ2 был намного ниже по сравнению с курящими в настоящее время ($t = 2,709$; $P = 0,001$) (Рис. 2А). В массиве данных для эпителиальных клеток ротовой полости исследования GSE17913 уровень экспрессии АПФ2 у курящих в настоящее время был значительно выше по сравнению с никогда не курившими ($t = 3674$; $P < 0,001$) (Рис. 2В).

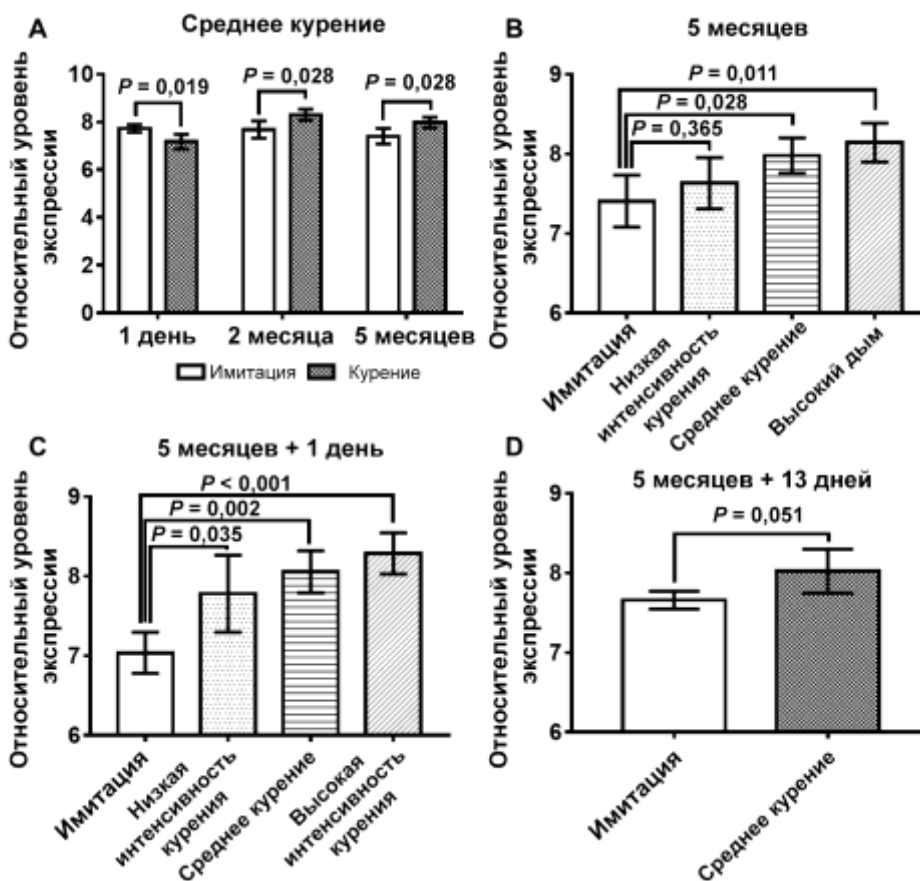
Рис. 2. Уровни экспрессии АПФ2 у добровольцев с различным анамнезом курения в массивах данных (А) в исследованиях GSE994 и (В) GSE17913.



3.3. Курение сигарет и стимулирование экспрессии АПФ2 у мышей

После 1 дня воздействия курения уровень экспрессии АПФ2 в группе животных, подвергнутых воздействию курения, был значительно снижен по сравнению с контрольной группой (Рис. 3А). Однако уровень экспрессии АПФ2 был значительно выше в группе животных, подвергнутых воздействию курения через 2 и 5 месяцев воздействия (Рис. 3А). После 5 месяцев воздействия курения уровни экспрессии АПФ2 в группах со средней и высокой дозой были повышены в зависимости от дозы (Рис. 3В). Значительное дозозависимое повышение уровня экспрессии АПФ2 также наблюдали в легких мышей, подвергнутых 5-месячному воздействию курения плюс период восстановления продолжительностью 1 день (Рис. 3С). Кроме того, уровень экспрессии АПФ2 был выше в группе со средней дозой после 5 месяцев воздействия курения плюс период восстановления продолжительностью 13 дней (Рис. 3Д).

Рис. 3. Анализ данных, полученных в мышинной модели курения. (А) уровни экспрессии АПФ2, измеренные в разное время после воздействия курения средней интенсивности (среднее курение); (В) уровни экспрессии АПФ2 в разных группах дозирования после 5 месяцев воздействия курения; (С) уровни экспрессии АПФ2 в разных группах дозирования после 5 месяцев воздействия курения и 1 дня восстановления; (D) уровень экспрессии АПФ2 в группе курящих после 5 месяцев воздействия курения и 13 дней восстановления.



4. Обсуждение

По результатам исследований установили, что АПФ2 является рецептором для SARS-CoV [9,10] и нового Уханьского коронавируса (COVID-19) [11-13]. По результатам анализа корреляции и обогащения двух массивов данных человека (исследования GSE994 и GSE17913) мы показали, что вызванные курением изменения уровня экспрессии АПФ2 коррелируют с важными биологическими процессами, включая вирусные процессы и иммунный ответ, и это указывает на то, что АПФ2 принимает участие в процессе инфицирования вирусом и иммунном ответе.

В исследованиях эпидемии атипичной пневмонии, проводимых в 2002–2003 годы показали, что люди в возрасте < 25 лет имеют легкие или умеренные симптомы, в то время как у людей старше 60 лет с более серьезными заболеваниями смертность составила >50 % [14]. В эпидемиологических исследованиях также наблюдали половые различия в частоте и смертности от инфекции SARS-CoV [15,16]. Вирусом COVID-19 могут быть заражены люди всех возрастов, но пожилые люди и люди с уже имеющимися заболеваниями характеризуются высокой восприимчивостью [6]. Существует также явная зависимость данного заболевания от пола, причем у мужчин он выше, чем у женщин, что может быть связано с высоким уровнем курения среди мужчин [7].

Хорошо известно, что курения является фактором высокого риска для таких заболеваний, как сердечно-сосудистые заболевания, хроническая обструктивная болезнь легких и рак [17]. По результатам исследований подтвердили связь между курением и восприимчивостью к

гриппозным инфекциям [18]. Курение также влияет на метаболизм фактора, активирующего тромбоциты, и может способствовать повышению частоты бактериальной суперинфекции у людей, у которых развивается грипп [19]. Более того, у курящих по сравнению с некурящими быстрее происходило снижение титра антител к гриппу [20]. В другом исследовании показали, что курение может препятствовать противовирусному ответу хозяина за счет повышения частоты заражения гриппом и заболеваний нижних дыхательных путей у курильщиков [21]. В данном исследовании у курильщиков наблюдали повышенную экспрессию АПФ2 во внутрилегочных дыхательных путях и эпителиальных клетках ротовой полости по сравнению с некурящими, и это указывает на восприимчивость курильщиков к 2019-CoV. Важно отметить, что уровень экспрессии АПФ2 у бывших курильщиков был ниже, и это позволяет предположить, что отказ от курения может привести к снижению восприимчивости к 2019-CoV. По результатам экспериментов, проведенных на животных, также показали существенные зависимые от дозы и времени взаимные связи между воздействием курения и экспрессией АПФ2 в тканях легких мышей. Отказ от курения в течение длительного, но не короткого времени может привести к обращению повышенной экспрессии АПФ2 в легких мышей.

5. Выводы

Таким образом, на основании полученных нами результатов мы показали, что КС может вызывать повышенную экспрессию АПФ2 в дыхательных путях, и это указывает на то, что курильщики характеризуются повышенной восприимчивостью к COVID-19 по сравнению с некурящими. Поскольку индуцированные курением изменения в экспрессии АПФ2 связаны с вирусной инфекцией и иммунными процессами, у курильщиков, инфицированных COVID-19, могут возникнуть серьезные проблемы со здоровьем. Для подтверждения полученных результатов необходимы дополнительные данные эпидемиологических исследований.

Вклад авторов: концептуализация: Тао Чэн и Цзянь-Сян Ли; методология: Цзинь Ван и Цюлин Луо; программное обеспечение: Цзинь Ван; написание–подготовка оригинального проекта, Цзинь Ван и Цюлин Луо; написание–рецензирование и редактирование: Тао Чэн, Руи Чен и Цзянь-Сян Ли; финансирование приобретения: Руи Чен и Цзянь-Сян Ли Все авторы прочли и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: поддержку данного исследования осуществил Национальный фонд естественных наук Китая (81573178 и 81770085).

Благодарности: мы выражаем признательность LetPub (www.letpub.com) за языковую помощь при подготовке данной рукописи.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Zhang, H.; Cai, B. The impact of tobacco on lung health in China. *Respirology* 2003, 8, 17-21, doi:10.1046/j.1440-1843.2003.00433.x.
2. IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004, 83, 1-1438.
3. Alraddadi, B.M.; Watson, J.T.; Almarashi, A.; Abedi, G.R.; Turkistani, A.; Sadran, M.; Housa, A.; Almazroa, M.A.; Alraihan, N.; Banjar, A., et al. Risk Factors for Primary Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Illness in Humans, Saudi Arabia, 2014. *Emerg Infect Dis* 2016, 22, 49-55, doi:10.3201/eid2201.151340.
4. Hui, D.S.; Chan, M.C.; Wu, A.K.; Ng, P.C. Severe acute respiratory syndrome (SARS): epidemiology and clinical features. *Postgrad Med J* 2004, 80, 373-381, doi:10.1136/pgmj.2004.020263.
5. Kim, K.H.; Tandi, T.E.; Choi, J.W.; Moon, J.M.; Kim, M.S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) outbreak in South Korea, 2015: epidemiology, characteristics and public health implications. *J Hosp Infect* 2017, 95, 207-213, doi:10.1016/j.jhin.2016.10.008.
6. Novel Coronavirus (2019-nCoV) advice for the public: Myth busters. Available online: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public/myth-busters>. (accessed on 2020.03.03).
7. Yang, Y.; Lu, Q.; Liu, M.; Wang, Y.; Zhang, A.; Jalali, N.; Dean, N.; Longini, I.; Halloran, M.E.; Xu, B., et al. Epidemiological and clinical features of the 2019 novel coronavirus outbreak in China. 2020, 10.1101/2020.02.10.20021675 %J medRxiv, 2020.2002.2010.20021675, doi:10.1101/2020.02.10.20021675 %J medRxiv.
8. Zhou, P.; Yang, X.L.; Wang, X.G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.L., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020, 10.1038/s41586-020-2012-7, doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
9. He, L.; Ding, Y.; Zhang, Q.; Che, X.; He, Y.; Shen, H.; Wang, H.; Li, Z.; Zhao, L.; Geng, J., et al. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *J Pathol* 2006, 210, 288-297, doi:10.1002/path.2067.
10. Li, W.; Sui, J.; Huang, I.C.; Kuhn, J.H.; Radoshitzky, S.R.; Marasco, W.A.; Choe, H.; Farzan, M. The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. *Virology* 2007, 367, 367-374, doi:10.1016/j.virol.2007.04.035.
11. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020, 10.1038/s41586-020-2012-7, doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
12. Wan, Y.; Shang, J.; Graham, R.; Baric, R.S.; Li, F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS. *J Virol* 2020, 10.1128/JVI.00127-20, doi:10.1128/JVI.00127-20.
13. Tian, X.; Li, C.; Huang, A.; Xia, S.; Lu, S.; Shi, Z.; Lu, L.; Jiang, S.; Yang, Z.; Wu, Y., et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect* 2020, 9, 382-385, doi:10.1080/22221751.2020.1729069.
14. Nicholls, J.M.; Poon, L.L.; Lee, K.C.; Ng, W.F.; Lai, S.T.; Leung, C.Y.; Chu, C.M.; Hui, P.K.; Mak, K.L.; Lim, W., et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003, 361, 1773-1778, doi:10.1016/s0140-6736(03)13413-7.
15. Karlberg, J.; Chong, D.S.Y.; Lai, W.Y.Y. Do men have a higher case fatality rate of severe acute respiratory syndrome than women do? *American Journal of Epidemiology* 2004, 159, 229-231, doi:10.1093/aje/kwh056.
16. Leong, H.N.; Earnest, A.; Lim, H.H.; Chin, C.F.; Tan, C.S.H.; Puhaindran, M.E.; Tan, A.C.H.; Chen, M.I.C.; Leo, Y.S. SARS in Singapore - Predictors of disease severity. *Ann Acad Med Singap* 2006, 35, 326331.
17. Courtney, R. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General, 2014. U.S. Department of Health and Human Services Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2014. 1081 pp. Online (grey literature): <http://www.surgeongeneral.gov/library/reports/50-years-of-progress>. 2015, 34, 694-695, doi:10.1111/dar.12309.
18. Finklea, J.F.; Sandifer, S.H.; Smith, D.D. Cigarette smoking and epidemic influenza. *Am J Epidemiol* 1969, 90, 390-399, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a121084.
19. Miyaura, S.; Eguchi, H.; Johnston, J.M. Effect of a cigarette smoke extract on the metabolism of the proinflammatory autacoid, platelet-activating factor. *Circ Res* 1992, 70, 341-347, doi:10.1161/01.res.70.2.341.
20. Finklea, J.F.; Hasselblad, V.; Riggan, W.B.; Nelson, W.C.; Hammer, D.I.; Newill, V.A. Cigarette smoking and hemagglutination inhibition response to influenza after natural disease and immunization. *Am Rev Respir Dis* 1971, 104, 368-376, doi:10.1164/arrd.1971.104.3.368.
21. Aronson, M.D.; Weiss, S.T.; Ben, R.L.; Komaroff, A.L. Association between cigarette smoking and acute respiratory tract illness in young adults. *Jama* 1982, 248, 181-183.