

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL RESEARCHES

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *TRPM8* И МАРКЕРОВ ХОБЛ В ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ СИГАРЕТНЫМ ДЫМОМ И ТАБАЧНЫМ АЭРОЗОЛЕМ

Тимкин П.Д.¹,
Киселёв М.А.¹,
Шаповалова Д.А.¹,
Наумов Д.Е.²,
Линская П.М.¹,
Бородин Е.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (675001, Амурская обл., г. Благовещенск, ул. Горького, 101, Россия)
² ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (675011, Амурская обл., г. Благовещенск, ул. Калинина, 22, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Тимкин Павел Дмитриевич,
e-mail: timkin.pasha@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) остается глобальной медико-социальной проблемой. Известно, что ионный канал *TRPM8*, являющийся рецептором холода, вовлечен в патогенез заболевания. Однако существующие экспериментальные модели ХОБЛ часто не включают верификацию изменений его экспрессии.

Цель. Смоделировать ХОБЛ-подобные изменения у крыс при ингаляционном воздействии сигаретного дыма и табачного аэрозоля, комплексно оценив морфологические изменения в легочной ткани и уровень экспрессии гена *TRPM8*, а также ключевых генов-маркеров ХОБЛ.

Материалы и методы. Самцов крыс линии *Wistar* разделили на контрольную и две экспериментальные группы ($n = 30$). Ежедневно в течение 42 дней проводили ингаляционное воздействие: на первую группу — сигаретным дымом (СД), на вторую — табачным аэрозолем (ТА). На 42-й день выполняли гистологический анализ легких и оценку экспрессии маркерных генов ХОБЛ (*CCR3*, *CCL13*, *COL4A2*, *IL2RA*, *VWF*) и *TRPM8* методом ОТ-ПЦР.

Результаты. Воздействие СД вызывало значительные морфологические изменения: склероз (73,3 % животных), инфильтрат (100 %), эмфизема (56,7 %) и гиперплазия бокаловидных клеток (90 %) против контроля ($p < 0,001$). ТА приводил к менее выраженным изменениям, а эмфизема отсутствовала. В группе СД отмечали достоверное повышение экспрессии: *COL4A2* в 63,5 раза, *IL2RA* в 7,9 раза, *CCL13* в 4,7 раза и *TRPM8* в 2,2 раза. В группе ТА экспрессия также значительно увеличилась: *COL4A2* в 9,6 раза, *IL2RA* в 3,0 раза, *CCL13* в 7,0 раза и *TRPM8* в 2,6 раза. СД вызывал более сильную экспрессию *COL4A2* и *IL2RA*, чем ТА.

Заключение. Модель с 42-дневным воздействием СД наиболее адекватно воспроизводит ХОБЛ-подобный фенотип. Важно, что обе использованные экспериментальные модели вызывают значимое увеличение транскрипции гена холодовых рецепторов *TRPM8*, что подтверждает его роль в патогенезе и открывает новые мишени для терапии.

Ключевые слова: ХОБЛ, *TRPM8*, *CCR3*, *CCL13*, *COL4A2*, *IL2RA*, *VWF*, дифференциальная экспрессия генов

Статья поступила: 30.04.2025
Статья принята: 25.11.2025
Статья опубликована: 25.12.2025

Для цитирования: Тимкин П.Д., Киселёв М.А., Шаповалова Д.А., Наумов Д.Е., Линская П.М., Бородин Е.А. Сравнительный анализ экспрессии гена *TRPM8* и маркеров хобл в легких крыс при интоксикации сигаретным дымом и табачным аэрозолем. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(6): 225-237. doi: 10.29413/ABS.2025-10.6.24

COMPARATIVE ANALYSIS OF *TRPM8* GENE AND COPD MARKERS EXPRESSION IN RAT LUNGS FOLLOWING EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE AND TOBACCO AEROSOL

**Timkin P.D.¹,
Kiselev M.A.¹,
Shapovalova D.A.¹,
Naumov D.E.²,
Linskaya P.M.¹,
Borodin E.A.¹**

¹ Amur State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation (Gorkogo St., 101, Amur region, Blagoveshchensk 675001, Russian Federation)

² Far Eastern Scientific Center for Physiology and Pathology of Respiration (Kalinina St., 22, Amur region, Blagoveshchensk 675011, Russian Federation)

Corresponding author:
Pavel D. Timkin,
e-mail: timkin.pasha@mail.ru

RESUME

Background. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) remains a global medical and social problem. The ion channel *TRPM8*, a cold receptor, is known to be involved in the pathogenesis of the disease. However, existing experimental COPD models often exclude verification of changes in its expression.

Objective. To model COPD-like changes in rats exposed to cigarette smoke and tobacco aerosol, with a comprehensive assessment of morphological changes in lung tissue and the expression level of the *TRPM8* gene, as well as key COPD marker genes.

Materials and methods. Male Wistar rats were divided into one control and two experimental groups ($n = 30$). For 42 days, the first experimental group was subjected to daily inhalation exposure to cigarette smoke (CS), and the second group to tobacco aerosol (TA). On day 42, histological analysis of the lungs and assessment of the expression of COPD marker genes (*CCR3*, *CCL13*, *COL4A2*, *IL2RA*, *VWF*) and *TRPM8* were performed using RT-PCR.

Results. CS exposure caused significant morphological changes: sclerosis (73.3 % of animals), infiltrate (100 %), emphysema (56.7 %), and goblet cell hyperplasia (90 %) compared to control ($p < 0.001$). TA led to less pronounced changes, and emphysema was absent. In the CS group, a significant increase in expression was observed: *COL4A2* by 63.5-fold, *IL2RA* by 7.9-fold, *CCL13* by 4.7-fold, and *TRPM8* by 2.2-fold. In the TA group, expression also increased significantly: *COL4A2* by 9.6-fold, *IL2RA* by 3.0-fold, *CCL13* by 7.0-fold, and *TRPM8* by 2.6-fold. CS induced a stronger expression of *COL4A2* and *IL2RA* compared to TA.

Conclusion. The model with 42-day CS exposure most adequately reproduces the COPD-like phenotype. Importantly, both experimental models caused a significant increase in the transcription of the cold receptor gene *TRPM8*, confirming its role in the pathogenesis and revealing new targets for therapy.

Keywords: COPD, *TRPM8*, *CCR3*, *CCL13*, *COL4A2*, *IL2RA*, *VWF*, differential gene expression

Received: 30.04.2025

Accepted: 25.11.2025

Published: 25.12.2025

For citation: Timkin P.D., Kiselev M.A., Shapovalova D.A., Naumov D.E., Linskaya P.M., Borodin E.A. Comparative analysis of *TRPM8* gene and copd markers expression in rat lungs following exposure to cigarette smoke and tobacco aerosol. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(6): 225-237. doi: 10.29413/ABS.2025-10.6.24

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным ВОЗ за 2019 год, хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) стала причиной 3,3 млн смертей, заняв третье место в рейтинге причин смертности. Основные факторы риска для данного заболевания включают генетические и эпигенетические изменения, а также воздействие факторов окружающей среды, особенно сигаретного дыма [1]. ХОБЛ отличается значительной гетерогенностью, которая проявляется в разнообразии клинических симптомов и эндотипов, что затрудняет диагностику и лечение. В настоящее время в качестве молекулярных мишеней для терапии ХОБЛ используются $\beta 2$ -адренорецепторы, м-холинорецепторы, глюкокортикоидные рецепторы, циклические нуклеотидфосфодиэстеразы, специфичные к цАМФ, а также рецепторы интерлейкинов-4, -13, -33 и ионные каналы CFTR [2]. Традиционные универсальные подходы к лечению не учитывают индивидуальные особенности пациентов, что снижает их эффективность [3].

Холодовые рецепторы TRPM8, относящиеся к меластатиновому подсемейству ионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом [4], могут представлять собой перспективную альтернативу как для терапии, так и для диагностики ХОБЛ, поскольку играют роль в различных патологических процессах, характерных для данного заболевания. Спектр активирующих температур для TRPM8 несколько разнится по данным разных авторов, но в среднем составляет 8–28°C, с оптимумом активности при 10°C. Известно, что воздействие низких температур на дыхательные пути может приводить к повреждению респираторного эпителия, а также TRPM8-опосредованному высвобождению воспалительных медиаторов и привлечению воспалительных клеток в дыхательные пути [5]. Кроме этого, стимуляция TRPM8 может вызывать увеличение продукции муцина MUC5AC за счет сигнального каскада, включающего повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , активацию фосфолипазы С (PLC), осуществляющей гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата (PIP2) на инозитол-трифосфат (IP3) и диацилглицерол (DAG), активирующий протеинкиназу С (РКС). Снижение PIP2 и активация РКС приводят к диссоциации меристоилированного аланин-богатого субстрата киназы С (MARCKS) от клеточной мембраны, что ослабляет актиновый барьер и облегчает экзоцитоз везикул с муцином [6].

Примечательно, что TRPM8 также могут активироваться под действием пылевых частиц и сигаретного дыма – основных этиологических факторов ХОБЛ. При этом основную роль в данном процессе, по-видимому, играют исходно содержащиеся в дыме и вторично образующиеся в клетках при его воздействии активные формы кислорода [5, 7].

Экспериментальное блокирование TRPM8 существенно снижало число клеток и концентрацию MIP-2 в бронховоальвеолярном лаваже, экспрессию фосфорилированных форм киназ, регулируемых внеклеточным

сигналом (ERK), и N-терминальных киназ транскрипционного фактора c-Jun (JNK), а также уровень воспалительной инфильтрации и повреждений в тканях легких мышей на фоне 7-дневной экспозиции с сигаретным дымом. Более того, все перечисленные изменения были более выражены при экспозиции особей с дымом от сигарет с ментолом (агонистом TRPM8), по сравнению с условиями, в которых использовали дым обычных сигарет [8].

По-видимому, сигаретный дым может повышать экспрессию TRPM8 в респираторном тракте, что было зафиксировано в экспериментах у мышей при субхроническом воздействии (1,5 сигареты в день, 7 дней) [8], а также у крыс при интенсивной экспозиции (10 сигарет в час, 6 часов в день, 40 дней) [9]. Увеличенная экспрессия мРНК и белка TRPM8 была зафиксирована и в бронхиальном эпителии больных ХОБЛ, по сравнению со здоровыми лицами [6].

Как известно, одним из подходов к изучению механизмов развития ХОБЛ является моделирование заболевания у лабораторных животных за счет продолжительного воздействия на органы дыхания сигаретного дыма [10]. Данные модели позволяют воспроизвести ХОБЛ-подобные воспалительные процессы в легочной ткани животных, что позволяет изучать особенности патогенеза ХОБЛ в контролируемых условиях, в том числе, проводить анализ дифференциальной экспрессии генов [11-13]. При этом эффективность моделирования патологии может оцениваться не только по морфологическим критериям, но и по специфическим изменениям экспрессии маркерных генов в паренхиме легких. В качестве таких ключевых маркеров могут быть использованы гены рецептора СС-хемокинов типа 3 (CCR3), СС-хемокинового лиганда типа 13 (CCL13), $\alpha 2$ -цепи коллагена IV типа (COL4A2), α -субъединицы рецептора интерлейкина 2 (IL2RA) и фактора Виллебранда (VWF), дифференциальная экспрессия которых ранее была выявлена у больных ХОБЛ с помощью транскриптомного секвенирования и впоследствии подтверждена в модели заболевания у крыс методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией [14].

Учитывая отсутствие подходящих моделей ХОБЛ с доказанной повышенной экспрессией TRPM8, **целью исследования** являлось моделирование ХОБЛ-подобных изменений в респираторной системе крыс при воздействии сигаретного дыма или табачного аэрозоля с верификацией специфических молекулярных и морфологических биомаркеров заболевания, а также уровня экспрессии гена TRPM8 в каждой из моделей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на базе Амурской государственной медицинской академии в течение 42 суток. Использовались крысы мужского пола, линии Wistar (8–10 недель, 250–300 г). Исследование выполнено с соблюдением этических принципов проведения научных медицинских исследований (выписка

из протокола № 2 от 26 июня 2023 г). Воздействие дыма и аэрозоля на животных осуществлялось в герметичной пластиковой камере объемом 9 литров, снабженной двумя вентиляционными отверстиями диаметром 1 см каждое, расположенными на съемной крышке для обеспечения воздухообмена и предотвращения избыточного давления.

В эксперименте участвовали три группы крыс: контрольная, первая экспериментальная и вторая экспериментальная, каждая группа состояла из 30 животных. Контрольная группа не подвергалась воздействию, животные из первой экспериментальной группы получали сигаретный дым (сигареты с фильтром «Максим красный», ООО «Империал Тобакко», никотин – 0,7 мг/сиг), а во второй экспериментальной группе проводили экспозицию с табачным аэрозолем (никотин – 0,7 мг/стик neo™, система нагрева табака glo™, Группа компаний ITMS).

Дым/аэрозоль получали из одной сигареты или одного стика с использованием самостоятельно изготовленного шприцевого насоса. Объем затяжки составлял 35 мл, продолжительность – 2 с. После каждой затяжки сигарету гасили, а стик выдерживали для остывания нагревательного элемента; полученный дым/аэрозоль вводили в экспозиционную камеру. Процедуру повторяли с интервалом 3 минуты (12 затяжек) для сигареты и 2 минуты 50 секунд (14 затяжек) для стика, что обеспечивало полное использование одного изделия при одинаковом общем времени экспозиции 40 минут для всех животных.

Нагрев табака до 350°C в специальных системах не приводит к образованию новых соединений, которых бы не было в сигаретном дыме, при сжигании того же самого табака. Химические различия между аэрозолем и дымом в основном носят количественный, а не качественный характер: аэрозоль содержит то же множество соединений, но в значительно меньших количествах, за исключением небольшой группы веществ, повышенный уровень которых в табачном аэрозоле объясняется главным образом наличием глицерина в рецептуре [15].

Каждую крысу ежедневно подвергали воздействию дыма от одной сигареты или одного стика в течение 40 минут. На 42-й день животные были выведены из эксперимента путем дислокации цервикальных позвонков под хлороформным наркозом.

Выбор 42-дневного срока интоксикации крыс основан на необходимости моделирования устойчивых патофизиологических изменений, характерных для ранних стадий ХОБЛ у человека. Этот период является минимально достаточным для развития выраженного воспаления, окислительного стресса и начала ремоделирования дыхательных путей [16].

Доза курения (1 сигарета в день) была определена в результате предшествующих пилотных наблюдений, установивших, что большая доза (≥ 2 сигарет в день) в тестируемых условиях приводила к частой преждевременной смертности у животных. Мы не использовали липополисахариды и инфекционные патогены при

моделировании ХОБЛ с целью достижения этиологической релевантности и воссоздания естественного течения патологии без существенного искажения воспалительного ответа [17].

Легкие изымали для гистологической оценки и анализа уровней экспрессии *CCR3*, *CCL13*, *COL4A2*, *IL2RA*, *VWF* и *TRPM8*. Ткани легких фиксировали в 10 % формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Окраска проводилась гематоксилином и эозином. Полученные препараты исследовали с помощью микроскопии. При микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивали характерные гистопатологические маркеры хронического воспаления легочной ткани: воспалительную инфильтрацию (лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги) перибронхиально и периваскулярно, ремоделирование дыхательных путей (утолщение стенок бронхов, гиперплазия бокаловидных клеток), деструкцию альвеолярных перегородок (эмфизема) и развитие интерстициального фиброза. Статистический анализ частоты морфологических изменений проводили в среде R (версия 4.4.2; R Foundation for Statistical Computing). Для выявления общих различий в частоте встречаемости морфологических изменений между тремя опытными группами применяли точный критерий Фишера – Фримена – Холтона (функция *fisher.test* из пакета *stats*), который является предпочтительным методом для таблиц сопряженности 2×3 при наличии нулевых или малых ожидаемых частот. В случае выявления статистически значимых различий ($p < 0,05$) проводили попарные апостериорные сравнения с использованием точного критерия Фишера для таблиц 2×2 с поправкой Бонферрони на множественные сравнения.

Из оставшихся тканей легких выделяли тотальную РНК с использованием набора RNA Solo (Евроген, Россия). Концентрацию тотальной РНК после ДНКазной обработки измеряли на спектрофотометре NanoDrop (ThermoFisher Scientific, США). Оценку качества выделенной РНК проводили с помощью гель-электрофореза в 2 % агарозном геле, визуализируя полосы 28S и 18S рРНК с использованием системы гель-документирования Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, США). Качественные образцы без признаков деградации РНК имели четко выраженные интактные полосы 28S и 18S рРНК и соотношение их интенсивности, близкое к 2:1. Из выделенной РНК получали кДНК методом обратной транскрипции (ОТ) с использованием набора OT-MULV (Биолабмикс, Россия). В дальнейшем была проведена количественная ПЦР для всех генов с использованием набора HS-qPCR SYBR-BLUE (Биолабмикс, Россия). В результате обратной транскрипции с олиго(dT) праймерами было получено достаточное количество кДНК для *CCR3*, *CCL13* и *18S*, а для генов *COL4A2*, *IL2RA*, *TRPM8*, *VWF* была проведена ген-специфическая ОТ. Локус *18S* служил в качестве конститутивного (референсного) гена, как наиболее стабильный при воспалительных процессах в легких [14], и в дальнейшем использовался для расчета нормализованных значений экспрессии

интересующих генов. ПЦР в реальном времени предусматривала проведение анализа кривой плавления после завершения реакции (Рис. 1). Анализ пиков плавления проводили для подтверждения специфичности амплификации и отсутствия неспецифических продуктов или димеров праймеров. Амплификация шести целевых генов проводилась в раздельных пробирках. После завершения стадии элонгации, амплификатор регистрировал интенсивность флуоресценции с последующим построением производных кривых плавления. Наличие единственного узкого пика на каждой производной кривой для всех шести анализов свидетельствовало об амплификации специфичного продукта и отсутствии побочных продуктов ПЦР.

Наличие единственного пика у каждого из шести генов указывает на то, что праймеры преимущественно амплифицируют целевой участок ДНК.

Полученные образцы анализировали в четырехкратных повторах на амплификаторе CFX96 (BioRad,

США), при этом использовали олигонуклеотиды, указанные в таблице 1 [14]. Как отмечалось ранее, маркерные гены *CCR3*, *CCL13*, *VWF*, *COL4A* и *IL2RA* были отобраны на основании результатов исследования, в ходе которого проводили дифференциальный анализ экспрессии различных генов в легочной ткани, ассоциированных с развитием ХОБЛ-подобного состояния.

Амплификацию проводили при следующих температурных режимах: начальная денатурация – при 96°C в течение 2 мин, затем 32 цикла при температурно-временном режиме: денатурация – при 94°C – 30 сек, отжиг праймеров при 60°C – 40 сек, элонгация – при 70°C в течение 1 мин; финальная элонгация – при 70°C в течение 2 мин.

Статистические расчеты относительной экспрессии целевых генов методом $2^{-\Delta\Delta Cq}$ проводили с использованием веб-сервиса qRAT [18], с его плагином для анализа ddCq [19, 20].

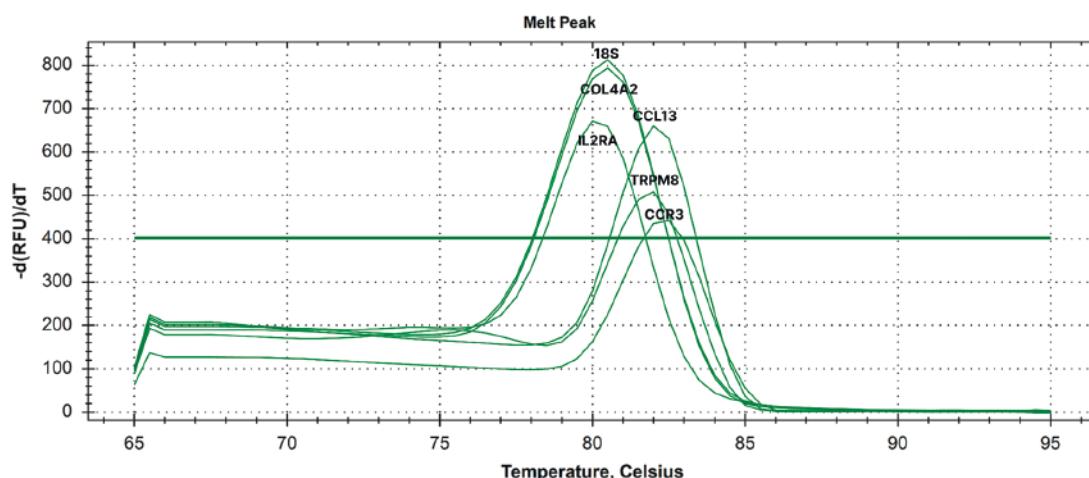


РИС. 1.

Пики плавления для продуктов генов *CCR3*, *CCL13*, *COL4A2*, *IL2RA*, *TRPM8*, *18S* (компиляция шести графиков)

FIG. 1.

Melting peaks for *CCR3*, *CCL13*, *COL4A2*, *IL2RA*, *TRPM8*, *18S* gene products (compilation of six graphs)

ТАБЛИЦА 1
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1
PRIMER SEQUENCES

Локус	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина ампликона
<i>CCR3</i>	CCTGCTGACAATCGACAGGTA	GCTGCCAATACTGCAAGACC	120
<i>CCL13</i>	TCAGTGTTCACCCAGTCAC	GGACACTGGCTGCTTGTGAT	101
<i>VWF</i>	CCTTGTAAGTGGCTCGTCT	GCAAGTTGCAGTTGACCAGG	88
<i>COL4A2</i>	CGAGAGGCCTCTCTGGATTCT	TGCGTAAGGTTCGCCTTCT	200
<i>IL2RA</i>	CCATAGTACCCGGCTGTTGG	CCGTTCTTGTAGGAGAGGGC	91
<i>TRPM8</i>	GCAGTGGTACATGAACGGAGT	TGAAGAGTGAAGCCGGAATAC	109
<i>18S</i>	CTTAGAGGGACAAGTGGCG	GGACATCTAAGGGCATCACA	70

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее явные морфологические изменения в легких были выявлены у животных, получавших сигаретный дым. Так, была установлена бокаловидно-клеточная гиперплазия, что, по всей видимости, является следствием инфильтрации нейтрофилами при дегрануляции которых высвобождается

нейтрофильная эластаза и катепсин G (Рис. 2D) [21]. В мышечной оболочке подслизистого слоя бронхов наблюдалась гипертрофия и гиперплазия миоцитов, что обусловлено уменьшением количества гранул гликогена в мышечных клетках бронхиол (Рис. 3А, 3Д) [22]. Со стороны сосудов отмечались значительные изменения, проявляющиеся в пролиферации интимы и фиброзе эластазе, приводящим к резкому сужению

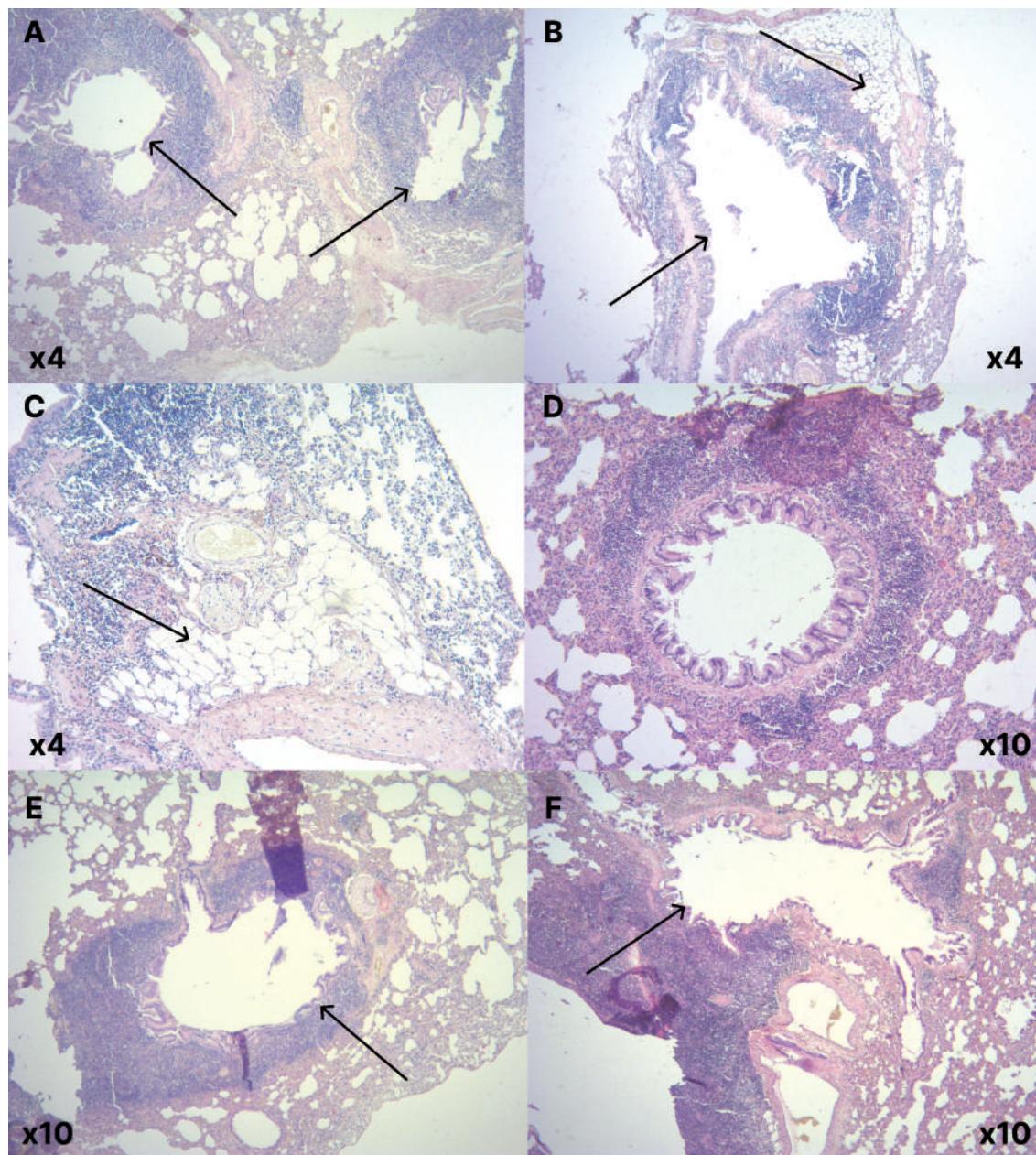


РИС. 2.

Гистологические снимки легких крысы, подвергшейся хроническому воздействию сигаретного дыма (световая микроскопия, увеличение $\times 4$ и $\times 10$, окраска гематоксилином и эозином). На всех снимках отмечается серозно-лейкоцитарный инфильтрат в альвеолах, склероз легочной ткани, полнокровие и сужение просвета сосудов; А, В, Е, F – бронхэкстазы; В, С – очаги эмфизематозного изменения легочной ткани с бронхэкстазами, участки перерастяжения альвеол; D – утолщение стенок бронха.

FIG. 2.

Histological images of the lungs of a rat chronically exposed to cigarette smoke (light microscopy, magnification $\times 4$ and $\times 10$, stained with hematoxylin and eosin). All images show serous-leukocytic infiltrate in the alveoli, sclerosis of the lung tissue, plethora and narrowing of the vascular lumen; A, B, E, F – bronchiectasis; B, C – foci of emphysematous changes in the lung tissue with bronchiectasis, areas of alveolar overstretching; D – thickening of the bronchial walls.

просвета (Рис. 3С). Пролиферация интимы сосудов в данном случае обусловлена гиперплазией гладкомышечных клеток и накоплением эластических и коллагеновых волокон, что происходит вследствие повреждения эндотелия интимы, повышения давления в системе легочной артерии и гипоксии [23] (Рис. 3С). Утолщение стенок бронхов (Рис. 2D, 3A, 3D) связано с несколькими патофизиологическими процессами, включая воспаление, гипертрофию слизистых желез, фиброз и отек. Десквамация эпителия (Рис. 3В) и плоскоклеточная метаплазия (Рис. 3А) являются результатом повреждения, вызванного хроническим воздействием сигаретного дыма и активацией репаративных процессов. Наблюдалась гиперплазия и гипертрофия желез, склерозирование легочной ткани (Рис. 2А, 2Е, 3А, 3D). Возникало эмфизематозное изменение легочной ткани, предположительно, индуцированное нейтрофильными протеазами, включая нейтрофильную эластазу, протеиназу 3 и катепсин G, приводящим к повреждению окружающих тканей. Кроме того, роль в развитии эмфиземы может играть эластаза макрофагов, активность которой увеличивается

на фоне курения, при этом ее действие не подавляется α 1-антитрипсином, что позволяет этому ферменту разрушать антипротеазы (Рис. 2В и 2С) [24]. На фоне воздействия табачного аэрозоля изменения в легких были менее выраженным: наблюдалась инфильтрация воспалительных клеток, полнокровие сосудов, ремоделирование легочной ткани (Рис. 5А, 5В, 5С). Патологических изменений (склероз легочной ткани, эмфизематозное изменение, бокаловидно-клеточная гиперплазия) в легких у крыс из интактной группы не наблюдалось (Рис. 4А, 4В).

Воздействие сигаретного дыма вызывает наиболее выраженные патологические изменения легочной ткани (склероз, инфильтрат, эмфизема, гиперплазия) по сравнению с интактной группой ($p < 0,001$). Табачный аэрозоль также приводит к значимым изменениям, но в меньшей степени: он вызывает склероз и инфильтрат, но не эмфизему, а его влияние статистически слабее, чем у дыма ($p < 0,001$ в попарных сравнениях). Таким образом, традиционное курение оказывает более разрушительное воздействие на лёгкие, чем использование табачного аэрозоля (Табл. 2).

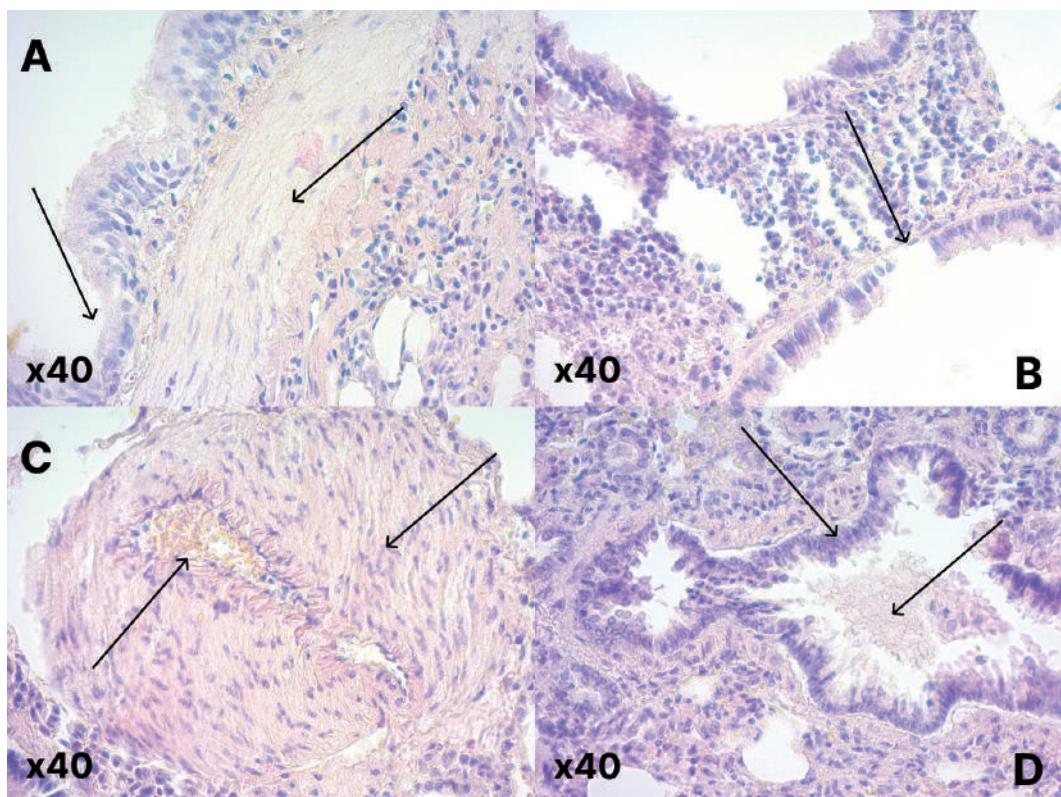


РИС. 3.

Гистологические снимки легких крысы, подвергшейся хроническому воздействию сигаретного дыма (световая микроскопия, увеличение $x40$, окраска гематоксилином и эозином). А – плоскоклеточная метаплазия эпителия бронха, гипертрофия и гиперплазия миоцитов; В – десквамация мерцательного эпителия; С – полнокровие, склероз и фиброэластоз сосуда, утолщение мышечного слоя, повышенная инфильтрация периваскулярной ткани; D – бокаловидно-клеточная гиперплазия, лейкоцитарный инфильтрат в просвете бронха.

FIG. 3.

Histological images of the lungs of a rat chronically exposed to cigarette smoke (light microscopy, 40x magnification, hematoxylin and eosin staining). A – squamous cell metaplasia of the bronchial epithelium, hypertrophy and hyperplasia of myocytes; B – desquamation of the ciliated epithelium; C – plethora, sclerosis and fibroelastosis of the vessel, increased infiltration of perivascular tissue; D – goblet cell hyperplasia, leukocyte infiltrate in the bronchial lumen.

ТАБЛИЦА 2

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 2

PREVALENCE OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN LABORATORY ANIMALS

Морфологическое изменение	Группы (n = 30)	% (n) с изменением	p-value (критерий Фишера – Фримена – Холтона)	Попарные сравнения (p-value с поправкой Бонферрони)
1. Склероз легочной ткани	Интактная	0 (0)	< 0,001	$p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,024$ (не знач.) $p_3 < 0,001$
	Сигаретный дым	73,3 (22)		
	Табачный аэрозоль	20,0 (6)		
2. Серозно-лейкоцитарный инфильтрат	Интактная	10,0 (3)	< 0,001	$p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
	Сигаретный дым	100 (30)		
	Табачный аэрозоль	70,0 (21)		
3. Эмфизематозное изменение	Интактная	0 (0)	< 0,001	$p_1 < 0,001$ $p_2 = 1,0$ (не знач.) $p_3 < 0,001$
	Сигаретный дым	56,7 (17)		
	Табачный аэрозоль	0 (0)		
4. Бокаловидно-клеточная гиперплазия	Интактная	0 (0)	< 0,001	$p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
	Сигаретный дым	90,0 (27)		
	Табачный аэрозоль	30,0 (12)		

Примечания: *Интактная vs. Дым (p_1), Интактная vs. Аэрозоль (p_2), Дым vs. Аэрозоль (p_3).

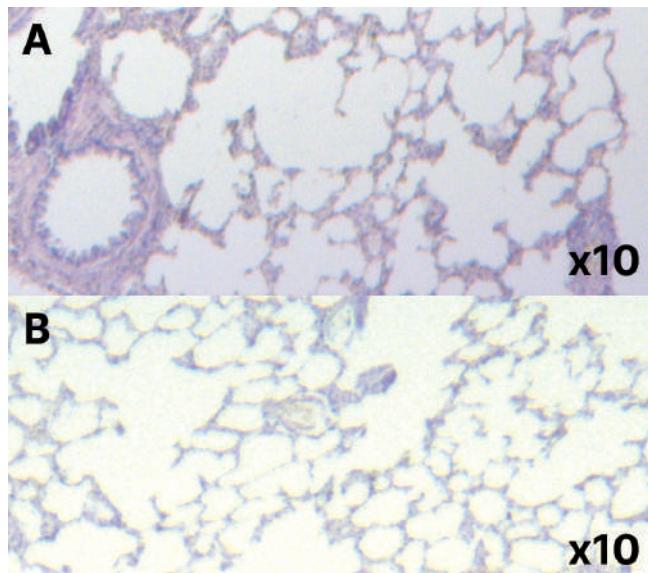


РИС. 4.

Гистологические снимки легких крысы интактной группы (световая микроскопия, увеличение 10x, окраска гематоксилином и эозином). А, В – легкие без патологических изменений.

FIG. 4.

Histological images of the lungs of rats from the intact group (light microscopy, 10x magnification, hematoxylin and eosin staining). A, B – lungs without pathological changes.

Экспрессию VWF определить не удалось, вероятно, из-за очень низкой концентрации транскриптов этого гена в исследуемом образце. Несмотря на выполнение ген-специфичной обратной транскрипции, направленной на повышение специфичности реакции, результат остался отрицательным. Полученные результаты

анализа относительного уровня экспрессии прочих генов (за исключением CCR3) демонстрировали повышение их транскрипции в обеих экспериментальных группах по отношению к контрольной (Рис. 6).

При сравнении экспериментальных групп относительно друг друга, наблюдали отсутствие статистически значимых различий для большинства генов, за исключением COL4A2 и IL2RA, которые в большей степени экспрессировались в группе, подвергнутой действию сигаретного дыма (в 1,7 ($p < 0,001$) и 1,5 раза ($p = 0,04$)). Такие различия указывают на более выраженный эффект сигаретного дыма, по сравнению с табачным аэрозолем, на провоспалительную реакцию, опосредованную через IL2RA и повышенную транскрипцию COL4A2, который отвечает за образование коллагена (Рис. 6).

Локус CCR3 в обеих экспериментальных группах имел незначительное изменение (Рис. 6) экспрессии. Известно, что рецептор CCR3 играет важную роль в развитии аллергических реакций и бронхиальной астмы, проявляя активную экспрессию в базофилах, эозинофилах, а также в Th2 лимфоцитах и эпителиальных клетках, выстилающих респираторный тракт. Таким образом, его низкая экспрессия указывает на отсутствие аллергического воспаления в респираторном тракте крыс с ХОБЛ-подобным состоянием, что, несмотря на противоречие с данными Guan Q. et al., [14] в целом характерно для ХОБЛ [25].

CCL13 и IL2RA, также как и CCR3, вовлечены в различные иммунные механизмы, ассоциированные с воспалением. CCL13, также известный как MCP-4 (моноцитарный хемоаттрактантный белок-4), представляет собой СС-хемокин, обладающий значительной хемоаттрактантной активностью в отношении моноцитов, эозинофилов и базофилов. Данный хемокин в значительной

степени ассоциирован с аллергическими заболеваниями, такими как бронхиальная астма, но может играть роль и при ХОБЛ [26]. Продукция CCL13 может быть индуцирована воспалительными цитокинами, включая интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) [27]. Полученные данные демонстрируют статистически значимые различия в воздействии табачного аэрозоля и сигаретного дыма на экспрессию хемокина CCL13, что подтверждает достоверность наблюдаемых эффектов. Более выражена экспрессия CCL13 при воздействии табачного аэрозоля 7,0-кратное увеличение ($p < 0,05$) в то время как при воздействии сигаретного дыма 4,7-кратное увеличение ($p < 0,001$).

В то же время для *IL2RA* наблюдалась противоположная картина: экспрессия этого гена увеличивалась

в 7,9 раза в группе, получавшей сигаретный дым ($p < 0,001$) (Рис. 6), и в 3,0 раза ($p < 0,001$) в группе, получавшей табачный аэрозоль (Рис. 6). Альфа-цепь рецептора интерлейкина-2 (IL2RA или CD25) играет ключевую роль в патогенезе аутоиммунных и онкологических заболеваний, а повышенная экспрессия данного белка является маркером активации Т-клеток. CD25 может также быть обнаружен в нелимфоидных тканях, таких как альвеолярные макрофаги, клетки Купфера, клетки Лангерганса. Роль данного рецептора в развитии ХОБЛ ещё предстоит выяснить, однако имеются исследования, демонстрирующие повышенное содержание растворимого рецептора интерлейкина-2 (sIL-2R) в сыворотке у курящих лиц. Воспаление, индуцированное сигаретным дымом, играет центральную

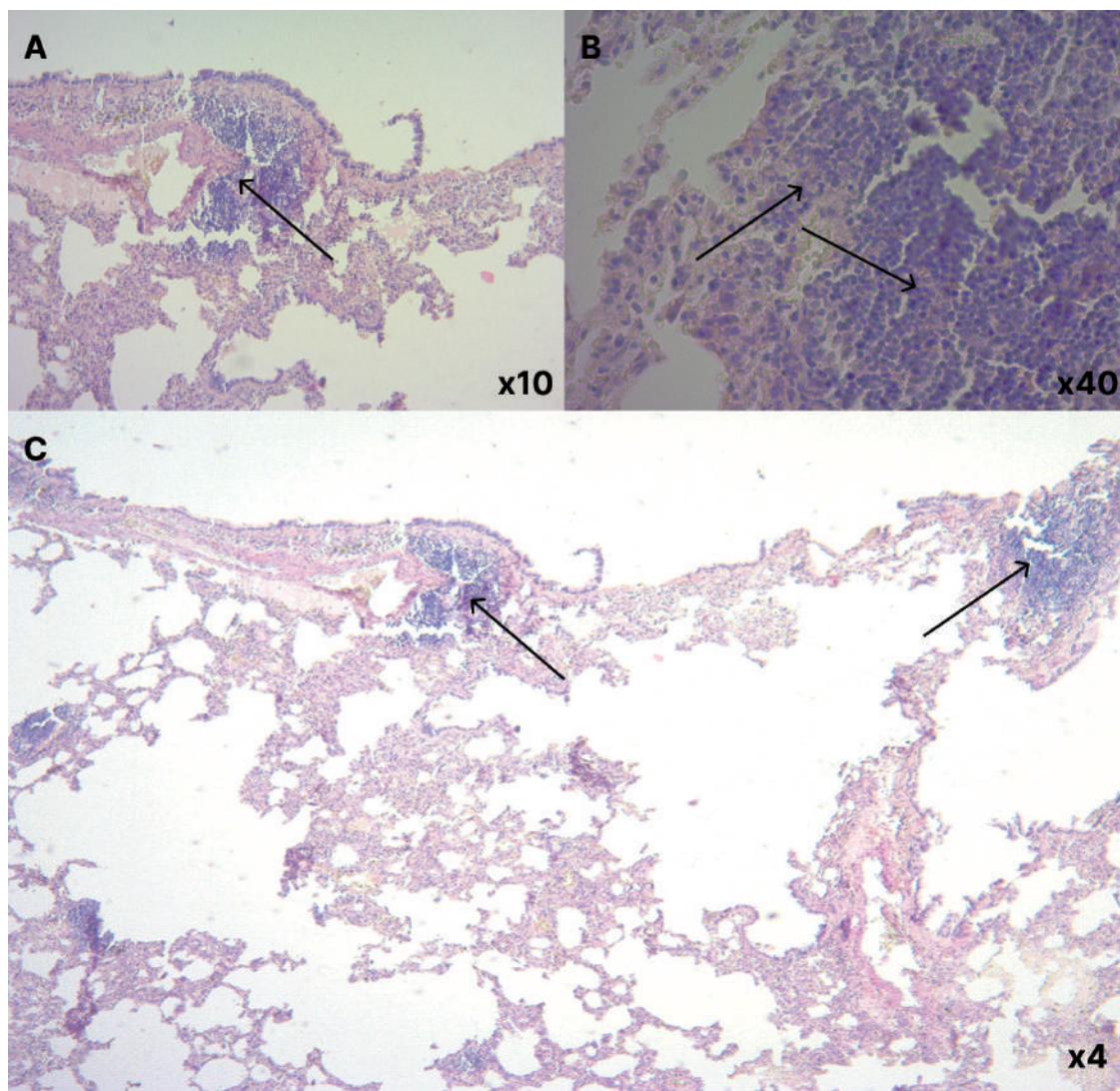


РИС. 5.

Гистологические снимки легких крысы, подвергшейся хроническому воздействию табачного аэрозоля (световая микроскопия, увеличение $x4$, $x10$, $x40$, окраска гематоксилином и эозином). А, В, С – лимфоидная инфильтрация, А – периваскулярная инфильтрация, утолщение интимы сосуда, склероз и полнокровие сосуда.

FIG. 5.

Histological images of the lungs of a rat chronically exposed to tobacco aerosol (light microscopy, magnification $x4$, $x10$, $x40$, stained with hematoxylin and eosin). A, B, C – lymphoid infiltration, A – perivascular infiltration, thickening of the vascular intima, sclerosis and vascular congestion.

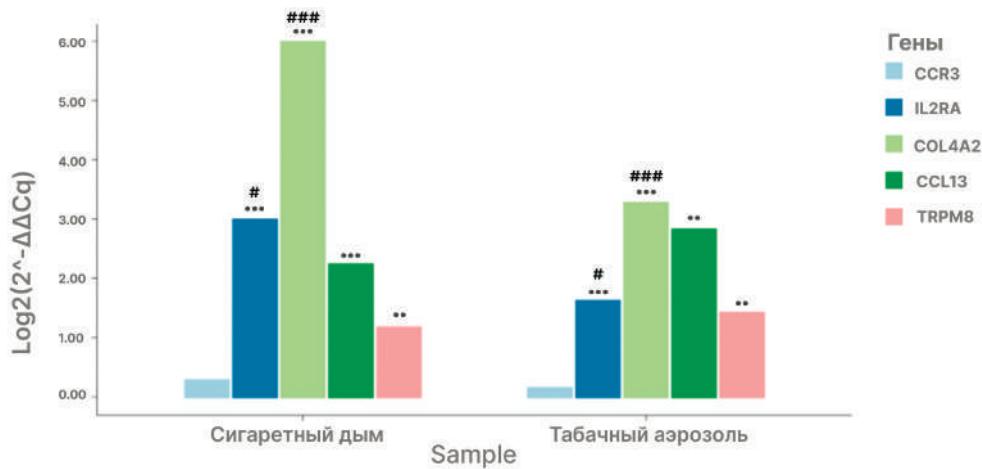
**РИС. 6.**

График анализа экспрессии генов в экспериментальных группах по сравнению с контролем (по вертикальной оси $\text{Log2}(2^{-\Delta\Delta Cq})$).

Статистически значимые отклики *** $p < 0,001$; ** $p < 0,05$ – по отношению к контролю; ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$ – по отношению экспериментальных групп к друг другу

роль в ремоделировании дыхательных путей и повреждении легочной ткани. Исследования показывают, что даже после прекращения курения воспалительные процессы в легких продолжают сохраняться, что указывает на возможное присутствие аутоиммунных факторов при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Это позволяет предположить, что повышенная концентрация sIL-2R в сыворотке может свидетельствовать о том, что сигаретный дым способствует возникновению и прогрессированию ХОБЛ через активацию Т-клеток [28].

Значительное повышение экспрессии *COL4A2* наблюдалось в обеих экспериментальных группах: в группе, получавшей сигаретный дым, оно составило 63,5 раза ($p < 0,001$) (Рис. 6), а в группе, получавшей табачный аэрозоль – 9,6 раз ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (Рис. 6). Это обусловлено несколькими патофизиологическими процессами, среди которых особенно значимы хроническое воспаление и повреждение легочной ткани. В ответ на воспалительные сигналы происходит увеличение синтеза коллагена для попытки восстановления повреждений [29]. Известно, что ХОБЛ может сопровождаться развитием фиброза, в котором *COL4A2* выполняет критическую роль как основной компонент внеклеточного матрикса. Нарушение структуры внеклеточного матрикса может приводить к избыточному отложению коллагена в тканях и утолщению базальных мембран. Дополнительно, гипоксия, часто наблюдаемая при ХОБЛ, может активировать сигнальные пути, ответственные за синтез коллагена, через активацию гипоксически индуцируемых факторов транскрипции. На основании полученных данных можно заключить, что сигаретный дым оказывал большее влияние на экспрессию коллагена, по сравнению с табачным аэрозолем.

FIG. 6.

Graph of gene expression analysis in experimental groups versus control (on the vertical axis $\text{Log2}(2^{-\Delta\Delta Cq})$).

Statistically significant differences *** $p < 0,001$ ** $p < 0,05$ – in relation to control; ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$ – in relation of experimental groups to each other.

Увеличение синтеза мРНК *TRPM8* по сравнению с контролем, было сопоставимо между группой, получавшей сигаретный дым (2,2 раза, $p = 0,006$) (Рис. 6), и группой, получавшей табачный аэрозоль (2,6 раза, $p = 0,002$) (Рис. 6). Известно, что холодный воздух, ментол и твердые частицы, содержащиеся в сигаретном дыме, могут инициировать воспалительные реакции через опосредуемый *TRPM8* сигнальный путь РКС/НФ-кВ в первичных эпителиальных клетках дыхательных путей. При этом результатом активации *TRPM8* является повышенная экспрессия множества цитокинов и хемокинов, таких как IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и TNF- α . [30].

Исследования, посвященные полиморфизмам гена *TRPM8*, также подтверждают его значимую роль в патогенезе ХОБЛ. В частности, полиморфизм *TRPM8* rs2052030 может оказывать влияние на предрасположенность к развитию ХОБЛ, а носители аллеля С по полиморфизму rs11562975 предрасположены к формированию прогрессирующей бронхиальной обструкции [31, 32].

К основным недостаткам проведенного исследования можно отнести то, что экспрессию маркеров ХОБЛ и *TRPM8* оценивали только на уровне мРНК, что может не отражать изменений экспрессии соответствующих белков вследствие посттранскрипционной регуляции. В исследовании не проводили измерение числа лейкоцитов и воспалительных маркеров в бронховоальвеолярном лаваже, а также не оценивали системный уровень воспаления. Кроме того, для полученных гистологических препаратов не выполняли количественный морфометрический анализ. Тем не менее, выявленные на молекулярном уровне изменения экспрессии мРНК, а также морфологические особенности лёгочной ткани

после воздействия сигаретного дыма, свидетельствуют о формировании патологического фенотипа, релевантного модели ХОБЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы протестировали моделирование ХОБЛ-подобного состояния у крыс с помощью ингаляции табачных сигарет и табачного аэрозоля, генерируемого системами нагревания табака. Несмотря на то, что создание модели ХОБЛ у животных с использованием сигаретного дыма часто также включает ингаляции липополисахаридов [33], нами была выбрана модель заболевания, развивающаяся только при воздействии сигаретного дыма, поскольку она проще, менее затратная и лучше подходит для моделирования стабильной ХОБЛ [34]. Некоторые исследования показывают, что увеличенное количество клеток в бронхоальвеолярном лаваже, повышенная экспрессия IL-6 и эмфизематозные изменения легочной паренхимы появляются уже через 1 месяц экспозиции с сигаретным дымом при интенсивности экспозиции 0,00103 сиг./л/мин и суточной дозе 0,124 сиг./л [35], тогда как в нашем случае значения интенсивности и дозы составили 0,00278 сиг./л/мин. и 0,11 сиг./л соответственно.

В нашем эксперименте, крысы, получавшие табачный аэрозоль, демонстрировали умеренные морфологические изменения в легких, тем не менее, по данным Nitta N.A. et al. при 6-месячной экспозиции мышей с табачным аэрозолем изменения были сопоставимы с теми, что наблюдались у особей, получавших ингаляции сигаретного дыма. Кроме того, на фоне экспозиции с табачным аэрозолем в бронхоальвеолярном лаваже значительно возрастало количество нейтрофилов и лимфоцитов [36]. Таким образом, вероятно, что индукция ХОБЛ-подобного фенотипа с помощью табачного аэрозоля должна занимать больше времени, и 6-недельной экспозиции было недостаточно для развития выраженных морфологических нарушений.

На фоне действия сигаретного дыма и табачного аэрозоля было зафиксировано увеличение экспрессии большинства маркерных генов ХОБЛ в тканях легких. При этом, в отличие от прочих генов, экспрессия CCR3 не возрастала. Данная особенность может быть обусловлена тем, что в работе Guan Q. et al. [14], для моделирования ХОБЛ воздействие сигаретного дыма комбинировали с назальной инстилляцией инфекционного патогена (*Klebsiella pneumoniae*), тогда как наша модель не предусматривала проведения дополнительной стимуляции живыми бактериями или компонентами их клеточной стенки. Кроме того, мы не смогли оценить экспрессию гена *VWF*, что может быть связано с особенностями использованных праймеров и других реагентов для проведения ОТ-ПЦР.

Важно подчеркнуть, что данная работа была направлена не только на моделирование ХОБЛ, но также на верификацию повышенной транскрипции *TRPM8* в конкретных моделях у крыс, с целью дальнейшего изучения

роли данного катионного канала в развитии заболевания. Важно отметить, что ранее гиперэкспрессия *TRPM8* была зафиксирована либо при краткосрочной экспозиции с сигаретным дымом, не способной вызвать типичные ХОБЛ-подобные изменения в легочной ткани [8], либо, напротив – в модели с, вероятно, чрезмерной экспозицией (60 сигарет в день, 40 дней), хотя подробные условия эксперимента (например, объем, в котором заключался полученный объем дыма) не указаны [37]. Нам впервые удалось показать, что экспрессия мРНК *TRPM8* возрастает не только при контакте с сигаретным дымом, но и на фоне экспозиции с табачным аэрозолем. В настоящее время данные о способности компонентов табачного аэрозоля вызывать активацию *TRPM8* отсутствуют. Тем не менее, известно, что данный аэрозоль обладает даже более выраженной способностью к индукции окислительного стресса в клетках бронхиального эпителия *in vitro*, по сравнению с сигаретным дымом [38]. Таким образом, можно ожидать, что как сигаретный дым, так и табачный аэрозоль будут выступать в качестве активаторов данного катионного канала. Обнаруженное увеличение экспрессии *TRPM8* представляет собой важную предпосылку для оценки потенциала этих каналов в качестве фармакологической мишени, что, в свою очередь, создает основу для дальнейших исследований, направленных на изучение их функциональной роли в патогенезе ХОБЛ и разработку новых подходов к лечению данного заболевания.

Финансирование

Расходные материалы и реактивы для проведения морфологических исследований, а также реагенты для анализа дифференциальной экспрессии генов были закуплены за счет собственных средств Тимкина Павла Дмитриевича.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 141(4): 737–745. doi: 10.1038/sj.bjp.0705652.
2. Bolger GB. Therapeutic Targets and Precision Medicine in COPD: Inflammation, Ion Channels, Both, or Neither? *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(24): 17363. doi: 10.3390/ijms242417363
3. Cazzola M, Rogliani P, Blasi F. Can treatable traits be the approach to addressing the complexity and heterogeneity of COPD? *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2023; 18: 1959–1964. doi: 10.2147/COPD.S428391
4. Wang J, Yang G, Li M, Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-based mechanisms underlie both the cold temperature-induced inflammatory reac-

tions and the synergistic effect of cigarette smoke in human bronchial epithelial (16HBE) cells. *Front. Physiol.* 2019; 10: 285. doi: 10.3389/fphys.2019.00285

5. Lamb JG, Romero EG, Lu Z, Marcus SK, Peterson HC, Veranth JM, et al. Activation of Human Transient Receptor Potential Melastatin-8 (TRPM8) by Calcium-Rich Particulate Materials and Effects on Human Lung Cells. *Mol. Pharmacol.* 2017; 92(6): 653–664. doi: 10.1124/mol.117.109959
6. Li M, Li Q, Yang G, Kolosov VP, Perelman JM, Zhou XD. 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): 626–34.e1–5. doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.032
7. Lin AH, Liu MH, Ko HB, Perng DW, Lee TS, Kou YR. 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. doi: 10.3389/fphys.2017.00263
8. Lin AH, Liu MH, Ko HK, Perng DW, Lee TS, Kou YR. Menthol Cigarette Smoke Induces More Severe Lung Inflammation Than Non-menthol Cigarette Smoke Does in Mice With Subchronic Exposure – Role of TRPM8. *Front Physiol.* 2018; 9: 1817. doi: 10.3389/fphys.2018.01817
9. Li MC, Yang G, Zhou XD, Tselluyko S, Perelman JM. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats. *Int J Mol Med.* 2014; 33(1): 83–90. doi: 10.3892/ijmm.2013.1535
10. Feng T, Cao J, Ma X, Wang X, Guo X, Yan N, et al. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Front Med (Lausanne)*. 2024; 11: 1474870. doi: 10.3389/fmed.2024.1474870
11. Wong ET, Kogel U, Veljkovic E, Martin F, Xiang Y, Boue S, et al. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 4: 90-day OECD 413 rat inhalation study with systems toxicology endpoints demonstrates reduced exposure effects compared with cigarette smoke. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2016; 81 (Suppl 2): S59–S81. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.10.015
12. Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS, Sham JS. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006; 290(6): L1267–76. doi: 10.1152/ajplung.00515.2005
13. Upadhyay P, Wu CW, Pham A, Zeki AA, Royer CM, Kodavanti UP, et al. Animal models and mechanisms of tobacco smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 2023; 26(5): 275–305. doi: 10.1080/10937404.2023.2208886
14. Guan Q, Tian Y, Zhang Z, Zhang L, Zhao P, Li J. Identification of Potential Key Genes in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Through Bioinformatics Analysis. *Front. Genet.* 2021; 12: 754569. doi: 10.3389/fgene.2021.754569
15. Lang G, Henao C, Almstetter M, Arndt D, Goujon C, Maeder S. Non-targeted analytical comparison of a heated tobacco product aerosol against mainstream cigarette smoke: does heating tobacco produce an inherently different set of aerosol constituents? *Anal Bioanal Chem.* 2024; 416(6): 1349–1361. doi: 10.1007/s00216-024-05126-x
16. Moennikes O, Vanscheeuwijk PM, Friedrichs B, Anskeit E, Patskan GJ. Reduced toxicological activity of cigarette smoke by the addition of ammonia magnesium phosphate to the paper of an electrically heated cigarette: subchronic inhalation toxicology. *Inhal Toxicol.* 2008; 20(7): 647–63. doi: 10.1080/08958370701813273
17. Wright JL, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295(1): L1–L15. doi: 10.1152/ajplung.90200.2008
18. Flatschacher D, Speckbacher V, Zeilinger S. qRAT: an R-based stand-alone application for relative expression analysis of RT-qPCR data. *BMC Bioinformatics.* 2022; 23(1): 286. doi: 10.1186/s12859-022-04823-7
19. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(7): e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
20. Zhang JD, Biczok R, Ruschhaupt M. ddCt: The ddCt Algorithm for the Analysis of Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). R package version 1.62.0. 2024. doi: 10.18129/B9.bioc.ddCt
21. Voynow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, Longphre M, et al. Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004; 287(6): L1293–302. doi: 10.1152/ajplung.00140.2004
22. Малыхин Ф.Т., Косторная И.В. Морфологические изменения органов дыхания при хронической обструктивной болезни легких. *Архив патологии.* 2016; 78(1): 42–50. [Malykhin FT, Kostornaya IV. Morphological changes in the respiratory organs in chronic obstructive pulmonary disease. *Russian Journal of Archive of Pathology.* 2016; 78(1): 42–50. (In Russ.)]. doi: 10.17116/patol201678142-50
23. Karnaushkina MA, Fedosenko SV, Vinogradov DL, Streltsova TV, Ogorodova LM. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Cardiovascular Diseases: Systemic Effects. *Doctor.Ru. Internal Medicine Cardiology Rheumatology.* 2015; 8(109)–9(110): 50–53.
24. Смирнова О.В., Выхристенко Л.Р. Роль клеток системы иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы. *Медицинские новости.* 2011; 5: 14–19. [Smirnova OV, Vykhristenko LR. The role of immune system cells in the pathogenesis of bronchial asthma. *Meditinskije novosti.* 2011; 5: 14–19. (In Russ.)].
25. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(11): 3546–3556. doi: 10.1172/jci36130
26. Fang C, Kang B, Zhao P, Ran J, Wang L, Zhao L, et al. MCP-4 and Eotaxin-3 are novel biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease. *Can. Respir. J.* 2023; 2023: 8659293. doi: 10.1155/2023/8659293
27. Jha A, Thwaites RS, Tunstall T, Kon OM, Shattock RJ, Hansel TT, et al. Increased nasal mucosal interferon and CCL13 response to a TLR7/8 agonist in asthma

and allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2021; 147(2): 694–703.e12. doi: 10.1016/j.jaci.2020.07.012

28. Zhang Y, Ren L, Sun J, Han F, Guo X. Increased Serum Soluble Interleukin-2 Receptor Associated with Severity of Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2021; 16: 2561–2573. doi: 10.2147/COPD.S321904

29. Chernyaev AL, Samsonova MV. Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: molecular basis of pathogenesis. *Consilium Medicum.* 2008; 10(10): 57–63.

30. Wang J, Yang G, Li M, Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-based mechanisms underlie both the cold temperature-induced inflammatory reactions and the synergistic effect of cigarette smoke in human bronchial epithelial (16HBE) cells. *Front. Physiol.* 2019; 10: 285. doi: 10.3389/fphys.2019.00285

31. Naumov DE, Kotova OO, Gassan DA, Sugaylo IY, Afanas'eva EY, Sheludko EG, et al. Effect of TRPM8 and TRPA1 polymorphisms on COPD predisposition and lung function in COPD patients. *J. Pers. Med.* 2021; 11(2): 108. doi: 10.3390/jpm11020108

32. Сугайло И.Ю., Гассан Д.А., Котова О.О., Наумов Д.Е., Горчакова Я.Г., Шелудко Е.Г., и др. Влияние полиморфизма TRPM8 на прогрессирование бронхиальной обструкции у больных хронической обструктивной болезнью легких. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2022; (86): 15–23. [Sugaylo IYu, Gassan DA, Kotova OO, Naumov DE, Gorchakova YaG, Sheludko EG, et al. The influence of TRPM8 polymorphism on the progression of bronchial obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Bulletin of the Far Eastern Scientific Center for Physiology and Pathology of Respiration and Translational Research.* 2022; 86(1): 15–23. doi: 10.3390/jpm11020108]

33. Feng T, Cao J, Ma X, Wang X, Guo X, Yan N, et al. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Front Med (Lausanne).* 2024; 11: 1474870. doi: 10.3389/fmed.2024.1474870

34. Zhou F, Li DF, Yuan L, Fu HY, Ma P, Zhang KD, et al. A comparative study of two chronic obstructive pulmonary disease mouse models established by different methods. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2019; 42(5): 367–371. (In Chinese). doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2019.05.010

35. Yang Y, Di T, Zhang Z, Liu J, Fu C, Wu Y, et al. Dynamic evolution of emphysema and airway remodeling in two mouse models of COPD. *BMC Pulm Med.* 2021; 21(1): 134. doi: 10.1186/s12890-021-01456-z

36. Nitta NA, Sato T, Komura M, Yoshikawa H, Suzuki Y, Mitsui A, et al. Exposure to the heated tobacco product IQOS generates apoptosis-mediated pulmonary emphysema in murine lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022; 322(5): L699–L711. doi: 10.1152/ajplung.00215.2021

37. Li MC, Yang G, Zhou XD, Tselluyko S, Perelman JM. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats. *Int J Mol Med.* 2014; 33(1): 83–90. doi: 10.3892/ijmm.2013.1535

38. Saha P, Jain S, Mukherjee I, Panda SR, Zeki AA, Naidu VGM, et al. The effects of dual IQOS and cigarette smoke exposure on airway epithelial cells: implications for lung health and respiratory disease pathogenesis. *ERJ Open Res.* 2023; 9(3): 00558–2022. doi: 10.1183/23120541.00558–2022

Сведения об авторах

Timkin Павел Дмитриевич – аспирант 2-го кафедры химии, ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; e-mail: timkin.pasha@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6655-1049>

Kiselyov Максим Андреевич – студент 6-го курса, лечебного дела, ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; e-mail: maksim.kiselyov.01@list.ru, <https://orcid.org/0009-0002-3676-9199>

Шаповалова Дарья Андреевна – студент 3-го курса лечебного дела, ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: dashken.666@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-2342-3165>

Наумов Денис Евгеньевич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярных и трансляционных исследований ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: denn1985@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3921-8755>

Линская Полина Михайловна – студент 3-го курса лечебного дела, ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: elduspaldium@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0004-9734-8464>

Бородин Евгений Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедры химии ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; e-mail: borodin.eugene54@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0983-4541>

Information about the authors

Pavel D. Timkin – 2nd year postgraduate student, Department of Chemistry, Amur State Medical Academy; e-mail: timkin.pasha@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6655-1049>

Maxim A. Kiselev – 6th year student, Amur State Medical Academy; e-mail: maksim.kiselyov.01@list.ru, <https://orcid.org/0009-0002-3676-9199>

Daria A. Shapovalova – 3rd year student, Amur State Medical Academy; e-mail: dashken.666@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-2342-3165>

Denis E. Naumov – Cand. Sc. (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center for Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: denn1985@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3921-8755>

Polina M. Linskaya – 3rd year student, Amur State Medical Academy; e-mail: elduspaldium@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0004-9734-8464>

Evgeny A. Borodin – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department of Chemistry, Amur State Medical Academy; e-mail: borodin.eugene54@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0983-4541>