

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

САВИН
ИННОКЕНТИЙ АНДРЕЕВИЧ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ
ОСТРЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ И ИХ ПЕРЕХОД В
ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ**

1.5.4 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук
Сенькова Александра Васильевна

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН
Зенкова Марина Аркадьевна

НОВОСИБИРСК 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ КАК ИСХОД ОСТРЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РЕЛЕВАНТНЫЕ МЫШИНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	17
<i>1.1 Острое воспаление легких как предшественник легочного фиброза: этиология, патогенез, патоморфологические характеристики, исходы</i>	18
1.1.1 Острое повреждение легких (ОПЛ) как один из этиологических факторов легочного фиброза.....	19
1.1.2 Патогенез ОПЛ.....	19
1.1.3 Патоморфологические изменения в легких при развитии ОПЛ.....	20
1.1.4 Бронхиальная астма (БА) как одна из причин легочного фиброза.....	20
1.1.5 Этиология и патогенез БА.....	21
1.1.6 Патоморфологические изменения в легких при БА.....	22
1.1.7 Исходы острого воспаления в легких.....	23
<i>1.2 Патоморфологические изменения в легких при ремоделировании дыхательных путей и развитии легочного фиброза</i>	24
1.2.1 Ремоделирование дыхательных путей.....	24
1.2.2 Патогенез легочного фиброза.....	25
1.2.3 Взаимосвязь ОПЛ и легочного фиброза с риском развития злокачественных новообразований легких.....	26
1.2.4 Патоморфологические изменения в легких при развитии легочного фиброза.....	27
1.2.4.1 Гистологическая классификация.....	27
1.2.4.2 Мультидисциплинарная классификация Американского торакального сообщества и Европейского общества пульмонологов.....	28
<i>1.3 Молекулярные механизмы развития легочного фиброза</i>	28
1.3.1 Основные эффекторные клетки легочного фиброза: фибробласты, миофибробласты и фиброциты.....	29
1.3.1.1 Характеристика фиброцитов и их роль в развитии легочного фиброза.....	30

1.3.1.2 Дифференцировка фибробластов в миофибробласты и их роль в развитии фиброза легких.....	31
1.3.1.3 Роль липофибробластов в развитии фиброза легких.....	32
1.3.2 Возможная роль эпителиально-мезенхимального перехода в развитии фиброза легких.....	33
1.3.3 Сигнальные пути в развитии фиброза легких.....	33
1.3.3.1 Сигнальный путь TGF- β	34
1.3.3.2 Сигнальный путь Wnt/ β -катенин.....	35
1.3.3.3 Сигнальный путь VEGF.....	37
1.3.3.4 Сигнальный путь hedgehog.....	38
1.3.3.5 Сигнальный путь Notch.....	39
1.3.3.6 Факторы роста фибробластов.....	39
1.3.4 Роль цитокинов в развитии фиброза легких.....	40
1.3.5 Роль иммунных клеток в развитии фиброза легких.....	40
1.3.5.1 Т-лимфоциты.....	40
1.3.5.2 Макрофаги.....	42
1.3.5.3 Аутоиммунные реакции.....	42
1.3.6 Роль активных форм кислорода в развитии фиброза легких.....	42
1.3.7 Универсальность механизмов развития фиброза в различных органах.....	43
<i>1.4 Релевантные мышечные модели острого повреждения и фиброза легких.....</i>	<i>45</i>
1.4.1 Общая характеристика животных моделей ОПЛ.....	45
1.4.1.1 ЛПС-индуцированное ОПЛ.....	49
1.4.1.2 ОПЛ, индуцированное гипероксией.....	49
1.4.1.3 ОПЛ, индуцированное олеиновой кислотой.....	50
1.4.1.4 ОПЛ, индуцированное аспирацией кислоты.....	50
1.4.1.5 ОПЛ, индуцированное механической вентиляцией.....	51
1.4.2 Общая характеристика животных моделей легочного фиброза.....	52
1.4.2.1 Овальбумин-индуцированная астма и пост-астматический легочный фиброз.....	55
1.4.2.2 Блеомицин-индуцированный легочный фиброз.....	56
1.4.2.3 Легочный фиброз, индуцированный радиацией.....	57
1.4.2.4 Легочный фиброз, индуцированный микрочастицами кремния.....	58
1.4.2.5 Легочный фиброз, индуцированный флюоресцин-5-изотиоцианатом.....	59
1.4.2.6 Влияние используемых линий мышечной ткани на развитие экспериментального легочного фиброза.....	59

1.5 Прогностические маркеры острого повреждения и фиброза легких.....	60
1.5.1 Биомаркеры ОПЛ.....	66
1.5.1.1 Экссудативная фаза.....	66
1.5.1.2 Пролиферативная фаза.....	66
1.5.2 Биомаркеры легочного фиброза.....	67
1.6 Терапевтические подходы к блокированию перехода острого воспаления в фиброз легких.....	70
1.6.1 Препараты, одобренные для терапии фиброза.....	70
1.6.2 Препараты для терапии фиброза, находящиеся во II и III фазе клинических испытаний.....	70
1.6.3 Потенциал ген-направленной терапии легочного фиброза.....	71
1.6.3.1 Повышение экспрессии гена.....	72
1.6.3.2 Подавление экспрессии гена.....	73
1.7 Заключение.....	74
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	75
2.1 Материалы.....	75
2.1.1 Реактивы и препараты.....	75
2.1.2 Оборудование.....	75
2.1.3 Олигонуклеотиды.....	76
2.1.4 Буферы и растворы.....	78
2.1.5 Лабораторные животные.....	78
2.2 Методы.....	79
2.2.1 Биоинформатический анализ.....	79
2.2.1.1 Анализ наборов данных в базе данных Gene Expression Omnibus.....	79
2.2.1.2 Функциональный анализ.....	80
2.2.1.3 Реконструкция сетей белок-белковых взаимодействий.....	81
2.2.1.4 Текст-майнинговый анализ.....	81
2.2.1.5 Анализ влияния уровня экспрессии ДЭГ на выживаемость пациентов при злокачественных новообразованиях легких.....	81
2.2.2 <i>In vivo</i> модели.....	82
2.2.2.1 Модель ЛПС-индуцированного острого повреждения легких (ОПЛ).....	82
2.2.2.2 Модель овальбумин (ОВА)-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза.....	82
2.2.3 Анализ бронхоальвеолярной жидкости.....	83
2.2.4 Иммуноферментный анализ.....	83

2.2.5 Морфологическое исследование.....	83
2.2.5.1 Гистология.....	83
2.2.5.2 Иммуногистохимия.....	84
2.2.6 Выделение суммарной РНК.....	84
2.2.7 Определение уровней экспрессии генов в ткани легких методом ОТ-ПЦР в реальном времени.....	85
2.2.7.1 Обратная транскрипция.....	85
2.2.7.2 ОТ-ПЦР.....	85
2.2.8 Статистический анализ.....	86
ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ ОСТРЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ И ИХ ПЕРЕХОД В ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ).....	87
3.1 <i>Идентификация ключевых генов, вовлеченных в развитие острого повреждения легких различной этиологии.....</i>	<i>87</i>
3.1.1 Биоинформатический анализ баз данных полногеномного микрочипирования. Идентификация дифференциально экспрессированных генов.....	87
3.1.2 Характеристика наиболее взаимосвязанных ДЭГ в качестве регуляторов ОПЛ.....	88
3.2 <i>In vivo модель острого повреждения легких. Патоморфологическая и молекулярно-биологическая характеристика.....</i>	<i>92</i>
3.2.1 Индукция и характеристика <i>in vivo</i> модели ЛПС-индуцированного ОПЛ.....	92
3.2.2 Оценка противовоспалительных эффектов СМ и дексаметазона на модели ЛПС-индуцированного ОПЛ.....	95
3.3 <i>Анализ паттернов экспрессии генов, потенциальных мастер-регуляторов (ПМР) острого воспалительного процесса, в легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ.....</i>	<i>98</i>
3.3.1 Анализ уровней экспрессии генов ПМР в ткани легких здоровых мышей и мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ.....	98
3.3.2 Анализ уровней экспрессии генов ПМР в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ после предварительной терапии противовоспалительными соединениями.....	99
3.4 <i>Идентификация узловых генов, связанных с развитием COVID-19, и их валидация на in vivo модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких.....</i>	<i>101</i>

3.4.1	Биоинформатический анализ и идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием COVID-19.....	101
3.4.2	Анализ изменения уровней экспрессии генов-регуляторов развития COVID-19 у человека на мышинной модели ЛПС-индуцированного ОПЛ.....	103
3.4.3	Взаимосвязь мышинных ОПЛ-ассоциированных узловых генов с ОПЛ/ОРДС у людей.....	105
3.5	<i>Корреляции между идентифицированными ОПЛ-ассоциированными ДЭГ и выживаемостью пациентов с злокачественными новообразованиями легких и неопухолевыми хроническими заболеваниями легких.....</i>	106
3.6	<i>Взаимосвязь и взаимодействие идентифицированных ОПЛ-ассоциированных генов при различных заболеваниях легких.....</i>	110
3.6.1	Взаимосвязь ОПЛ-ассоциированных ключевых регуляторов с прогрессированием COVID-19 и опухолевых заболеваний легких.....	111
3.6.2	Иерархический анализ генов-регуляторов развития ОПЛ и идентификация наиболее перспективных терапевтических мишеней.....	114
3.7	<i>Идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием овальбумин (ОВА)-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза.....</i>	116
3.7.1	Идентификация ключевых генов, ассоциированных с острой астмой.....	117
3.7.2	Характеристика топ-10 наиболее взаимосвязанных генов, ассоциированных с острой астмой.....	119
3.8	<i>Идентификация ключевых астма-специфических генов, ассоциированных с пост-астматическим фиброзом легких.....</i>	121
3.8.1	Биоинформатический анализ астма-специфических генов, потенциально ассоциированных с фиброзом легких.....	121
3.8.2	Идентификация потенциальных маркеров перехода острого астматического воспаления в пост-астматический фиброз.....	121
3.9	<i>In vivo модель овальбумин (ОВА)-индуцированной астмы.....</i>	125
3.9.1	Характеристика воспалительных изменений в легких мышей в острую фазу ОВА-индуцированной астмы.....	125
3.9.2	Характеристика воспалительных изменений в легких мышей в подострую фазу ОВА-индуцированной астмы.....	128
3.10	<i>Анализ паттернов экспрессии генов, ассоциированных с развитием астмы и легочного фиброза.....</i>	130
3.10.1	Анализ уровней экспрессии идентифицированных ключевых генов в легких здоровых мышей и мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом.....	130

3.10.2 Оценка экспрессии <i>Fn1</i> и <i>Muc5ac</i> в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой и пост-астматическим фиброзом на белковом уровне.....	133
3.11 <i>Пересечение узловых генов, регулирующих развитие острой астмы и пост-астматического фиброза, и генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным легочным фиброзом.....</i>	135
3.11.1 Идентификация и характеристика общих генов, регулирующих развитие астмы, пост-астматического фиброза и фиброза легких других этиологий.....	136
3.11.2 Анализ уровней экспрессии генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом, на мышинной модели астмы и пост-астматического фиброза.....	139
3.11.3 Функциональный анализ <i>Col4a1</i> и <i>Col4a2</i> и исследование их роли в развитии легочного фиброза.....	141
3.12 <i>Взаимосвязь астма-ассоциированных генов с регуломом легочного фиброза.....</i>	143
3.13 <i>Экспрессия ключевых генов, ассоциированных с развитием пост-астматического и блеомицин-индуцированного легочного фиброза на мышинных моделях, у пациентов с хроническими патологиями легких.....</i>	146
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	149
ВЫВОДЫ.....	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

В настоящее время острые и хронические заболевания легких являются третьей по частоте причиной смертности, занимая это место после сердечно-сосудистых и онкопатологий [1]. Несмотря на то, что острые воспалительные заболевания легких, такие как бактериальные и вирусные пневмонии, успешно поддаются этиотропной, патогенетической и симптоматической терапии, в ряде случаев происходит тяжелое и обширное повреждение легочной ткани [2,3].

Острое повреждение легких (ОПЛ) – это специфическая форма поражения легких, характеризующаяся обширным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным нейтрофил-ассоциированным воспалением, что приводит к легочной недостаточности и гипоксемии [4–7]. Ежегодно ОПЛ диагностируется более чем у 3 миллионов пациентов по всему миру, а смертность от данной патологии варьирует от 35% до 46% [8,9]. В течение нескольких последних лет заболеваемость и смертность от ОПЛ значительно возросла в результате пандемии новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-2019) [10,11].

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) является комплексным каскадным процессом, часто развивающимся в результате ОПЛ и приводящим к фульминантной дыхательной недостаточности и летальному исходу [3,12]. В настоящее время, терапия ОРДС в основном симптоматическая, направленная на облегчение симптомов и часто включающая в себя механическую вентиляцию и введение кортикостероидных гормонов. Однако, основные усилия в области исследования ОРДС сосредоточены на идентификации прогностических биохимических и молекулярных маркеров, позволивших бы диагностировать прогрессирование ОПЛ и его переход в ОРДС уже на ранних стадиях заболевания. Кроме того, своевременная диагностика и предотвращение перехода ОПЛ в ОРДС играет важную роль в профилактике хронизации воспалительного процесса в легких и развития легочного фиброза – хронического, неуклонно прогрессирующего заболевания, сопровождающегося разрастанием соединительной ткани в легких [13].

Патоморфологически ОРДС представлен паттерном диффузных альвеолярных повреждений, характеризующих экссудативную фазу, которая сопровождается отеком и формированием гиалиновых мембран, а затем переходит в пролиферативную фазу с

развитием обратимых фибропластических изменений в межальвеолярных перегородках и гиперплазией альвеоцитов II типа [12]. Потенциальной третьей и финальной фазой ОРДС может стать фиброз легких. По некоторым данным, развитие легочного фиброза как исход ОРДС происходит в 4% случаев при длительности ОРДС меньше одной недели; в 24% случаев, если заболевание длится от одной до трех недель; и в 61% случаев, если продолжительность ОРДС составляет более трех недель [14].

Каскад воспалительных реакций в острую фазу ОРДС может приводить к массивному повреждению эпителия и эндотелия в легких, с последующим выбросом антифибринолитических факторов, запуском патологической регенерации, пролиферацией гладкомышечных клеток и дифференцировкой фибробластов в миофибробласты, что в итоге вызывает дисбаланс между синтезом и деградацией компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и создает предпосылки для развития фиброза легких [15]. Одним из факторов развития легочного фиброза при ОРДС, ассоциированном с COVID-19, является нарушение иммунных механизмов, возникающее как одно из последствий цитокинового шторма [16] и вызывающее повреждение альвеолярных структур, а также нарушение функционирования матричных металлопротеиназ и их ингибиторов под действием провоспалительных цитокинов [17] (Рисунок 1).

Одной из самых распространенных хронических воспалительных патологий легких, сопровождающейся фибротическими изменениями, является бронхиальная астма (БА) – гетерогенное заболевание, главными отличительными признаками которого являются персистирующее воспаление дыхательных путей, а также их гиперреактивность и обратимое нарушение проходимости [18,19]. Структурные изменения дыхательных путей, ассоциированные с прогрессией и хронизацией астмы, объединены под широким термином «ремоделирование дыхательных путей» [20,21], который включает в себя клеточные и внеклеточные изменения в больших и малых дыхательных путях: отложение компонентов ВКМ [22], нарушение барьерной и транспортной функции эпителия [23], гиперплазию бокаловидных клеток с гиперсекрецией слизи [24–27], пролиферацию гладкомышечных клеток и фибробластов/миофибробластов [28–30], а также интенсивный ангиогенез в дыхательных путях [31,32]. Хроническое персистирующее эозинофильное воспаление при БА приводит к рекрутингу лимфоцитов и макрофагов в ткани легких, которые секретируют про-воспалительные медиаторы, стимулирующие синтез и секрецию эпителиальными клетками, фибробластами и гладкомышечными клетками хемоаттрактантов для эозинофилов, замыкая таким образом «порочный круг». Кроме того, по некоторым данным эозинофилы сами являются профибротическими агентами и играют определенную роль в развитии фиброза при астме [33]. Неадекватное

функционирование разрешающих воспаление сигнальных путей приводит к тому, что на поздней стадии астмы воспалительный процесс переходит с дыхательных путей на паренхиму легких, приводя к хроническому воспалению и необратимым изменениям не только в дыхательных путях, но и в ткани легких [34].

Таким образом, самый распространенный исход острого воспаления – это его своевременное разрешение с последующим восстановлением поврежденных тканей. Однако, при невозможности элиминации воспалительного фактора, острое воспаление переходит в хроническое, а в ряде случаев, персистирующее хроническое воспаление может привести к развитию фиброза. В основе развития фиброза лежит нерегулируемый процесс восстановления повреждений (wound healing), а основными эффекторными клетками данного процесса являются фибробласты и миофибробласты [15] (Рисунок 1).

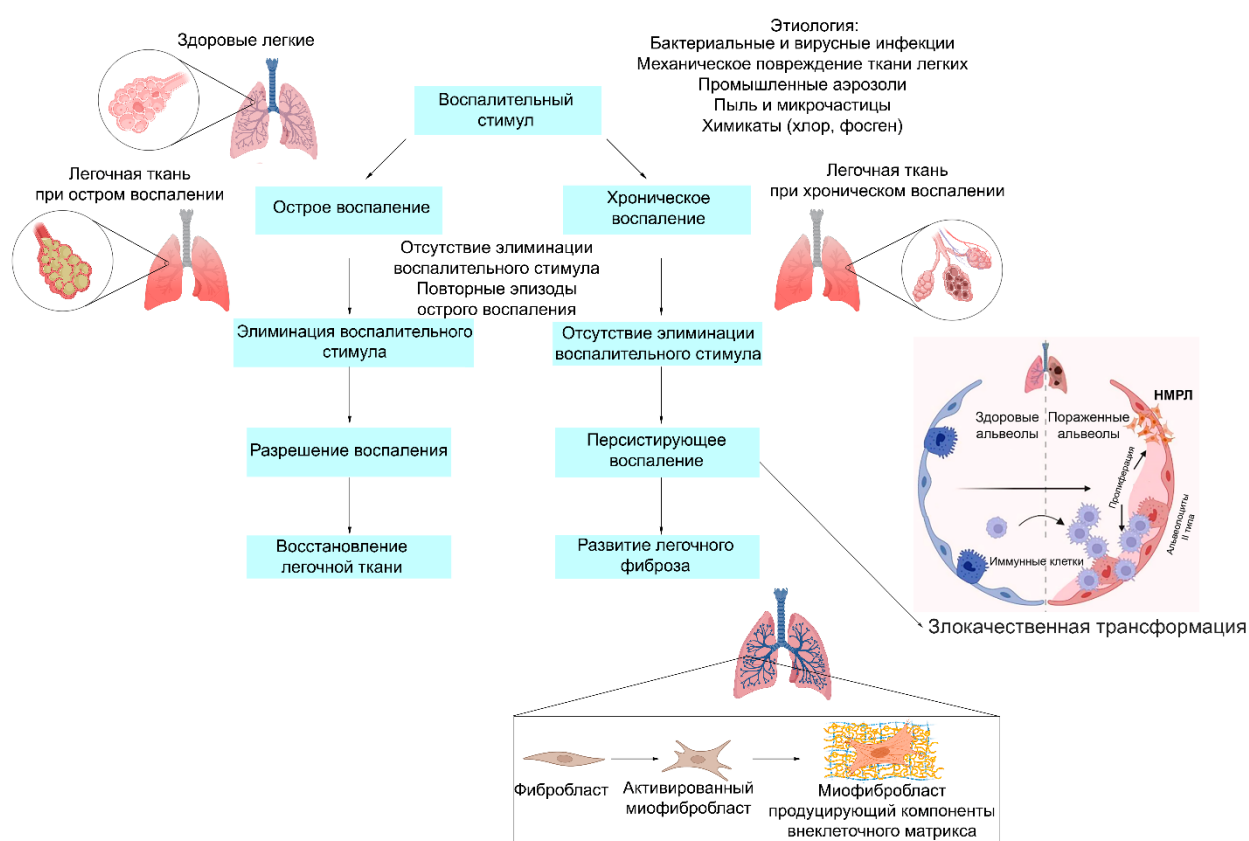


Рисунок 1. Общая схема развития и исходов воспалительных изменений в легких. НМЖЛ – немелкоклеточный рак легких.

Также показано, что одним из долговременных эффектов персистирующего легочного воспаления является гиперпролиферация клеток легких, гиперплазия альвеолоцитов 2 типа и сквамозная метаплазия бронхиального эпителия, которые являются предопухолевыми состояниями [14] (Рисунок 1).

Поэтому быстрое и ранее прогнозирование тяжелого течения, возможных осложнений и отдаленных последствий ОПЛ с помощью специфических биомаркеров могло бы улучшить прогноз пациентов с воспалительными заболеваниями легких, что делает поиск таких биомаркеров актуальной задачей.

ВКМ является структурой, обеспечивающей механическую и физиологическую поддержку архитектуры легких, к основным компонентам которой относятся структурные белки (коллаген, эластин), белки адгезии (фибронектин, тенасцин) и гликозаминогликаны/протеогликаны [20–23,35]. В качестве регуляторов синтеза и деградации компонентов ВКМ выступают представители семейства матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов (MMPs и TIMPs, соответственно). В физиологических условиях, процессы синтеза и деградации компонентов ВКМ находятся в состоянии динамического равновесия, обеспечивая оптимальное функционирование легких. Однако, развитие воспаления приводит к активной пролиферации фибробластов, их дифференцировке в миофибробласты – главную эффекторную клетку легочного фиброза – и как следствие, повышенному отложению компонентов ВКМ в структурах легких [36].

В настоящее время легочный фиброз является неизлечимым и неизбежно прогрессирующим заболеванием. Имеющиеся терапевтические средства, одобренные для использования агентством по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), пирфенидон и нинтеданиб, замедляют прогрессирующее разрушение легочной ткани и нарушение легочных функций, однако не приводят к восстановлению структур легких и полному излечению пациентов [37]. Несмотря на большой объем исследований, направленных на поиск новых радикальных способов лечения фиброза, таких как ген-направленная терапия [38,39], аналоги антифибротических молекул [40] или моноклональные антитела, направленные к участникам патогенеза фиброза [41,42], единственным выходом для пациентов с критическим нарушением параметров легочных функций является трансплантация легких, возможная далеко не для всех нуждающихся в ней пациентов. В отсутствие в обозримом будущем препарата, способного полностью излечить легочный фиброз, быстрая и ранняя диагностика состояний, способных привести к развитию данного патологического процесса, приобретает еще большую актуальность, а поиск новых специфических биологических маркеров перехода от острых воспалительных изменений в легких к фиброзу является актуальной задачей. В данной работе, с помощью методов биоинформатического анализа (поиск и анализ наборов транскриптомных данных, функциональный анализ, анализ генно-ассоциативных сетей и текст-майнинговый анализ) и валидации полученных данных на *in vivo* моделях была

проведена идентификация ключевых генов, вовлеченных в развитие острого воспаления различной этиологии и его переход в легочный фиброз. Общий план работы приведен на Схеме 1.

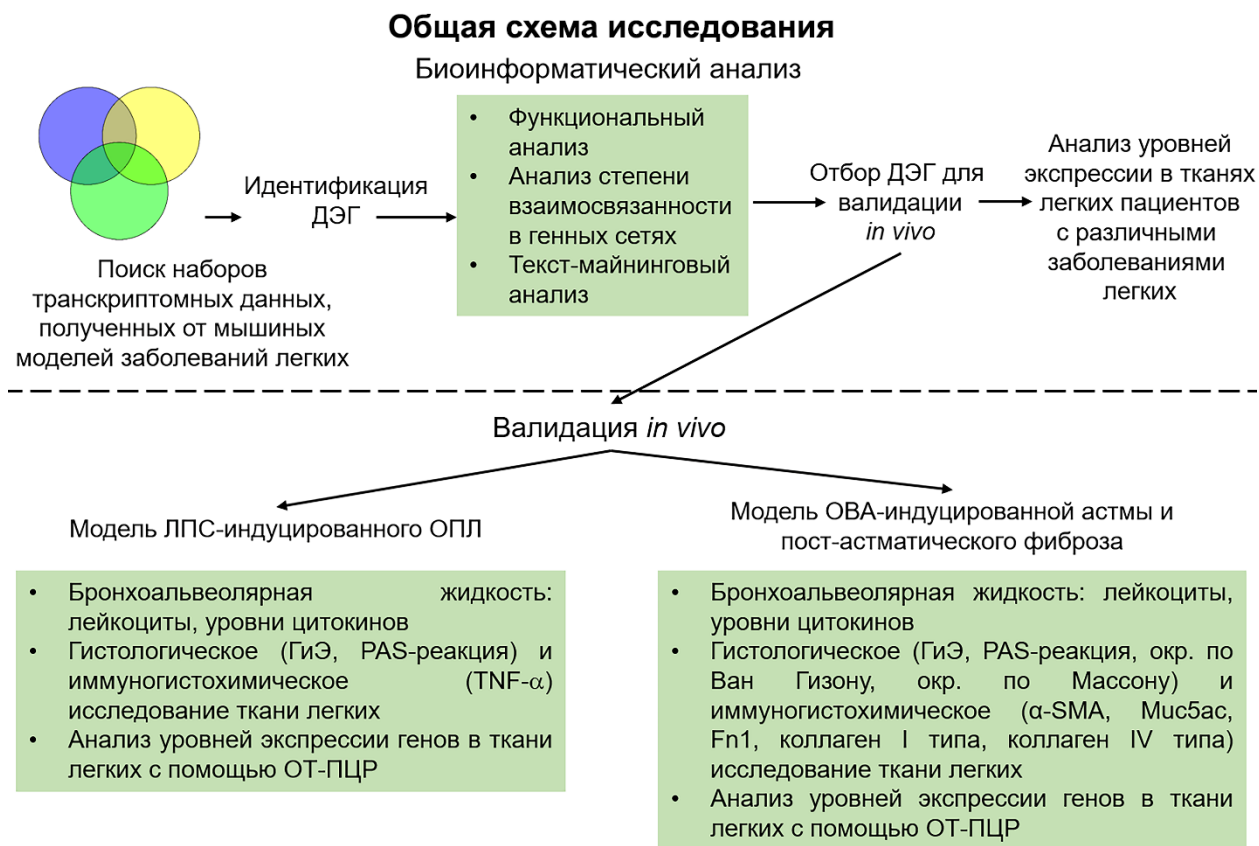


Схема 1. Общий план исследования, представленный двумя основными подходами: биоинформатическим анализом и валидацией полученных данных *in vivo*. ДЭГ – дифференциально экспрессированные гены, ЛПС – липополисахарид, ОПЛ – острое повреждение легких, ОВА – овалбумин, ГиЭ – гематоксилин и эозин, ОТ-ПЦР – обратная транскрипция полимеразная цепная реакция.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлась идентификация ключевых генов, вовлеченных в развитие легочного воспаления различной этиологии, а также потенциальных молекулярных маркеров перехода от острых воспалительных изменений в легких к легочному фиброзу. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Поиск ключевых генов, ассоциированных с развитием острого повреждения легких (ОПЛ) различной этиологии.
2. Валидация идентифицированных генов на *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ без лечения и после его коррекции противовоспалительными соединениями.

3. Исследование функциональной взаимосвязи между идентифицированными узловыми элементами ОПЛ-ассоциированной регуляторной сети и генами, изменение экспрессии которых связано с развитием/прогрессированием COVID-19 и опухолевых заболеваний легких.

4. Поиск ключевых генов, ассоциированных с развитием острого астматического воспаления, а также их связи с фиброзом легких.

5. Валидация идентифицированных астма-ассоциированных генов на модели овальбумин-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза.

6. Исследование функциональной взаимосвязи между идентифицированными фиброз-ассоциированными генами и генами, изменение экспрессии которых связано с развитием/прогрессированием хронических заболеваний легких человека.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что гены *Il-6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, *Ptx3*, *Socs3* являются ключевыми участниками развития острых воспалительных изменений в легких при ОПЛ различной этиологии. Показано, что при развитии ЛПС-индуцированного ОПЛ происходит активация данных генов, в то время как противовоспалительная терапия приводит к подавлению их экспрессии, что подтверждает ключевую роль указанных генов в данных процессах. Впервые показано, что некоторые ОПЛ-ассоциированные гены (*Saa1*, *Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4*, *Mmp8*) связаны с развитием COVID-19, а на материале от модели ЛПС-индуцированного ОПЛ показано изменение их экспрессии как при развитии острого легочного воспаления, так и при проведении противовоспалительной терапии, что подтверждает регуляторную роль выявленных генов, а также демонстрирует необходимость их дальнейшего исследования в качестве потенциальных молекулярных маркеров и терапевтических мишеней, в том числе COVID-19-ассоциированного ОПЛ/ОРДС. Также впервые показана взаимосвязь между уровнями экспрессии ряда ОПЛ-ассоциированных генов (*PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR*) и неблагоприятным прогнозом у пациентов с злокачественными новообразованиями легких.

Впервые на модели ОВА-индуцированной астмы показано, что морфологические признаки ремоделирования дыхательных путей и легочного фиброза формируются уже на стадии подострого астма-ассоциированного воспаления. Впервые идентифицированы гены, регулирующие как острое астматическое воспаление, так и развитие раннего пост-астматического фиброза (*Timp1*, *Ccl2*, *Igf1*, *Muc5ac*, *Muc5b*, *C3*, *, *Cat*, *Cyp2e1*). Впервые показано, что уровни экспрессии ряда генов, ассоциированных с легочным фиброзом неастматической этиологии (*Colla1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs1*, *Tyrobp*), повышались в ткани легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом, что указывает на*

возможную роль данных генов как универсальных пан-фибротических регуляторов. Также впервые показано, что профиль экспрессии генов при пост-астматическом фиброзе у мышей обладает наибольшим сходством с профилем экспрессии генов при идиопатическом легочном фиброзе у людей, что указывает на возможность использования данной мышинной модели в качестве инструмента для изучения профилактических и терапевтических подходов при данной патологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты позволяют расширить современные представления о механизмах, лежащих в основе развития ОПЛ различной этиологии, а также перехода острого воспаления в легочный фиброз. Идентифицирован ряд генов, которые могут быть рассмотрены в качестве потенциальных молекулярных маркеров и терапевтических мишеней воспалительных и фибротических изменений в легких, в том числе вызванных SARS-CoV-2 и опухолевыми заболеваниями легких.

Полученные результаты могут использоваться в качестве теоретической базы при разработке новых подходов стратификации риска развития осложнений, тяжелого течения и отдаленных последствий острых воспалительных процессов в легких у пациентов, а также для разработки методов терапии острых и хронических воспалительных заболеваний легких, позволивших бы повысить качество и общую продолжительность жизни пациентов с данными заболеваниями. Исследованные *in vivo* модели могут использоваться в качестве платформы для разработки средств противовоспалительной и антифибротической терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Воспалительный процесс и последующее ремоделирование внеклеточного матрикса являются основополагающими этапами острого повреждения легких (ОПЛ), а узловые гены, вовлеченные в эти процессы (*Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*, *Ptx3*, *Cat*, *Eln*), могут являться потенциальными прогностическими маркерами и терапевтическими мишенями ОПЛ.

2. *In vivo* модель ЛПС-индуцированного ОПЛ может быть использована в качестве платформы для разработки средств противовоспалительной терапии при SARS-CoV-2-ассоциированном повреждении легких.

3. Изменение экспрессии генов *TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR* и *PTX3*, играющих ключевую роль в развитии ОПЛ, отражает тяжесть течения и скорость прогрессирования злокачественных новообразований легких.

4. Гены *Fnl*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Muc5b*, *Muc5ac*, *Cat*, *Cyp2e1*, ассоциированные с развитием острой астмы, могут являться регуляторами ранних фибротических изменений в легких.

5. *In vivo* модель овалбумин-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза может быть использована в качестве платформы как для изучения ранних фибротических изменений в легких так и для разработки средств их терапии.

6. Пост-астматический фиброз у мышей обладает наибольшим сходством с ранним идиопатическим легочным фиброзом у человека, а гены *Col4a1* и *Col4a2* могут являться потенциальными предикторами и ранними маркерами развития легочного фиброза.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая достоверность полученных результатов гарантирована достаточным объемом материала для исследования, использованием стандартизированных наборов реагентов, валидацией результатов биоинформатического анализа на материале от мышинных моделей *in vivo*, а также методами статистической обработки полученных результатов.

По материалам работы опубликовано **14** работ, из них: **4** статьи в журналах, индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science, и **10** тезисов в сборниках Российских и международных конференций. Основные научные положения диссертационной работы и результаты исследования были представлены в рамках: Научной конференции с элементами школы молодых ученых «Biotop 2020: актуальные вопросы современной биологии», 21-24 декабря 2020, г. Новосибирск, Россия; Первой всероссийской школе для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021, 4-9 июля 2021, г. Новосибирск, Россия; Научной школы-конференции для молодых ученых «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины», 22-24 ноября 2021, г. Новосибирск, Россия; Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24-28 июля 2022, г. Новосибирск, Россия; II Объединенного научного форума: VII съезд физиологов СНГ, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», 3-7 октября 2022, г. Сочи, Россия.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 218 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка и 8 таблиц. Библиография содержит 800 литературных источника.

Личный вклад автора

Результаты, представленные в диссертационном исследовании, получены самим автором или при его непосредственном участии. Биоинформатический анализ был проведен совместно с сотрудником лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины к.б.н. Марковым Андреем Владимировичем. Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю к.м.н. Сеньковой Александре Васильевне за чуткое руководство и бесконечное терпение; научному консультанту заведующей лабораторией д.б.н., чл.-корр. Зенковой Марине Аркадьевне за идеологическое направление и концептуальную поддержку работы; к.б.н. Маркову Андрею Владимировичу за обширную поддержку, оказанную при овладении методами биоинформатического анализа; к.б.н. Бреннеру Евгению Владиславовичу и д.б.н. Черноловской Елене Леонидовне в освоении методик выделения РНК и qRT-PCR анализа; а также всем сотрудникам лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН за поддержку.

ГЛАВА 1. ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ КАК ИСХОД ОСТРЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РЕЛЕВАНТНЫЕ МЫШИНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Легочный фиброз является хроническим, неуклонно прогрессирующим заболеванием, характеризующимся разрастанием соединительной ткани в легких и утолщением альвеолярных перегородок, что приводит к нарушению дыхательных функций, газообмена и развитию легочной недостаточности [43,44]. Легочный фиброз это гетерогенное заболевание с характерным паттерном повреждений ткани легких, которое включает в себя большое количество хронических заболеваний дыхательной системы, сопровождающихся ростом соединительной ткани в различных компартментах легких, таких как интерстициальная болезнь легких (ИБЛ) и идиопатический легочный фиброз (ИЛФ), которые являются наиболее тяжелыми представителями данной группы заболеваний из-за необратимого и прогрессирующего характера фиброзирования паренхимы легких [45–48]. Статистика заболеваемости легочным фиброзом продолжает возрастать как из-за развития диагностических методов, так и вследствие старения населения. В настоящее время заболеваемость ИЛФ составляет 10 случаев на 100,000 населения, а ИБЛ – 19,4 случаев на 100,000 населения [49,50]. Заболевание прогрессирует с различной скоростью у каждого конкретного пациента в зависимости от возраста и пола [51], особенностей микробиома легких [52], генетических факторов и факторов окружающей среды [53]. В целом, 5-летняя выживаемость составляет от 20 до 40% для пациентов с ИЛФ [54] и от 55 до 75% для пациентов с ИБЛ [55,56].

В большинстве случаев развитию легочного фиброза предшествует острое воспаление легких, которое не разрешилось в срок и привело к отложению соединительной ткани и нарушению функции легких [45]. Острое воспаление легких может быть вызвано множеством этиологических факторов, таких как вирусные и бактериальные инфекции, ионизирующая радиация, химиотерапия, ирританты и поллютанты воздуха [57–60]. Следует отметить, что этиология ИЛФ неизвестна, поскольку до сих пор не были идентифицированные причинно-следственные связи или конкретные ассоциации [61], но среди множества внутренних и внешних факторов риска отдельное место отводят вирусным инфекциям [13], гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) и ассоциированными с ней микро-аспирациями [62], а также генетической

предрасположенности [63,64]. ГЭРБ – один из самых значимых факторов риска развития ИЛФ – является наиболее распространенной болезнью среди пациентов с ИЛФ, затрагивая почти 87% от всего числа пациентов, однако причинно-следственные связи между легочным фиброзом и ГЭРБ до сих пор не ясны и остаются темой для дальнейших исследований [65,66]. Следует отметить, что ряд авторов подчеркивают сложность процессов, происходящих в организме пациентов с ИЛФ/ИБЛ, в период заболевания COVID-19 [67,68]. Обычными клиническими симптомами легочного фиброза являются одышка, непродуктивный кашель, потеря веса и хроническая усталость в следствии гипоксии [69].

В 2014 году FDA одобрило использование пирфенидона и нинтеданиба для терапии легочного фиброза [70]. Несмотря на всю важность данного события, поскольку до 2014 года не существовало одобренных антифибротических препаратов, ситуация с терапией легочного фиброза остается плачевной, поскольку данные препараты позволяют лишь затормозить развитие фиброза, но не полностью излечить пациента. Более того, у некоторых пациентов наблюдаются выраженные побочные реакции на данные препараты (желудочно-кишечное кровотечение, тяжелая диарея). В качестве терапии последней линии пациентам с легочным фиброзом проводят трансплантацию легких, которая несколько увеличивает их продолжительность жизни. Однако, для большинства пациентов данный метод лечения не представляется возможным вследствие ограниченного количества донорских органов и сопутствующего риска отторжения трансплантата. Следовательно, изучение молекулярных механизмов легочного фиброза и поиск новых молекулярных маркеров, которые могут быть использованы в качестве мишеней для терапевтических средств, предотвращающих развитие фиброза, представляется крайне актуальным. Однако подобный поиск является сложной задачей, не в последнюю очередь из-за сложного патогенеза данного заболевания.

В представленном обзоре будут рассмотрены механизмы и пути перехода острых воспалительных изменений легких в легочный фиброз, будет проанализирован патогенез предшествующих фиброзу острых воспалительных процессов в легких, приведены известные молекулярные механизмы развития легочного фиброза, дана характеристика самых распространенных *in vivo* моделей и известных на данный момент прогностических маркеров легочного фиброза, а также освещены последние открытия в области стандартной и ген-направленной терапии рассмотренной патологии.

1.1 Острое воспаление легких как предшественник легочного фиброза: этиология, патогенез, патоморфологические характеристики, исходы

1.1.1 Острое повреждение легких (ОПЛ) как один из этиологических факторов легочного фиброза

Воспалительный компонент является ключевым фактором развития легочного фиброза, а самым частым его предшественником является острое повреждение легких. Острое повреждение легких (ОПЛ), а также его последствие – острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) – являются специфической формой воспаления легких, которое характеризуется диффузным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным воспалением, что в конечном итоге приводит к дыхательной недостаточности и гипоксемии [71–74]. Ежегодно более 3-х миллионов человек во всем мире заболевает ОРДС, а смертность от данной патологии колеблется от 35% до 46% [8,9]. В рост показателей заболеваемости и смертности от ОРДС за последний год значительный вклад внесла пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной коронавирусом, ассоциированным с тяжелым острым респираторным дистресс синдромом (SARS-CoV-2) и названным так из-за высокой гомологии с SARS-CoV-1, который вызвал вспышку тяжелого респираторного дистресс синдрома в 2002-2003 годах [10,11,75]. Тем не менее, этиологическими факторами ОПЛ и ОРДС у людей может быть большое количество стимулов и заболеваний, таких как бактериальные (вызванные *Streptococcus pneumoniae* или *Staphylococcus aureus* [76,77]) и вирусные (вызванные вирусом гриппа или риновирусом [78,79]) пневмонии, длительная механическая вентиляция [80–82], воздействие химикатов (хлор, фосген и промышленные вещества [83–85]), использование электронных сигарет и вейпинг [86,87], острая травма головного мозга [88,89], сепсис [90,91], острый панкреатит [92] и многие другие патологии.

1.1.2 Патогенез ОПЛ

Патогенез ОПЛ включает в себя развитие каскадной воспалительной реакции в ответ на повреждение легких, что приводит к увеличению проницаемости легочных капилляров и диффузному повреждению альвеол [93–95]. Альвеолярные макрофаги являются первыми клетками, которые вступают в контакт с поступающими извне патогенами и ирритантами, а также участвуют в инициации и разрешении иммунного ответа в легких. Помимо данных функций, альвеолярные макрофаги выполняют не-иммунные, органоспецифические функции, такие как утилизация сурфактанта, а также поглощение апоптозирующих и разрушенных клеток [96–99]. В ответ на повреждение, макрофаги легких переходят в про-воспалительный (M1) фенотип и начинают секретировать про-воспалительные цитокины (TNF- α , IL-6, IL-1) и хемокины (IL-8, CCL7, CCL2), что приводит к хемотаксису и прогрессивному накоплению моноцитов и нейтрофилов в альвеолярном пространстве [2]. В свою очередь, нейтрофилы

высвобождают дополнительные медиаторы воспаления, активные формы кислорода и протеиназы, которые разрушают сурфактант, базальные мембраны и эпителиально-эндотелиальный барьер в целом. Сурфактант является липидно-протеиновым комплексом, который секретируется альвеолоцитами II типа [100]. Функции сурфактанта заключаются в снижении поверхностного натяжения альвеол, поддержании их в расправленном виде и предотвращении появления легочных белков в просвете альвеол [101]. При развитии ОПЛ, гибель альвеолоцитов II типа приводит к резкому снижению секреции и деградации сурфактанта и, как следствие, спаданию альвеол [102]. Кроме того, патогенез ОПЛ и ОРДС включает в себя множество таких факторов, как дисбаланс процессов коагуляции/фибринолиза, апоптоз, дисфункция антиоксидантной системы [95]. Комбинация этих патологических процессов приводит к увеличению мертвого, «невентилируемого» пространства легких, внутрилегочному сбросу крови и завершается гипоксией, гипоксемией и легочной недостаточностью [83].

1.1.3 Патоморфологические изменения в легких при развитии ОПЛ

Патоморфологические изменения в легких при развитии ОПЛ/ОРДС представлены преимущественно нейтрофильной воспалительной инфильтрацией и диффузным повреждением альвеол, приводящим к альвеолярному и интерстициальному отекам, а также к формированию гиалиновых мембран в экссудативную фазу и накоплению межальвеолярного фибрина и отложению компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в пролиферативную фазу [94,103,104]. Альвеолярные и эпителиальные структуры также подвергаются неспецифическим изменениям, наиболее частыми из которых являются десквамация и гиперплазия альвеоцитов II типа, а также плоскоклеточная метаплазия бронхиального эпителия [103]. Следует отметить, что иммунопатологический фон и гистологическая картина SARS-CoV-2-ассоциированного повреждения легких очень схожи с не SARS-CoV-2-ассоциированным ОПЛ [103,105]. Таким образом, описанные воспалительные, деструктивные и дисциркуляторные изменения в тканях легких являются универсальными как для инфекционных, так и для неинфекционных острых легочных заболеваний различного происхождения, и данные изменения нельзя считать патогномоничными или высоко специфичными для COVID-19 [106].\

1.1.4 Бронхиальная астма (БА) как одна из причин легочного фиброза

Следует отметить, что в этиологии легочного фиброза большую роль играет хроническое воспаление дыхательных путей в результате длительного течения бронхиальной астмы (БА) – заболевания, которым страдают более 300 миллионов человек во всем мире [107]. При БА в легких и дыхательных путях развивается воспаление, сопровождаемое инфильтрацией ткани легких эозинофилами, продукцией цитокинов

клетками Т-хелперами II типа (Th2), увеличением концентрации иммуноглобулина E (IgE) в сыворотке крови и гиперреактивностью дыхательных путей, прогрессирование которого может в дальнейшем приводить к ремоделированию ВКМ и развитию легочного фиброза [108]. В настоящее время астма считается «сборным» диагнозом, в который включены несколько заболеваний с разными клиническими признаками (фенотипы) и патофизиологическими механизмами (эндотипы) [109]. Также это наиболее распространенное хроническое заболевание у детей, причем более характерное для мальчиков, тогда как среди взрослых астма в большей степени распространена среди женщин [110]. Заболеваемость, тяжесть течения и смертность от БА значительно отличаются в разных государствах: заболеваемость астмой выше в развитых странах, в то время как большинство смертей от астмы приходится на развивающиеся страны [111].

1.1.5 Этиология и патогенез БА

БА является гетерогенным заболеванием, характеризующимся персистирующим легочным воспалением, обратимым нарушением проходимости и гиперреактивностью дыхательных путей [18,112]. Этиология бронхиальной астмы до сих пор неизвестна, однако существует большое количество факторов риска данной патологии, среди которых выделяют генетические факторы и факторы окружающей среды [113]. К генетическим факторам риска относят изменение экспрессии ряда генов, отвечающих за такие процессы, как фолдинг белков в эндоплазматической сети, развитие атопических заболеваний, функционирование эпителия и эозинофилов [113–115]. Наличие аллергических заболеваний дыхательной системы (например, аллергического ринита) также ассоциировано с повышенным риском развития астмы [116]. К факторам окружающей среды относят курение (активное и пассивное) [117], степень загрязненности воздуха (в том числе поллютантами, ассоциированными с автотранспортом (черный углерод и оксид азота NO₂)) [118], ожирение [119], а также факторы риска, связанные с профессиональной деятельностью, в которые входит работа с мучной пылью, ферментами животного и растительного происхождения, древесными смолами, табаком, полиизоцианатами, ангидридами кислот и металлами [120,121].

Учитывая механизмы развития воспаления, выделяют аллергическую и неаллергическую астму [122]. Аллергическая БА считается одним из наиболее распространенных типов астмы и развивается в результате сенсibilизации аллергенами окружающей среды [123]. В основном это аэроаллергены, такие как домашняя пыль, пыльца растений, споры грибов, животная шерсть и т.д. После сенсibilизации, симптомы астмы обычно проявляются при повторном контакте с аллергеном [124]. Аллергическая реакция на аллерген, активирующая IgE-зависимые механизмы, является наиболее

распространенной причиной развития астмы. Воспаление инициируется связыванием антигена с IgE, который присутствует на тучных клетках и базофилах. Далее происходит их дегрануляция, высвобождение медиаторов, таких как гистамин, протеазы, гепарин, и про-воспалительных цитокинов, ответственных за хемотаксис.

Также в патогенезе БА принимают участие CD4⁺ лимфоциты. После контакта с антигеном, Th2 начинают секретировать такие про-воспалительные цитокины, как IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, которые стимулируют продукцию IgE и миграцию воспалительных клеток [125–129]. Помимо Th2 в развитии БА принимают участие и Т-хелперы 1 типа (Th1), которые после контакта с антиген-презентирующими дендритными клетками начинают секретировать IL-2 и IFN γ , которые приводят к активации макрофагов и усилению клеточного иммунного ответа. Также Т-клеточный ответ дополнительно модулируют такие цитокины, как IL-1, IL-4, IL-12 и IL-18, секретируемые дендритными клетками [130]. Данный каскад реакций в конечном итоге приводит к развитию персистирующего воспаления в легких.

Считается, что около трети больных астмой страдают неаллергической астмой [131], которая характеризуется отсутствием реакции на аллергены при проведении скарификационных проб и нормальным или низким уровнем IgE, который повышен при аллергической астме [132]. Механизмы, опосредующие развитие неаллергической астмы, до конца не известны, однако считается, что в развитии данного заболевания задействованы два механизма: дисрегулируемый нейтрофил-опосредованный иммунный ответ из-за воспаления в дыхательной системе [133], а также дефекты в активации IL-17-опосредованного сигнального пути [134], что приводит к нарушению разрешения воспаления [135].

1.1.6 Патоморфологические изменения в легких при БА

Патоморфологические изменения в легких больных БА можно разделить на две группы: изменения бронхиального эпителия и гладкой мускулатуры, преобладающие при обострении астмы, и субэпителиальный фиброз, характерный для длительно текущей астмы [136]. Все эти изменения приводят к бронхообструкции – нарушению проходимости дыхательных путей, обратимой на ранних стадиях и необратимой на поздней стадии заболевания.

При развитии острой астмы в бронхах наблюдается гиперплазия и метаплазия бокаловидных и эпителиальных клеток, приводящая к гиперпродукции слизи, утолщению стенок дыхательных путей, сужению просвета бронхов и бронхообструкции [137]. Кроме того, при тяжелых обострениях астмы наблюдается обширная закупорка больших и малых дыхательных путей слизистыми пробками, часто содержащими примесь воспалительных

клеток (в основном эозинофилов, в случае аллергической астмы) [138], а дополнительным фактором, способствующим появлению слизистых пробок в дыхательных путях, является дисфункция реснитчатых клеток в результате воспаления, проявляющаяся в уменьшении частоты колебаний, дискинезии и дезориентации ресничек [139].

Одним из факторов обратимого сужения просвета дыхательных путей при астме является спазм гладкой мускулатуры бронхов – бронхоконстрикция. В физиологических условиях гладкомышечные волокна принимают участие в поддержании механической стабильности бесхрящевых дыхательных путей. Однако, гиперреактивность дыхательных путей, характерная для астмы, приводит к снижению порога чувствительности гладкомышечных волокон в ответ на различные стимулы, что выражается в их спазме и развитии обратимой обструкции [140]. Также одним из компонентов патоморфологических изменений при астме, приводящих к утолщению стенок дыхательных путей, является увеличение числа гладкомышечных клеток как в результате гипертрофии, так и гиперплазии этих элементов [141]. Существует предположение, что гладкомышечные клетки могут способствовать ремоделированию дыхательных путей при астме путем секреции про-воспалительных медиаторов, матриксных белков, а также экспрессии молекул клеточной адгезии и других стимуляторных молекул, задействованных в дальнейшей миграции и активации воспалительных клеток [142].

Основным проявлением хронического астматического воспаления является субэпителиальный фиброз, представленный разрастанием соединительной ткани в области базальной мембраны и в подслизистом пространстве стенок дыхательных путей, однако изменения, приводящие к его формированию, начинаются уже на ранних стадиях астмы [136,143]. По мере развития и прогрессирования БА, воспалительный процесс распространяется со стенок дыхательных путей в паренхиму легких, что обычно приводит к утяжелению состояния пациентов.

1.1.7 Исходы острого воспаления в легких

Самый распространенный исход острого воспаления – это его своевременное разрешение после элиминации фактора, вызвавшего воспаление, и восстановление поврежденных тканей (Рисунок 1). Однако при невозможности элиминации флогогена происходит переход острого воспалительного процесса в хронический (Рисунок 1). Данный процесс, с небольшими вариациями, является универсальным для всех внутренних органов, в том числе и легких [144]. Причины невозможности элиминации фактора, вызвавшего воспаление в дыхательной системе, могут быть следующими: дефект фагоцитарной никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP) оксидазы и производства активных форм кислорода (АФК), необходимых для фагоцитоза бактериальных патогенов

[145], длительное либо постоянное воздействие ирритантов или частиц инородных соединений, которые не могут быть устранены путем ферментативного расщепления или фагоцитоза, таких как кремний или асбест [146], наличие аутоиммунных нарушений, таких как ревматоидный артрит и системная красная волчанка [147], а также повышенный синтез воспалительных и биохимических индукторов оксидативного стресса и митохондриальной дисфункции, таких как молекулы свободных радикалов и конечные продукты гликирования [148,149]. Большинство признаков острого воспаления, таких как вазодилатация, повышенный приток крови и миграция лейкоцитов в очаг воспаления, сохраняется и при переходе его в хроническую форму, однако, в композиции лейкоцитов, формирующих воспалительную инфильтрацию, короткоживущие нейтрофилы вытесняются лимфоцитами и макрофагами [150]. Наконец, в некоторых случаях длительно текущее хроническое воспаление может привести к развитию фиброза (Рисунок 1). Считается, что в основе развития фиброза легких на фоне персистирующего хронического воспаления лежит нерегулируемый процесс восстановления повреждений (так называемый «wound healing») [151]. Миофибробласты, которые являются особой формой фибробластов, способной к сокращению, являются одним из ключевых игроков как данного процесса, так и легочного фиброза [152]. Дифференцировка фибробластов в миофибробласты в нормальных условиях происходит в ответ на секрецию TGF- β 1 и механический стресс. Миофибробласты активно синтезируют компоненты ВКМ при восстановлении повреждений в ткани легкого и в условиях здорового организма подвергаются апоптозу при достаточном количестве ВКМ. Однако в условиях хронического воспаления миофибробласты не подвергаются апоптозу, что является основой aberrantного wound healing и, как следствие, легочного фиброза [153].

1.2. Патоморфологические изменения в легких при ремоделировании дыхательных путей и развитии легочного фиброза

1.2.1 Ремоделирование дыхательных путей

Структурные изменения дыхательных путей, ассоциированные с прогрессией и хронизацией астмы, а также других хронических заболеваний легких, в медицинской литературе обобщают под термином «ремоделирование дыхательных путей», которое характеризуется как клеточными, так и внеклеточными изменениями в больших и малых дыхательных путях. К этим изменениям относят отложение компонентов ВКМ [23,35]; нарушение целостности эпителиального барьера, приводящее к гиперплазии бокаловидных клеток с последующей гиперсекрецией слизи [24,26], пролиферацию гладкомышечных клеток и миофибробластов [30,154], усиленный ангиогенез в тканях

дыхательных путей [112,155]. В дальнейшем воспалительный процесс может переходить со стенки дыхательных путей на паренхиму легких, что приводит к прогрессирующему нарушению механизмов wound healing и гомеостаза легких [156].

1.2.2 Патогенез легочного фиброза

Внеклеточный матрикс (ВКМ) – это структура, которая поддерживает архитектуру легкого и находится в состоянии динамического равновесия между процессами синтеза и деградации ее компонентов [157]. ВКМ состоит из обширной группы протеинов и гликопротеинов, в том числе структурных протеинов (коллагенов и эластина), адгезивных протеинов (фибронектина и тенасцина) и гликозаминогликанов/протеогликанов [35]. Коллагеновые волокна, состоящие из коллагенов I, II, III, V и IX типов, являются наиболее широко представленными компонентами ВКМ в легких и благодаря большому пределу прочности и низкой эластичности позволяют легким сохранять свою форму, образуя их каркас. С другой стороны, эластические волокна за счет своих качеств обеспечивают податливость легких и их эластичность [158]. Адгезивные протеины ВКМ, такие как фибронектин и тенасцин, являются лигандами рецепторов клеточной адгезии, в то время как гликозаминогликаны и протеогликаны являются главными структурными компонентами ВКМ, формируя строуму практически всех типов тканей [159]. Таким образом, в обычных условиях, протеины ВКМ обеспечивают структурную и механическую поддержку тканям легких, а также формируют основу для нормальной клеточной деятельности, такой как адгезия, миграция и пролиферация. В патологических же условиях ВКМ превращается в один из факторов, обеспечивающих прогрессирование фиброза [160]. Так, ВКМ тканей легких, полученный от пациентов с легочным фиброзом, без клеточного компонента и без добавления каких-либо цитокинов приводил к дифференцировке нормальных легочных фибробластов в активированные миофибробласты [161]. Также было показано, что повышенный синтез компонентов ВКМ активированными миофибробластами приводит к снижению его эластичности, что в свою очередь, активирует механочувствительный эффектор сигнального пути Hippo Yes-associated protein-1 (YAP-1) и приводит к еще большему отложению компонентов ВКМ и снижению эластичности легких, замыкая один из фиброгенных порочных кругов [162].

Повышенное отложение белков ВКМ является одним из основных признаков необратимых изменений в дыхательных путях и легочной ткани у пациентов с БА, приведшей к развитию легочного фиброза, а также у пациентов с другими хроническими заболеваниями легких, сопровождающимися легочным фиброзом, такими как ИЛФ и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [20,159]. Обширно документирован тот факт, что отложение различных компонентов ВКМ, в том числе коллагенов I, III и V,

адгезивных протеинов фибронектина и тенасцина, а также протеогликанов, таких как люмикан и бигликан, увеличено при астме, ИЛФ и ХОБЛ [21,22,163]. Основными клетками, ответственными за гиперпродукцию белков ВКМ, являются фибробласты [21,164] и гладкомышечные клетки дыхательных путей, гипертрофия и гиперплазия которых является ключевой характеристикой дыхательных путей пациентов с легочным фиброзом и ХОБЛ [165,166].

Также считается, что в результате развития и персистирования воспаления дыхательных путей, вызванного различными воспалительными заболеваниями, в легких происходит изменение экспрессии матриксных металлопротеиназ, ответственных за деградацию белков ВКМ [167]. Однако их роль в развитии фиброза легких неоднозначна. Помимо своей протеолитической функции, матриксные металлопротеиназы также принимают участие в процессинге и активации протеинов, не являющихся компонентами ВКМ (различные факторы роста, хемокины, клеточные рецепторы), регуляции функции лейкоцитов, противомикробной защите, миграции клеток и других процессах, которые как усиливают, так и ослабляют процессы фиброобразования в легких [168,169].

Избыток воспалительных клеток и нарушение функционирования матриксных металлопротеиназ приводит к дисрегуляции ВКМ, что, в свою очередь, стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток, активацию фибробластов и аккумуляцию коллагена. Экспрессия альфа-актина гладкомышечных клеток (*alpha-smooth muscle actin*, α -SMA) является маркером дифференцировки фибробластов в их активную форму – миофибробласты. Миофибробласты, экспрессирующие α -SMA, активно синтезируют компоненты ВКМ, что ведет к прогрессивному и необратимому разрушению нормальной структуры легкого, замещению ее соединительной тканью, нарушению газообмена в легких, и в конечном итоге – дыхательной недостаточности [170].

1.2.3 Взаимосвязь ОПЛ и легочного фиброза с риском развития злокачественных новообразований легких

При развитии новообразований бронхов и легких, предраковыми считаются три состояния: (1) бронхиальная дисплазия в случае плоскоклеточного рака легких (*lung squamous cell carcinoma*, LUSC), (2) атипичная аденоматозная гиперплазия в случае аденокарциномы легких (*lung adenocarcinoma*, LUAD) и (3) диффузная идиопатическая нейроэндокринная гиперплазия легких в случае карциноидов [171].

Считается, что LUSC развивается в результате плоскоклеточной метаплазии, перетекающей в дисплазию, и в финале, в карциному *in situ*, как следствие прямого воздействия повреждающих агентов на дыхательный эпителий [172]. Одним из отдаленных последствий острого повреждения легких, в том числе и SARS-CoV-2-

индуцированного, является гиперплазия пневмоцитов II типа и плоскоклеточная метаплазия и атипия эпителия малых бронхов, которые являются предопухолевыми состояниями, ассоциированными с высоким риском развития плоскоклеточной карциномы легких [173–175]. Более того, похожие изменения в ткани легких могут развиваться в результате нарушения процессов воспаления и регенерации, к которым могут приводить другие повреждающие факторы, такие как сигаретный дым [176], вирус гриппа [174,177], химические соединения [178], дефицит витамина А [179], а также быть причиной легочного фиброза [180,181]. LUAD развивается из пневмоцитов II типа или клеток Клара и проходит через похожие стадии трансформации от атипической аденоматозной гиперплазии до аденокарциномы *in situ*, минимально инвазивной карциномы, и, в конечном итоге, высоко инвазивной карциномы; факторы риска схожи с таковыми для LUSC [182–184].

Также следует отметить, что легочный фиброз, развивающийся в результате ОПЛ, может являться независимым фактором риска развития злокачественных новообразований легких. Так, в недавнем мета-анализе литературы, проведенном Hosseini et al. [185], показано, что легочный фиброз, как нозологическая единица, удовлетворяет 5 критериям предракового состояния: 1) заболевание приводит к повышенному риску развития злокачественного новообразования; 2) злокачественное новообразование развивается из ткани, затронутой данным заболеванием; 3) предраковая ткань отличается от здоровой ткани; 4) заболевание не является злокачественным новообразованием, но обладает некоторыми характеристиками рака и 5) существуют диагностические методы, позволяющие идентифицировать данное состояние.

1.2.4 Патоморфологические изменения в легких при развитии легочного фиброза

1.2.4.1 Гистологическая классификация

Патоморфологические изменения в легких при развитии легочного фиброза можно разделить на три паттерна: 1) ассиметричный фиброз альвеолярных стенок, так называемая «обычная интерстициальная пневмония» (interstitial usual pneumonia, UIP), 2) фиброз межальвеолярных перегородок, «неспецифическая интерстициальная пневмония» (non-specific interstitial pneumonia, NSIP) и 3) внутриаальвеолярный фиброз, так называемый «плевропаренхиматозный фиброэластоз» (pleuroparenchymal fibroelastosis, PPFE) [186].

UIP характеризуется гетерогенным скоплением фибробластов (фибропластические фокусы) в стенках альвеол, а также областями сохранившихся альвеолярных структур [187]. Ключевой патоморфологической характеристикой NSIP является сплошной характер процесса, без островков незатронутой паренхимы легких [188]. PPFE, третий

патоморфологический паттерн легочного фиброза, характеризуется облитерацией альвеол коллагеновыми и эластическими волокнами, а также другими компонентами ВКМ [189]. В любом легком с фибротической трансформацией можно обнаружить все три типа паттернов. Один из них обычно доминирует и в целом определяет вид фиброза. В зависимости от первоначальной патологии, которая привела к запуску персистирующего воспаления в легких и развитию фиброза, также может присутствовать слабо выраженная перибронхиальная воспалительная инфильтрация, представленная в основном лимфоцитами с примесью моноцитов/макрофагов.

1.2.4.2 Мультидисциплинарная классификация Американского торакального сообщества и Европейского общества пульмонологов

Другим подходом, дополняющим гистологическую классификацию заболеваний, ассоциированных с легочным фиброзом, является классификация, предложенная Американским торакальным сообществом и Европейским обществом пульмонологов в 2002 году и обновленная в 2013 году. Она заменила исторический “золотой стандарт” гистологической диагностики мультидисциплинарным подходом, включающим клинические и радиологические особенности каждого отдельного вида фиброза в дополнение к гистологическим особенностям, и разделила все патоморфологические варианты интерстициальных пневмоний на три группы: 1) основные идиопатические интерстициальные пневмонии, 2) редкие идиопатические интерстициальные пневмонии и 3) неклассифицируемые идиопатические интерстициальные пневмонии [187,189]. В группу основных идиопатических интерстициальных пневмоний входят шесть заболеваний: идиопатический легочный фиброз, идиопатическая неспецифическая интерстициальная пневмония, респираторный бронхолит-интерстициальное заболевание легких, десквамативная интерстициальная пневмония, криптогенная организирующая пневмония и острая интерстициальная пневмония. К редким идиопатическим интерстициальным пневмониям относят идиопатическую лимфоидную интерстициальную пневмонию и идиопатический плевропаренхимальный фиброэластоз. При интерстициальных пневмониях с, а) недостаточными клиническими, радиологическими или гистологическими данными и/или б) принципиальным несоответствием между клиническими, радиологическими и гистологическими находками, подобные случаи относят к категории неклассифицируемых идиопатических интерстициальных пневмоний.

1.3 Молекулярные механизмы развития легочного фиброза

Персистирующее, длительно текущее воспаление является хорошо известным стимулом неконтролируемой активации молекулярных механизмов, ведущих к развитию

необратимых изменений в ткани легких, таких как легочный фиброз [34]. Основные морфологические характеристики легочного фиброза (отложение компонентов ВКМ и ремоделирование легочной архитектуры) являются последствиями нарушения баланса двух физиологических процессов в легких: 1) пролиферации и апоптоза фибробластов и миофибробластов; 2) аккумуляции и разрушения ВКМ [153]. Данные процессы тесно взаимосвязаны, и нарушение нормального функционирования фибробластов и миофибробластов является одним из главных движущих факторов нарушения гомеостаза ВКМ и, как следствие, развития легочного фиброза.

1.3.1 Основные эффекторные клетки легочного фиброза: фибробласты, миофибробласты и фиброциты

Основными эффекторными клетками фиброза являются фибробласты, миофибробласты и фиброциты, а основными их предшественниками являются мезенхимальные клетки [53]. Было предложено несколько возможных путей их накопления в очаге фиброобразования: 1) пролиферация резидентных фибробластов легких; 2) миграция и фибробластическая дифференцировка клеток костного мозга, таких как циркулирующие фиброциты или моноциты [190–193]; и 3) образование фибробластов в результате процесса эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [194]. Независимо от источника появления фибробластов в легких, считается, что конечной эффекторной клеткой при легочном фиброзе является миофибробласт – дифференцированный фибробласт, который обладает свойствами, сходными с гладкомышечными клетками, а также характеризуется способностью к сокращению и присутствием α -гладкомышечного актина (Рисунок 2).

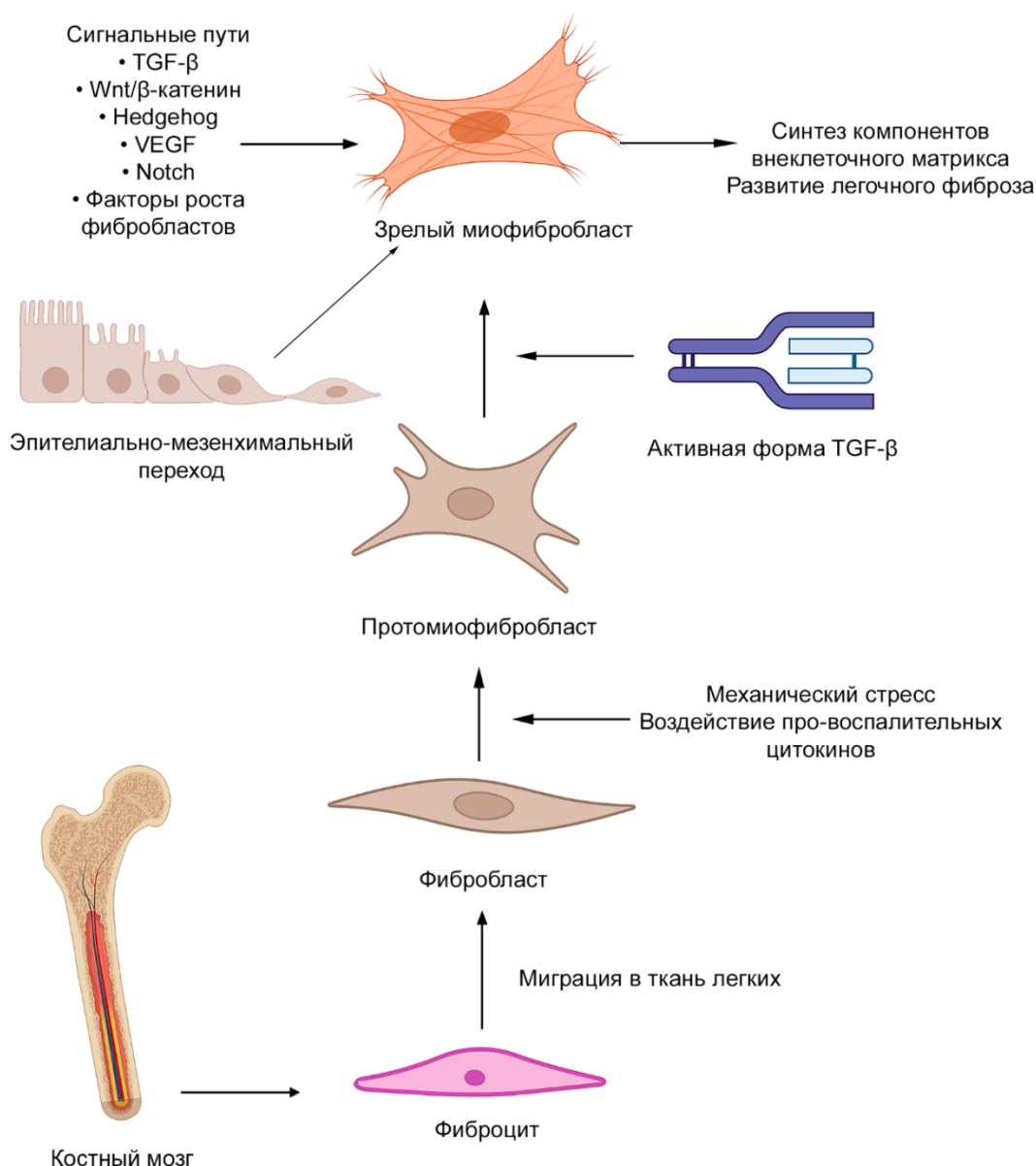


Рисунок 2. Эволюция фиброцита в миофибробласт – главную эффекторную клетку легочного фиброза.

1.3.1.1 Характеристика фиброцитов и их роль в развитии легочного фиброза

Гипотеза о том, что источниками миофибробластов могут служить различные клеточные популяции, была сформулирована множество десятилетий назад, однако только в 1994 году Bucala et al. описали популяцию фибробластоподобных клеток, происходящих из костного мозга, циркулирующих в крови, обладающих способностью к миграции к поврежденным тканям и дифференцировке в миофибробласты (Рисунок 2), которые были названы фиброциты [191]. Считается, что миграция фиброцитов к месту поврежденной ткани происходит по механизму так называемой многошаговой навигации, который обеспечивает возможность фиброцитам двигаться как бы “против течения” местного градиента хемоаттрактантов к отдаленному очагу активности [195].

В дальнейшем фиброциты были описаны как веретенообразные клетки с овальным ядром, экспрессирующие маркеры гемопоэтических клеток-предшественников, лейкоцитов и мезенхимальных клеток [196], а также участвующие в таких потенциально фиброгенных процессах, как wound healing и ангиогенез в множестве органов: легкие [197], печень [198], почки [199], сердце [200], кровеносные сосуды [201], кожа [202] и глаза [203]. Эти уникальные клетки обладают про-воспалительными свойствами макрофагов и способностью к ремоделированию ткани, присущей фибробластам. Участие фиброцитов в процессе wound healing представлено множеством ролей: 1) антиген-представляющая функция и участие в активации Т-клеточного иммунитета [204]; 2) прямая элиминация патогенов с помощью внеклеточных ловушек, лизосомальных пептидов и фагоцитарной активности [205,206]; 3) синтез и секреция цитокинов, хемокинов и факторов роста, участвующих в процессе wound healing [207]; 4) синтез и секреция белков ВКМ (однако, насчет данного пункта существует некоторая неоднозначность, поскольку имеются исследования, как демонстрирующие, что фиброциты не производят значимого количества компонентов ВКМ [208,209], так и показывающие, что фиброциты синтезируют большое количество коллагеновых и неколлагеновых компонентов ВКМ под действием цитокинов, секретлируемых Т-хелперами II типа [210]); 5) усиление ангиогенеза путем секреции таких факторов роста как тромбоцитарный фактор роста (platelet derived growth factor, PDGF), фактор роста фибробластов-2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2) и фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) [207,211]; и 6) непосредственная трансформация в другие типы мезенхимальных клеток, такие как фибробласты и миофибробласты [212]. В дополнение к вышеперечисленным функциям, фиброциты также секретируют MMP-2 и MMP-9 – матриксные металлопротеиназы, которые участвуют в деградации субэндотелиальной базальной мембраны сосудов, облегчая миграцию фиброцитов к месту повреждения [213]. Помимо этого, повышенный уровень MMP-9 приводит к высвобождению активной формы TGF- β из неактивного комплекса, которая стимулирует дифференцировку фиброцитов в фибробласты [214].

1.3.1.2 Дифференцировка фибробластов в миофибробласты и их роль в развитии фиброза легких

Процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты хорошо описан и представлен следующей серией событий (Рисунок 2). В нормальном состоянии фибробласты как не проявляют актин-ассоциированных межклеточных и клеточно-матриксных контактов, так и не осуществляют продукцию компонентов ВКМ [215]. После повреждения ткани фибробласты мигрируют к очагу повреждения и начинают

синтезировать компоненты ВКМ под воздействием цитокинов, секретируемых воспалительными и резидентными клетками [216]. Другим важным стимулом начала перехода фибробластов в миофибробласты являются механические изменения микроокружения клеток (Рисунок 2). Если в неповрежденной ткани фибробласты защищены от стресса волокнами ВКМ, то в постоянно ремоделируемом ВКМ повреждённого органа эта защита теряется. В ответ на механическую стимуляцию, фибробласты приобретают сократительные стрессовые волокна, состоящие из цитоплазматического актина, переходя таким образом в разряд «протомиофибробластов» – клеток переходного типа между фибробластами и миофибробластами (Рисунок 2) [215]. Затем стрессовые волокна протомиофибробластов объединяются с белками ВКМ в интегрин-содержащие клеточно-матриксные комплексы [217] и с другими клетками путем образования N-кадгериновых связей [218]. Помимо механического стресса, для окончательной трансформации протомиофибробластов в миофибробласты требуется выполнение еще двух условий: 1) аккумуляция биологически активного TGF- β 1 (Рисунок 2) и 2) присутствие специализированных белков ВКМ, таких как ED-A вариант фибронектина [215]. Считается, что жесткость ВКМ является основным ограничителем предельно допустимого уровня напряжения в стрессовых волокнах, и лишь тогда, когда жесткость ВКМ становится достаточной для формирования так называемых “фибрoneксусов” – специализированных механочувствительных соединений между клетками и матриксом, α -SMA встраивается в существующие актиновые волокна миофибробластов, что является основным маркером дифференцировки данных клеток [217].

1.3.1.3 Роль липофибробластов в развитии фиброза легких

В последнее время появились свидетельства, что еще одной возможной эффекторной клеткой при развитии легочного фиброза являются липофибробласты – интерстициальные фибробласты, содержащие капли жиров, располагающиеся рядом с альвеолярными эпителиальными клетками II типа и участвующие в продукции сурфактанта [219]. Эти клетки экспрессируют большое количество маркеров жировой ткани [220], а также обладают способностью к дифференцировке в миофибробласты в ответ на гипероксию [221] или воздействие никотина [222]. Также в настоящее время считается, что в процессе разрешения легочного фиброза большинство миофибробластов дедифференцируются в липофибробласты [223], а в недавнем исследовании Kheirollahi et al. было показано, что антидиабетический препарат метформин ускоряет разрешение легочного фиброза путем индукции липогенной трансформации миофибробластов за счет стимуляции гамма рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (peroxisome

proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) и ингибирования TGF- β -ассоциированной продукции коллагена [224]. Однако точная роль, которую играют липофибробласты в развитии легочного фиброза, еще не до конца ясна.

1.3.2 Возможная роль эпителиально-мезенхимального перехода в развитии фиброза легких

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является динамичным, обратимым процессом, участвующим в эмбриональном развитии, процессе wound healing и фиброзе [225]. При ЭМП эпителиальные клетки теряют свой эпителиальный фенотип и апикально-базальную полярность и приобретают некоторые мезенхимальные признаки, такие как передне-задняя полярность, N-кадгериновые связи и виментиновые стрессовые волокна [226,227]. При физиологическом wound healing роль ЭМП в основном положительная, однако, если процесс wound healing становится патологическим, то ЭМП может служить одним из компонентов процесса фибротизации [228], однако данные по степени участия ЭМП в формировании фиброза неоднозначны (Рисунок 2). С одной стороны, с помощью лазерной микродиссекции была доказана экспрессия мезенхимальных маркеров эпителиальными клетками легких, указывающая на то, что ЭМП может участвовать в пополнении популяции мезенхимальных клеток при легочном фиброзе [229]. С другой стороны, в исследованиях *in vivo* было обнаружено, что сравнительно небольшое количество фибробластов образуется из эпителиальных клеток [230], а также то, что α -SMA не ко-локализуется в клетках, образовавшихся в результате ЭМП, указывая на отсутствие трансформации данных клеток в миофибробласты [231]. Тем не менее, сравнительно недавно стали появляться данные о том, что ЭМП может опосредованно участвовать в развитии легочного фиброза путем паракринной активации фибробластов через транскрипционный фактор ZEB1, который контролирует экспрессию тканевого активатора плазминогена (tissue plasminogen activator, tPA), основного стимулятора TGF- β -индуцированного профиброгенного ответа в фибробластах [232]. Таким образом, хотя прямое участие ЭМП в развитии легочного фиброза ограничено, его опосредованное участие через паракринную регуляцию фибробластов делает данный процесс потенциальной мишенью при терапии легочного фиброза.

1.3.3 Сигнальные пути в развитии фиброза легких

Известно, что в процессе развития легочного фиброза принимают участие гены и сигнальные пути, в основном задействованные в пре- и постнатальном развитии легких [233,234]. И хотя точная роль этих молекулярных механизмов в развитии легочного фиброза до конца неясна, накопилось достаточно свидетельств об их активации в процессе фиброобразования.

К путям, регулирующим различные стадии онтогенеза легких, относятся сигнальные пути TGF- β , Wnt/ β -катенин, hedgehog, VEGF, Notch и сигнальный путь факторов роста фибробластов (Рисунок 3) [235,236]. Большинство из этих сигнальных путей неактивны во взрослом организме, однако активируются во время регенерации тканей. Также было обнаружено, что хроническая патологическая активация данных путей во взрослом состоянии ассоциирована с процессами восстановления повреждений, в том числе и в легких [233,237–239]. Более того, недавнее исследование Landi et al. продемонстрировало, что нинтеданиб, один из двух препаратов, одобренных для терапии фиброза, модулирует такие сигнальные пути как TGF- β , VEGF и Wnt/ β -катенин, подтверждая их центральную роль в развитии легочного фиброза [240].

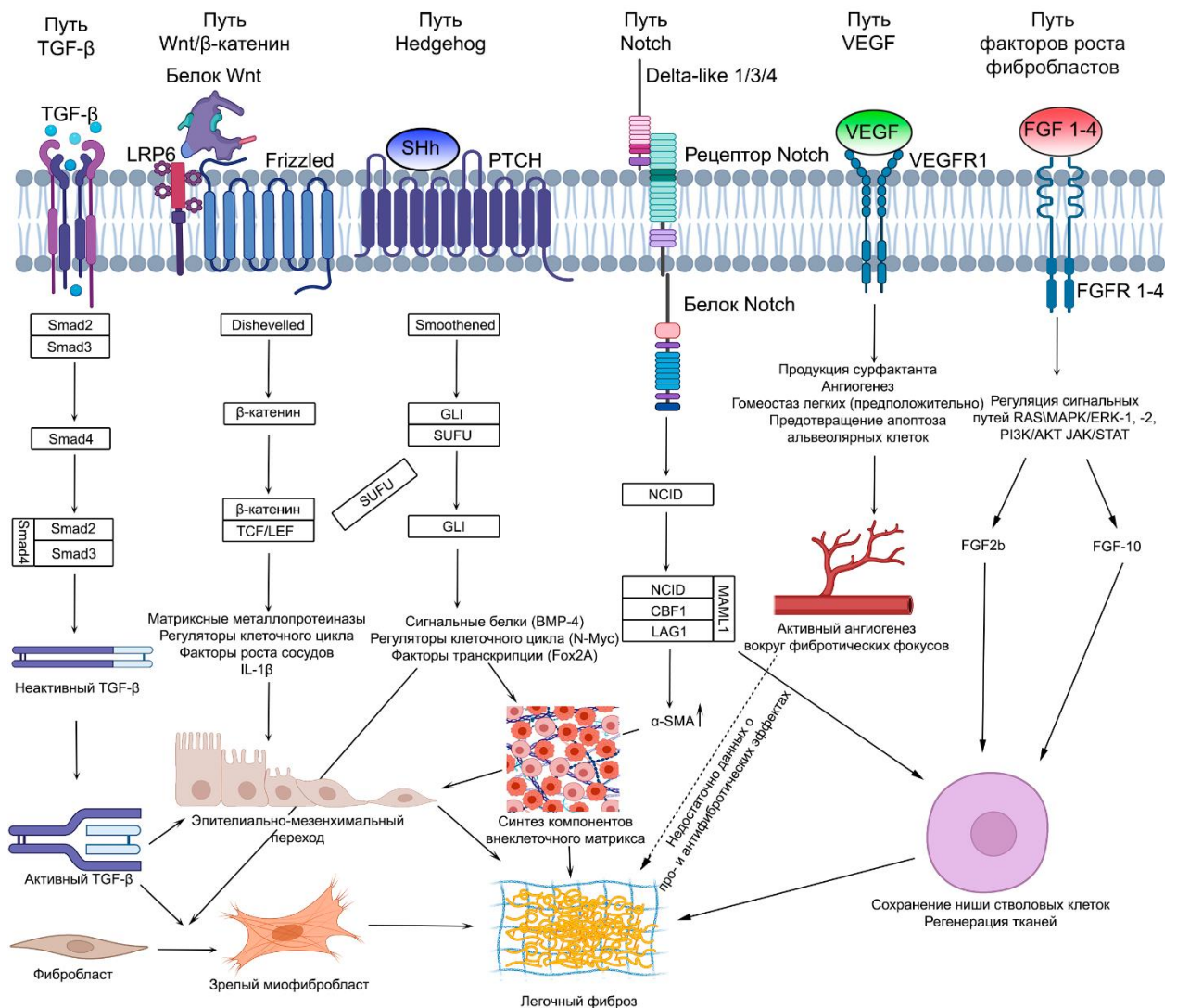


Рисунок 3. Обзор некоторых сигнальных путей, регулирующих развитие легочного фиброза.

1.3.3.1 Сигнальный путь TGF- β

Трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor beta, TGF- β) является членом большого семейства полипептидов, модулирующих ряд процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток во многих органах [241]. Сигнальный путь TGF- β активируется при процессе фиброзировании любой ткани, независимо от локализации и этиологии повреждения (Рисунок 3). Активация данного сигнального пути приводит как к синтезу TGF- β *de novo* множеством типов клеток, в том числе макрофагами [242], тромбоцитами [243] и Т-клетками [244], так и высвобождению накопленного неактивного TGF- β из депо, представленного ВКМ [245]. Поскольку TGF- β секретируется в неактивном виде, его переход в активную форму является одним из главных механизмов, регулирующих активность TGF- β при развитии фиброза [246]. При развитии легочного фиброза TGF- β через Smad-зависимый сигналинг стимулирует синтез белков ВКМ [247] и ингибирует их деградацию матриксными металлопротеиназами [248], а также регулирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты [249] (Рисунок 3).

Помимо своего эффекта на фибробласты и ВКМ, TGF- β также оказывает профибротический эффект на макрофаги, которые считаются одними из важнейших регуляторов фибротического ответа и секретируют цитокины, факторы роста и регуляторные белки ВКМ [250]. Лимфоциты также могут являться одной из мишеней TGF- β при развитии фиброза, поскольку они высоко чувствительны к TGF- β [251], который оказывает значительный, но зависимый от местных условий, эффект на пролиферацию, дифференцировку, активацию и функционирование популяций лимфоцитов [252]. Также TGF- β принимает участие в развитии патологического wound healing в ответ на постоянное повреждение альвеолярного эпителия [253,254].

1.3.3.2 Сигнальный путь Wnt/ β -катенин

Белковые продукты семейства генов Wnt представлены 19 секретируемыми гликопротеинами, которые регулируют эмбриональное развитие млекопитающих и восстановление тканей после их повреждения, а также являются первым компонентом сигнального пути Wnt [255,256]. Вторым компонентом данного сигнального пути являются рецепторы Frizzled, расположенные на поверхности клеток и активирующие внутриклеточные сигнальные каскады при контакте с гликопротеинами семейства Wnt [257]. Канонический сигналинг Wnt инициируется при связывании гликопротеинов Wnt с рецепторами Frizzled на плазматической мембране, что приводит к ингибированию фосфорилирования β -катенина в цитоплазме с последующей транслокацией в ядро клетки, где происходит активация факторов транскрипции принадлежащих к семейству генов TCF/LEF (Рисунок 3) [256,257]. Канонический сигналинг Wnt регулирует экспрессию нескольких семейств генов, включая матриксные металлопротеиназы [258] и ангиогенные

факторы роста [259], принимающие участие в развитии легочного фиброза (Рисунок 3). Также существует два неканонических пути активации Wnt: Wnt/planar cell polarity (Wnt/PCP) и Wnt/кальций (Wnt/Ca²⁺). Путь Wnt/PCP активирует JNK и Rho-киназы [260], в то время как путь Wnt/Ca²⁺ приводит к увеличению концентрации внутриклеточного кальция и активации сигнальных путей протеинкиназы С и кальциневрина.

В легких взрослого организма сигнальный путь Wnt участвует в поддержании гомеостаза путем регуляции функций стволовых клеток и клеток-предшественников как в физиологическом состоянии, так и во время ответа на повреждение [261,262]. Также была показана роль сигналинга Wnt в пролиферации эпителиальных клеток, процессе ЭМТ, дифференцировке миофибробластов и синтезе коллагена [238]. В эпителиальных клетках Wnt способствует продукции сурфактанта и дифференцировке альвеолоцитов II типа в альвеолоциты I типа [263], а в легочных фибробластах Wnt способствует их пролиферации, увеличивает экспрессию фибронектина и ингибирует апоптоз [264].

Патологическая активация сигнального пути Wnt при развитии легочного фиброза была продемонстрирована во многих работах. В физиологическом состоянии β-катенин экспрессируется только в эндотелиальных и эпителиальных клетках. Однако, при развитии легочного фиброза, β-катенин аккумулируется в пролиферирующем эпителии и фибробластических фокусах [265]. Более того, ингибирование сигналинга Wnt/β-катенина на модели блеомцин-индуцированного фиброза приводило к смягчению течения заболевания [266].

Wnt может участвовать в патогенезе легочного фиброза посредством нескольких механизмов:

- Сигналинг Wnt/β-катенина индуцирует анти-апоптотический и про-фибротический фенотип в легочных фибробластах, что приводит к пролиферации фибробластов, их дифференцировке в миофибробласты и способствует процессу фиброобразования легочной ткани [267];
- Активация Wnt/β-катенина в альвеолоцитах II типа приводит к увеличению продукции IL-1β, что способствует развитию воспалительного и про-фибротического ответов [268];
- Неканоническая активация Wnt приводит к усилению пролиферации и жизнеспособности легочных фибробластов, а также к повышенному синтезу компонентов ВКМ [264].

Также в развитии легочного фиброза важную роль играет совместный сигналинг Wnt/β-катенина и TGF-β. Так, TGF-β1 обладает синергетическим взаимодействием с сигнальным путем Wnt/β-катенина при индукции ЭМП [269]. Также TGF-β1-

индуцированное увеличение экспрессии индуктора металлопротеиназ ВКМ (EMMPRIN, гликозилированный трансмембранный протеин) в альвеолоцитах II типа приводит к стимуляции продукции определенных металлопротеиназ стромальными фибробластами через Wnt/ β -катенин сигнальный путь [270]. Эти находки указывают на то, что взаимодействие сигнальных путей TGF- β и Wnt/ β -катенин может быть одной из перспективных мишеней при терапии легочного фиброза.

1.3.3.3 Сигнальный путь VEGF

Семейство факторов роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) включает в себя 5 изоформ VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E) и родственный им плацентарный фактор роста (placental growth factor, PlGF) [271]. VEGF-A является наиболее распространенной из изоформ и оказывает свое биологическое действие через рецепторы VEGF I (VEGFR1) и VEGF II (VEGFR2), относящиеся к классу тирозин киназ, а также через ко-рецепторы нейропилин 1 (NP1) и 2 (NP2) [272].

В здоровых легких взрослого человека компартментами, экспрессирующими VEGF, являются альвеолярный эпителий, гладкомышечные клетки, макрофаги и фибробласты [273]. В то же время, классические процессы, ассоциированные с VEGF (проницаемость сосудов, ангиогенез и митоз), слабо представлены в зрелом легком, поэтому точная роль VEGF в легких до сих пор не ясна, хотя имеется предположение, что присутствие VEGF в альвеолярном пространстве (на альвеолярной капиллярной мембране) необходимо для поддержания функционирования и сохранения легочной структуры [274], помимо основной функции поддержания жизнеспособности сосудов (Рисунок 3). Поскольку нарушение целостности альвеолярной капиллярной мембраны являются частью патогенеза как острых (ОРДС), так и хронических (легочный фиброз) заболеваний легких, хотя и в результате действия разных механизмов, данное предположение кажется вероятным [275].

Функционально, VEGF участвует в росте альвеоцитов II типа [276], продукции сурфактанта [277], системном ангиогенезе [278], а также играет определенную роль в анти-апоптотической защите альвеолярных эпителиальных клеток [279].

Как было сказано выше, роль VEGF в развитии легочного фиброза остается не до конца ясной. В исследованиях нескольких групп было показано, что уровень VEGF может как снижаться в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с легочным фиброзом [280], так и повышаться [281], или оставаться неизменным [282]. Похожая ситуация наблюдалась и с количеством VEGF в ткани легких – сообщалось как о снижении количества VEGF [282], так и о его повышении [283] при развитии легочного фиброза. Кроме того, как

подавление экспрессии VEGF [284], так и ее повышение [285] приводили к появлению эмфизематозного фенотипа в преclinical моделях.

Поскольку VEGF является мощным ангиогенным фактором, закономерно было бы задаться вопросом, может ли он принимать участие в процессах сосудистого ремоделирования, как одного из компонентов легочного фиброза [286]? Оказалось, что несмотря на минимальную экспрессию в фибротических фокусах, VEGF интенсивно экспрессируется в окружающих тканях [287]. Увеличенная плотность альвеолярных капилляров в областях легких, не затронутых фиброзом, объясняется повышенной экспрессией VEGF альвеоцитами II типа, которые располагаются рядом с этими капиллярами [288]. Поскольку VEGF задействован в поддержании гомеостаза в ткани легких, появилась гипотеза, что в относительно здоровых областях фиброзированного легкого VEGF выделяется альвеоцитами II типа и участвует в защите стенок альвеол, регенерируя дефекты, а увеличивающийся локально ангиогенез является частью попытки запустить процесс регенерации [289].

Таким образом, имеющиеся данные не позволяют сделать однозначный вывод о роли VEGF в развитии легочного фиброза, поскольку есть свидетельства как о его анти-фибротических, так и про-фибротических эффектах.

1.3.3.4 Сигнальный путь hedgehog

Сигнальный путь hedgehog является одним из главных сигнальных путей, регулирующих органогенез в различных организмах [290]. Ген hedgehog был впервые обнаружен во фруктовой мушке *Drosophila melanogaster* [291], а у позвоночных было идентифицировано три аналога данного гена, а именно sonic hedgehog (Shh), indian hedgehog (Ihh) и desert hedgehog (Dhh). Среди этих ортологов Shh является наиболее широко экспрессируемым лигандом данного сигнального пути, который играет значительную роль в гистогенезе многих органов, в том числе легких [292].

Канонический сигналинг hedgehog активируется, когда один из лигандов данного сигнального пути соединяется с рецептором Patched1 (PTCH1) на плазматической мембране клетки [292]. В отсутствие лиганда, PTCH1 взаимодействует с рецептором Smoothed (SMO), что приводит к ингибированию сигналинга hedgehog [293]. При связывании с лигандом hedgehog, SMO становится способным к взаимодействию с глиома-ассоциированными факторами транскрипции (GLI-1, 2, 3), что в свою очередь приводит к их диссоциации с супрессором fused (SUFU) в цитозоле клетки [294]. GLI-1, 2, 3 переходят в ядро клетки, повышая экспрессию Shh зависимых генов и транскрипционных факторов [295–297] (Рисунок 3).

Усиление экспрессии сигнального пути hedgehog неоднократно отмечалось при развитии легочного фиброза [239,298,299]. Значительное повышение экспрессии генов Shh было обнаружено в альвеолярном эпителии и областях, подверженных фибротическому ремоделированию [298,299]. Также было показано, что Shh обладают способностью стимулировать продукцию коллагена тканевыми фибробластами и их дифференцировку в миофибробласты при системном склерозе [300]. В легких Shh стимулирует пролиферацию и миграцию фибробластов, а также продукцию ими компонентов ВКМ, но в то же время не влияет на уровень экспрессии α -SMA в структурах легких, в том числе и фибробластах [233,298]. И хотя ингибирование сигналинга hedgehog не приводило к подавлению развития блеомицин-индуцированного фиброза, стимуляция экспрессии генов SHH вызывала утяжеление течения данной патологии [301,302], а уровни экспрессии Shh-зависимых генов увеличивались в клетках дыхательных путей и альвеолярном эпителии во время развития блеомицин-индуцированного фиброза [302].

1.3.3.5 Сигнальный путь Notch

Сигнальный путь Notch является крайне консервативным сигнальным путем, играющим ключевую роль в эмбриональном развитии и гомеостазе множества органов, в том числе легких [303]. Он выполняет свои функции путем паракринного сигналинга с помощью однонаправленных трансмембранных рецепторов, регулируя таким образом судьбу клеток во время органогенеза. У млекопитающих есть четыре ортолога Notch (Notch 1-4) и несколько лигандов в различных белковых семействах, таких как Delta-like 1 (DLL1, DLL3 и DLL4) и Jagged (JAG1 и JAG2) [304]. Каноническая активация Notch индуцируется серией протеолитических расщеплений рецепторов семейства Notch, что приводит к выбросу внеклеточного домена Notch (NICD) (Рисунок 3). После освобождения, NICD переходит в ядро и там, совместно с ДНК-связывающими пептидами CBF1, LAG1 и ко-активатором Mastermind (MAML1), стимулирует транскрипцию генов данного сигнального пути [304]. Считается, что дисрегуляция сигналинга Notch играет определенную роль в развитие фиброза и опухолевой трансформации [303,305].

В сформированных легких сигнальный путь Notch участвует в регуляции функционирования клеток-предшественников совместно с другими сигнальными путями, а также участвует в процессе восстановления повреждений [303,306]. Повышенный уровень сигналинга Notch был обнаружен при развитии легочного фиброза [307], а подавление компонентов сигнального пути Notch Jagged1, Notch1, NICD и Hes-1 препятствовало развитию легочного фиброза в блеомицин-индуцированной модели [308].

1.3.3.6 Факторы роста фибробластов

Факторы роста фибробластов (fibroblast growth factors, FGFs) это семейство секретлируемых протеинов, выполняющих жизненно важную роль в контроле клеточной пролиферации, выживания, миграции и дифференциации во время эмбрионального и постнатального развития путем активации набора рецепторов на поверхности клеток (fibroblast growth factors receptors, FGFRs) [309]. У позвоночных животных было идентифицировано четыре FGFRs (1-4), каждый из которых соединяется со своим специфичным лигандом, за исключением FGF-1, который способен взаимодействовать со всеми FGFRs [309] (Рисунок 3).

В сформированных легких FGFs обычно экспрессируются в эпителии, сосудистом эндотелии, гладкой мускулатуре и эпителиальной базальной мембране [310,311]. При развитии легочного фиброза отмечается повышенный уровень экспрессии FGF-1 [312]. Кроме того, FGF2b участвует в поддержании популяции стволовых клеток легких на стабильном уровне, а FGF-10, секретлируемый гладкомышечными элементами воздухоносных путей, запускает процесс восстановления повреждений [313,314]. Напротив, FGF-1 подавляет TGF- β 1-стимулированную дифференциацию миофибробластов и ЭМП путем протеосомальной деградации рецептора TGF- β 1 [315]. Более того, значительное снижение экспрессии FGF-10 в предшественниках альвеолярных эпителиальных клеток наблюдалось у пациентов с прогрессирующим легочным фиброзом [233], что указывает на двойную роль FGFs в фиброгенезе.

1.3.4 Роль цитокинов в развитии фиброза легких

За время изучения легочного фиброза было проведено большое количество работ, которые подтверждали участие широкого спектра воспалительных цитокинов и клеточных маркеров в развитии данной патологии. Было описано множество цитокинов, повышенная экспрессия которых ассоциируется с усилением процесса фиброобразования, хотя были описаны цитокины и с обратным эффектом. К цитокинам, стимулирующим развитие фиброза, в том числе и в легких, относятся факторы роста, стимулирующие продукцию компонентов ВКМ и пролиферацию фибробластов – трансформирующий фактор роста- β (transforming growth factor beta, TGF- β) [194,316–325], фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor, CTGF) [326–330], тромбоцитарный фактор роста (platelet derived growth factor, PDGF) [331–341], инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor, IGF) [342,343], интерферон-гамма (interferon gamma, IFN- γ) [344–349], фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha, TNF- α), онкостатин М (oncostatin M, OSM) [350–355].

1.3.5 Роль иммунных клеток в развитии фиброза легких

1.3.5.1 Т-лимфоциты

Постоянной находкой при легочном фиброзе является присутствие Т-лимфоцитов в ткани легких. Исследование механизма действия Т-лимфоцитов при фиброзе проводилось на мышах, у которых отсутствовали Т-лимфоциты, на модели блеомицин-индуцированного фиброза. Было обнаружено, что у мышей без Т-клеток введение блеомицина приводило к снижению пролиферации фибробластов, и, соответственно, меньшей аккумуляции компонентов ВКМ по сравнению с интактными животными [356]. Мыши, на чьих лимфоцитах отсутствовал CD28 – центральная ко-стимуляторная молекула, необходимая для полной активации Т-клеток – показали значительную устойчивость к развитию фиброза в результате действия блеомицина, а перенос CD28+ Т-лимфоцитов этим мышам восстанавливал их чувствительность к фиброзирующему действию блеомицина [357]. Также в мышах, полностью лишенных Т-лимфоцитов, введение блеомицина приводило к меньшему накоплению коллагена и повышению выживаемости по сравнению с контрольными животными [358,359].

Существует предположение, что при легочном фиброзе между субпопуляциями Т-лимфоцитов происходят сложные взаимодействия, особенно между Т-эффекторными и Т-регуляторными клетками. Т-регуляторные лимфоциты являются про-фибротическими и иммуносупрессивными клетками, оказывающими свой про-фибротический эффект при воздействии TGF- β и PDGF [360]. Было показано, что в животных моделях легочного фиброза Т-регуляторные клетки мигрируют в легкие, стимулируя там пролиферацию фибробластов, а также вызывают легочный фиброз при введении здоровым мышам [332]. Обсервационные исследования на людях выявили связь между инфильтрацией легочной ткани Т-клетками и развитием фиброза: у пациентов с легочным фиброзом присутствие Т-клеток в ткани легких и бронхоальвеолярной жидкости наблюдалось постоянно [361,362]. Также повышенное содержание CD8+ Т-лимфоцитов в ткани легких пациентов с легочным фиброзом было ассоциировано с плохим прогнозом течения заболевания, а высокое соотношение CD4/CD8 Т-лимфоцитов в бронхоальвеолярной жидкости коррелировало с улучшением ответа на противовоспалительную терапию [363]. Кроме того было показано, что у пациентов с легочным фиброзом в ткани легких присутствуют хорошо организованные лимфоидные структуры, которые состоят из Т-клеток, экспрессирующих CD40L, В-клеток и зрелых дендритных клеток [364]. Эти находки свидетельствуют о том, что организованная лимфоидная ткань может вносить свой вклад в развитие и поддержание хронического воспаления легких, даже в отсутствие локальной лимфоидной воспалительной инфильтрации. Таким образом, исследования, проведенные на животных моделях и на материале от пациентов, описывают ассоциацию легочного фиброза с Т-клеточным звеном иммунитета.

1.3.5.2 Макрофаги

Макрофаги являются одними из основных клеток, которые обнаруживаются в бронхоальвеолярной жидкости здоровых людей и выполняют важную роль в процессах фагоцитоза, врожденного и адаптивного иммунитета, а также в гомеостазе сурфактанта [365]. Патогенетическая роль макрофагов при легочном фиброзе продемонстрирована во множестве работ и заключается в повышении образования активных форм кислорода [366–369], стимуляции протеиназа-активируемых рецепторов [370,371] и профибротических цитокинов [372–375]. При классическом пути активации макрофаги активируются интерфероном-гамма и экспрессируют IL-1 β , IL-6, TNF- α и оксид азота. При альтернативном пути активации, индуцируемом цитокинами Th2, такими как IL-4 и IL-13, макрофаги характеризуются экспрессией рецепторов маннозы-1, аргиназы-1 и хемокина CCL18 [375,376]. В мышинных моделях, а также у пациентов с легочным фиброзом макрофаги чаще всего активируются по альтернативному пути [377–379], что свидетельствует о том, что альтернативно активированные макрофаги могут играть механистическую роль в развитии легочного фиброза, а блокирование альтернативной активации может привести к снижению интенсивности данного процесса.

1.3.5.3 Аутоиммунные реакции

Одним из факторов развития ОПЛ/ОРДС и легочного фиброза являются аутоиммунные реакции, специфические для легких, которые запускаются при развитии ОПЛ [380,381]. Одним из предложенных механизмов патогенеза аутоиммунных реакций при ОПЛ является потеря Т и В клетками толерантности из-за большого количества поврежденных и разрушенных эпителиальных и эндотелиальных структур легких, в результате чего происходит выброс антигенов, которые и запускают аутоиммунные реакции при ОПЛ и последующем легочном фиброзе [382].

1.3.6 Роль активных форм кислорода в развитии фиброза легких

Активные формы кислорода (reactive oxygen species, ROS) образуются путем окисления молекулярного кислорода с формированием супероксид аниона (O₂⁻), перекиси водорода (H₂O₂) и гидроксильного радикала (OH) [383]. Из-за своих мощных окислительных свойств, ROS могут генерировать окислительные молекулярные продукты, которые разрушают клеточные и субклеточные структуры в легких, включая ДНК, белки, клеточные мембраны и митохондрии. Хотя данный постулат остается истинным на фармакологическом уровне, в настоящее время известно, что несколько молекул ROS, продуцируемых в результате реакций в дыхательной цепи, могут выступать в роли молекул межклеточного сигналинга, участвуя в функционировании широкого спектра клеточных процессов, важных как в условиях здорового организма, так и при

патологических состояниях, включая фиброз легких [384]. ROS могут продуцироваться в результате нескольких механизмов, в том числе митохондриальной цепи переноса электронов, деятельности миелопероксидазы, ксантиноксидазы и NADP оксидазы [385]. Отрицательный эффект ROS наиболее глубоко проявляется в ткани легких из-за постоянного воздействия кислорода из окружающей атмосферы. Соответственно, в легких эволюционировали защитные механизмы, направленные на предотвращение отрицательного действия ROS на клетки, наиболее значительным из которых является семейство супероксиддисмутаз [385]. Помимо прямого повреждающего воздействия на клетки, ROS также могут стимулировать развитие фиброза путем воздействия на молекулярные механизмы и сигнальные пути, вовлеченные в этот процесс. Например, молекула тиоредоксин, основная роль которой заключается в восстановлении окисленных периредоксинов, также может функционировать в качестве детектора ROS с последующей активацией сигнальных путей клеточного стресса, в том числе MAPK, которые усиливают сигналинг TGF- β независимо от процессов фосфорилирования Smad и ядерной транслокации, что указывает на важную роль, которую ROS могут играть в развитии легочного фиброза [386].

1.3.7 Универсальность механизмов развития фиброза в различных органах

Процессы фибротического ремоделирования могут затронуть практически любую ткань и вносят значительный вклад в снижение уровня жизни и смертность при таких заболеваниях, как атеросклероз, хронические воспалительные заболевания кишечника, поражение почек и печени, в дополнение к легочным патологиям, обсуждаемым выше [387]. В основе фибротической трансформации различных органов лежит физиологический и патологический wound healing. При обоих процессах, первоначальное повреждение тканей инициирует каскад репаративных реакций, направленных на уменьшение повреждения и восстановление целостности тканей [388]. Таким образом, развитие фиброза в различных органах происходит по универсальному механизму, а различия чаще всего касаются специфики строения того или иного органа.

В почках, поскольку они имеют достаточно сложное строение, выделяют несколько видов фиброза в зависимости от пораженного компонента: гломерулосклероз (при поражении клубочков почек), тубулоинтерстициальный фиброз (при поражении канальцев и интерстиция почек) и артериолосклероз (при поражении почечных сосудов). В начале заболевания патологический процесс затрагивает только один из компонентов почек, что позволяет предположить этиологию фиброза в конкретном случае, однако по мере прогрессирования заболевания поражаются все компоненты почек [389]. Также в отличие от фиброза других типов тканей, при фиброзе почек в синтезе компонентов ВКМ

может быть задействовано гораздо больше клеток, опять же, из-за более сложного строения данного органа, к которым относятся такие клетки, как подоциты, париетальные эпителиальные клетки, клетки мезангия и гломерулярные эндотелиальные клетки. Также особенностью фиброза почек является наличие ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, которая является как одним из главных компонентов патогенеза фиброза почек, так и очень привлекательной мишенью для анти-фибротической терапии [389].

В развитии фиброза печени также есть свои особенности. Звездчатые клетки являются основным источником активированных миофибробластов при развитии фиброза печени, но не единственным. Эндогенные портальные фибробласты и миофибробласты, дифференцирующиеся из клеток паренхимы печени в результате ЭМП, являются предшественниками значительного количества миофибробластов при развитии фиброза печени [390]. Также источник миофибробластов зависит от этиологического фактора фиброза печени. Например, активированные звездчатые клетки печени являются источником миофибробластов при фиброзе печени, индуцированном CCL₄, в то время как портальные фибробласты являются источником миофибробластов при холестатическом фиброзе, а клетки из костного мозга являются источником миофибробластов при более длительных хронических процессах [390]. Еще одной важной особенностью печеночного фиброза является его потенциальная обратимость. Поскольку печень обладает значительным регенеративным потенциалом, при удалении стимула, вызвавшего фиброзирование, происходит каскад событий, который приводит к реверсии фибротического процесса [391], что обусловлено снижением уровня про-фибротических цитокинов, утилизацией фибротической ткани и миофибробластов путем апоптоза, а также увеличением активности коллагеназ [392].

Несмотря на то, что специфика воспалительного ответа, ведущего к фиброзу, варьирует от ткани к ткани, во всех случаях происходит поляризация макрофагов в M2 фенотип, сопровождающаяся обильным выбросом про-фибротических медиаторов, что приводит к активации и аккумуляции миофибробластов [388]. Предшественниками миофибробластов в разных тканях могут служить целый спектр различных клеток, таких как резидентные фибробласты, перициты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки [393]. Синтез и депонирование компонентов соединительной ткани миофибробластами приводит к увеличению жесткости ткани и гипоксии, что образует порочный круг активации фибробластов и тканевого ремоделирования. Понимание этих общих механизмов позволит разработать новые эффективные методы терапии фиброза различных органов и тканей [144].

1.4. Релевантные мышинные модели острого повреждения и фиброза легких

Животные модели различных заболеваний человека направлены на создание «трансляционного моста» между пациентом и лабораторией: гипотезы, сформулированные при исследовании человеческого материала, могут быть напрямую проверены либо опровергнуты на животных моделях, а результаты *in vitro* экспериментов могут быть успешно валидированы *in vivo*.

1.4.1 Общая характеристика животных моделей ОПЛ

У пациентов развернутый воспалительный ответ в легких начинается до того, как появляются клинические признаки ОПЛ/ОРДС, достигает наибольшей интенсивности в первые 3 дня после начала заболевания [394] и сопровождается повреждением эндотелия и эпителия легких, развитием альвеолярного и интерстициального отека и нарушением газообмена [395]. Таким образом, животные модели ОПЛ должны воспроизводить как воспалительный ответ, так и повреждение эпителиальных и эндотелиальных барьеров в ткани легких. Кроме того, одним из самых сложных аспектов моделирования человеческого ОПЛ на лабораторных животных, таких как мыши и крысы, является тот факт, что на легкие людей, страдающих от ОПЛ, могут воздействовать как первичное заболевание, приведшее к ОПЛ (например, сепсис), так и некоторые терапевтические и поддерживающие меры (такие как искусственная вентиляция легких) [396]. Следовательно, ни одна из существующих в настоящее время животных моделей ОПЛ не отражает в полной мере все особенности протекания данной патологии у человека. Однако при тщательном подборе в соответствии с целями и задачами конкретного исследования каждая из моделей может дать ответы на те или иные вопросы о механизмах развития ОПЛ и способах их регулирования (Таблица 1).

При проведении исследований на животных, воздействие различных химических агентов приводит к уникальному сочетанию нарушений нормального функционирования легких, что, в конечном итоге, приводит к развитию патологических изменений, схожих с острой фазой ОПЛ/ОРДС. Наиболее частыми методами индукции ОПЛ являются введение бактериального липополисахарида (ЛПС) [397,398], введение олеиновой [399] или соляной кислоты [400], гипероксическое повреждение [401], механическая вентиляция [402]. Все вышеуказанные модели имеют свои преимущества и недостатки, различную воспроизводимость на экспериментальных животных, разные гистопатологические характеристики и клиническую релевантность (Таблица 1). Основным недостатком всех *in vivo* моделей ОПЛ является вариабельность воспалительного ответа как в ткани легких, так и в организме лабораторного животного в целом. Однако, основным преимуществом данных моделей является широкий спектр

клинических проявлений в зависимости от индуктора ОПЛ, что делает возможным воспроизводить разнообразные патологические состояния в легких, а также дает возможность комбинировать несколько моделей для достижения максимальной релевантности относительно патологии человека.

Таблица 1. Обзор мышинных моделей острого повреждения легких.

Модель	Гистологические характеристики	Моделируемые процессы	Преимущества и недостатки	Литература
<i>Липополисахарид (ЛПС)-индуцированное ОПЛ</i> Индукующий агент – ЛПС	Воспалительная инфильтрация ткани легких нейтрофилами с примесью лимфоцитов и макрофагов, дисциркуляторные нарушения, микрососудистый тромбоз, кровоизлияния, интерстициальный и альвеолярный отек легких	Воспалительный процесс при бактериальной инфекции; экссудативная фаза ОПЛ/ОРДС	+Множество способов введения (внутрибрюшинный, интраназальный, интратрахеальный) +Воспроизводимость -Вариабельность тяжести воспаления -Зависимость от качества/очистки/типа бактерии, из которой был выделен ЛПС	[397,398,403–408]
<i>ОПЛ, индуцированное гипероксией</i> Индукующий агент – 100% кислород	Утолщение альвеолярных стенок, альвеолярный и интерстициальный отек легких, кровоизлияния и воспалительная инфильтрация	Экссудативная и пролиферативная фазы ОПЛ/ОРДС; регенерация легких после повреждения	+Воспроизводимость +Клиническая релевантность относительно пациентов отделения интенсивной терапии, находящихся на кислородной и вентиляционной поддержке -Низкая релевантность относительно здоровых легких	[401,409–411]
<i>ОПЛ, индуцированное олеиновой кислотой</i> Индукующий агент – цис-9-октодеционовая кислота	Образование ранних некротических фокусов и микрососудистый тромбоз с последующей пролиферацией альвеолоцитов II типа и разрастанием соединительной ткани в субплевральных областях; полиморфизм поврежденных областей легочной ткани	Морфологические изменения в легких в результате жировой эмболии легочных сосудов после тяжелой травмы мягких тканей и/или переломов длинных трубчатых костей	+Воспроизводимость +Отражение обратимых изменений в легких при ОПЛ -Необходимость растворения индуцирующего агента в этиловом спирте -Небольшое число ОПЛ в результате жировой эмболии у людей	[412–415]
<i>ОПЛ, индуцированное аспирацией кислоты</i> Индукующий агент –	Нейтрофильная воспалительная инфильтрация и	Морфологические изменения в легких, вызванные аспирацией	+Большое количество изменяемых параметров +Возможность комбинирования с другими методами индукции ОПЛ	[416–420]

соляная кислота	альвеолярные кровоизлияния с последующим фибропролиферативным ответом; интерстициальный и альвеолярный отек легких	желудочного содержимого; механизмы миграции нейтрофилов при ОПЛ/ОРДС	-Небольшая разница между достаточной и смертельной дозой соляной кислоты -Низкая клиническая релевантность, поскольку в клинической практике наблюдается аспирация не чистой соляной кислотой, а сложной смесью желудочного содержимого	
<i>ОПЛ, индуцированное механической вентиляцией</i> Индуцирующий агент – механическая вентиляция	Интерстициальный отек, инфильтрация альвеолярных стенок мононуклеарными клетками, кровоизлияния, отложение фибрина	Стратегии механической вентиляции у пациентов с критическим ОПЛ; биомеханика легких при развитии ОПЛ/ОРДС	+Клиническая релевантность +Возможность комбинирования с другими факторами повреждения легких -Сложность модели и необходимость в специальном оборудовании	[421–428]

1.4.1.1 ЛПС-индуцированное ОПЛ

ЛПС, который является главным компонентом внешней мембраны Грам-отрицательных бактерий, вызывает местный и системный воспалительные ответы, тесно связан с повреждением легких и часто используется для индукции легочного воспаления в *in vivo* моделях [403–405]. К основным преимуществам данной модели относятся разнообразность способов введения ЛПС, а также хорошая воспроизводимость эффектов. К недостаткам модели можно отнести зависимость тяжести индуцируемого в легких воспаления от типа бактерий, от которых был получен ЛПС, чистоты приготовленного раствора и присутствия в нем загрязнений в виде бактериальных липопротеинов и других частиц [407] (Таблица 1).

Гистологически, изменения при ЛПС-индуцированном ОПЛ представлены воспалительной инфильтрацией, состоящей преимущественно из нейтрофилов с небольшой примесью лимфоцитов и макрофагов, и нарушениями циркуляции в виде микрососудистого тромбоза, кровоизлияний, а также интерстициального и альвеолярного отеков [408] (Таблица 1). ЛПС является мощным активатором врожденного иммунного ответа через TLR4-зависимый путь, что позволяет изучать на данной модели воспалительный ответ, подобный ответу при бактериальных инфекциях [406].

1.4.1.2 ОПЛ, индуцированное гипероксией

У большинства млекопитающих длительное воздействие 100% кислорода приводит к нарушению дыхательной функции и смерти. Однако у людей со здоровыми легкими после 24 часов воздействия 100% кислородом наблюдается лишь небольшое увеличение проницаемости альвеолярных капилляров, а длительное воздействие 100% кислородом используется как одно из средств антибактериальной терапии [409]. Тем не менее существует гипотеза о том, что кислород может приводить к более тяжелому течению или даже служить причиной ОПЛ у тяжелобольных пациентов [410], однако однозначного ответа на этот вопрос в настоящее время не существует.

Токсическое действие кислорода на легкие животных обусловлено нарушением клеточного гомеостаза в результате образования активных форм кислорода. У животных гипероксия используется как в качестве прямого повреждающего агента, так и в качестве вторичного повреждения при использовании моделей с другим основным механизмом легочного повреждения [401]. К преимуществам данной модели относятся хорошая воспроизводимость, а также возможность достаточно точно отражать изменения в легких пациентов с тяжелым ОПЛ, получающих терапию кислородом и механическую вентиляцию. Среди недостатков остаются вопросы к релевантности этой модели в отношении человеческого ОПЛ, поскольку воздействие 100% кислородом на здоровые

легкие в течение до трех дней не приводит к отрицательным последствиям для человека (Таблица 1).

Гистологически данная модель характеризуется утолщением альвеолярных стенок, тяжелым или умеренным интерстициальным и альвеолярным отеком, кровоизлияниями и инфильтрацией воспалительными клетками [411]. Функционально, гипероксическая модель ОПЛ характеризуется хорошо выраженной экссудативной и пролиферативной фазами, что делает ее идеально приспособленной для изучения восстановления легких после ОПЛ (Таблица 1).

1.4.1.3 ОПЛ, индуцированное олеиновой кислотой

Также для индукции ОПЛ используют олеиновую кислоту (цис-9-октадеценовая кислота), которая является самой распространенной свободной жирной кислотой в организме млекопитающих. Данная модель была разработана в попытке воспроизвести ОПЛ, которое является последствием жировой эмболии [412]. К преимуществам данной модели относят ее хорошую воспроизводимость и способность отражать ранние этапы ОПЛ, характеризующиеся обратимыми нарушениями проницаемости альвеолярного эпителия и газообмена. К недостаткам модели можно отнести необходимость растворения кислоты в этаноле, поскольку олеиновая кислота нерастворима в воде, а также сравнительно небольшое число случаев ОПЛ у людей, связанных с жировой эмболией (Таблица 1).

Гистологически данная модель характеризуется ранним появлением очагов некроза в ткани легких, а также микроваскулярным тромбозом, за которыми следует репаративная стадия, характеризующаяся пролиферацией альвеоцитов II типа и наличием очагов разрастания соединительной ткани в субплевральных областях [413] (Таблица 1). Поврежденных участков всегда несколько, и они гетерогенны: в некоторых присутствуют только минимальные изменения, в то время как в других обнаруживаются интерстициальный отек и обширные кровоизлияния [414]. Основными процессами, исследуемыми на данной модели, являются морфологические изменения в легких при жировой эмболии легочных сосудов, возникающей при обширных повреждениях мягких тканей и переломах длинных трубчатых костей [415] (Таблица 1).

1.4.1.4 ОПЛ, индуцированное аспирацией кислоты

Аспирация содержимого желудка в настоящее время признается одним из важных факторов риска развития ОПЛ, особенно для пациентов отделений интенсивной терапии [416]. Поскольку одной из основных характеристик желудочного содержимого является низкий рН, то основным индуктором в данной модели является раствор соляной кислоты с показателем рН около 1,2-1,5, вводимый лабораторным животным через трахею [418].

ОПЛ, индуцированное аспирацией кислоты, характеризуется повреждением дыхательных путей и альвеолярного эпителия, а также нарушением транспортных функций легких, что приводит к понижению клиренса альвеолярной жидкости и развитию интерстициального и альвеолярного отеков (Таблица 1). Гистологически в легких наблюдаются очаги нейтрофильной воспалительной инфильтрации и альвеолярных кровоизлияний, которые сменяются фибропролиферативным ответом примерно через одну неделю после индукции [419].

К преимуществам данной модели относится многообразие изменяемых параметров функционирования легких, а также возможность комбинирования данной модели с другими методиками индукции ОПЛ, что позволяет более точно воспроизводить клинически релевантные сценарии повреждения легких [420] (Таблица 1). Недостатком данной модели является небольшая разница между концентрацией кислоты, достаточной и недостаточной для индукции ОПЛ. Еще одним недостатком модели является тот факт, что люди аспирируют не чистый раствор HCL, а сложную смесь содержимого желудка, в которой содержатся цитокины и другие составляющие, рН которой обычно выше 1,5 (Таблица 1). Данная модель наиболее приспособлена для изучения гемодинамических и физиологических изменений в легких, а также механизмов миграции нейтрофилов при ОПЛ (Таблица 1).

1.4.1.5 ОПЛ, индуцированное механической вентиляцией

Работы, проведенные в конце прошлого века, показали, что механическая вентиляция при определенных условиях может вызывать повреждение и воспаление в легких животных [421,422]. Поскольку эти работы стали основой для нескольких многоцентровых исследований, сравнивающих эффективность различных стратегий вентиляционной поддержки пациентов с ОПЛ [423], можно сказать, что на данный момент эта модель является единственной моделью, использование которой привело к изменению подхода к терапии ОПЛ в клинике.

В отличие от большинства мышинных моделей ОПЛ, индуцируемых известными патогенами, приводящими к повреждению легких, эта модель индуцируется терапией – механической вентиляцией (Таблица 1). Существует два подвида данной модели – ОПЛ, индуцированное механической вентиляцией, в котором вентиляция является единственным этиологическим фактором, и ОПЛ, ассоциированное с вентиляцией, в которой механическая вентиляция накладывается на уже запущенный воспалительный процесс в легких, вызванный, например, сепсисом или аспирацией желудочного содержимого. Моделью, наиболее приближенной к клиническому протеканию ОПЛ у

людей, является модель острого повреждения, ассоциированного с вентиляцией на фоне воспаления легких [424,425].

Повреждение легких при механической вентиляции происходит из-за чрезмерного растяжения ткани легких воздухом и активации специфических межклеточных сигнальных путей, задействованных в так называемой механотрансдукции – явлении, когда механические силы, действующие на клетки, вызывают биохимический ответ [426], что приводит к повреждению легочного эндотелия и эпителия. Гистологически, данная модель характеризуется интерстициальным отеком, инфильтрацией альвеолярных стенок мононуклеарными клетками, кровоизлияниями и отложением фибрина [427] (Таблица 1). К однозначным преимуществам данной модели относят ее клиническую релевантность. К недостаткам относятся как сложность постановки модели, поскольку для этого требуется специализированное оборудование и опыт работы с животными, так и различное время вентиляции у мышей (часы) и людей (дни и недели) (Таблица 1).

Главной областью применения данной модели является изучение влияния различных стратегий искусственной вентиляции легких на течение ОПЛ, а также изменение биомеханики легких и соотношения вентиляции/перфузии при развитии повреждения легких [428].

1.4.2 Общая характеристика животных моделей легочного фиброза

Поскольку ключевые механизмы ремоделирования дыхательных путей и легочного фиброза не могут быть всесторонне исследованы у людей, мышинные модели данных патологий являются незаменимым инструментом в исследовании этиологических факторов и молекулярных механизмов, а также идентификации потенциальных терапевтических мишеней при данной патологии. К таким моделям можно отнести мышиную модель овальбумин-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза, модели легочного фиброза, индуцированные блеомицином, ионизирующим облучением, воздействием микрочастиц кремния и флюоресцентным красителем флюоресцин-5-изотиоцианатом (Таблица 2).

Таблица 2. Обзор мышинных моделей легочного фиброза.

Модель	Гистологические характеристики	Моделируемые процессы	Преимущества и недостатки	Литература
<p><i>Овальбумин (ОВА)-индуцированная астма и пост-астматический фиброз</i> Индуцирующие агенты: сенситизация – ОВА/гидроксид алюминия внутрибрюшинно, индукция – ОВА ингаляционно</p>	<p>Острая астма: перибронхиальная воспалительная инфильтрация, состоящая из эозинофилов и нейтрофилов с примесью лимфоцитов и макрофагов, гиперплазия бокаловидных клеток, гиперсекреция слизи бронхиальным эпителием Пост-астматический фиброз: уменьшение интенсивности воспаления и гиперпродукции слизи, появление признаков ремоделирования дыхательных путей – перибронхиальное и периваскулярное разрастание соединительной ткани</p>	<p>Острая астма: воспаление дыхательных путей, типичное для ранних стадий и обострения астмы Пост-астматический фиброз: необратимые изменения в легких, характерные для длительно текущей, хронической астмы и ХОБЛ</p>	<p>Острая астма: +Простота индукции +Воспроизводимость +Короткая продолжительность эксперимента -Отсутствие ремоделирования дыхательных путей -Высокая вариабельность других параметров астмы (гиперчувствительность и гиперреактивность дыхательных путей, интенсивность воспаления) Пост-астматический фиброз: +Отражение ключевых характеристик астмы у людей (гиперплазия/метаплазия бокаловидных клеток, пролиферация гладкомышечных элементов, перибронхиальный и периваскулярный фиброз) -Длительный период индукции -Низкая релевантность индуцирующего агента относительно астмы у человека</p>	<p>Острая астма: [108,429–432] Пост-астматический фиброз: [112,433]</p>
<p><i>Блеомицин-индуцированный легочный фиброз</i> Индуцирующий агент – блеомицин</p>	<p>Инфильтрация мононуклеарными клетками, утолщение стенок альвеол, полнокровие кровеносных сосудов, десквамация альвеолярного эпителия, отложение вновь синтезированных коллагеновых волокон в стенках альвеол и вокруг кровеносных сосудов и бронхов</p>	<p>Механизмы развития легочного фиброза после ОПЛ/ОРДС; оценка эффективности антифибротической терапии</p>	<p>+Множество способов введения (интраназальный, интратрахеальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутривенный, ингаляционный) +Простота индукции +Воспроизводимость/стандартизация эффектов +Клиническая релевантность в отношении ОРДС -Самоограничивающийся характер фиброза -Низкая релевантность способа индукции</p>	<p>[434–439]</p>

			относительно фиброза у людей
<i>Легочный фиброз, индуцированный радиацией</i> Индуктирующий агент – ионизирующее излучение	Субплевральные фибротические фокусы, отложение коллагена в спавшихся альвеолах, воспалительная инфильтрация ткани легких вокруг фибротических фокусов	Легочный фиброз, индуцированный радиацией; ремоделирование легочных сосудов при легочной гипертензии	+Клиническая релевантность -Длительный период индукции -Высокая стоимость (источник ионизирующего излучения, средства индивидуальной защиты для персонала)
			[170,440–445]
<i>Легочный фиброз, индуцированный микрочастицами кремния</i> Индуктирующий агент – микрочастицы кремния	Рост соединительной ткани и формирование очагов фиброза вокруг микрочастиц кремния, воспаление низкой интенсивности	Нодулярный легочный фиброз, индуцированный кремнием, силикоз и силикофиброз	+Множество способов введения (ингаляция аэрозоля, интратрахеальная или орофарингеальная инстиляция) +Постоянный процесс фиброобразования +Возможность проведения долгосрочных исследований -Зависимость формирования фиброза от способа введения частиц (интратрахеальная инстиляция – от двух до четырех недель, ингаляция аэрозоля – от одного до трех месяцев) -Низкая воспроизводимость -Низкая клиническая релевантность -Отсутствие некоторых характерных черт фиброза (гетерогенность, гиперпластические изменения альвеолярного эпителия)
			[446–451]
<i>Легочный фиброз, индуцированный флуоресцин-5-изотиоцианатом (FITC)</i> Индуктирующий агент – FITC	Перибронхиальная инфильтрация легочной ткани мононуклеарными клетками и нейтрофилами, отек и гиперплазии эпителиальных клеток, развитие фиброза	Исследование различных способов диагностики фиброза; исследование эффективности антифибротических средств в отношении уже сформировавшегося фиброза	+Возможность использования различных линий мышей +Постоянный процесс фиброобразования +Возможность проведения долгосрочных исследований +Отсутствие самоограничивающегося характера фиброза -Зависимость модели от качества FITC и размера частиц -Узкое окно между индуцирующей и токсичной дозой FITC -Низкая клиническая релевантность
			[451–454]

1.4.2.1 Овальбумин-индуцированная астма и пост-астматический легочный фиброз

Среди мышинных моделей астмы и пост-астматического фиброза, астма, индуцированная овальбумином, основным компонентом яичного белка, широко используется для моделирования астма-подобных симптомов у мышей [429]. Классическую модель острой астмы у мышей индуцируют путем внутрибрюшинной сенсибилизации животных овальбумином (ОВА) и гидроксидом алюминия с последующим цикловым введением раствора овальбумина в виде ингаляций [108,429]. Данная модель отражает самые ранние события в развитии астмы, в основном воспаление дыхательных путей [430] (Таблица 2). Дальнейшее увеличение числа циклов ингаляций овальбумином приводит к развитию хронических изменений в дыхательных путях, которые характеризуются уменьшением интенсивности воспалительных процессов и появлением необратимых морфологических изменений в легких [112] (Таблица 2). Гистологически острая астма характеризуется наличием перибронхиальной воспалительной инфильтрации, представленной преимущественно гранулоцитами (эозинофилами и нейтрофилами) с примесью лимфоцитов и макрофагов, а также гиперплазией бокаловидных клеток, сопровождающейся повышенной выработкой слизи в бронхах [431]. Для хронической астмы характерно снижение интенсивности воспаления и гиперпродукции слизи, которые уступают место признакам ремоделирования дыхательных путей – перибронхиальному и периваскулярному разрастанию соединительной ткани в легких и дыхательных путей [112] (Таблица 2).

Модель острой астмы обладает следующими преимуществами: относительная простота индукции, небольшая продолжительность эксперимента и хорошая воспроизводимость (Таблица 2). К недостаткам относят: отсутствие, ввиду небольшой длительности модели, одной из ключевых характеристик астмы у человека – ремоделирования дыхательных путей, а также переменный характер других параметров данной модели (гиперчувствительность/гиперреактивность дыхательных путей, интенсивность воспаления) [432] (Таблица 2). Основным преимуществом модели хронической астмы является возможность воспроизведения ключевых характеристик астмы у людей (гиперплазия и метаплазия бокаловидных клеток, перибронхиальный и периваскулярный фиброз, а также локальная гиперплазия гладкомышечных клеток в легких) (Таблица 2). Недостатками данной модели являются длительная индукция, большой расход реагентов и сомнения в релевантности ОВА относительно развития астмы у людей [433] (Таблица 2).

В попытках диверсифицировать данный тип модели было опробовано множество вариаций. Например, для стимулирования иммунного ответа вместо интраперитонеальной инъекции адъюванта использовали ингаляции NO₂ в надежде на то, что это поможет более точно моделировать роль воздушных поллютантов в развитии астмы в индустриальных сообществах [455]. Также сомнения относительно релевантности ОВА в развитии астмы у людей привели к попыткам использования других антигенов, таких как экстракт домашней пыли [456] и экстракт аспергилла [457], аллергия к которым встречается у людей более часто. Особенно интересной была проблема хронического воздействия антигена. Изменения, развивающиеся при использовании данной модели, являются сравнительно острыми, в то время как у людей астма является хроническим, длительно текущим заболеванием, с явными признаками ремоделирования дыхательных путей на поздней стадии [458], поэтому были проведены исследования долгосрочного воздействия антигена на мышей. Однако, длительное воздействие антигена в некоторых линиях мышей, например, таких как Balb/C, приводило к развитию толерантности, характеризующейся спадом воспаления и исчезновением фенотипа гиперреактивности дыхательных путей [459], что говорит о наличии ограничений в использовании и необходимости оптимизации данной модели (Таблица 2).

1.4.2.2 Блеомицин-индуцированный легочный фиброз

Среди мышинных моделей легочного фиброза, модель блеомицин-индуцированного фиброза является наиболее широко используемой [434] (Таблица 2). В данной модели блеомицин, противоопухолевый антибиотик, оказывающий свое повреждающее воздействие путем формирования одно- и двуцепочечных разрывов ДНК, вызывающих остановку клеточного цикла и апоптоз [435], может вводиться в организм животного практически любым способом (интраназально, интратрахеально, интраперитонеально, подкожно, внутривенно или ингаляционно) [434] (Таблица 2). Однако, независимо от пути введения, попадание блеомицина в организм приводит к прямому повреждению клеток, продукции свободных радикалов и развитию оксидативного стресса с последующим некрозом и/или апоптозом клеток, что вызывает воспаление в легких, и как исход, формирование легочного фиброза [436].

Гистологически данная модель характеризуется мононуклеарной инфильтрацией ткани легких с утолщением межальвеолярных перегородок, полнокровием сосудов, разрушением легочного эпителия наряду с отложением новообразованного коллагена в межальвеолярных перегородках, а также вокруг сосудов и бронхов [437] (Таблица 2).

К преимуществам данной модели относятся техническая простота выполнения, хорошая воспроизводимость, стандартизация и клиническая релевантность, поскольку

данная модель повторяет развитие ОРДС у людей, где первоначальное повреждение и воспаление дыхательных путей уступает место развивающемуся фиброзу. Однако, значительным недостатком данной модели является самоограничивающийся характер фиброза, что не соответствует картине легочного фиброза у человека [438] (Таблица 2). Помимо этого, существует мнение о том, что интратрахеальное введение блеомицина, используемое наиболее часто, является “сверхмощным стимулом”, который не имеет ничего общего с теми стимулами, которые приводят к развитию легочного фиброза в клинической практике (Таблица 2). Несмотря на это, данная модель широко используется для исследования механизмов развития легочного фиброза и разработки антифибротических лекарственных препаратов [439].

1.4.2.3 Легочный фиброз, индуцированный радиацией

Данная модель отображает клинически значимый процесс легочного фиброза после воздействия ионизирующего излучения (Таблица 2). В первых экспериментах постановка данной модели осуществлялась путем единовременного облучения всего тела мыши в дозе 12-15 грэй, что приводило к развитию фиброза в течение 20 недель после облучения [440]. Однако на сегодняшний день более распространенным является вариант, при котором облучению подвергается только грудная клетка животного (остальные части тела закрываются свинцовым покрытием), что приводит к развитию легочного фиброза через 24 недели после облучения [441,442]. Считается, что развитие легочного фиброза при воздействии радиации происходит в результате разрушения легочных эпителиальных и эндотелиальных клеток ионизирующим излучением, что приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, обеспечивающих приток макрофагов и лимфоцитов к очагу повреждения [170], а в восполнение популяции миофибробластов в случае воздействия радиации вносит свой вклад процесс ЭМП, в котором участвуют резидентные стромальные фибробласты, фиброциты из костного мозга и альвеоциты II порядка [443].

Гистологически модель радиационного фиброза характеризуется развитием субплевральных фибротических фокусов и повышенным отложением коллагена в областях спавшихся альвеолярных стенок [444]. Также присутствует воспалительная инфильтрация вокруг очагов фибротизированной ткани (Таблица 2). Характерной особенностью и преимуществом данной модели является тот факт, что ремоделирование легочных сосудов при радиационном повреждении в эксперименте хорошо воспроизводит ремоделирование сосудов при легочной гипертензии у людей [445]. К недостаткам данной модели относят ее длительность, необходимую материальную базу в виде источника ионизирующего излучения и защиты для персонала, и, как следствие, высокую стоимость данной модели (Таблица 2).

1.4.2.4 Легочный фиброз, индуцированный микрочастицами кремния

Введение частиц кремния в легкие мышей приводит к разрастанию соединительно-тканых волокон и формированию фибротических узелков вокруг кремниевых частиц, напоминающих кремниевый нодулярный фиброз, развивающийся у людей, которые в течение длительного времени контактировали с микрочастицами кремния (чаще всего в результате профессиональной деятельности).

Микрочастицы кремния могут вводиться множеством способов: в виде аэрозоля [446], интратрахеально [447] или с помощью орофарингеальной аспирации [448] (Таблица 2). Воспалительный ответ при попадании частиц кремния в легкие характеризуется низкой интенсивностью и высокой продолжительностью воспаления по причине инертной природы частиц и невозможности их элиминации из организма. Развитие фиброза при таком воспалении обусловлено увеличением продукции про-фибротических факторов роста и цитокинов, таких как PDGF, TGF- β , TNF- α и IL-10 [449].

Интересной особенностью данной модели является тот факт, что у мышей и крыс процесс фиброзирования протекает по-разному, несмотря на сопоставимый конечный результат [450]. У крыс кремний вызывает хроническое прогрессирующее воспаление, сопровождаемое повышенной продукцией TNF- α , что обуславливает эффективность противовоспалительной терапии в лечении легочного фиброза, индуцированного кремнием у крыс [450]. У мышей развитие кремниевого фиброза ассоциировано с малоинтенсивным и быстропроходящим воспалением, основную роль в котором играет повышенная продукция противовоспалительного цитокина IL-10, что обуславливает неэффективность противовоспалительной терапии на данной модели у мышей [450].

Длительность данной модели в значительной степени зависит от метода введения частиц кремния: при интратрахеальном введении развитие фиброза происходит в течение 2-4 недель, что делает модель более простой и дешевой для применения, в то время как при аэрозольном введении кремниевых частиц фиброз формируется значительно дольше (от 1 до 3 месяцев), однако более точно симулирует развитие силикоза и силикофиброза у людей (Таблица 2). Преимуществом данной модели является то, что частицы кремния не элиминируются из легких в течение продолжительного времени, следовательно, стимулирование процессов фиброзирования является постоянным (Таблица 2). К недостаткам относят длительность развития фиброза, низкую воспроизводимость, а также отсутствие некоторых характерных признаков легочного фиброза, присущих человеку, таких как местная гетерогенность и гиперпластические изменения альвеолярного эпителия, что ограничивает использование данной модели в доклинических испытаниях [451] (Таблица 2).

1.4.2.5 Легочный фиброз, индуцированный флюоресцин-5-изотиоцианатом

Флюоресцин-5-изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate, FITC) является химическим соединением, которое использовали еще в середине прошлого века для флуоресцентного мечения иммунизированной сыворотки [452]. В 90-х годах прошлого века было предложено использовать FITC для индукции легочного фиброза у грызунов [453]. При интратрахеальном введении FITC действует как гаптен, связываясь белками дыхательных путей и образуя длительно действующий воспалительный стимул, что в течении 2-3 недель приводит к развитию легочного фиброза [454]. Эта особенность FITC позволяет исследователям использовать иммунофлуоресценцию для обнаружения областей легких, пораженных фиброзом. При введении FITC происходит инфильтрация легочной ткани мононуклеарными клетками и нейтрофилами, сконцентрированная в основном вокруг респираторных бронхиол, сопровождающаяся отеком и гиперплазией эпителиальных клеток с последующим развитием фиброза (Таблица 2). Продолжительность этой модели делает ее подходящей для долговременных исследований терапевтической эффективности тех или иных препаратов в отношении уже развившегося фиброза.

Преимуществом данной модели является возможность ее постановки на мышах разных линий [454]. Другим преимуществом является то, что фибротический ответ при введении FITC более постоянен (по крайней мере на протяжении 6 месяцев от момента индукции) и не обладает самоограничивающимся характером, присущим блеомициновой модели (Таблица 2). Недостатком данной модели является сильная зависимость её воспроизводимости от различных технических аспектов, в том числе от качества FITC, которое может отличаться даже в разных поставках одного производителя. Другой проблемой является различный размер частиц FITC, которые формируются при озвучивании: небольшие размеры частиц могут привести к чрезмерной острой токсичности и преждевременной смерти животных [451]. Наконец, поскольку воздействие FITC не является частой причиной развития легочного фиброза у человека, возникают вопросы к клинической релевантности данной модели при поиске терапевтических средств для пациентов с фиброзом (Таблица 2).

1.4.2.6 Влияние используемых линий мышей на развитие экспериментального легочного фиброза

Большое влияние на развитие фиброза оказывает линия мышей, используемая в экспериментальной модели. Ранние работы показали, что мыши линии C57/Bl6 являются более склонными к развитию блеомицин-индуцированного фиброза, в то время как мыши линии Balb/C обладают резистентностью к данному заболеванию [460], в то время как при

использовании FITC более выраженное развитие фиброза наблюдается у мышей линии Balb/C [454]. На сегодняшний день трансгенные подходы создали животных с генетическими дефектами, делающими их более восприимчивыми к фиброзу, включая измененную экспрессию некоторых цитокинов [461], белков фибринолитических сигнальных путей [462], компонентов ВКМ [463,464] и тканевых протеиназ [465]. Подобные животные модели наиболее полезны для обнаружения биомаркеров, релевантных в отношении людей. Несмотря на то, что природа ОПЛ и легочного фиброза у человека недостаточно исследована, прогрессирование патологии и переход от острого легочного воспаления к фибротическому ремоделированию у экспериментальных животных более линейна и предсказуемы. Потому, простота индукции легочного фиброза в каждой конкретной модели, а также ее близость к человеческому заболеванию, будут определять актуальность модели в исследованиях легочного фиброза.

1.5. Прогностические маркеры острого повреждения и фиброза легких

В настоящее время научное сообщество пришло к соглашению, что идеальный биомаркер должен обладать следующими свойствами: 1) обладать прямой связью с патофизиологическими механизмами заболевания; 2) быть надежным и воспроизводимым; 3) быть специфичным и высоко чувствительным; 4) обнаруживаться с помощью простых и не инвазивных методов анализа; и 5) не иметь зависимости от цикла день/ночь [466].

Несмотря на большое количество потенциальных прогностических биомаркеров тяжести ОПЛ/ОРДС [467], включая биохимические и гематологические маркеры «цитокинового шторма» (ферритин, Д-димер, ЛДГ, С-реактивный белок, АлТ, соотношение нейтрофилов и лейкоцитов в периферической крови, СОЭ), прогнозирующие тяжесть инфекции SARS-CoV-2 [468], неутешительная статистика заболеваемости и смертности [469–471], а также явная неэффективность регуляторных механизмов, направленных на ограничение воспаления на местном уровне [472,473], указывает на необходимость поиска новых биомаркеров данной патологии. Идентификация и внедрение в клиническую практику данных биомаркеров позволило бы проводить раннюю диагностику случаев тяжелого ОПЛ/ОРДС и в результате уменьшить смертность пациентов с COVID-19-ассоциированной легочной недостаточностью в отделениях интенсивной терапии, а также снизить риск тяжелых осложнений, таких как легочный фиброз.

Одной из главных сложностей в идентификации и использовании биомаркеров ОПЛ/ОРДС является тот факт, что в основе различных фаз развития ОПЛ (экссудативной

и пролиферативной) лежат различные патофизиологические процессы, и, следовательно, разные молекулы будут являться оптимальными биомаркерами в зависимости от фазы воспаления. Более того, в недавних работах было показано, что в структуре ОПЛ присутствуют различные, так называемые «подтипы», которые отличаются друг от друга особенностями молекулярных процессов, лежащих в основе повреждения легких: в зависимости от первоначальной локализации повреждения, выделяют группы с прямым (эпителиальный тип) и непрямым (эндотелиальный тип) повреждением легких; в зависимости от интенсивности воспаления пациентов разделяют на группы с гипо- и гипервоспалительным процессом. Таким образом, для различных групп пациентов будут актуальны различные типы биомаркеров, что делает процесс идентификации и валидации данных биомаркеров более сложным [474].

В случае астмы для проведения успешной терапии и контроля заболевания требуется идентификация ключевых маркеров прогрессии и хронизации астмы. В настоящее время, признаками неблагоприятного течения заболевания считаются как клинические симптомы астмы, такие как прогрессирующее нарушение дыхания, тяжесть в груди, кашель, одышка, так и признаки фатальной астмы – предыдущие эпизоды тяжелых обострений астмы, пребывание в отделении интенсивной терапии и неконтролируемое прогрессирование заболевания [475]. Однако, несмотря на множество исследований, молекулярные маркеры прогрессии астмы, которые не зависят от клинических симптомов тяжелого течения астмы и отсутствуют в начале заболевания, все еще не идентифицированы. Поскольку подобные биомаркеры также могут быть использованы в качестве мишеней для ранней антифибротической терапии как у пациентов с БА, так и с другими заболеваниями, сопровождающиеся развитием легочного фиброза, идентификация таких биомаркеров остается актуальной и важной задачей.

В Таблице 3 приведены как уже установленные, так и потенциальные биомаркеры тяжести заболевания, смертности и прогноза для пациентов с ОПЛ и легочным фиброзом, обнаруженные с помощью анализа литературы.

Таблица 3. Используемые в клинической практике и потенциальные прогностические маркеры ОПЛ и легочного фиброза.

Патология легких	Биомаркер	Источник	Дизайн исследования	Возможное использование в клинике	Литература
ОПЛ (экссудативная фаза)	IL-6	Сыворотка	Мышиная модель; одноцентровое проспективное когортное исследование	Повышенная концентрация ассоциирована с ранними обострениями легочного фиброза и фатальной SARS-CoV-2-индуцированной пневмонией	[476–478]
	CXCL13	Сыворотка и плазма	Одноцентровое проспективное когортное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером высокой смертности при SARS-CoV-2-индуцированном ОПЛ и вероятностью госпитализации в отделение интенсивной терапии	[479,480]
	IL-8	Плазма	Многоцентровое рандомизированное клинические	Повышенная концентрация является маркером тяжести и высокой смертности у пациентов с ОПЛ	[481]
	IL-18	Периферическая кровь и плазма	Мышиная модель, одноцентровое рандомизированное исследование	Повышенная концентрация является маркером тяжести и смертности в отделении интенсивной терапии у пациентов с ОПЛ	[482]
	II-1 β	Бронхоальвеолярная жидкость	Одноцентровое обсервационное исследование	Повышенная концентрация коррелирует с повышенной смертностью в отделении интенсивной терапии	[483]
	TNF- α	Сыворотка, бронхоальвеолярная жидкость	Одноцентровое проспективное исследование	Высокая концентрация коррелирует с повышенной смертностью в отделении интенсивной терапии	[483]
	Белки сурфактанта А и D	Сыворотка	Одноцентровое обсервационное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером тяжелого течения SARS-CoV-2-индуцированного ОПЛ	[484]
	Кребс фон ден Лунген-6	Сыворотка	Мета-анализ литературы	Повышенная концентрация указывает на высокую вероятность тяжелого течения COVID-19	[485]
	Сосудисто-эндотелиальный фактор роста	Бронхоальвеолярная жидкость	Одноцентровые обсервационные и ретроспективные исследования	Повышенная концентрация является прогностическим маркером разрешения ОПЛ	[486,487]

ОПЛ (пролиферативная фаза)	Фактор роста кератиноцитов	Бронхоальвеолярная жидкость	Одноцентровое проспективное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером тяжелого течения и неблагоприятного исхода ОПЛ	[488]
	Активатор ингибитора плазминогена	Плазма	Многоцентровое проспективное наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером тяжести ОПЛ	[489]
	Тромбомодулин	Плазма	Многоцентровое проспективное наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером высокой смертности при ОПЛ в течение первых 90 дней после механической вентиляции легких	[490]
	Фактор роста гепатоцитов	Бронхоальвеолярная жидкость	Одноцентровое когортное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером развития ОПЛ	[491]
	Пентраксин-3	Мононуклеарные клетки из периферической крови	Одноцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером высокой смертности при COVID-19	[492]
	Тканевый ингибитор матричной металлопротеиназы -1	Сыворотка	Многоцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация ассоциирована с неблагоприятным исходом ОПЛ при наличии механической вентиляции	[493]
	Тенасцин-С	Бронхоальвеолярная жидкость	Одноцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером тяжелого течения SARS-CoV-2-индуцированного ОПЛ	[494]
	Матриксная металлопротеиназа-8	Бронхоальвеолярная жидкость	Одноцентровое наблюдательное и проспективное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером фатального течения ОПЛ	[495]
	Урокиназный активатор плазминогена	Плазма	Многоцентровое наблюдательное и проспективное исследование	Повышенная концентрация является диагностическим и прогностическим маркером тяжелого течения ОПЛ у пациентов в условиях механической вентиляции	[496]
	Дизентегрин и металлопротеиназа-8	Бронхоальвеолярная жидкость	Мышиная модель; одноцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером начала и тяжести течения ОПЛ	[497]

Легочный фиброз	Кребс фон ден Лунген-6	Плазма	Одноцентровое проспективное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим фактором обострений при легочном фиброзе	[498]
	Белок сурфактанта А	Плазма	Одноцентровое наблюдательное исследование	Низкая концентрация является прогностическим маркером эффективности антифибротической терапии	[499]
	Белок клеток Клара 16	Сыворотка	Одноцентровое ретроспективное лонгитюдное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером активного легочного фиброза у пациентов с системным склерозом	[500]
	Матриксная металлопротеиназа-1	Периферическая кровь, ткань легких	Одноцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация в периферической крови является диагностическим маркером легочного фиброза, дифференцируя его от других ИБЛ	[501]
	Матриксная металлопротеиназа-7	Сыворотка	Многоцентровое, проспективное, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование с двойным ослеплением	Повышенная концентрация в сыворотке является прогностическим маркером высокого риска ухудшения легочных функций при фиброзе легких	[502]
	Матриксная металлопротеиназа-9	Сыворотка	Многоцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером тяжелого течения и неблагоприятного исхода легочного фиброза	[503]
	Дизентегрин и металлопротеиназа-17	Мононуклеарные клетки периферической крови	Одноцентровое наблюдательное исследование	Повышенная экспрессия ассоциирована с более активным развитием и тяжестью заболевания	[504]
	Периостин	Сыворотка	Одноцентровое ретроспективное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером высокой смертности у пациентов с легочным фиброзом	[505]
	Циркулирующие фиброциты	Сыворотка	Одноцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером активности и высокой смертности при легочном фиброзе	[506,507]
	Остеопонтин	Сыворотка	Одноцентровое наблюдательное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером обострений при	[508]

легочном фиброзе				
Лизил оксидаза подобный фермент 2	Сыворотка	Одноцентровое обсервационное исследование	Повышенная концентрация является прогностическим маркером легочной гипертензии и неблагоприятного исхода заболевания при легочном фиброзе	[509]
Белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста	Сыворотка	Одноцентровое обсервационное исследование	Повышенная концентрация ассоциирована с неблагоприятным исходом у пациентов с легочным фиброзом, ассоциированным с системным склерозом	[510,511]

1.5.1 Биомаркеры ОПЛ

1.5.1.1 Экссудативная фаза

В экссудативной фазе ОПЛ повреждение легочной ткани является последствием сложных взаимодействий между воспалительными клетками, про- и противовоспалительными цитокинами, участниками коагуляционного каскада и структурами легких. Таким образом, поиск потенциальных новых биомаркеров целесообразно проводить среди провоспалительных цитокинов, поскольку они задействованы в развитии ОПЛ на самых ранних этапах и легко обнаруживаются во многих биологических средах. Множество исследователей сообщали в своих работах, что высокие уровни экспрессии таких провоспалительных цитокинов, как IL-6 [476,478,512], CXCL13 [479,513], IL-8 [481], IL-18 [482], TNF- α [483] и IL-1 β [483], ассоциированы с тяжестью и смертностью от COVID-19-ассоциированного ОПЛ и могут быть использованы для стратификации риска пациентов с ОПЛ (Таблица 3).

Другой категорией биомаркеров экссудативной фазы ОПЛ являются эпителиальные маркеры, такие как белковые молекулы сурфактанта [484], белок Кребс фон ден Лунген-6 [485], сосудисто-эндотелиальный фактор роста и фактор роста кератиноцитов, которые обладают как маркерной, так и прогностической функцией [487,514] (Таблица 3). Кроме того, было показано, что компоненты системы коагуляции/фибринолиза, такие как ингибитор активатора плазминогена-1 [515] и активатор антикоагуляционного белка С тромбомодулин [490], ассоциированы с увеличением общей смертности и ухудшением прогноза у тяжело больных пациентов с ОПЛ (Таблица 3).

1.5.1.2 Проллиферативная фаза

Во второй стадии ОПЛ происходит пролиферация эпителиальных и эндотелиальных клеток с последующим восстановлением ткани легких. Через несколько дней после начала ОПЛ, отечная жидкость в альвеолах резорбируется, тяжесть воспалительного ответа уменьшается, альвеолоциты II типа начинают дифференцироваться в альвеолоциты I типа, а вновь синтезированные коллагеновые волокна стимулируют клеточную миграцию [516]. Степень пролиферации и дифференцировки альвеолярных эпителиальных клеток коррелирует с уровнем фактора роста гепатоцитов, который оказывает митогенное действие на альвеолоциты II типа и повышенная концентрация которого ассоциирована с ухудшением прогноза для пациентов с ОПЛ [517] (Таблица 3). Более того, регуляторы ВКМ могут быть использованы в качестве маркеров пролиферативной фазы ОПЛ: повышенный уровень экспрессии генов, ответственных за регуляцию ВКМ (PTX3 [492,518], TIMP1 [493], TNC

[494], MMP8 [495], PLAUR [519], ADAM8 [497]), ассоциирован с высокой тяжестью и быстрой прогрессией ОПЛ различной этиологии, включая COVID-19 (Таблица 3).

1.5.2 Биомаркеры легочного фиброза

Несмотря на множество исследований, в настоящее время не существует надежных и точных прогностических маркеров развития легочного фиброза: возраст, пол, статус курильщика, индекс массы тела и наличие легочной гипертензии являются прогностическими маркерами выживания и исхода легочного фиброза, но не скорости снижения легочной функции [520]. Понимание комплексных и взаимосвязанных молекулярных механизмов инициации и прогрессирования легочного фиброза сделало возможным идентификацию биомаркеров данного заболевания в сыворотке крови и ткани легких для различных целей, таких как выявление пациентов, склонных к развитию легочного фиброза; диагностика легочного фиброза; предсказание прогрессирования и тяжелого течения заболевания; оценка эффективности терапевтических подходов [521]. Учитывая вышесказанное, было предложено использовать следующие потенциальные биомаркеры легочного фиброза (Таблица 3).

Белок *Кребс фон ден Лунген-6* (*Krebs von den Lungen-6, KL-6*) – гликопротеин с высоким молекулярным весом, который является компонентом слизи и экспрессируется на поверхности альвеолоцитов II типа и бронхиальных эпителиальных клеток [522]. Было предложено использовать данный белок в качестве биомаркера как ОПЛ/ОРДС, так и легочного фиброза, поскольку повреждение альвеолоцитов II типа является ключевым моментом в патогенезе обоих заболеваний (Таблица 3). Данный факт ограничивает диагностические возможности данного биомаркера из-за низкой специфичности, однако в ряде работ был описан его прогностический потенциал в отношении легочного фиброза [498,523].

Белки сурфактанта (*surfactant proteins, SPs*) являются липопротеиновыми компонентами сурфактанта и могут быть рассмотрены в качестве потенциальных биомаркеров ОПЛ/ОРДС и легочного фиброза. Содержание SP-A и SP-D, которые отличаются последовательностью аминокислот и функциями, было повышено в сыворотке крови пациентов с легочным фиброзом, однако данный биомаркер не обладал способностью дифференцировать легочный фиброз различной этиологии [524]. Кроме того, SP-D оказался более чувствительным, но менее специфичным биомаркером по сравнению с KL-6 [525]. В недавних исследованиях было высказано предположение использовать концентрацию SP-A в сыворотке крови больных с фиброзом в качестве маркера эффективности антифибротической терапии [499] (Таблица 3).

Клетки Клара принадлежат к классу многофункциональных клеток, расположенных в терминальных бронхиолах и секретирующих белок клеток Клара (*Clara cell protein, CC16*), который обладает мощными защитными, иммуносупрессивными и противовоспалительными функциями [526]. По данным литературы, концентрация CC16 в сыворотке крови была повышена при ряде заболеваний легких, в том числе при легочном фиброзе, саркоидозе и остром повреждении легких [500,527] (Таблица 3).

Матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMPs) и их ингибиторы (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs) участвуют в процессе деградации ВКМ, воспалении и регуляции функционирования факторов роста во множестве органов, включая легкие, а MMP8, MMP9 и TIMP1 являются самыми перспективными потенциальными диагностическими биомаркерами легочного фиброза [503] (Таблица 3). Другим возможным биомаркером, сопряженным с функциями MMPs и TIMPs, являются фрагменты коллагеновых волокон, образующиеся в результате функционирования MMPs и поступающие в системный кровоток. Например, высокая концентрация коллагенов I и III была ассоциирована с повышенным риском прогрессирования легочного фиброза по сравнению с пациентами с низкой концентрацией данных белков [528].

Дизинтегрины и металлопротеиназы (a disintegrin and metalloproteinases, ADAMs) – это группа многофункциональных мембранных белков, выполняющих различные функции в легких, включая деградацию коллагена, и вовлеченных во множество процессов, ассоциированных с болезнями легких, таких как пролиферация гладкомышечных клеток сосудов, миграция и апоптоз, регенерация ткани и wound healing [529]. Исследований по использованию этих молекул в качестве биомаркеров немного. ADAM17 может использоваться в качестве диагностического и прогностического биомаркера легочного фиброза [504], в то время как концентрация ADAM33 была повышена в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с саркоидозом и демонстрировала обратную корреляцию с функцией легких и их диффузионной способностью, однако никаких отличий в ферментативной активности ADAM33 у здоровых людей и пациентов с саркоидозом не наблюдалось [530] (Таблица 3).

Периостин является секретируемым матриклеточным белком, участвующим в регенерации ткани, развитии новообразований, легочных и аллергических заболеваниях. Также периостин стимулирует отложение компонентов ВКМ и пролиферацию мезенхимальных клеток, что приводит к развитию фиброза в легких и других внутренних органах [531]. Повышенная концентрация периостина в сыворотке крови прямо коррелирует со скоростью нарушения легочных функций у пациентов с легочным

фиброзом [532]. Однако, концентрация периостина в сыворотке крови может быть повышена при множестве воспалительных заболеваний, снижая специфичность данного биомаркера в отношении легочного фиброза (Таблица 3).

Циркулирующие фиброциты – мезенхимальные клетки, происходящие из костного мозга и описанные в рамках данного обзора выше – быстро мигрируют из костного мозга к месту повреждения через системный кровоток. Некоторыми исследователями была обнаружена связь между увеличенным числом циркулирующих фиброцитов и ухудшением прогноза выживаемости, отрицательной динамикой форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и диффузионной способности легких у пациентов с легочным фиброзом [506] (Таблица 3). В недавнем исследовании было показано, что повышенное количество циркулирующих фиброцитов прямо коррелировало с числом обострений и последующей смертностью у пациентов с легочным фиброзом аутоиммунной этиологии [507].

Остеопонтин является секретлируемым фосфопротеином, изначально обнаруженным в остеобластах и остеокластах, где он вовлечен в широкий спектр биологических процессов, включая рекрутирование, адгезию и выживание клеток, регуляцию иммунных процессов и wound healing [530]. В легких, остеопонтин, продуцируемый бронхиальными эпителиальными клетками и альвеолярными макрофагами, играет важную роль во множестве легочных заболеваний, включая туберкулез и рак легких [533]. В недавних исследованиях было показано, что повышенная концентрация остеопонтина в сыворотке крови была ассоциирована с более частыми обострениями легочного фиброза и, как результат, повышенной смертностью данной группы пациентов по сравнению с пациентами с низкими сывороточными концентрациями остеопонтина и стабильным легочным фиброзом [508] (Таблица 3).

Лизил оксидаза-подобный фермент 2 (lysyl oxidase-like 2, LOXL 2) это медь-зависимая амин оксидаза, секретлируемая активированными фибробластами и стимулирующая синтез коллагена и ремоделирование ВКМ [534]. При легочном фиброзе, LOXL 2 стимулирует фиброгенез через периостиновый сигналинг независимо от сигнального пути TGF- β [535]. Более того, высокая концентрация LOXL 2 в сыворотке крови прямо коррелировала с ухудшением прогноза у пациентов с легочным фиброзом и легочной гипертензией [509] (Таблица 3).

Белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor binding proteins, IGFbps), функционируют в качестве транспортных белков, регулируя и модулируя функционирование и клиренс инсулиноподобного фактора роста (*insulin-like growth factor, IGF*) [536]. Однако, большинство IGFbps вовлечены в несколько

биологических процессов, независимых от IGF. При развитии легочного фиброза IGFБPs задействованы в активации фибробластов, их дифференцировке в миофибробласты и аномальном синтезе компонентов ВКМ [537]. По данным литературы, повышенные концентрации IGFБP-1 и -2 были обнаружены в сыворотке крови пациентов с легочным фиброзом [510] и обратно коррелировали с легочным фиброзом, ассоциированным с системным склерозом [511] (Таблица 3).

1.6. Терапевтические подходы к блокированию перехода острого воспаления в фиброз легких

1.6.1 Препараты, одобренные для терапии фиброза

В настоящее время для терапии легочного фиброза доступно два препарата: пирфенидон и нинтеданиб. Пирфенидон – препарат, принадлежащий к классу пиридинов – оказывает выраженный противовоспалительный, антиоксидантный и антифибротический эффект путем регуляции нескольких ключевых про-фибротических молекул, таких как TGF- β , PDGF, а также путем прямого изменения уровня экспрессии коллагена [538]. Клинические исследования показали, что пирфенидон улучшает динамику снижения фЖЕЛ у пациентов с легочным фиброзом [539,540]. Ингибитор тирозинкиназы нинтеданиб оказывает подавляющее воздействие на пролиферацию и дифференцировку фибробластов [541,542]. Клинические исследования II и III фазы описывают значительное улучшение функционирования легких у пациентов с фиброзом, получавших терапию нинтеданибом. Нинтеданиб также эффективен у пациентов в продвинутой стадии заболевания, он достаточно безопасен и обладает приемлемым профилем толерантности [543,544].

1.6.2 Препараты для терапии фиброза, находящиеся во II и III фазе клинических испытаний

Ответ пациентов на антифибротическую терапию нинтеданибом и пирфенидоном может быть неоднозначным, с наличием побочных эффектов, ограничивающих их широкое применение, что объясняет необходимость поиска новых средств терапии легочного фиброза. В настоящее время несколько потенциальных препаратов уже проходят II и III фазы клинических испытаний.

PRM-151 – рекомбинантный человеческий аналог пентраксина-2 (pentraxin-2, РТХ-2). РТХ-2, также известный как амилоид сыворотки Р, является циркулирующим протеином, который связывается с моноцитами, ингибирует их пролиферацию в про-фибротические фиброциты и продуцирующие TGF- β макрофаги, и, таким образом, стимулирует регенерацию эпителия и способствует разрешению фиброза [545,546]. У пациентов с легочным фиброзом наблюдаются низкие уровни РТХ-2, а его

рекомбинантный человеческий аналог (PRM-151) ингибирует развитие легочного фиброза в блеомицин-индуцированной и TGF- β -экспрессирующей животной модели [379]. В клинических исследованиях была показана тенденция к улучшению динамики фЖЕЛ у пациентов с легочным фиброзом при терапии PRM-151 [547].

Памревлумаб – антагонист фактора роста соединительной ткани (connective tissue growth factor, CTGF). CTGF обычно слабо экспрессируется у здоровых людей, однако повышение его экспрессии приводит к усилению синтеза TGF- β , отложению компонентов ВКМ и подавлению его деградации путем ингибирования металлопротеиназ [548]. Данные эффекты CTGF оказывают значительное про-фибротическое действие при развитии легочного фиброза, а повышенные уровни CTGF наблюдаются в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с легочным фиброзом [549,550]. При проведении клинических испытаний антагонист CTGF памревлумаб значительно замедлял динамику снижения легочных функций у пациентов с легочным фиброзом [551]. В настоящее время идет подготовка к запуску исследований III фазы данного препарата.

PBI-4050 является аналогом жирных кислот средней длины, обладает сродством к рецепторам G-протеина и ингибирует множество путей, задействованных в развитии легочного фиброза, включая ингибирование стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР), продукции ROS, процесса ЭМП, а также дифференциации, пролиферации и миграции фиброцитов/фибробластов [552]. В клинике наблюдалось значительное улучшение динамики фЖЕЛ у пациентов с легочным фиброзом при комбинированной терапии PBI-4050 и пирфенидоном, что предполагает возможные синергетические взаимодействия между данными препаратами [553].

GLPG1690 – селективный ингибитор аутоаксина и лизофосфатидной кислоты (ЛФК). Фермент аутоаксин играет важную роль в апоптозе эпителиальных клеток путем регуляции синтеза биоактивной ЛФК [554]. Показано, что у больных легочным фиброзом уровни ЛФК и аутоаксина увеличены в бронхоальвеолярной жидкости и конденсате выдыхаемого воздуха, что свидетельствует о возможной роли аутоаксинового пути при развитии данного заболевания [555]. При проведении клинических исследований GLPG1690, селективного ингибитора аутоаксина и ЛФК, была продемонстрирована безопасность данного препарата и тенденция к улучшению динамики снижения фЖЕЛ у пациентов с легочным фиброзом [556]. В настоящее время планируется III фаза клинических испытаний.

1.6.3 Потенциал ген-направленной терапии легочного фиброза

Несмотря на многообещающие результаты клинических испытаний, приведенных выше препаратов, они всего лишь замедляют функциональную деградацию легких при

фиброзе. Поэтому необходимы более эффективные способы терапии, не только замедляющие, но и предотвращающие развитие легочного фиброза, а также способствующие «обратному развитию» уже сформированного фиброза. Введение специфических инструментов ген-направленной терапии в клетку дает возможность воздействовать на те молекулярные мишени, которые до этого считались «неприкосновенными». Ниже приведены примеры исследований по действию ген-направленных препаратов на мышинных моделях легочного фиброза.

Существует несколько основных подходов к ген-направленной терапии фиброза: 1) восстановление или повышение экспрессии гена и 2) подавление экспрессии гена с помощью РНК-интерференции [557,558].

1.6.3.1 Повышение экспрессии гена

В одном из исследований по терапии легочного фиброза путем усиления экспрессии гена, использовали плазмидные ДНК (пДНК), кодирующие марганцевую супероксиддисмутазу (MnSOD) или медно-цинковую супероксиддисмутазу (Cu/ZnSOD) [558]. Данные последовательности, доставляемые в организм лабораторного животного либо лентивирусными векторами, либо наночастицами путем интратрахеального введения, повышали экспрессию гена SOD, что приводило к уменьшению тяжести и замедлению развития легочного фиброза, индуцированного радиацией [559,560].

В другом исследовании было обнаружено, что развитие блеомицин-индуцированного фиброза у мышей частично подавлялось повышением экспрессии гена Smad7 путем введения рекомбинантных аденовирусных векторов, нагруженных кДНК Smad7 с цитомегаловирусным промоутером AdCMV-Smad7. Smad7, одна из ингибиторных молекул Smad, является негативным регулятором сигналинга TGF- β [561]. По механизму отрицательной обратной связи, Smad7 ингибирует сигналинг TGF- β путем конкуренции за рецептор TGF- β 1, блокируя фосфорилирование и активацию Smad2 и, таким образом, предотвращая развитие легочного фиброза [562].

В еще одной работе аденовирусные вектора нагружали кДНК мышинового урокиназного активатора плазминогена (Plaur) и стоп-последовательностью бычьего гормона роста [563]. Повышение уровня экспрессии Plaur приводило к повышению активности системы фибринолиза и, как следствие, снижению отложения коллагена. Однако, в самой фибротической ткани экспрессии Plaur не наблюдали, что свидетельствует о том, что данная терапия подавляет развитие и прогрессирование фиброза, но не стимулирует разрушение уже существующего коллагена.

В более поздней работе было достигнуто частичное восстановление нормальной архитектуры легких путем повышения экспрессии теломеразной обратной транскриптазы

(Tert). Введение аденовирусных векторов с 3'-нетранслируемым регионом гена Tert восстанавливало регенераторный потенциал легких, предотвращало повреждение ДНК клеток легких, а также их старение и апоптоз, восстанавливало активность синтеза сурфактанта, стимулировало пролиферацию альвеолоцитов II типа и предотвращало развитие блеомицин-индуцированного легочного фиброза [564].

1.6.3.2 Подавление экспрессии гена

Подавление экспрессии IL-13R α 2, рецептора IL-13, являющегося частью сигнального пути TGF- β , с помощью малой интерферирующей РНК (small interfering RNA, siRNA) к IL-13R α 2, загруженной в HVJ вирусный вектор, приводило к подавлению развития блеомицин-индуцированного фиброза у мышей и замедлению скорости отложения коллагена в легких [565].

NADPH оксидаза-4 (NOX4) является ключевым регулятором активации и дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Подавление экспрессии NOX-4 путем внутривенного введения siRNA в модифицированных мицеллах, таргетных к фибробластам и миофибробластам, приводило к апоптозу и подавлению активации данных клеток, менее выраженному отложению коллагена и компонентов ВКМ, а также восстановлению функции легких на модели блеомицин-индуцированного легочного фиброза [566].

Smad3 является одним из ключевых белков сигнального пути TGF- β и участвует в развитии легочного фиброза. Показано, что у Smad3-дефицитных мышей блеомицин-индуцированный легочной фиброз развивается значительно медленней, чем у мышей с базальным уровнем экспрессии Smad3 [567]. Введение малой шпилечной РНК (small hairpin RNA, shRNA), загруженной в аденовирусный вектор, приводило к подавлению экспрессии Smad3 в клетках L929. На мышинной модели паракват-индуцированного легочного фиброза подавление экспрессии Smad3 приводило к уменьшению скорости отложения коллагена и предотвращало развитие легочного фиброза [568].

Кроме того, относительно недавно были разработаны терапевтические подходы по использованию сразу нескольких siRNA для подавления множества сигнальных путей, задействованных в развитии фиброза легких. Например, в исследовании Garbuzenko et al. было продемонстрировано, что совместное введение модифицированных наночастиц с siRNA, специфичной к Mmp3, Ccl12 и Hif1a, более эффективно предотвращало развитие блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей по сравнению с монотерапией наночастицами или siRNA, направленной какому-либо одному гену [569].

Таким образом, в настоящее время прорабатывается несколько подходов к ген-направленной терапии легочного фиброза. Однако, все вышеупомянутые потенциальные

средства для терапии фиброза лишь замедляют прогрессию данного заболевания, не предотвращая его развитие и не вызывая разрушение уже сформировавшейся соединительной ткани. На сегодняшний день наиболее оптимальной стратегией представляется профилактика развития данного заболевания на этапе острых воспалительных изменений в легких, что обуславливает актуальность поиска потенциальных генов-мишеней, задействованных в развитии фиброза еще на этапе предшествующего острого воспаления.

1.7 Заключение

Несмотря на то, что за последние несколько лет был накоплен значительный объем знаний касательно патофизиологии легочного фиброза, предшествующего ему острого воспаления легких и потенциальных средств терапии данных патологий, остановить прогрессирование фибротических изменений в легких все еще не представляется возможным. Различные новые терапевтические подходы, в том числе ген-направленная терапия, успешно подавляют процессы фибротизации легких на животных моделях, в том числе ингибируя дифференцировку фибробластов, синтез компонентов ВКМ, процесс ЭМП и многие другие, задействованные в процессе фиброобразования сигнальные пути.

Однако, на сегодняшний день ввиду отсутствия терапевтического подхода, способного обеспечить полное излечение пациентов с легочным фиброзом, имеется большое количество вопросов, на которые пока нет ответа. Какие биомаркеры использовать для диагностики и прогнозирования развития легочного фиброза в период острых воспалительных изменений? Каким образом уменьшить количество уже депонированных компонентов ВКМ в паренхиме легких? Как минимизировать побочные эффекты и обеспечить высокое качество жизни пациентов с легочным фиброзом в случае продолжительной терапии? Ответы на данные вопросы может дать поиск и идентификация новых молекулярных маркеров и терапевтических мишеней легочного фиброза как среди уже известных про- и антифибротических молекул, так и среди молекул, не рассматриваемых ранее в качестве регуляторов данного патологического процесса. Следует отметить, что существует большая вероятность того, что эффективная терапия фиброза потребует одновременного воздействия на несколько фибротических сигнальных путей, учитывая сложный патогенез данного заболевания, и идентификация новых генов, играющих регуляторную роль в данном процессе, будет несомненно занимать одну из ведущих позиций в поиске новых диагностических и терапевтических подходов в случае легочного фиброза.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы и препараты

В данной работе использовали липополисахарид (055:B5, Sigma-Aldrich, США), овалбумин (A5503, Sigma-Aldrich, США), полусинтетическое производное 18-βН глицерретовой кислоты солоксолон метил (синтезирован, охарактеризован и любезно предоставлен к.х.н. Саломатиной О.В. и д.х.н. проф. Салахутдиновым Н.Ф., НИОХ СО РАН им. Н.Н. Ворожцова, Россия), дексаметазон (BML-EI126-0001, Enzo Life Sciences, США), гидроксид алюминия (239186, Sigma-Aldrich, США), реагент TRIzol (Ambion, США), изофлуран (5AGG9621, Вахтер, США), лизирующую матрицу D (MP Biomedicals, США), диметилсульфоксид, кунжутное масло, 0,9% раствор NaCl, 10% забуференный формалин (BioVitrum, Россия), парафин HISTOMIX (BioVitrum, Россия), гематоксилин Майера (HK-G0-DL01, BioVitrum, Россия), раствор эозина водный (HK-EV-AL01, BioVitrum, Россия), азур-эозин по Романовскому (05-028, BioVitrum, Россия), реактив Шиффа (05-022, BioVitrum, Россия), раствор пикрофуксина по Ван Гизону (05-012, BioVitrum, Россия), набор для окраски по Массону с анилиновым синим (21-042/L, Biovitrum, Россия), наборы для проведения иммуноферментного анализа для определения концентрации IL-6 и TNF-α (Thermo Fisher Scientific, США), систему для детекции HRP/DAB, специфичную для мышей и кроликов (ab236466, Abcam, США), моноклональные антитела к TNF-α (ab212899, Abcam, США), Муca5ac (ab3649, Abcam, США), фибронектину Fn1 (PA5-29578, Thermo Fisher Scientific, США), гладкомышечному актину α-SMA (ab5694, Abcam, США), коллагену I типа Col1 (MA1-26771, Thermo Fisher Scientific, США), коллагену IV типа Col4 (MA1-22148, Thermo Fisher Scientific, США), ферменты ДНК-полимераза Таq, обратная транскриптаза M-MuLV-RH, мастер-миксы HS-qPCR (2×) и HS-qPCR SYBR Blue (2×) (все реагенты от Биолабмикс, Россия).

2.1.2 Оборудование

В работе использовали амплификатор C1000 Touch с блоком CFX96 (BioRad, США), шейкер ST-3M (ELMI Ltd, Латвия), спектрофотометр Multiscan RC (Thermo Labsystems, Финляндия), микроскоп AxioStar plus с камерой AxioCam MRc5 (ZEISS, Германия), микротом Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США), систему анестезии с одним выходом (изофлуран) (21100, Ugo Basile, Италия), ингаляционную камеру для мелких грызунов (21100-790, Ugo Basile, Италия), термостат Гном (ДНК-Технология, Россия), центрифугу 5415 R Eppendorf (Eppendorf, Германия), небулайзер Omron NE-C28 Plus (Omron Healthcare Co., Ltd., Япония), гомогенизатор FastPrep-24TM 5G с адаптером QuickPrep 24 MP Biomedicals, США), установку для очистки воды MilliQ

	Probe	5'-((5,6)-FAM)-CCCAACCGAGACCTCTTGCTCC-3'-BHQ1
	Reverse	5'-ACCACTGTCTTTGAGGCTTG-3'
<i>Spp1</i>	Forward	5'-CTACGACCATGAGATTGGCAG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-AATCAGTCACTTTCACCGGGAGGG-3'-BHQ1
	Reverse	5'-TCTTCAGAGGACACAGCATTC-3'
<i>Muc5b</i>	Forward	5'-TGCCTATCAAAGTGTGGGAC-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-CTCGTAGTGGAAAGTGGCAAGGCT-3'-BHQ1
	Reverse	5'-GAGCACGGAGGTACAGTTATC-3'
<i>Ccr3</i>	Forward	5'-AAAGGACTTAGCAAAATTCACCAG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-CACACCCTATGAATATGAGTGGGCACC-3'-BHQ1
	Reverse	5'-AGTACAGTGGAGGCAGGAG-3'
<i>C3ar1</i>	Forward	5'-TTGGTCTCACTTGTCTATTGGG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-ACCAGCCCATTGCCTAGCAGT-3'-BHQ1
	Reverse	5'-TCTTCATCTTTACGCCAGCTAC-3'
<i>Muc5ac</i>	Forward	5'-GAGTGACAGCAAGATGGAGG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-CCCACAAAAGCACCAGGCCAAT-3'-BHQ1
	Reverse	5'-TCATCAAAGTTCCCACACAGG-3'
<i>Colla1</i>	Forward	5'-AGTTGGTGCTAAGGGTGAAG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-CTCTGAAGGTCCCCAGGGTGTG-3'-BHQ1
	Reverse	5'-TTTAGCGCCAGGTTGTCC-3'
<i>Col4a1</i>	Forward	5'-CAGGTTTGACAGGTGAAGTTG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-AAAGGTCAGAAAGGAGAGAGCTGCC-3'-BHQ1
	Reverse	5'-CTTTAGCCCCAGGTTGTCC-3'
<i>Col4a2</i>	Forward	5'-ACGGACAGAAGGGTGAAAAG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-ACATAGGACAGCCAGGACCCAAC-3'-BHQ1
	Reverse	5'-ACAAGTGTGATGTCAGATGGG-3'
<i>Thbs2</i>	Forward	5'-TGGAATCGGAGATGCTTGTG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-CCTTCTCATCGCTCACACCGTCATT-3'-BHQ1
	Reverse	5'-GTCTCCAACCTCATCCTTGTG-3'
<i>Il-6</i>	Forward	5'-AAACCGCTATGAAGTTCCTCTC-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-TTGTCACCAGCATCAGTCCCAAGA-3'-BHQ1
	Reverse	5'-GTGGTATCCTCTGTGAAGTCTC-3'
<i>Ccl2</i>	Forward	5'-TCCACTACCTTTTCCACAACC-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-AAGGCATCACAGTCCGAGTCACAC-3'-BHQ1
	Reverse	5'-GGATCCACACCTTGCATTTAAG-3'
<i>Catalase</i>	Forward	5'-TTCCATCCTTTATCCATAGCCAG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-ACTCCAGAAGTCCAGACCATGTCA-3'-BHQ1
	Reverse	5'-GAATCCCTCGGTCACTGAAC-3'
<i>Serpine1</i>	Forward	5'-ACACACAGCCAACCACAG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-ACAGCCAACAAGAGCCAATCACAAG-3'-BHQ1
	Reverse	5'-TCCCAGAGACCAGAACCAG-3'
<i>Elastin</i>	Forward	5'-CTTATAAAGCTGCCGCCAAA-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-ACTCCGCCAACTCCAACACCA-3'-BHQ1
	Reverse	5'-ACTCCACCAACTCCAACAC-3'
<i>Ptx3</i>	Forward	5'-AGCAAATTCGCCTCTCCAG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-AAGCAGGATCGCAGGGAGGTG-3'-BHQ1
	Reverse	5'-GTCCATTGTCTATTTTCGTTGTCC-3'
<i>Socs3</i>	Forward	5'-CCTATGAGAAAGTGACCCAGC-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-CCCCTCTGACCCTTTTGCTCCTT-3'-BHQ1
	Reverse	5'-TTTGTGCTTGTGCCATGTG-3'
<i>Mmp8</i>	Forward	5'-CATATCTCTGTTCTGGCCCTTC-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-TACCCAACGGTCTTCAGGCTGC-3'-BHQ1
	Reverse	5'-CAGGTCATAGCCACTTAGAGC-3'

<i>Rsad2</i>	Forward	5'-TGGATGTTGGCGTGGAAG-3'
	Probe	5'- ((5,6)-FAM)-TCTGAAGCGTGGCGGAAAGTATGT-3'-BHQ1
	Reverse	5'-CTGTAGCTGGTCGGAGTTTC-3'
<i>Rtp4</i>	Forward	5'-GTTCCCGCATGACTTCAGTAC-3'
	Probe	5'- ((5,6)-FAM)-TTGGCAGGTTCCAGTGTTCAGAT-3'-BHQ1
	Reverse	5'-CTGAGCAGAGGTCCAACCTTC-3'
<i>Ifi44</i>	Forward	5'-GAACTATACCCATGACCCACTG-3'
	Probe	5'- ((5,6)-FAM)-CCACCAGCTCAGAAGAGTGCATTTCA-3'-BHQ1
	Reverse	5'-GTAATCAGATCCAGGCTATCCAC-3'
<i>Saa1</i>	Forward	5'-CAGGATGAAGCTACTCACCAG-3'
	Probe	5'- ((5,6)-FAM)-CATTTGTTTCACGAGGCTTTCCAAGGG-3'-BHQ1
	Reverse	5'-CTTCATGTCAGTGTAGGCTCG-3'
<i>Hprt</i>	Forward	5'-CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC-3'
	Probe	5'- ((5,6)-ROX)-CTTGCTGGTGAAAAGGACCT-3'-BHQ2
	Reverse	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCC-3'
<i>Tnf-α</i>	Forward	5'-TCAGCCTCTTCTCATTCCTG-3'
	Reverse	5'-TGAAGAGAACCTGGGAGTAG-3'
<i>Il-1β</i>	Forward	5'-TGCAGAGTTCCCCAACTGGTACAT-3'
	Reverse	5'-GTGCTGCCTAATGTCCCCTTGAAT-3'
<i>Gapdh</i>	Forward	5'-AAGAGAGGCCCTATCCCAAC-3'
	Reverse	5'-GCAGCGAACTTTATTGATGG-3'

2.1.4 Буферы и растворы

В работе использовали буфер хранения, 5 \times ОТ буфер, HS-qPCR (2 \times), HS-qPCR SYBR Blue (2 \times). Составы буферов и растворов приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Состав буферов и растворов, использованных в работе.

Название буфера/раствора		Состав буфера/раствора
Буфер хранения		50мМ Трис-НСl, рН 8,0 (при 25 °С), 100мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 0,1% (v/v) NP-40
5 \times ОТ буфер		250 мМ Трис-НСl, рН 8,3 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl ₂ , 2,5 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 50 мМ дитиотреитол, стабилизаторы и усилители
HS-qPCR (2 \times)		100 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 100 мМ KCl, 0,4 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 10 мМ MgCl ₂ , 0,1 ед.акт/мкл HS-Тaq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы Тaq ДНК-полимеразы
HS-qPCR Blue (2 \times)	SYBR	100 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 100 мМ KCl, 0,4 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 3мМ MgCl ₂ , 0,06 ед.акт/мкл Тaq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы HS-Тaq ДНК-полимеразы, SYBR Green I и инертный краситель

2.1.5 Лабораторные животные

В работе использовали мышей линии Balb/C со средним весом 22-24 грамма разведения вивария ИХБФМ СО РАН. Мыши содержались в пластиковых клетках (по 5 животных в клетке) со стандартным 12 ч циклом день/ночь (с 9 до 21 – день; с 21 до 9 –

ночь), регулируемым в условиях вивария автоматически. Животные имели свободный доступ к еде и воде. Все эксперименты были проведены в соответствии с нормами обращения с животными, изложенными в Директиве Европейского Парламента и Совета ЕС от 22 сентября 2010 г. и “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г.). Все эксперименты на животных одобрены межинститутской Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 51 от 23.05.2019 г. и протокол № 56 от 10.08.2019 г.).

2.2 Методы

2.2.1 Биоинформатический анализ

2.2.1.1 Анализ наборов данных в базе данных *Gene Expression Omnibus*

Все наборы данных, касающиеся *острого повреждения легких* [GSE58654 (ткань легких, 3 здоровых мыши, 3 мыши с гипероксическим ОПЛ); GSE130936 (ткань легких, 3 здоровых мыши, 4 мыши с ЛПС-индуцированным ОПЛ); GSE80011 (ткань легких, 3 здоровых мыши, 3 мыши с ОПЛ, индуцированным вирусом гриппа); GSE94522 (ткань легких, 3 здоровых мыши, 3 мыши с блеомицин-индуцированным ОПЛ); GSE21802 (периферическая кровь, 4 здоровых донора, 6 пациентов с гриппозной пневмонией); GSE20346 (периферическая кровь, 18 здоровых доноров, 6 пациентов с бактериальной пневмонией, 4 пациента с вирусной пневмонией); GSE40012 (периферическая кровь, 18 здоровых доноров, 16 пациентов с бактериальной пневмонией); GSE76293 (полиморфноядерные нейтрофилы крови, 10 здоровых доноров, 12 пациентов с ОРДС)], *острой астмы* [GSE27066 (ткань легких, 4 здоровых мыши, 4 мыши с ОВА-индуцированной астмой); GSE41665 (ткань легких, 8 здоровых мышцей, 6 мышцей с ОВА-индуцированной астмой); GSE116504 (ткань бронхов, 4 здоровых мыши, 4 мыши с ОВА-индуцированной астмой); GSE122197 (ткань легких, 7 здоровых мышцей, 8 мышцей с ОВА-индуцированной астмой); GSE50176 (ткань легких, 4 здоровых мыши, 6 мышцей с астмой, индуцированной углеродными нанотрубками)], *блеомицин-индуцированного фиброза* [GSE8553 (ткань легких, 6 здоровых мышцей, 4 мыши с фиброзом); GSE25640 (ткань легких, 3 здоровых мыши, 3 мыши с фиброзом); GSE37635 (ткань легких, 7 здоровых мышцей, 6 мышцей с фиброзом)] и *хронических заболеваний легких* [GSE53845 (ткань легких, 8 здоровых доноров, 11 пациентов с ИЛФ); GSE24206 (ткань легких, 6 здоровых доноров, 8 пациентов с ИЛФ); GSE72073 (ткань легких, 3 здоровых донора, 5 пациентов с ИЛФ); GSE33566 (периферическая кровь, 30 здоровых доноров, 93 пациента с ИЛФ); GSE103174 (ткань легких, 16 здоровых доноров, 37 пациентов с ХОБЛ); GSE76925 (ткань легких, 40 здоровых доноров, 111 пациентов с ХОБЛ); GSE47460 (ткань легких, 91

здоровый донор, 145 пациентов с ХОБЛ); GSE8581 (ткань легких, 19 здоровых доноров, 16 пациентов с ХОБЛ); GSE29133 (альвеолоциты II типа, 3 здоровых донора, 3 пациента с ХОБЛ); GSE100153 (периферическая кровь, 24 здоровых донора, 17 пациентов с ХОБЛ); GSE55962 (лейкоциты из периферической крови, 82 здоровых донора, 22 пациента с ХОБЛ); GSE148004 (мокрота, 9 здоровых доноров, 7 пациентов с ХОБЛ); GSE130928 (альвеолярные макрофаги, 42 здоровых донора, 22 пациента с ХОБЛ); GSE56341 (эпителиальные клетки малых дыхательных путей, 14 здоровых доноров, 6 пациентов с ХОБЛ); GSE16972 (альвеолярные макрофаги, 5 здоровых доноров, 5 пациентов с ХОБЛ); GSE13896 (альвеолярные макрофаги, 33 здоровых донора, 12 пациентов с ХОБЛ); GSE1122 (ткань легких, 5 здоровых доноров, 5 пациентов с хронической эмфиземой); GSE26296 (миелоидные клетки легких, 3 здоровых донора, 3 пациента с хронической эмфиземой); GSE38267 (периферическая кровь, 28 здоровых доноров, 23 пациента с кистозным фиброзом) и GSE40445 (назальные эпителиальные клетки, 5 здоровых доноров, 5 пациентов с кистозным фиброзом)] были идентифицированы в базе данных Gene Expression Omnibus. Во всех проанализированных наборах данных материал был забран не позднее чем через 24 ч после индукции (в случае острых мышинных моделей), 4 недели после индукции (в случае хронических мышинных моделей) и через один день после поступления пациента (в случае человеческих наборов данных). Число наборов данных, взятых для анализа каждой их исследованных патологий, было продиктовано необходимостью в соблюдении баланса между числом идентифицированных общих генов, которое находится в обратной зависимости от числа наборов данных, и точностью анализа, которая возрастает с увеличением количества проанализированных наборов данных.

Идентификация дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) между контрольными и экспериментальными группами была проведена с помощью GEO2R – веб-сервиса, который позволяет проводить сравнение двух или более наборов данных GSE с целью идентификации ДЭГ. Значение $p < 0,05$, и $|\text{уровень изменения экспрессии}| > 1,5$ были приняты за пороговые значения. Анализ с использованием диаграммы Венна был выполнен с помощью веб-сервисов Venny v.2.0 и Bioinformatics and Evolutionary Genomics.

2.2.1.2 Функциональный анализ

Для оценки биологических процессов и сигнальных путей был выполнен функциональный анализ ДЭГ с помощью плагина ClueGo v.2.5.1 в программном обеспечении Cytoscape v.3.8.1. ДЭГ были картированы на самые последние версии баз данных Gene Ontology (biological processes), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

(KEGG), REACTOME и WikiPathways. Только термины со значением $p \leq 0,05$ были включены в анализ.

2.2.1.3 Реконструкция сетей белок-белковых взаимодействий

Белок-белковые взаимодействия были реконструированы на основе данных, депонированных в базе данных Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Genomes (STRING), с значением уверенности $> 0,7$. Реконструированные сети белок-белковых взаимодействий включали в себя функциональные связи белков, полученные из пяти типов источников: опубликованные эксперименты с высокопроизводительным секвенированием, предсказания по геномному контексту, совместная экспрессия, машинный текст-майнинговый анализ и сети белок-белковых взаимодействий в других базах данных. Реконструированные сети были визуализированы как ненаправленные или иерархические сети с помощью программного обеспечения Cytoscape. Для идентификации узловых белков, наиболее взаимосвязанных со своими соседями в сети, показатель взаимосвязанности вычислялся с помощью плагина NetworkAnalyzer и визуализировался в виде тепловых карт с помощью веб-сервиса Morpheus. Показатель взаимосвязанности > 10 считался пороговым значением.

2.2.1.4 Текст-майнинговый анализ

Для анализа совместного упоминания анализируемых генов и ключевых слов, ассоциированных с легочной патологией, в научных текстах, депонированных в базе данных MEDLINE, был выполнен текст-майнинговый анализ с помощью веб-сервиса GenClIP3. В случае генов, ассоциированных с развитием ОПЛ, поиск проводился по следующим ключевым словам: COVID-19, pneumonia (пневмония), lung inflammation (воспаление легких), influenza (грипп), hyperoxia (гипероксия), LPS AND Lung (ЛПС и легкие), acute lung injury OR ALI (острое повреждение легких или ОПЛ), bleomycin AND lung (блеомицин и легкие), ARDS (ОРДС).

В случае генов, ассоциированных с развитием астмы и пост-астматического фиброза, поиск проводился по следующим ключевым словам: asthma (астма), pulmonary fibrosis (легочный фиброз), lung fibrosis (фиброз легких), hepatic fibrosis (печеночный фиброз), liver fibrosis (фиброз печени), renal fibrosis (почечный фиброз) и kidney fibrosis (фиброз почек). Визуализация полученных данных была выполнена с помощью программного обеспечения Circos Table Viewer. Ширина лент соответствует количеству обнаруженных совместных упоминаний генов и ключевых слов.

2.2.1.5 Анализ влияния уровня экспрессии ДЭГ на выживаемость пациентов при злокачественных новообразованиях легких

Для анализа связи идентифицированных ДЭГ с тяжестью течения аденокарциномы легких (LUAD) и плоскоклеточной карциномы легких (LUSC) был проведен анализ выживаемости пациентов с данными заболеваниями и ее корреляции с уровнями экспрессии идентифицированных ДЭГ с помощью The Cancer Genome Atlas (TCGA). Визуализация полученных данных была выполнена с помощью программного обеспечения Circos Table Viewer. Ширина лент соответствует логарифму значения p ; чем больше ширина, тем более значимыми являются корреляции. Графики выживаемости Каплана-Мейера в зависимости от уровня мРНК были построены на основании данных TCGA с помощью сервиса OncoLnc. Графики выживаемости Каплана-Мейера в зависимости от уровня экспрессии белка были построены на основании данных The Human Protein Atlas.

2.2.2 In vivo модели

2.2.2.1 Модель ЛПС-индуцированного острого повреждения легких (ОПЛ)

Мыши линии Valb/C были случайным образом распределены на 5 групп по 6 мышей в каждой. ОПЛ индуцировали путем интраназальных инстилляций ЛПС в дозе 10 мкг в 50 мкл физиологического раствора на мышью под анестезией изофлураном. В качестве соединений с известной противовоспалительной активностью были использованы полусинтетическое производное 18β H-глицерретовой кислоты солоксолон метил (СМ) и глюкокортикостероид дексаметазон. СМ (10 мг/кг) и дексаметазон (1 мг/кг) растворяли в растворе ДМСО/кунжутное масло (1:9) (носитель) и вводили мышам внутривентрикулярно за 1 ч до введения ЛПС. Животные, которым был введен ЛПС с раствором-носителем (здесь и далее, носитель) или только ЛПС (здесь и далее, ОПЛ) были использованы в качестве контролей. Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации через 24 ч после индукции воспаления. Ткань легких и бронхоальвеолярная жидкость были собраны для дальнейшего анализа.

2.2.2.2. Модель овалбумин (ОВА)-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза

Мыши линии Valb/C были распределены случайным образом на 3 группы по 9 мышей в каждой. Мыши были сенситизированы с помощью интраперитонеальных инъекций смеси ОВА (20 мкг) и гидроксида алюминия $Al(OH)_3$ (2 мг), растворенной в 200 мкл физиологического раствора на 0, 7 и 14 дни эксперимента, с последующей ингаляцией 2% раствора ОВА на 21, 22, 23 и 24 дни эксперимента. Ингаляции проводили в течение 30 мин с помощью небулайзера Omron NE-C28 Plus в индукционной камере из оргстекла. Мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации через 24 ч или 4

недели после последней ингаляции ОВА. Ткань легких и бронхоальвеолярная жидкость были собраны для дальнейшего анализа.

2.2.3 Анализ бронхоальвеолярной жидкости

Легкие промывали 1 мл холодного физиологического раствора дважды во всех группах. Потери объема составляли около 10-20%. Собранную бронхоальвеолярную жидкость центрифугировали на скорости 1500 оборотов в минуту в течение 10 мин при 4 °С, с последующим сбором супернатанта для иммуноферментного анализа. Клеточный осадок ресуспендировали в 50 мкл физиологического раствора и подсчитывали общее число лейкоцитов в камере Горяева с помощью оптической микроскопии после разбавления клеточного осадка раствором Тюрка в соотношении 1:20. Для определения процентного соотношения субпопуляций лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости, суспензию клеток еще раз центрифугировали при тех же условиях, наносили на гистологические стекла и окрашивали азур-эозином по Романовскому с последующим подсчетом их количества с помощью оптической микроскопии. Результаты представлены в виде общего числа лейкоцитов ($\times 10^4$ клеток/мл) и процентного содержания нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов (%).

2.2.4 Иммуноферментный анализ

Содержание про-воспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 определяли в образцах бронхоальвеолярной жидкости. 50 мкл супернатанта и 50 мкл растворителя для образцов помещали в лунки с иммобилизованными моноклональными антителами к TNF- α и IL-6 и 50 мкл раствора биотинилированных анти-TNF- α и анти-IL-6 антител, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на скорости 400 оборотов в минуту в термостатическом шейкере ST-3M. Затем лунки промывали 6 раз раствором для промывки и в каждую лунку добавляли 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, с дальнейшей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре на скорости 400 оборотов в минуту. Затем лунки снова промывали 6 раз раствором для промывки и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в отсутствие прямых солнечных лучей. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл стоп-раствора и измеряли абсорбцию раствора в лунках на длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра Multiscan RC plate reader.

2.2.5 Морфологическое исследование

2.2.5.1 Гистология

Ткань легких фиксировали в 10% забуференном формалине, дегидратировали в растворах этанола и ксилола восходящей концентрации и заключали в парафин

HISTOMIX. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм нарезали на микротоме Microm HM 355S и окрашивали гематоксилином и эозином.

Количество нейтральных муцинов в ткани легких оценивали с помощью ШИК-реакции. Для этого срезы легких были депарафинизованы, регидратированы, окрашены реагентом Шиффа и докрашены гематоксилином. Локализацию и количество стромального компонента в легких (коллагеновые и эластиновые волокна) определяли с помощью окраски трихромом по Массону и по Ван Гизону. Для этого срезы легких депарафинизовали, регидратировали и окрашивали анилиновым синим по Массону и пикрофуксином по Ван Гизону.

Все гистологические препараты были исследованы и отсканированы с помощью микроскопа AxioStar Plus с цифровой камерой AxioCam MRc5 на увеличении $\times 100$ и $\times 400$.

2.2.5.2 Иммуногистохимия

Для проведения иммуногистохимического исследования срезы легких толщиной 3-4 мкм депарафинизовали и регидратировали. Затем проводили демаскировку антигенов путем помещения срезов в микроволновую печь мощностью 700 W на 20 мин. Затем образцы инкубировали с специфическими первичными анти-TNF- α , анти-Muc5ac, анти-фибронектин Fn1, анти- α -SMA, анти-коллаген I типа Col1 и анти-коллаген IV типа Col4 антителами в соответствии с протоколом производителя. Затем образцы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена и 3,3'-диаминобенидином (DAB), и окрашивали гематоксилином Майера.

Интенсивность иммуногистохимической окраски срезов легких оценивали с помощью полуколичественного метода, где 0 принимали за отсутствие экспрессии, 1 – за слабую экспрессию, 2 – за умеренную экспрессию и 3 – за высокую экспрессию. Количественная оценка проводилась при увеличении $\times 200$ в 5-6 полях зрения в каждом исследуемом образце.

2.2.6 Выделение суммарной РНК

Суммарную РНК выделяли из легких экспериментальных животных с помощью реагента TRIzol согласно инструкциям производителя. На первом этапе ткань легких собирали в пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 1 г лизирующей матрицы D, 1 мл реагента TRIzol и гомогенизировали с помощью гомогенизатора FastPrep-24TM 5G с адаптером QuickPrep 24. Гомогенизацию проводили на скорости 6,0 м/с в течение 40 сек. После гомогенизации, содержимое пробирок, исключая лизирующую матрицу, переносили в чистые пробирки объемом 1,5 мл и хранили при -80 °C до момента выделения РНК.

Выделение суммарной РНК проводили следующим образом: в пробирки добавляли 0,2 мл хлороформа, инкубировали 3 мин и затем центрифугировали 15 мин на скорости 12,000 оборотов в мин. В результате раствор в пробирке разделялся на водную фазу, содержащую РНК, интерфазу, содержащую белки, и фенольную фазу. Далее водную фазу отбирали в чистые пробирки объемом 1,5 мл добавляли 0,5 мл изопропилового спирта с последующей инкубацией в течение 10 мин и центрифугированием в течение 10 мин на скорости 12,000 оборотов в минуту. В результате суммарная РНК осаждалась в виде гелеподобных гранул на дне пробирки. Далее, изопропиловый спирт отбирали водоструйным насосом, а в пробирки добавляли 1 мл 75% этилового спирта для очистки суммарной РНК. Затем этиловый спирт отбирали с помощью водоструйного насоса, а суммарную РНК растворяли в 40 мкл воды, очищенной на установке MilliQ, и инкубировали в термостате при температуре 60 °С 15 мин. Сохранность выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ной агарозе.

2.2.7 Определение уровней экспрессии генов в ткани легких методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Определение уровней мРНК генов *Fn1*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Cxcl12*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Spp1*, *Muc5b*, *Ccl2*, *C3ar1*, *Muc5ac*, *Col1a1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs2*, *Il-6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Ptx3*, *Socs3*, *Mmp8*, *Rsad2*, *Rtp4*, *Ifi44*, *Saa1*, *Hprt*, *Tnf- α* , *Il-1 β* и *Gapdh* в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких, ОВА-индуцированной острой астмой и пост-астматическим фиброзом проводили с помощью метода количественной обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в реальной времени (ОТ-ПЦР).

2.2.7.1 Обратная транскрипция

Для синтеза кДНК использовали суммарную РНК из легких мышей, выделенную как описано выше. кДНК получали в реакционной смеси объемом 100 мкл, содержащей 2,5 мкг суммарной РНК, 20 мкл 5× ОТ буфера, 250 U M-MuLV RN ревертазы и 100 мкмоль праймера dT(15). Обратная транскрипция проводилась при 25 °С в течение 10 мин с последующей инкубацией при 42 °С в течении 1 ч. Затем, реакция обратной транскрипции была остановлена путем инкубации при температуре 70 °С в течение 10 мин. Полученные образцы кДНК либо использовали сразу же для проведения ПЦР, либо хранили при -20 °С.

2.2.7.2 ОТ-ПЦР

Последовательности олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров, приведены в Таблице 4.

В случае *Tnf- α* , *Il-1 β* и *Gapdh* амплификация кДНК проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл кДНК, 12,5 мкл HS-qPCR SYBR Blue (2 \times), 0,25 мкмоль прямых и обратных ген-специфических праймеров и 0,25 мкмоль прямых и обратных праймеров к *Gapdh*. Амплификацию проводили в следующих условиях: (1) 95 °С 5 мин; (2) 95 °С, 10 с; (3) 51 °С, 30 с, (4) 72 °С, 30 с (40 циклов шага 2-4); (5) с 65 °С до 95 °С с повышением в 0,5 °С каждые 5 с. Отсутствие загрязнений в ПЦР контролировали при замене кДНК пробы на MilliQ воду. Специфичность праймеров проверяли с помощью анализа кривой плавления. Относительный уровень экспрессии генов был нормализован на уровень экспрессии *Gapdh* по методу $\Delta\Delta C_t$.

В случае всех остальных генов, амплификация кДНК проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл кДНК, 12,5 мкл HS-qPCR (2 \times), 0,25 мкмоль прямого и обратного праймера к *Hprt* и *Hprt* специфического зонда с меткой ROX, 0,25 мкмоль прямых и обратных ген-специфических праймеров и зонда с меткой FAM. Амплификацию проводили в следующих условиях: (1) 94 °С, 5 мин, (2) 94 °С, 10 с, (3) 60 °С, 30 с (50 циклов шага 2-3). Отсутствие загрязнений в ПЦР контролировали при замене кДНК пробы на MilliQ воду. Относительный уровень экспрессии генов был нормализован на уровень экспрессии *Hprt* по методу $\Delta\Delta C_t$.

Во всех случаях амплификация проводилась на амплификаторе C1000 Touch с модулем CFX96, а подсчет проводился в программном обеспечении BioRad CFX Manager.

2.2.8 Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с использованием следующих методов. Значимость результатов функционального анализа была определена с помощью двухстороннего гипергеометрического теста Холма-Бонферрони в модуле ClueGo программного обеспечения Cytoscape. В случае всех остальных данных (подсчет лейкоцитов, оценка уровня цитокинов, гистологический скоринг и анализ данных ОТ-ПЦР) статистический анализ проводился с помощью двухстороннего непарного t-теста по Стьюденту в программном обеспечении Microsoft Excel. Значения $p < 0,05$ считали статистически достоверными. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ ОСТРЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ И ИХ ПЕРЕХОД В ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)

3.1 Идентификация ключевых генов, вовлеченных в развитие острого повреждения легких различной этиологии

3.1.1 Биоинформатический анализ баз данных полногеномного микрочипирования. Идентификация дифференциально экспрессированных генов

Для идентификации потенциальных ключевых генов, регулирующих развитие острого воспаления в легких как одного из проявлений острого повреждения легких (ОПЛ), вызванного различными этиологическими факторами, оценивали изменение экспрессии генов в воспаленной легочной ткани по сравнению со здоровыми легкими путем ре-анализа данных кДНК микрочипирования из следующих наборов данных: GSE58654 (гипероксия), GSE80011 (грипп), GSE130936 (ЛПС) и GSE94522 (блеомицин) с помощью сервиса GEO2R (Рисунок 4). Перечисленные наборы данных были проанализированы одновременно для идентификации узловых генов, общих для острых легочных патологий различной этиологии. В анализ вошли образцы, полученные через 24 ч после индукции.

Сопоставление выявленных дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) (изменение экспрессии $> 1,5$; $p > 0,05$) с помощью диаграммы Венна приведено на Рисунке 4А. Всего идентифицировано 58 ДЭГ, общих для всех проанализированных наборов данных. Функциональная аннотация идентифицированных ДЭГ показала достоверное обогащение по терминам, ассоциированным с регуляцией продукции цитокинов, синтезом оксида азота, иммунным ответом, легочным фиброзом и в меньшей степени с метаболизмом витамина В6 и ионов меди (Рисунок 4Б).

Затем была проведена кластеризация данных экспрессии генов с использованием метода Эвклидовых дистанций. Идентифицированные гены были сгруппированы в два кластера, содержащих 48 up-регулируемых и 10 down-регулируемых ДЭГ (Рисунок 4В). Любопытен тот факт, что несмотря на различную природу индукторов и механизмы индукции ОПЛ в результате их воздействия, профили экспрессии ДЭГ были в значительной степени схожи во всех проанализированных наборах данных. Далее для выявления потенциальной регуляторной роли идентифицированных общих ДЭГ в

развитии легочного воспаления, были реконструированы сети белок-белковых взаимодействий для всех проанализированных наборов данных с помощью базы данных STRING и выявлены взаимодействия белков с относительно высокой степенью достоверности (показатель достоверности $\geq 0,7$) с последующим подсчетом степени взаимосвязанности каждого из 58 общих ОПЛ-ассоциированных ДЭГ в реконструированных сетях (Рисунок 4Г).

3.1.2 Характеристика наиболее взаимосвязанных ДЭГ в качестве потенциальных мастер-регуляторов ОПЛ

В топ-10 наиболее взаимосвязанных в ОПЛ-ассоциированном регуломе генов вошли: (1) про-воспалительные цитокины и хемокины (*Il-6*, *Cxcl13*, *Ccl2*), которые принимают участие в широком спектре воспалительных заболеваний, включая вирусные и бактериальные инфекции [570–573] и (2) регуляторы взаимодействий клеток с другими клетками и внеклеточным матриксом (ВКМ), включая *Timp1*, ингибитор матриксных металлопротеиназ, ответственный за деградацию ВКМ и способствующий развитию воспаления и фиброза легких [574,575]; *Adam8*, мембранный белок, ответственный за коммуникации между клетками, а также клетками и ВКМ и активирующий острое и хроническое легочное воспаление [576]; *Thbs1*, адгезивный гликопротеин, который также опосредует взаимодействия между клетками и ВКМ и участвует в воспалительных реакциях [577]; *Serpina3n* и *Serpine1*, ингибиторы сериновых протеаз, вовлеченные в ремоделирование ВКМ и связанные с воспалением [578,579]. Кроме того, в топ-10 ОПЛ-ассоциированных ключевых генов также вошли *Socs3*, супрессирующий регулятор цитокинового сигналинга и сигнального пути JAK1/STAT3 [580], и *Rtp4*, ген, индуцируемый интерфероном I типа, вовлеченный в реакции иммунного ответа и противовирусной защиты [581]. Следует отметить, что приведенные топ-10 выявленных генов имели тесную взаимосвязь в инфламатоме грызунов, который представляет собой список ДЭГ, идентифицированных Wang et al. на 11 независимых моделях воспаления грызунов [582] (Рисунок 4Г), что явно указывает на регуляторную роль данных генов в процессе воспаления.

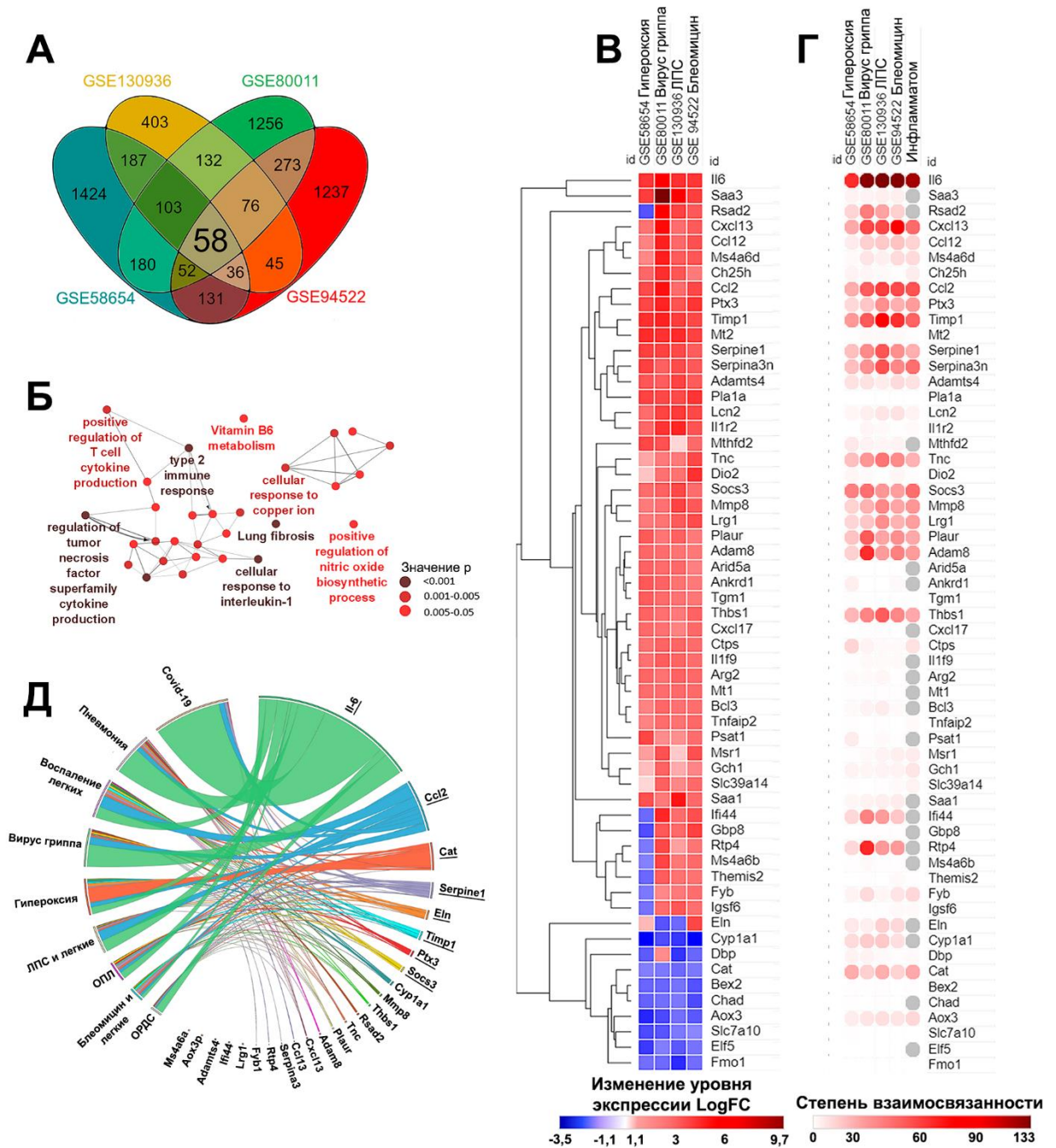


Рисунок 4. Ключевые гены, вовлеченные в развитие острого повреждения легких (ОПЛ), идентифицированные с помощью биоинформатического анализа. (А) Венн диаграмма, иллюстрирующая дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ), общие для четырех независимых наборов данных (GSE80011, GSE130936, GSE58654 и GSE94522), в которых ОПЛ было индуцировано различными агентами. **(Б)** Функциональный анализ идентифицированных ДЭГ. Обогащение терминов было проанализировано с помощью баз данных Gene Ontology (biological processes), KEGG, REACTOME и WikiPathways в плагине ClueGo программного обеспечения Cytoscape. Цвет узлов характеризует значимость обогащения термина. В сеть были включены только сигнальные пути с $p \leq 0,05$ после коррекции Холма-Бонферрони для множественного

тестирования. **(В)** Тепловая карта, демонстрирующая уровень экспрессии ДЭГ в независимых наборах данных. Построение тепловой карты и иерархическая кластеризация (Евклидовы дистанции) были выполнены с помощью веб-сервиса Morpheus. $\text{LogFC} = \text{Log}_2$ (кратность изменения экспрессии). **(Г)** Тепловая карта, демонстрирующая степень взаимосвязанности ДЭГ в сетях белок-белковых взаимодействий, реконструированных для каждого набора данных ОПЛ с помощью базы данных STRING (показатель уверенности $\geq 0,7$; максимальное число интеракторов = 0) в программном обеспечении Cytoscape. Степень взаимосвязанности: число взаимодействий между ДЭГ и его партнерами в сети. Инфламатом: число взаимодействий между ДЭГ и его партнерами в инфламатоме грызунов, сконструированном на основе транскриптомных данных, опубликованных Wang et al. [582]. **(Д)** Совместное упоминание идентифицированных ДЭГ с ОПЛ-ассоциированными терминами в научной литературе, депонированной в базе данных MEDLINE. Анализ был выполнен с помощью веб-сервиса GenClip3. Данные были визуализированы с помощью Circos.

Как показано на Рисунке 4Г, к числу ДЭГ, обладающих высоким показателем взаимосвязанности и входящих в топ-25 ключевых генов, входят: (1) регуляторы гомеостаза ВКМ (урокиназовый активатор плазминогена (*Plaur*), матриксная металлопротеиназа 8 (*Mmp8*), эластин (*Eln*), металлопептидаза ADAM с тромбоспондином 1 мотив 4 (*Adamts4*), тенасцин С (*Tnc*)); (2) участники иммунного ответа (интерферон индуцируемый протеин 44 (*Ifi44*), вайперин (*Rsad2*), пентраксин 3 (*Ptx3*), липокалин 2 (*Lcn2*)); (3) регуляторы передачи сигналов (обогащенный лейцином альфа-2 гликопротеин 1 (*Lrg*), адаптивный протеин, стимулирующий адгезию и дегрануляцию (*Fyb1*), мембранный 4-доменный белок А6А (*Ms4ab6a*)); (4) гены, кодирующие ключевой антиоксидантный фермент каталазу (*Cat*), один из основных ферментов метаболизма ксенобиотиков цитохром Р450 (*Cyp1a1*), и псевдоген альдегид оксидазы (*Aox3p*).

Далее для анализа степени исследованности идентифицированных ДЭГ, входящих в топ-25, и их белковых продуктов относительно легочного воспаления/повреждения, было проанализировано совместное упоминание названий генов и ключевых слов, ассоциированных с легочной патологией, в текстах научных статей, депонированных в базе данных MEDLINE, с помощью веб-сервиса GenCLiP3 (Рисунок 4Д). Для выполнения данного поиска, названия человеческих ортологов топ-25 узловых генов были загружены в веб-сервис GenCLiP3 и произведен поиск по следующим ключевым словам: COVID-19, pneumonia (пневмония), lung inflammation (воспаление легких), influenza (грипп), hyperoxia (гипероксия), LPS and lung (ЛПС и легкие), acute lung injury or ALI (острое повреждение

легких или ОПЛ), bleomycin and lung (блеомицин и легкие), ARDS (ОРДС). Текст-майнинговый анализ показал, что только 20 из топ-25 узловых генов были связаны с процессами, ассоциированными с воспалением/повреждением легких; среди них наиболее взаимосвязанными генами были *IL-6 > CCL2 > CAT > SERPINE1 > ELN > TIMP1 > PTX3 > SOCS3* (гены указаны в порядке уменьшения их взаимосвязанности с ключевыми словами) (Рисунок 4Д). Следует отметить, что представленный список генов включал в себя как гены из топ-10 взаимосвязанных генов (*Il-6, Timp1, Ccl2, Socs3, Serpine1*), так и гены из топ-25 взаимосвязанных генов: *Ptx3*, один из компонентов гуморального иммунитета, выполняющий сложную регуляторную роль в воспалительных процессах, а также в процессах организации и ремоделирования ВКМ [583], *Cat*, ключевой фермент антиоксидантной системы [584], и *Eln*, главный компонент эластиновых волокон, которые являются неотъемлемой частью ВКМ и содержание которых может как увеличиваться, так и уменьшаться при развитии воспаления [585–588].

Таким образом, идентифицированные топ-25 узловых генов, наиболее взаимосвязанные в ОПЛ-ассоциированном регуломе, участвуют в двух главных процессах: организации ВКМ (*Adam8, Adamts4, Eln, Il6, Mmp8, Ptx3, Serpine1, Thbs1, Timp1, Tnc*) и в ответе на повреждения и защите (*Adam8, Adamts4, Ccl2, Cxcl13, Il6, Lcn2, Mmp8, Ptx3, Rsad2, Rtp4, Serpina3, Serpine1, Socs3, Thbs1, Timp1*). Полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными данными:

1. Известно, что ремоделирование легких и активация врожденного иммунного ответа являются неотъемлемыми процессами, вовлеченными в развитие ОПЛ [589,590];
2. Девять из топ-25 ОПЛ-ассоциированных ключевых генов (*Adamts4, Ccl2, Cxcl13, Il6, Lcn2, Ptx3, Serpina3, Socs3, Thbs1*) были недавно идентифицированы Liang et al. как узловое ДЭГ в геной регуляторной сети ЛПС-индуцированного ОПЛ у мышей [591]. Более того, анализ биоинформатических данных, проведенный Tu et al. явно показал ключевую регуляторную роль шести идентифицированных ДЭГ (*Ccl2, Il6, Lcn2, Rsad2, Socs3, Timp1*) на модели ОПЛ, индуцированном механической вентиляцией у мышей [592];
3. Большинство из топ-25 ОПЛ-ассоциированных генов (19 из 25) вовлечены в инфламатом грызунов [582] (Рисунок 4Г); более того, степень их взаимосвязанности была схожа в структуре как ОПЛ-ассоциированной геной сети, так и в инфламатоме грызунов, что явно показывает ключевую роль данных генов в развитии ОПЛ.

Учитывая ключевую роль идентифицированных генов в регуляции воспаления легких различной этиологии, данные текст-майнингового анализа, в котором 8 генов (*Il-6,*

Timp1, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*, *Ptx3*, *Cat* и *Eln*) являются наиболее ассоциированными с ОПЛ-связанными терминами в текстах научной литературы, а также их узловую позицию в ОПЛ-ассоциированных сетях, следующие гены потенциальные мастер-регуляторы (далее гены ПМР) были выбраны нами для валидации *in vivo*: *Il-6* (позиция в списке генов = 1), *Timp1* (3), *Ccl2* (4), *Socs3* (7), *Serpine1* (9), *Ptx3* (16), *Cat* (18), и *Eln* (21).

3.2 *In vivo* модель острого повреждения легких. Патоморфологическая и молекулярно-биологическая характеристика

В настоящее время, наиболее распространенным методом индукции воспалительных процессов в легких *in vivo* является введение бактериального липополисахарида (ЛПС), который является основным компонентом внешней мембраны Грам-отрицательных бактерий и вызывает в организме животных локальные и системные воспалительные реакции, схожие с ОПЛ/ОРДС у человека [397,398,403–405]. Известно, что при ОПЛ, в том числе индуцированном ЛПС, происходит развитие каскада воспалительных реакций в ткани легких, который приводит к увеличению проницаемости сосудов, обширному повреждению альвеол и, в конечном итоге, дыхательной недостаточности [93–95], а также сопровождается местным и системным повышением уровней про-воспалительных цитокинов и хемокинов – известных маркеров воспаления (TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8, CCL7, CCL2) [593] и нейтрофил- и лимфоцит-ассоциированной воспалительной инфильтрацией [94,103,104].

Для оценки изменения уровней экспрессии идентифицированных генов потенциальных мастер-регуляторов (ПМР), а также маркеров воспаления в легких во время развития и разрешения острого воспаления, а также при его предварительной терапии противовоспалительными соединениями с различным механизмом действия была использована *in vivo* модель ЛПС-индуцированного ОПЛ.

3.2.1 Индукция и характеристика *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ

На первом этапе *in vivo* исследования была проанализирована динамика развития и молекулярно-биологические характеристики ЛПС-индуцированного ОПЛ. Мышам интраназально (и.н.) вводили ЛПС в дозе 10 мгк/мышь в 50 мкл физиологического раствора и анализировали изменения в легких через 24 и 72 ч после индукции воспаления (Рисунок 5Б). Как видно на Рисунке 5В, через 24 ч после введения ЛПС происходило развитие острого воспалительного процесса в дыхательной системе мышей, который характеризовался увеличением в бронхоальвеолярной жидкости общего числа лейкоцитов (преимущественно за счет гранулоцитов) в 34 раза и уровня про-воспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 в 261,3 и 47,7 раз, соответственно, по сравнению с здоровыми

животными. Анализ общего и дифференциального числа лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости через 72 ч после введения ЛПС показал частичное разрешение воспаления в дыхательной системе мышей с ОПЛ без лечения, которое характеризовалось снижением общего числа лейкоцитов, а также некоторой нормализацией клеточного состава бронхоальвеолярной жидкости (Рисунок 5В).

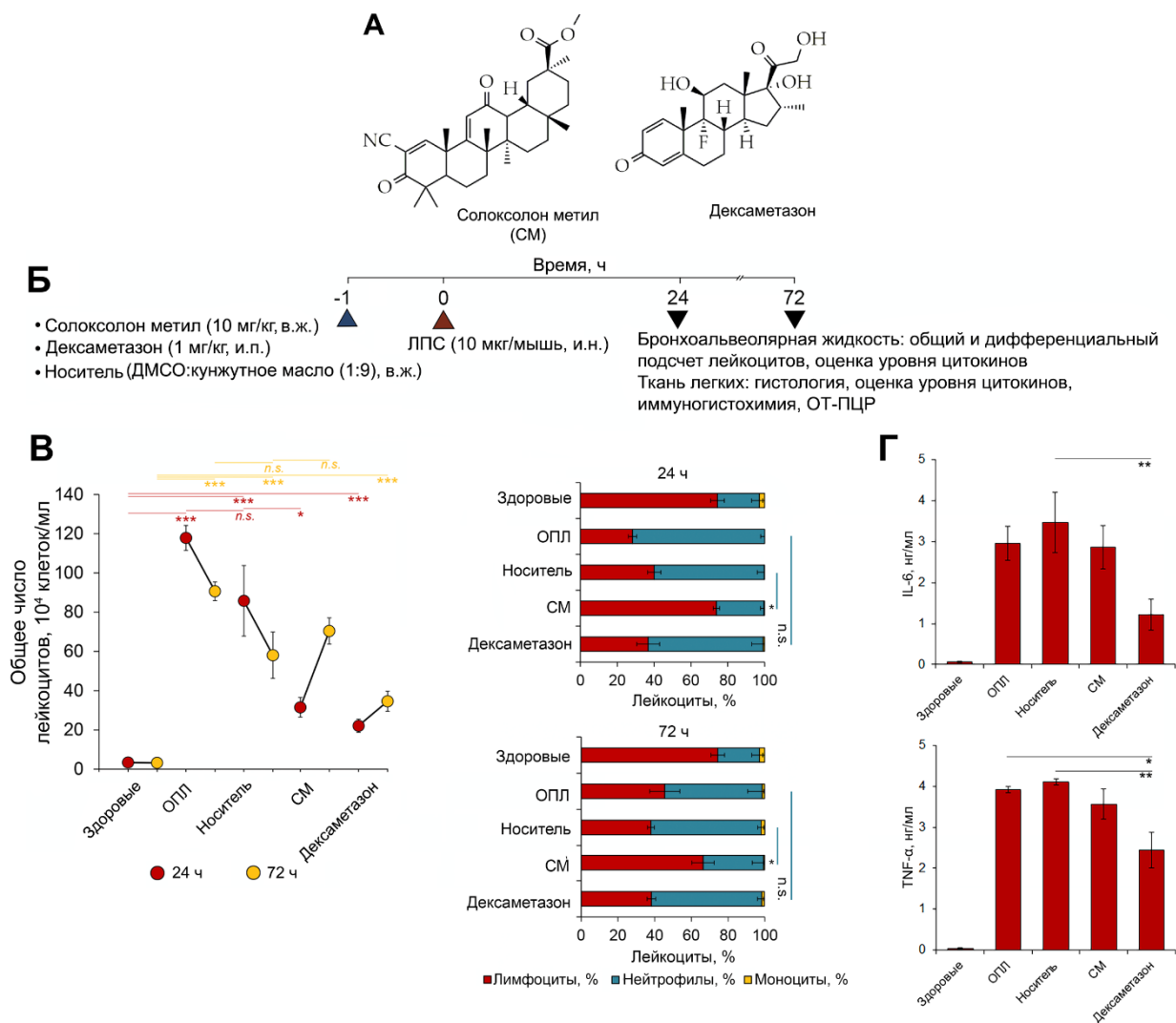


Рисунок 5. Влияние противовоспалительных соединений солоксолон метила и дексаметазона на развитие ЛПС-индуцированного ОПЛ *in vivo*. (А) Структурные формулы солоксолон метила (СМ) и дексаметазона. (Б) Схема эксперимента. СМ (10 мг/кг) и дексаметазон (1 мг/кг) вводили внутривенно (в.ж.) за 1 ч до интраназального (и.н.) введения ЛПС (10 мкг на мышь), с последующей оценкой развития ОПЛ через 24 и 72 ч после индукции. (В) Общее (левая панель) и дифференциальное (правая панель) число лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости здоровых мышей и мышей с ОПЛ без лечения и после введения противовоспалительных соединений СМ или дексаметазона. (Г) Уровень про-воспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α в бронхоальвеолярной жидкости мышей контрольных и экспериментальных групп.

Для более детальной характеристики ОПЛ-ассоциированного воспалительного ответа, была проведена оценка уровня экспрессии ряда ключевых про-воспалительных маркеров в ткани легких мышей через 24 ч после введения ЛПС. Проведенный ОТ-ПЦР анализ показал значительное повышение уровней экспрессии про-воспалительных цитокинов *Il-6* (в 6,7 раз), *Tnf- α* (в 1,9 раз) и *Il-1 β* (в 23,4 раза), хемокина *Cxcl10* (в 26,3 раза) и ключевого фермента синтеза простагландинов *Ptgs2* (3,9 раза) в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ по сравнению со здоровыми животными (Рисунок б).

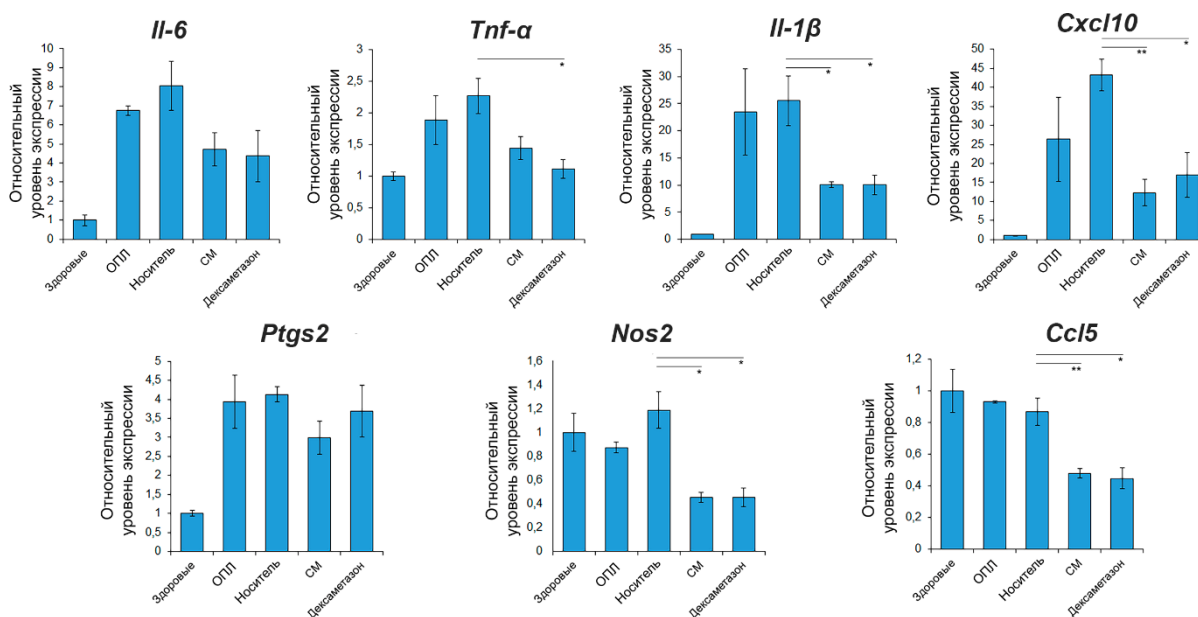


Рисунок 6. Уровни экспрессии про-воспалительных цитокинов и хемокинов в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после введения противовоспалительных соединений. Относительные уровни экспрессии данных генов были нормализованы на уровень экспрессии гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (*Hprt*), которая использовалась в качестве контрольного гена. Три образца из каждой экспериментальной группы были проанализированы в трипликате. Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного т-теста; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s – статистически не значимые различия.

Гистологически ткань легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ характеризовалась выраженной нейтрофильной воспалительной инфильтрацией, циркуляторными нарушениями (венозное полнокровие, кровоизлияния, интерстициальный и альвеолярный отеки) и деструктивными изменениями в бронхиальном и альвеолярном эпителии (Рисунок 7, верхняя панель). Более того, была выявлена реактивная гиперпродукция слизи бронхиальным эпителием, что является

компенсаторной реакцией ткани на повреждение воспалительными клетками [594] (Рисунок 7, средняя панель). Иммуногистохимическое окрашивание срезов легких антителами к TNF- α показало, что здоровые легкие характеризуются базальным уровнем экспрессии данного цитокина, что полностью соответствует литературным данным [595], а введение ЛПС значительно увеличивало уровень экспрессии TNF- α в ткани легких мышей с ОПЛ, особенно в бронхиальном эпителии, по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 7, нижняя панель).

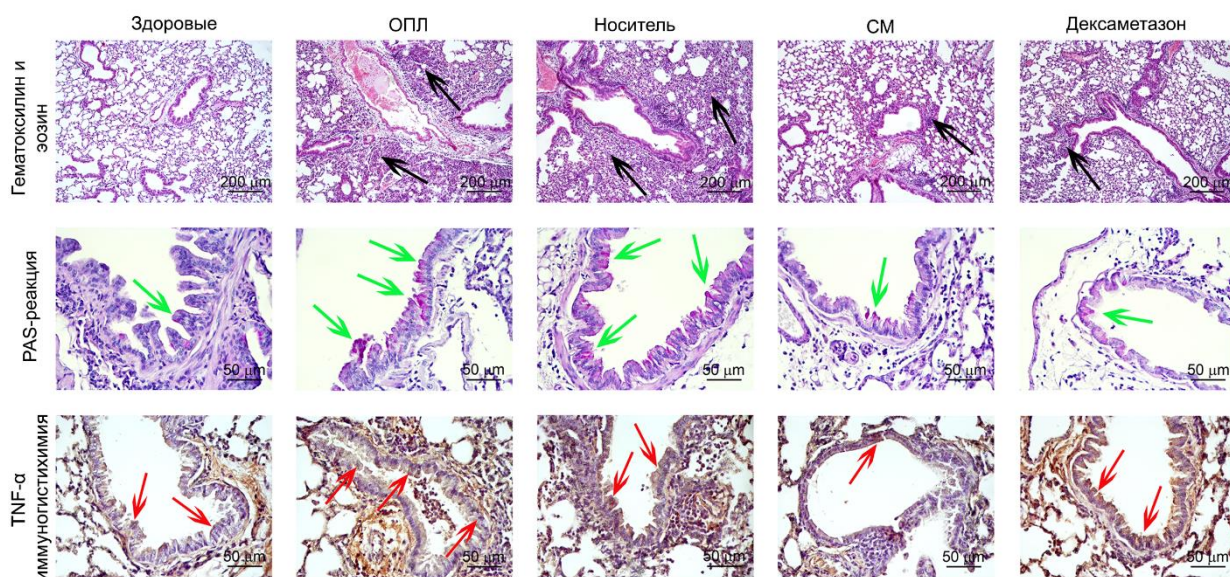


Рисунок 7. Гистологическое исследование ткани легких здоровых мышей и мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после введения противовоспалительных соединений. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$ (верхняя панель), окраска по Шиффу (PAS реакция), увеличение $\times 400$ (средняя панель) и иммуногистохимическая окраска антителами к TNF- α , увеличение $\times 400$ (нижняя панель). Черными стрелками указана воспалительная инфильтрация в ткани легких, зелеными стрелками указана гиперпродукция слизи бронхиальным эпителием, красными стрелками указана повышенная экспрессия TNF- α бронхиальным эпителием.

3.2.2 Оценка противовоспалительных эффектов СМ и дексаметазона на модели ЛПС-индуцированного ОПЛ

Известно, что кортикостероиды, одним из представителей которых является дексаметазон, оказывают свое противовоспалительное действие посредством взаимодействия со специфическим кортикостероидным рецептором, с последующей ядерной транслокацией и индукцией транскрипции противовоспалительных генов [596], или путем связывания с транскрипционными комплексами различных провоспалительных

факторов с последующей репрессией их транскрипции [597]. В случае тритерпеноидов, к которым относится солоксолон метил (СМ) – полусинтетическое производное 18 β -глицерретовой кислоты, точный механизм, опосредующий его противовоспалительное действие, до сих пор неизвестен. Однако, было показано, что СМ и его структурные аналоги являются мультитаргетными соединениями, оказывающими противовоспалительное действие, задействуя такие механизмы, как подавление продукции оксида азота [598], подавление экспрессии циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) [599–602] и подавление сигнального пути NF- κ B [603].

В эксперименте на модели ЛПС-индуцированного ОПЛ, противовоспалительные препараты СМ и дексаметазон вводили внутривенно за 1 ч до индукции воспаления, чтобы оценить патоморфологические признаки, а также изменение уровней экспрессии маркеров воспаления при модуляции воспалительного процесса предварительной противовоспалительной терапией. В виду того, что СМ плохо растворим в воде в качестве носителя соединения использовали кунжутное масло. Схема эксперимента представлена на Рисунке 5Б.

Как видно из представленных данных (Рисунки 5-7), введение СМ и дексаметазона предотвращает развитие острого воспаления в дыхательной системе мышей, индуцированного введением ЛПС, что выражается в уменьшении интенсивности воспалительной инфильтрации, а также уровней экспрессии маркеров воспаления в ткани легких. Введение кунжутного масла, используемого в качестве растворителя для СМ (контроль), не оказывало положительных эффектов на ЛПС-индуцированное воспаление легких.

Введение СМ и дексаметазона снижало общее число лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости мышей с ОПЛ в 2,7 и 5,3 раза, соответственно, через 24 ч после индукции по сравнению с контролем (Рисунок 5В). На основе анализа субпопуляций лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости мышей было показано, что СМ подавляет рекрутирование гранулоцитов в очаг воспаления через 24 ч после введения ЛПС, в то время как при терапии дексаметазоном данный эффект отсутствовал. Однако, через 72 ч после индукции, СМ терял свой ингибирующий эффект на ОПЛ-ассоциированную миграцию лейкоцитов, сохраняя при этом ингибирующую способность в отношении гранулоцитов.

Оценка уровней про-воспалительных цитокинов через 24 ч после индукции показала, что дексаметазон значительно снижает уровни TNF- α и IL-6 в бронхоальвеолярной жидкости мышей с ОПЛ в 1,6 и 2,8 раз, соответственно, по сравнению с контролем. Введение СМ также приводит к снижению количества этих про-

воспалительных цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости, однако, в меньшей степени, чем дексаметазон (Рисунок 5Г).

Оценка уровней экспрессии цитокинов и хемокинов, принимающих участие в развитии и прогрессии воспалительного процесса (маркеров воспаления), с помощью ОТ-ПЦР (Рисунок 6) показала, что введение СМ приводило к значительному снижению экспрессии данных маркеров в ткани легких мышей с ОПЛ по сравнению с контролем: *Il-1 β* , *Tnf- α* и *Il-6* снижались в 2,5; 1,6 и 1,7 раз, соответственно; уровни экспрессии *Cxcl10* и *Ccl5*, хемокинов, контролирующих миграцию воспалительных клеток к месту повреждения легких [604,605], снижались в 3,5 и 1,8 раза, соответственно. Также, введение СМ вызывало снижение уровней экспрессии гена *Ptgs2*, кодирующего циклооксигеназу-2, и гена *Nos2*, кодирующего индуцибельную NO синтазу, задействованную в развитии ОПЛ [606], в 1,4 и 2,6 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Предварительная терапия дексаметазоном мышей с ОПЛ приводила к сходному снижению уровней экспрессии анализируемых генов: *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Il-6*, *Cxcl10*, *Ccl5*, *Ptgs2*, *Nos2* снижались в 2,5; 2; 1,8; 2,6; 1,9; 1,1 и 2,6 раз, соответственно, по сравнению с контролем (Рисунок 6). Введение носителя не предотвращало повышение уровней экспрессии данных генов, а для некоторых маркеров (*Cxcl10*) даже вызывало некоторое увеличение их экспрессии.

Гистологический анализ показал, что введение противовоспалительных соединений в значительной степени предотвращало развитие ЛПС-индуцированных воспалительных изменений в легких мышей, вызывая уменьшение воспалительной инфильтрации, циркуляторных и деструктивных изменений в ткани легких (Рисунок 7, верхняя панель). Окраска по Шиффу показала, что СМ и дексаметазон эффективно предотвращали активацию продукции слизи бронхиальным эпителием в ответ на воспаление (Рисунок 7, средняя панель), а иммуногистохимическая окраска легких показала, что предварительная терапия СМ, но не дексаметазоном, в значительной степени предотвращала повышение продукции TNF- α бронхиальным эпителием мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ (Рисунок 7, нижняя панель). Введение носителя мышам с ОПЛ не оказывало влияния на морфологические признаки ЛПС-индуцированного воспаления в легких.

Таким образом, представленные результаты ясно демонстрируют, что введение ЛПС приводит к развитию выраженного воспалительного процесса в легких, развитие которого успешно модулируется противовоспалительными соединениями с различным механизмом действия, а описанная мышинная модель ОПЛ может быть использована в

качестве платформы для валидации роли ключевых генов в развитии легочного воспаления и оценки их чувствительности к противовоспалительной терапии.

3.3 Анализ паттернов экспрессии генов, потенциальных мастер-регуляторов (ПМР) острого воспалительного процесса, в легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ

Уровни экспрессии генов *Il-6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, *Ptx3* и *Socs3* (Рисунок 4Д, подчеркнутые гены), идентифицированных в качестве потенциальных мастер-регуляторов развития острого воспалительного процесса в легких (далее гены ПМР), были проанализированы с помощью ОТ-ПЦР с зондами TaqMan в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после введения противовоспалительных соединений.

3.3.1 Анализ уровней экспрессии генов ПМР в ткани легких здоровых мышей и мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ

Легкие здоровых животных характеризовались очень низкими уровнями экспрессии исследуемых генов, который для каждого из генов был принят за 1, в то время как введение ЛПС приводило к значительному повышению их экспрессии: уровень экспрессии *Il-6* увеличился в 260 раз, *Ccl2* – в 250 раз, *Timp1* – в 120 раз, *Socs3* – в 35 раз, *Serpine1* – в 25 раз, *Ptx3* – в 4 раза и *Eln* – в 2 раза по сравнению со здоровыми животными. Снижение уровня экспрессии после введения ЛПС наблюдалось только для гена *Cat* (2 раза), что коррелирует с данными биоинформатического анализа (Таблица 6, Рисунок 8). Полученные экспериментальные данные полностью подтверждают результаты биоинформатического анализа, поскольку модальность изменения уровней экспрессии генов в наборах данных, полученных от мышей с ОПЛ различной этиологии, полностью совпадала с аналогичными параметрами, полученными на экспериментальной модели ЛПС-индуцированного ОПЛ, несмотря на то, что численные показатели уровней экспрессии различались (Таблица 6).

Таблица 6. Уровни экспрессии генов потенциальных мастер-регуляторов (ПМР) ОПЛ в ткани легких экспериментальных животных и по данным биоинформатического анализа.

Название гена	Изменение уровней экспрессии генов (разы) ¹							
	Данные микрочиповых наборов данных				Экспериментальные данные			
	GSE58654 Гипероксия	GSE80011 Грипп	GSE130936 ЛПС	GSE94522 Блеомцин	ОПЛ ²	Носитель ²	СМ ²	Дексаметазон ²
<i>Il-6</i>	11,5	92,8	13,1	11,3	258,8	252,8	137,9*	167,3
<i>Ccl2</i>	6,8	30,6	3,0	7,4	244,9	310,6	164,6***	179,6***
<i>Cat</i>	-2,1	-2,1	-2,6	-2,2	-1,9	-2,6	-2,1*	-2,1*
<i>Serpine1</i>	8,9	8,4	7,1	4,4	25,2	36,4	18,5*	20,8**
<i>Eln</i>	3,1	-3,5	-2,6	7,5	2,1	1,4	-1,2	-1,5
<i>Timp1</i>	14,1	19,6	9,9	7,3	117,8	154,6	108,2*	98,2*
<i>Ptx3</i>	7,6	19,4	5,5	12,0	3,5	3,9	4,0	3,4
<i>Socs3</i>	3,0	3,9	7,0	2,9	35,0	37,7	23,1**	24,4**

¹Данные по уровням экспрессии генов получены путем сравнения легких мышей с ОПЛ с тканью легких здоровых мышей. GSE58654, платформа: Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array; GSE80011, платформа: Agilent Custom Mouse LncRNA (4*180K, Design ID: 049801); GSE130936, платформа: Affymetrix Mouse Expression 430A Array; GSE94522, платформа: Agilent 028005 SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray. В анализ вошли образцы, полученные через 24 ч после введения индуктора.

²Уровень экспрессии был нормализован на уровень экспрессии гена в ткани легких здоровых мышей. Было проанализировано по три образца из каждой экспериментальной группы в трех технических повторах. Образцы были получены через 24 ч после введения ЛПС.

Статистический анализ проведен с помощью двухстороннего непарного т-теста по Стьюденту, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ по сравнению с носителем.

3.3.2 Анализ уровней экспрессии генов ПМР в ткани лёгких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ после предварительной терапии противовоспалительными соединениями

Как было показано в разделе 3.2.1 и 3.2.2, введение СМ или дексаметазона за 1 ч до индукции значительно подавляло развитие ЛПС-индуцированного воспаления в легких и предотвращало активацию маркеров воспаления (про-воспалительных цитокинов и хемокинов), в то время как введение носителя не влияло на их экспрессию.

В связи с этим представлялось интересным оценить, насколько противовоспалительная терапия влияет на экспрессию генов ПМР ОПЛ, выявленных при биоинформатическом анализе. Для этого мы проанализировали уровни экспрессии данных генов в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным воспалением, получавших

СМ или дексаметазон. Данные по экспрессии генов ПМР приведены в Таблице 6 и на Рисунке 8.

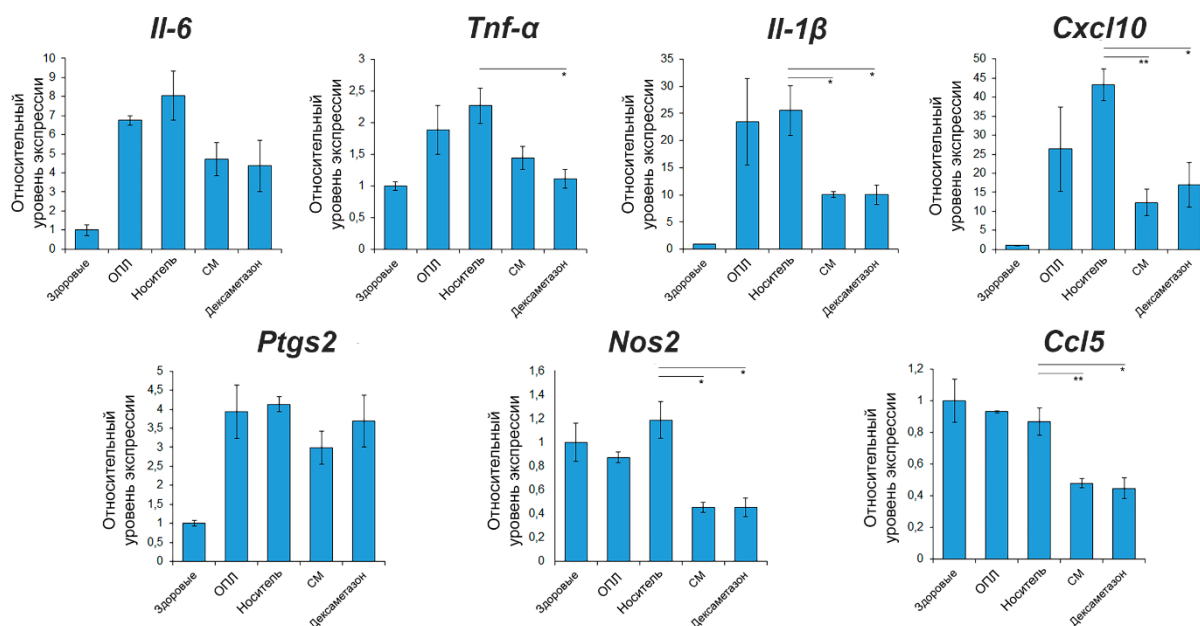


Рисунок 8. Уровни экспрессии ключевых генов ПМР в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после введения противовоспалительных соединений. Относительные уровни экспрессии были нормализованы на уровень гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (*Hprt*), принятым за ген домашнего хозяйства. Проанализировано по три образца из каждой группы в трех технических повторах. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ был проведен с помощью двухстороннего непарного т-теста по Стьюденту; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Уровни экспрессии генов *Il-6* и *Ccl2*, кодирующих основные про-воспалительные цитокины, снижались в ткани легких мышей с ОПЛ при введении СМ (в 1,8 и 1,9 раз, соответственно) и дексаметазона (в 1,5 и 1,7 раза, соответственно) по сравнению с контролем в большей степени, чем остальные гены, однако не достигали уровня здоровых животных через 24 ч после индукции ОПЛ (Таблица 6, Рисунок 8). Снижение уровней экспрессии других генов ПМР в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ при введении СМ и дексаметазона было менее значительным, чем у *Il-6* и *Ccl2*: по степени абсолютного снижения уровней экспрессии, гены расположились в следующем порядке: *Serpine1* (2 и 1,7 раза, соответственно) \geq *Eln* (1,8 и 2,1 раз, соответственно) $>$ *Timp1* (1,5 и 1,6 раз, соответственно) \approx *Socs3* (1,6 и 1,5 раза, соответственно). Видно, что при проведении предварительной терапии СМ прослеживалась тенденция к более выраженному снижению уровней экспрессии ингибитора сериновых протеаз *Serpine1* и

ингибитора цитокинового сигналинга *Socs3*, по сравнению с дексаметазоном, в то время как дексаметазон в большей степени предотвращал повышение уровней экспрессии генов *Timp1* и *Eln*, кодирующих тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы и компонент эластиновых волокон, соответственно, по сравнению с СМ, однако, выявленная разница между противовоспалительными соединениями была статистически не достоверна (Таблица 6, Рисунок 8). Экспрессия *Ptx3*, гена, кодирующего молекулу, принимающую участие в распознавании паттернов воспалительных процессов, не изменялась в ответ на введение СМ и дексаметазона. Уровень экспрессии гена *Cat*, кодирующего один из компонентов антиоксидантной системы каталазу, не изменялся в ткани легких мышей с ОПЛ после введения противовоспалительных соединений по сравнению с группой, не получавшей лечение, однако был несколько увеличен по сравнению с группой, получавшей только носитель (Таблица 6, Рисунок 8).

Таким образом, было показано, что уровни экспрессии идентифицированных генов ПМР (*Il6*, *Ccl2*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1* и *Socs3*) значительно коррелировали с тяжестью ОПЛ (возрастали в тканях легких мышей при развитии ЛПС-индуцированного ОПЛ и снижались при проведении предварительной противовоспалительной терапии СМ и дексаметазоном), что подтверждает регуляторную роль указанных генов в развитии и разрешении воспалительного ответа в легких, а также указывает на то, что данные гены и их белковые продукты могут являться потенциальными молекулярными маркерами и терапевтическими мишенями при воспалительных заболеваниях легких.

3.4 Идентификация узловых генов, связанных с развитием COVID-19, и их валидация на *in vivo* модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких

3.4.1 Биоинформатический анализ и идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием COVID-19

Следующим этапом исследования стал анализ вовлеченности обнаруженных ДЭГ и генов ПМР ОПЛ в развитие других патологических процессов в легких, таких как COVID-19. Для этого было проведено сопоставление 58 ДЭГ, участвующих в развитии легочного воспаления у мышей (Рисунок 4А), с генами, активация которых была обнаружена Daamen et al. в ткани легких пациентов, умерших от COVID-19 [607]. Данный анализ показал, что уровни экспрессии 15 из 58 ОПЛ-ассоциированных ДЭГ изменялись при развитии изменений в легких, индуцированных SARS-CoV-2: для 13 генов наблюдалась активация экспрессии, а для 2 – подавление экспрессии (Рисунок 9А). Анализ генно-ассоциативной сети, построенной из генов, ассоциированных с развитием COVID-19, показал, что гены *SAA1*, *RSAD2*, *IFI44*, *RTP4*, *MMP8* и *CCL2* обладали высоким уровнем

генов и их первых соседей с использованием плагина ClueGo программного обеспечения Cytoscape.

Затем, для идентификации вовлеченности данных генов в биологические процессы, ассоциированные с COVID-19, были идентифицированы первые соседи 15 генов, общих для COVID-19-ассоциированного регулома и ОПЛ, с последующей функциональной аннотацией реконструированной сети (Рисунок 9В, Г). Данный анализ продемонстрировал, что идентифицированные гены и их партнеры вовлечены в регуляцию трех главных процессов: ответ на вирусные и бактериальные инфекции (инфицирование коронавирусом, вирусом гриппа А, клеточный ответ на вирусы, инфекция *Staphylococcus aureus*), иммунный ответ (интерфероновый сигналинг, сигнальный путь Toll-подобных рецепторов, воспалительный ответ, гуморальный иммунный ответ) и сигнальный путь рецепторов G-связанных белков (GPCR) (связывание лигандов GPCR, сигналинг GPCR) (Рисунок 9Г). Учитывая функциональное обогащение терминов, ассоциированных с вирус-индуцированным иммунным ответом, а также известное участие сигналинга GPCR в прогрессии ряда воспалительных заболеваний [608], полученные результаты указывают на возможную регуляторную роль некоторых ОПЛ-ассоциированных генов в повреждении легких, индуцированном инфекцией SARS-CoV-2. Другими словами, данные результаты указывают на возможную связь между молекулярными механизмами, лежащими в основе острого воспаления легких, индуцированного ЛПС у мышей, и COVID-19 у человека.

3.4.2 Анализ изменения уровней экспрессии генов-регуляторов развития COVID-19 у человека на мышинной модели ЛПС-индуцированного ОПЛ

Уровни экспрессии топ-5 ОПЛ-ассоциированных генов, взаимосвязанных с регуломом COVID-19 (*Saa1*, *Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4* и *Mmp8*) (Рисунок 9Б), были проанализированы в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после терапии противовоспалительными соединениями. Введение ЛПС приводило к значительному повышению экспрессии всех вышеуказанных генов в ткани легких экспериментальных животных (Рисунок 10А), что хорошо согласуется с увеличением их экспрессии в ткани легких мышей при ОПЛ разной этиологии (Рисунок 4В). Примечателен тот факт, что кунжутное масло, использованное в качестве основного компонента растворителя для СМ, усиливало ЛПС-индуцированную экспрессию ОПЛ/COVID-19-взаимосвязанных генов. Противовоспалительные свойства как ДМСО, так и кунжутного масла хорошо известны и описаны в литературе [609,610], поэтому повышение экспрессии генов, ассоциированных с развитием воспаления, при введении

данных соединений мышам оказалось неожиданным. Введение дексаметазона мышам с ОПЛ показало более значительный эффект, по сравнению с СМ, что выражалось в снижении уровней экспрессии 4 из 5 анализируемых генов (*Saa1* в 3,6 раз, *Rsad2* в 3,2 раз, *Rtp4* в 2,1 раз, *Mmp8* в 4,7 раз), в то время как введение СМ уменьшало экспрессию только 3 из 5 выбранных генов (*Rsad2* в 2,9 раз, *Ifi44* в 2,8 раз, *Rtp4* в 1,9 раз) по сравнению с носителем (Рисунок 10).

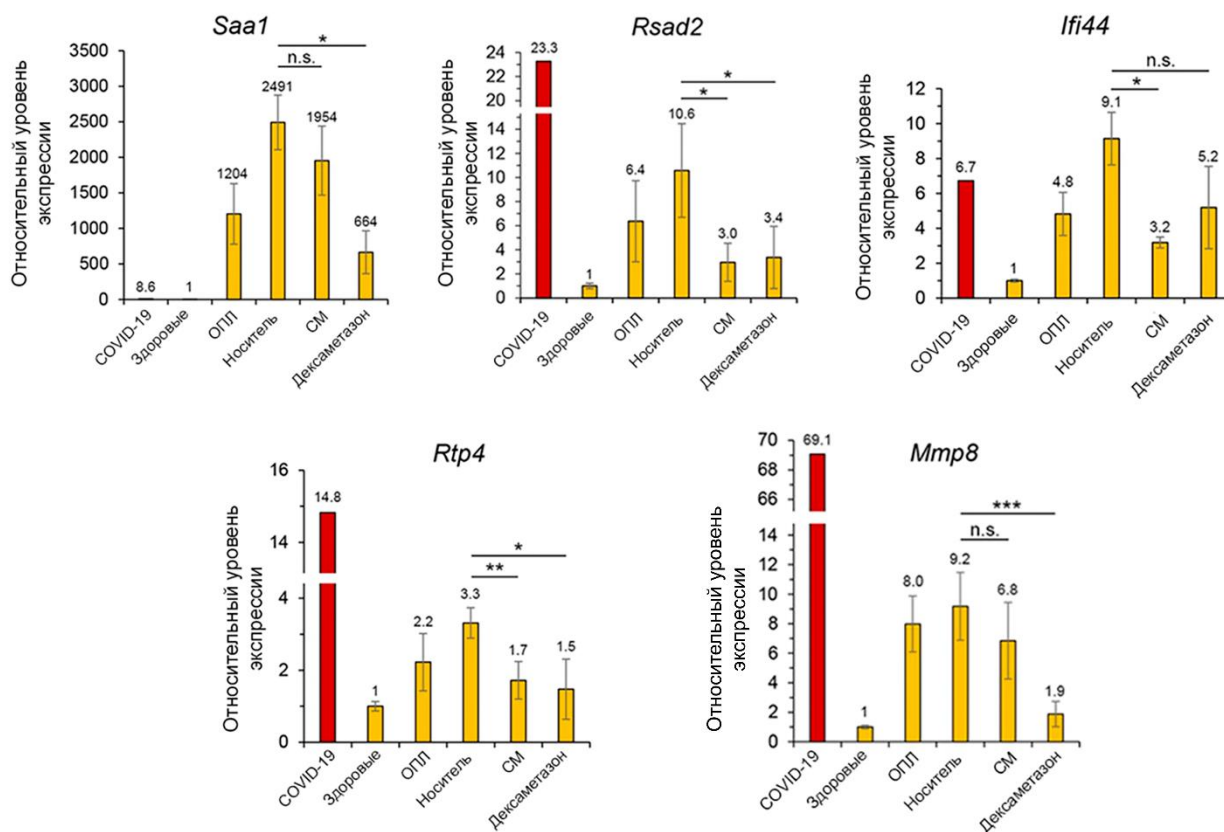


Рисунок 10. Уровни экспрессии ОПЛ/COVID-19-ассоциированных ДЭГ в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после предварительного введения противовоспалительных соединений. Относительные уровни экспрессии данных генов были нормализованы на уровень экспрессии гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (*Hprt*), которая использовалась в качестве гена домашнего хозяйства. Три образца из каждой экспериментальной группы были проанализированы в трипликате. Данные представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного т-теста; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. – различия статистически не значимы. Красные столбики отображают изменения уровней экспрессии упомянутых генов в легких пациентов с COVID-19 по сравнению с здоровыми легкими, представленные в исследовании Daamen et al. [607].

Из результатов следует, что ОПЛ-ассоциированные узловые гены, связанные с прогрессированием COVID-19, *Saa1*, *Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4* и *Mmp8* восприимчивы к противовоспалительной терапии, включая дексаметазон, который успешно используется для терапии COVID-19 в клинике [611], и СМ, структурный аналог которого прошел клиническое испытание II фазы у пациентов с COVID-19 [612]. Полученные результаты показывают необходимость дальнейшего исследования ОПЛ/COVID-19 ассоциированных генов в качестве потенциальных молекулярных и терапевтических мишеней, воздействие на которые могло бы уменьшить тяжесть ОРДС, ассоциированного с инфекцией SARS-CoV-2.

3.4.3. Взаимосвязь мышинных ОПЛ-ассоциированных узловых генов с ОПЛ/ОРДС у людей

Для определения того, участвуют ли гены, регулирующие развитие ОПЛ у мышей (топ-25 взаимосвязанных с ОПЛ генов, Рисунок 4Г) в развитии ОПЛ/ОРДС, не ассоциированного с SARS-CoV-2 у людей, был проведен ре-анализ шести различных полногеномных профилей экспрессии генов, полученных из образцов крови пациентов с ОПЛ, индуцированным вирусом гриппа А, бактериальными инфекциями и ОРДС, с оценкой уровней экспрессии и степени взаимосвязанности генов. Как показано на Рисунке 11, уровни экспрессии некоторых из топ-25 ассоциированных с ОПЛ генов, были повышены при развитии ОПЛ/ОРДС у людей и характеризовались высокой степенью взаимосвязанности. При этом обращает на себя внимание тот факт, что гены, ассоциированные с развитием SARS-CoV-2-индуцированного ОПЛ, обладали наибольшим уровнем экспрессии и взаимосвязанностью в наборах данных, полученных от пациентов с пневмонией, индуцированной вирусом гриппа А (*RSAD2*, *IFI44*, *LCN2*, *RTP4*, *MMP8*), в то время как среди генов ПМП в этих наборах данных дифференциально экспрессированными были только гены *CAT* и *SOCS3*. Данные результаты подтверждают, что: (1) между регуломом ОПЛ мышей и людей существует трансляционный мост; (2) при развитии ОПЛ, индуцированного вирусом гриппа, уровень экспрессии мышинных ОПЛ-ассоциированных генов изменяется значительно сильнее, чем у пациентов с бактериальной пневмонией и ОРДС; (3) регуляторы врожденного иммунитета *RSAD2*, *IFI44* и *RTP4* занимают ключевые позиции в генных сетях ОПЛ, индуцированного как вирусом гриппа (Рисунок 11), так и SARS-CoV-2 (Рисунок 9Б), и могут считаться новыми ключевыми регуляторами вирус-индуцированного ОПЛ/ОРДС у людей.

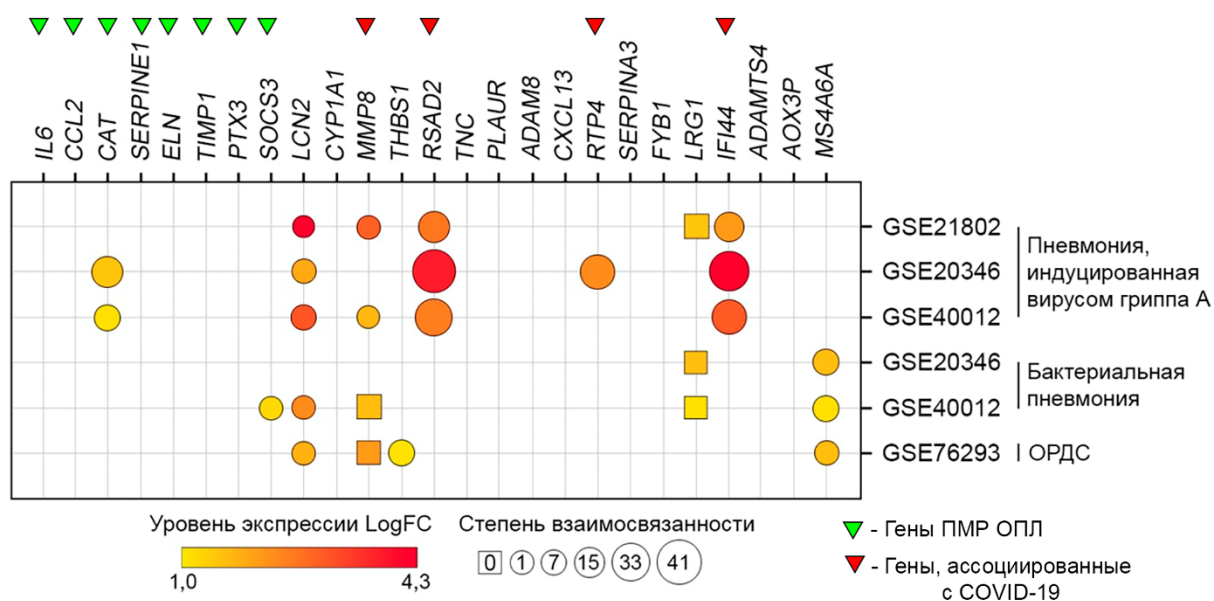


Рисунок 11. Уровни экспрессии и степени взаимосвязанности мышечных ОПЛ-ассоциированных ключевых генов в человеческом ОПЛ/ОРДС, индуцированном различными стимулами. $\text{LogFC} = \text{Log}_2$ (разы изменения экспрессии). Зеленые треугольники обозначают гены ПМП ОПЛ, красные треугольники обозначают гены, связанные с регуломом COVID-19.

Таким образом, путем сопоставления идентифицированных ОПЛ-ассоциированных ДЭГ с профилем экспрессии генов в постмортальных образцах легких пациентов с COVID-19, а также их последующей валидации в легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ, были выявлены гены, обладающие регуляторной ролью как при прогрессировании ОПЛ, так и при развитии COVID-19-ассоциированного ОРДС (*SAAI*, *RSAD2*, *IFI44*, *RTP4*, и *MMP8*).

3.5 Корреляции между идентифицированными ОПЛ-ассоциированными ДЭГ и выживаемостью пациентов с злокачественными новообразованиями легких и неопухолевыми хроническими заболеваниями легких

Учитывая тесную связь острого и хронического воспаления, легочного фиброза, метаплазии, дисплазии и злокачественной трансформации, была проанализирована связь идентифицированных ОПЛ-ассоциированных ДЭГ с выживаемостью пациентов с аденокарциномой легких (LUAD) и плоскоклеточным раком легких (LUSC) с помощью баз данных The Cancer Genome Atlas (TCGA) и Human Protein Atlas (HPA). Для проведения данного анализа, список топ-25 ОПЛ-ассоциированных ДЭГ был загружен в TCGA и HPA, и среди них отображены гены, имеющие достоверные корреляции между

уровнем экспрессии и продолжительностью жизни пациентов с злокачественными новообразованиями легких. Затем результаты анализа генов, общих для LUAD и LUSC, были представлены в виде Circos плота и графиков (в случае TCGA) и только графиков (в случае HPA). Ширина полосок Circos плота прямо пропорциональна величине p .

Анализ базы данных TCGA показал, что из топ-25 генов, ассоциированных с острым воспалением легких (Рисунок 4Г), 14 генов связаны с ухудшением прогноза у пациентов с LUAD и LUSC и могут влиять на скорость прогрессирования злокачественных новообразований легких (Рисунок 12А). Повышение экспрессии генов *IL-6*, *CCL2*, *PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1*, *MMP8*, *PLAUR*, *ADAM8*, *THBS1* и *SERPINA3* ассоциировалось с плохой выживаемостью пациентов с LUSC, в то время как высокая экспрессия *CXCL13*, *PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR* и *ADAMTS4* была ассоциирована с более высокой смертностью пациентов с LUAD. Кроме того, 4 гена (*PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1* и *PLAUR*) являются общими, как для LUAD, так и для LUSC, что указывает на потенциальную универсальность данных генов в качестве маркеров тяжести злокачественных новообразований легких (Рисунок 12А, Б). Следует отметить, что именно высокие уровни экспрессии практически всех идентифицированных генов были ассоциированы с низкой выживаемостью пациентов (LUAD и LUSC), тогда как для генов *CAT* и *ELN* с плохим прогнозом (LUAD) были связаны низкие уровни их экспрессии (Рисунок 12А).

Для подтверждения полученных данных, уровни экспрессии *PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1* и *PLAUR* были проанализированы с помощью базы данных HPA (Рисунок 12В). Проведенный анализ показал, что данные гены играют важную роль в прогрессии опухолевых заболеваний легких: повышение уровней экспрессии *PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1* и *PLAUR* в двух независимых базах данных коррелировало с низкой выживаемостью пациентов с LUAD и LUSC.

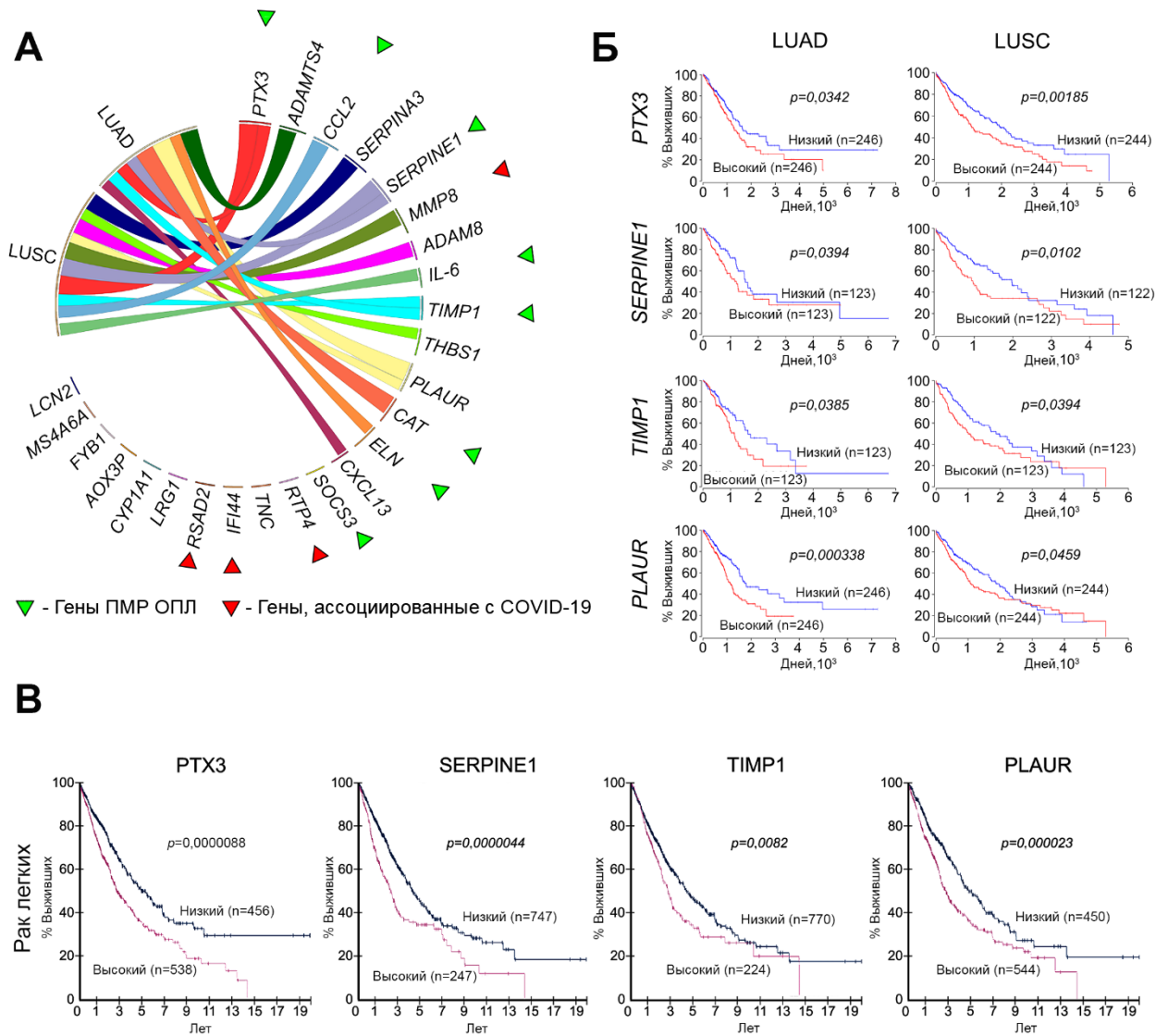


Рисунок 12. Связь ОПЛ-ассоциированных ДЭГ с выживаемостью пациентов с аденокарциномой легких (LUAD) и плоскоклеточным раком легких (LUSC). (А) Корреляции выживаемости пациентов с уровнями экспрессии генов были проанализированы с помощью TCGA. Данные представлены в виде Circos плота, где ширина полосы прямо пропорциональна величине p . (Б) Кривые Каплана-Мейера, демонстрирующие выживаемость пациентов с LUAD и LUSC в зависимости от уровня экспрессии конкретного гена в ткани легких. (В) Кривые Каплана-Мейера, демонстрирующие выживаемость пациентов с злокачественными новообразованиями легких в зависимости от уровня конкретного белка в ткани легких.

Далее нами был проведен анализ взаимосвязанности топ-25 идентифицированных ОПЛ-ассоциированных ДЭГ с неопухолевой хронической патологией легких, чтобы оценить возможную регуляторную роль данных генов в развитии отдаленных последствий воспалительных изменений в легких. Был проведен анализ научных статей, исследующих

ОПЛ-ассоциированные ДЭГ в связи с неопухолевыми хроническими воспалительными заболеваниями легких, такими как идиопатический легочный фиброз, хронический бронхит, хроническая эмфизема и хроническая обструктивная болезнь легких, бронхоэктатическая болезнь и муковисцидоз, а также системный склероз, сопровождающийся легочным фиброзом (Таблица 7).

Таблица 7. Связь ОПЛ-ассоциированных ДЭГ, идентифицированных на мышинных моделях, с хроническими заболеваниями легких у человека.

Ген*	Хронические заболевания легких				
	Идиопатический легочный фиброз	ХОБЛ и хронический бронхит	Бронхоэктатическая болезнь и кистозный фиброз	Хроническая эмфизема	Системный склероз
<i>IL-6</i>	[613–615]	[616–619]	[620,621]		[622]
<i>CXCL13</i>	[623]	[624]	[625]	[626]	[627]
<i>TIMP1</i>	[503,628]	[629–631]	[632]	[633,634]	
<i>CCL2</i>	[614,635]	[636,637]	[638]		
<i>ADAM8</i>		[639,640]			
<i>THBS1</i>	[641,642]	[643]			
<i>SOCS3</i>	[615]	[644]	[645]		
<i>SERPINA3</i>		[646]			
<i>SERPINE1</i>	[615]	[647–649]			
<i>PLAUR</i>		[649–651]	[650]		[652]
<i>TNC</i>	[653]	[654,655]			[656]
<i>MMP8</i>	[503]	[617,657,658]		[659]	[660]
<i>IFI44</i>	[661]				[662,663]
<i>RSAD2</i>		[664]			
<i>PTX3</i>			[665]	[518]	[666]
<i>LRG1</i>		[667]		[668]	
<i>CAT</i>		[669–672]			
<i>ELN</i>		[673]			

*Данные гены вовлечены в патогенез указанных хронических заболеваний легких, обладают прогностической значимостью и коррелируют с тяжестью этих легочных патологий. Зеленым цветом выделены гены ПМР ОПЛ, красным цветом выделены гены, связанные с развитием COVID-19-индуцированного ОПЛ/ОРДС.

В результате проведенного анализа обнаружено, что среди всех вышеуказанных патологий, ОПЛ-ассоциированные ДЭГ, в том числе и гены ПМР, обладают наибольшей взаимосвязью с патогенезом ХОБЛ и хронического бронхита – хроническими заболеваниями дыхательной системы, в основе развития которых лежит воспаление и нарушение иммунитета [674]. В то время как в меньшей степени данные гены были связаны с идиопатическим легочным фиброзом, бронхоэктатической болезнью, хронической эмфиземой и системным склерозом (Таблица 7). Таким образом, было показано, что идентифицированные ОПЛ-ассоциированные ДЭГ вовлечены в развитие не

только острого воспаления легких, вызванного различными этиологическими факторами, но и имеют тесную связь с хронической легочной патологией и злокачественной трансформацией легких, возможно, вследствие взаимосвязанности сигнальных путей, регулирующих данные процессы.

Результаты этого этапа работы показали, что уровни экспрессии большинства идентифицированных ОПЛ-ассоциированных ДЭГ, коррелируют с неблагоприятным прогнозом для пациентов с LUAD и LUSC. Четыре гена (*TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR* и *PTX3*), ассоциированные с низкими показателями общей выживаемости у пациентов с LUAD и LUSC, также участвуют в регуляции ремоделирования ВКМ [675–678], процессе, который играет ключевую роль в озлокачествлении опухоли и метастазировании [679]. Учитывая хорошо известный факт индукции ОПЛ у пациентов с злокачественными новообразованиями в ответ на химиотерапию, в том числе гефтинибом [680], гемцитабином [681], 5-фторурацилом [682], и лобэктомии в случае немелкоклеточного рака легких [683], наши результаты указывают на то, что ОПЛ-ассоциированные ключевые гены могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров тяжести течения и возможного рецидива рака легких после хирургического удаления и химиотерапии.

3.6 Взаимосвязь и взаимодействие идентифицированных ОПЛ-ассоциированных ДЭГ при различных заболеваниях легких

Острое воспаление легких является одним из главных патогенетических составляющих ОПЛ/ОРДС, которые могут развиваться в результате многих патологий дыхательной системы, включая COVID-19 [85,684]. В отсутствие эффективной терапии данные заболевания часто хронизируются, приводя к необратимому повреждению и ремоделированию ткани легких, с последующим развитием фиброза и/или злокачественной трансформации [685,686]. Регуляция данных комплексных последствий острого повреждения легких может восстановить нарушенный гомеостаз легких, снижая риск развития необратимого нарушения легочных функций и повреждения ткани легких. Несмотря на большое количество работ, исследующих патогенез ОПЛ/ОРДС, в том числе индуцированных инфекцией SARS-CoV-2, он все еще не изучен полностью.

Для того, чтобы всесторонне оценить возможную регуляторную роль, а также связь идентифицированных нами узловых ОПЛ-ассоциированных ДЭГ (топ-25) с развитием тяжелых заболеваний легких, были сопоставлены степени взаимосвязанности данных генов в сети белок-белковых взаимодействий с аналогичными параметрами в

инфламатоме грызунов, COVID-19-ассоциированном регуломе, а также с показателями корреляции анализируемых генов с выживаемостью пациентов с опухолями легких.

3.6.1 Взаимосвязь ОПЛ-ассоциированных ключевых регуляторов с прогрессированием COVID-19 и опухолевых заболеваний легких

В результате проведенного анализа данных обращают на себя внимание три ОПЛ-ассоциированных ключевых гена, наиболее взаимосвязанных с регуломом COVID-19 (*RTP4*, *IFI44*, *RSAD2*), но не связанных с опухолевой трансформацией в легких и не являющихся частью инфламатома грызунов (Рисунок 13А), которые представляют собой интерферон-индуцибельные гены, участвующие в регуляции противовирусного ответа организма [687–689]. Полученные результаты показывают, что, с одной стороны, эти гены формируют общий кластер с генами-партнерами в COVID-19-ассоциированной генной регуляторной сети (Рисунок 9В), а с другой – не ассоциированы с ОПЛ/ОРДС согласно проведенному текст-майнинговому анализу (Рисунок 4Д). Учитывая эти данные, а также известное участие *RTP4*, *IFI44* и *RSAD2* в регуляции ответа организма на инфекцию SARS-CoV-2 [690,691], эти гены могут считаться потенциальными новыми маркерами воспалительных заболеваний легких различной этиологии.

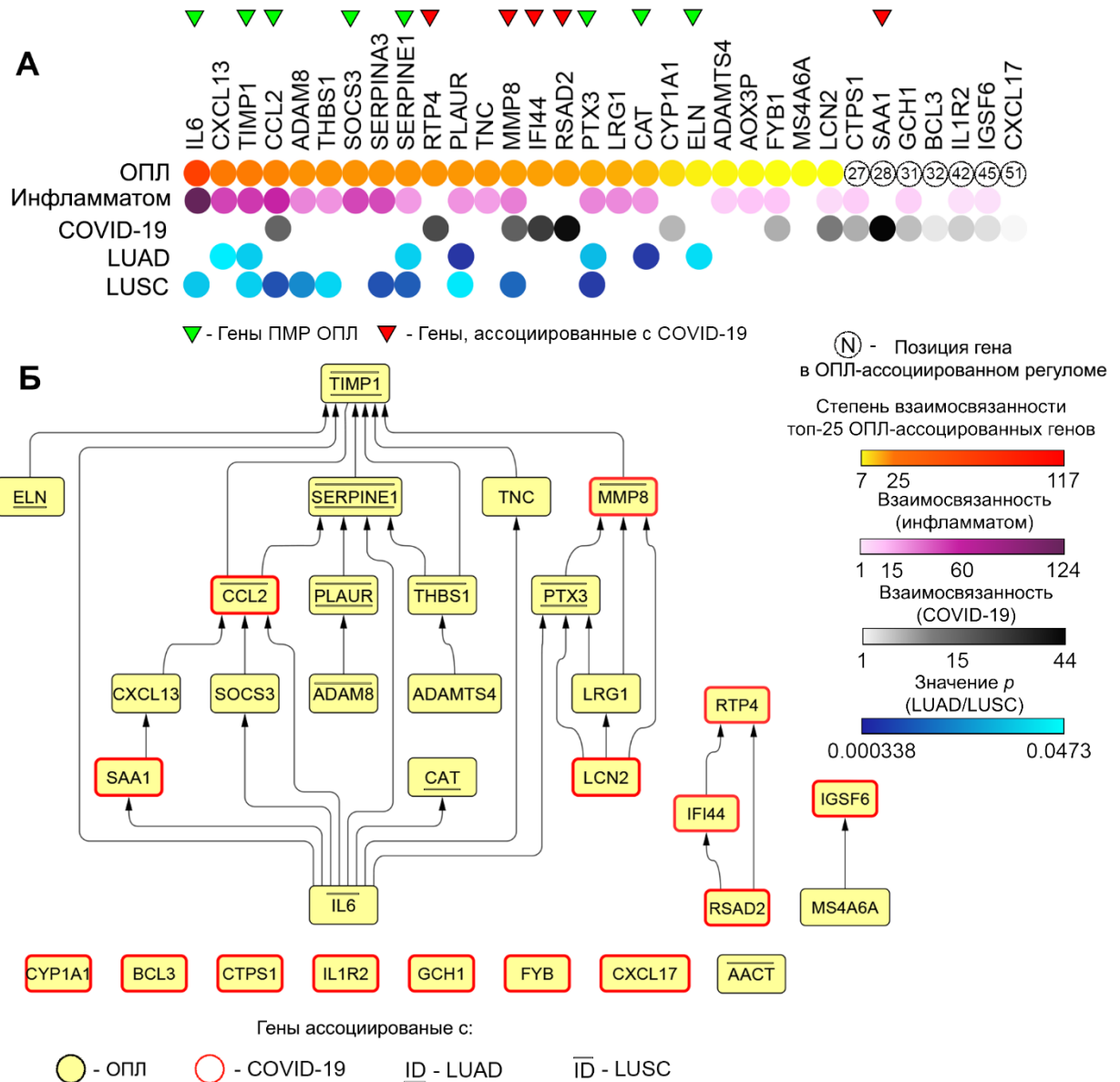


Рисунок 13. Участие выявленных ключевых ОПЛ-ассоциированных генов в различных легочных заболеваниях. (А) Тепловая карта, показывающая степень взаимосвязанности выявленных ОПЛ-ассоциированных ключевых генов с инфламмом грызунов, регуломом COVID-19 и прогрессией рака легких у человека. Зеленые треугольники указывают на гены ПМП ОПЛ, красные треугольники указывают на гены, ассоциированные с COVID-19. **(Б)** Иерархическая сеть, реконструированная из всех выявленных ключевых регуляторных генов, ассоциированных с развитием ОПЛ (STRING, показатель уверенности > 0,7).

Два других гена, связанных с инфицированием SARS-CoV-2, *CCL2* и *MMP8* характеризуются высокими показателями степени взаимосвязанности как в ОПЛ-, так и в COVID-19-ассоциированных генных сетях и инфламмоме грызунов (Рисунок 13А), а

также являются известными регуляторами нейтрофил-ассоциированного восстановления ткани легких, поскольку белковые продукты данных генов обладают хемоаттрактантной функцией в отношении нейтрофилов [692] и участвуют в ремоделировании поврежденной ткани легких [94], соответственно. Что касается *SAA1*, возрастание показателя степени его взаимосвязанности с 5 до 44 в ОПЛ- и COVID-19-ассоциированных генных сетях (Рисунок 13А), соответственно, указывает на необходимость дальнейшего исследования *SAA1* как возможного регулятора тяжести повреждения легких. Кроме того, *SAA1* является одним из основных белков острой фазы, которые обладают хемоаттрактантной активностью в отношении нескольких подтипов лейкоцитов и способствуют выживанию моноцитов [693]. Более того, было обнаружено, что рекомбинантный *SAA1* является мощным индуктором гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) *in vivo*, приводящим к нейтрофилии [694], появление которой ассоциировано с развитием ОРДС [695].

Несмотря на тот факт, что уровни экспрессии идентифицированных ОПЛ/COVID-19-ассоциированных узловых генов были проанализированы в ткани легких больных, умерших от инфекции COVID-19 [607], недавно стало известно, что уровни экспрессии некоторых из этих генов и их белковых продуктов (*CCL2*, *MMP8*, *IFI44*, *LCN2*, *SAA1*) также повышались в плазме, бронхоальвеолярной жидкости, назофарингеальных смывах и слюне пациентов с COVID-19, и коррелировали с тяжестью течения COVID-19 и неблагоприятным прогнозом у данных пациентов [690,696–699]. *RSAD2* и *IL1R2* также вовлечены в регуляцию развития инфекции SARS-CoV-2, однако, уровни экспрессии данных генов коррелировали только с вирусной нагрузкой [700] и продолжительностью выделения вируса [155], но не с тяжестью течения COVID-19.

Также примечательным является тот факт, что уровень экспрессии гена *Cat*, down-регулируемого в ткани легких мышей с ОПЛ как по данным биоинформатического анализа, так и при валидации *in vivo* и входящего в топ-25 наиболее взаимосвязанных генов, по данным Cavalcanti L.F. et al. снижался в ткани легких пациентов с COVID-19 вместе со снижением концентрации перекиси водорода H_2O_2 в плазме крови, причем в группе пациентов, умерших от COVID-19, выявленные изменения были более выраженными, чем в группе выживших [701]. Оксидативный стресс является доказанным повреждающим фактором при развитии ОПЛ, в том числе и COVID-19-индуцированного [702], поэтому снижение экспрессии данного гена, кодирующего каталазу – один из основных ферментов антиоксидантной защиты, вместо его закономерного повышения по механизму положительной обратной связи, представляется неожиданным и требует дальнейших исследований.

Таким образом, сопоставление ОПЛ-ассоциированных ДЭГ с профилем экспрессии генов пациентов с COVID-19-индуцированным ОРДС [607], позволило идентифицировать ряд общих генов, обладающих самым высоким показателем степени взаимосвязанности и дифференциально экспрессированных как в острой (ОПЛ, мыши), так и в подострой (COVID-19, посмертный человеческий материал) фазах повреждения легких (*SAA1*, *RSAD2*, *IFI44*, *RTP4* и *MMP8*), что доказывает возможную регуляторную роль данных генов в прогрессии ОПЛ, в том числе и COVID-19-ассоциированного ОРДС. Кроме того, ОТ-ПЦР анализ показал, что экспрессия *Saa1*, *Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4* и *Mmp8* была значительно повышена в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ и значительно снижалась при противовоспалительной терапии дексаметазоном и СМ. Эти данные подтверждают, что модель ЛПС-индуцированного ОПЛ у мышей в некоторых аспектах схожа с COVID-19-ассоциированным повреждением легких у человека и может являться эффективным инструментом в разработке подходов к противовоспалительной терапии COVID-19.

Также обращают на себя внимание 4 гена (*PTX3*, *SERPINE1*, *TIMP1*, *PLAUR*), которые обладают высокой степенью взаимосвязанности в ОПЛ-ассоциированном регуломе, входят в инфламатом грызунов, однако, не связаны с прогрессией COVID-19, и повышенные уровни экспрессии которых коррелируют с низкой продолжительностью жизни пациентов с опухолевыми заболеваниями легких (Рисунок 13А). Функционально данные гены участвуют в гомеостазе внеклеточного матрикса [703], а некоторые из них исследуются в качестве факторов прогрессии рака головы и шеи [704] и легких [705]. Тот факт, что уровни экспрессии данных генов изменяются при развитии острого воспаления и в ответ на противовоспалительную терапию, указывает на то, что *PTX3*, *SERPINE1*, *TIMP1*, *PLAUR* могут являться возможными регуляторами злокачественной трансформации клеток в ответ на воспаление.

3.6.2 Иерархический анализ генов-регуляторов развития ОПЛ и идентификация наиболее перспективных терапевтических мишеней

В результате биоинформатического анализа, проведенного в данном исследовании, был идентифицирован ряд генов, вовлеченных в развитие ОПЛ у мышей, а также некоторых тяжелых заболеваний легких у людей опухолевой и неопухолевой природы. Из-за большого разнообразия и разнонаправленности выявленных ключевых генов был проведен иерархический анализ с точки зрения вовлеченности идентифицированных ОПЛ-ассоциированных генов в регуляцию воспалительного ответа в легких. Как показано на иерархической генной сети (Рисунке 13Б), *IL6* находится в самом начале этой генной сети, что явно демонстрирует его ключевую роль в развитии ОПЛ и полностью согласуется с высокой степенью взаимосвязанности этого гена в проанализированном

регуломе ОПЛ (Рисунок 4Г) и результатами текст-майнингового анализа, проведенного нами, в котором *IL6* являлся наиболее связанным с ключевыми словами ОПЛ/ОРДС (Рисунок 4Д). *TIMP1* занимает конечную позицию в генной сети мастер-регуляторов (Рисунок 13Б). Учитывая ключевую роль данного гена в ОПЛ-ассоциированных генных сетях (третье место по степени взаимосвязанности после *IL6* и *CXCL13*) (Рисунок 4Г), а также связь по результатам текст-майнинга с широким спектром острых воспалительных заболеваний легких (Рисунок 4Д), наш анализ показал актуальность изучения *TIMP1* в качестве потенциальной терапевтической мишени в отношении ОПЛ. Другими генами, которые также могут считаться потенциальными ОПЛ-ассоциированными мишенями, являются *SERPINE1*, *CCL2*, *MMP8* и *PTX3*, которые, согласно реконструированной генной сети, связаны с несколькими ОПЛ-ассоциированными мастер-регуляторами (Рисунок 13Б) и обладают относительно высокой степенью взаимосвязанности в ОПЛ-ассоциированных сетях (9, 4, 13 и 16 место, соответственно) (Рисунок 4Г, 13А).

Следует отметить, что сеть, представленная на Рисунке 13Б, может быть разделена на две части: верхние позиции в сети занимают гены, участвующие в регуляции воспаления (*IL6*, *SAA1*, *LCN2*, *SOCS3*, *CXCL13*), в то время как большинство генов на нижних позициях иерархической сети являются известными регуляторами ремоделирования ВКМ (*TIMP1*, *ELN*, *SERPINE1*, *TNC*, *MMP8*, *CCL2*, *PLAUR*, *TNNBS1*, *PTX3*, *ADAM8*, *ADAMTS4*). Эти результаты говорят в пользу того, что процессы воспаления являются ключевыми пусковыми точками развития ОПЛ, а их фармакологическое подавление может быть эффективным подходом к купированию первых этапов развития повреждения легких [706], а в случае уже развившегося ОПЛ, подавление ремоделирования ВКМ может являться потенциальной терапевтической стратегией в отношении этого заболевания. В ряде работ было показано, что ингибирование матриксных металлопротеиназ, которые играют ключевую роль в регуляции функционирования ВКМ, эффективно подавляет развитие ОПЛ на разных *in vivo* моделях [707–709].

Также следует отметить, что в соответствии с представленной иерархической сетью большинство из идентифицированных ОПЛ-ассоциированных генов, вовлеченных в регуляцию SARS-CoV-2-индуцированного ОРДС либо формируют отдельные кластеры в мастер-регуляторной генной сети (*RSAD2*, *IFI44*, *RTP4*), либо не имеют никаких связей с данной сетью (Рисунок 13Б). Низкое количество COVID-19-ассоциированных ключевых генов в мастер-регуляторной сети (Рисунок 12А, Б) говорит о том, что модель ОПЛ, хотя и является важным и полезным экспериментальным инструментом в разработке новых терапевтических подходов к лечению COVID-19, тем не менее обладает некоторыми

ограничениями, поскольку не моделирует в полной степени поздние изменения в ткани легких, которые наблюдаются у пациентов, умерших от COVID-19.

Заключение

Таким образом, в результате всестороннего биоинформатического анализа с последующей валидацией данных на *in vivo* модели был выявлен ряд генов, ассоциированных с острыми воспалительными изменениями в легких различной этиологии и играющих регуляторную роль в COVID-19-индуцированном ОПЛ/ОРДС и опухолевых заболеваниях легких. Показано, что воспаление и последующее ремоделирование ВКМ легких являются ключевыми этапами развития ОПЛ различной этиологии, и фармакологическое воздействие на ключевых участников данных процессов (воспаление: *Il-6*, ремоделирование ВКМ: *Timp1, Serpine1, Ccl2, Mmp8, Ptx3, Eln*) может являться потенциальной терапевтической стратегией в отношении ОПЛ/ОРДС, в том числе вызванного COVID-19. Вовлечение ряда ОПЛ-ассоциированных узловых генов в регулом COVID-19 (*Rtp4, Ifi44, Rsad2, Saa1, Mmp8*) позволяет предположить возможность использования данных генов, а также противовоспалительных препаратов, регулирующих их экспрессию, в качестве эффективного подхода для терапии ОПЛ/ОРДС-индуцированного SARS-CoV-2. Кроме того, выявленная ассоциация некоторых ОПЛ-специфических генов (*TIMP1, SERPINE1, PLAUR, PTX3*) с плохой выживаемостью пациентов с раком легких может дать возможность дальнейшего изучения этих генов в качестве маркеров тяжести опухолевых заболеваний легких, сопровождающихся воспалением.

3.7 Идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием овалбумин (ОВА)-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза

Несмотря на разницу в этиологии и симптомах, общей характеристикой астмы и ХОБЛ является воспаление дыхательных путей, приводящее к развитию легочного фиброза [710]. Тяжесть астма- и ХОБЛ-ассоциированного воспаления может отличаться по состоянию легких и по эффективности фармакологической противовоспалительной терапии, поэтому прогнозирование развития и прогрессирования фиброза при данных заболеваниях является нетривиальной задачей [711–713]. Для успешного предотвращения и терапии легочного фиброза необходимо использование подходов доказательной

медицины, основанных на понимании молекулярных механизмов, вовлеченных в прогрессирование воспалительных заболеваний легких и развитие легочного фиброза.

3.7.1 Идентификация ключевых генов, ассоциированных с острой астмой

Для идентификации узловых генов, ассоциированных с острым астматическим воспалением, были проанализированы уровни экспрессии генов в легких мышей с астмой в сравнении с легкими здоровых мышей путем ре-анализа кДНКовых данных полногеномного микрочипирования (GSE41665, GSE116504, GSE122197, GSE27066), депонированных в базе данных GEO с использованием сервиса GEO2R (Рисунок 14). Учитывая тот факт, что ингаляция жестких многослойных углеродных нанотрубок вызывает у мышей воспаление, подобное аллергии и опосредованное врожденным иммунитетом [714], в анализ был также включен набор транскриптомных данных GSE50176. Следует отметить, что для анализа были выбраны данные, полученные на образцах, забранных через 24 ч после последнего введения индуктора: овальбумина или углеродных нанотрубок.

На Рисунке 14А представлено сравнение различных астматических транскриптомов с помощью диаграммы Венна, демонстрирующей 47 ДЭГ, общих для всех использованных наборов данных. Функциональная аннотация идентифицированных генов выявила, что данные ДЭГ ассоциированы с регуляцией хемокиновых сигнальных путей, хемотаксисом эозинофилов и дифференцировкой эпителиальных клеток легких – процессов, хорошо изученных в отношении развития астмы [715], а также с биосинтезом специализированных липидных медиаторов, играющих важную роль в регуляции и элиминации воспалительного экссудата [716] (Рисунок 14Б).

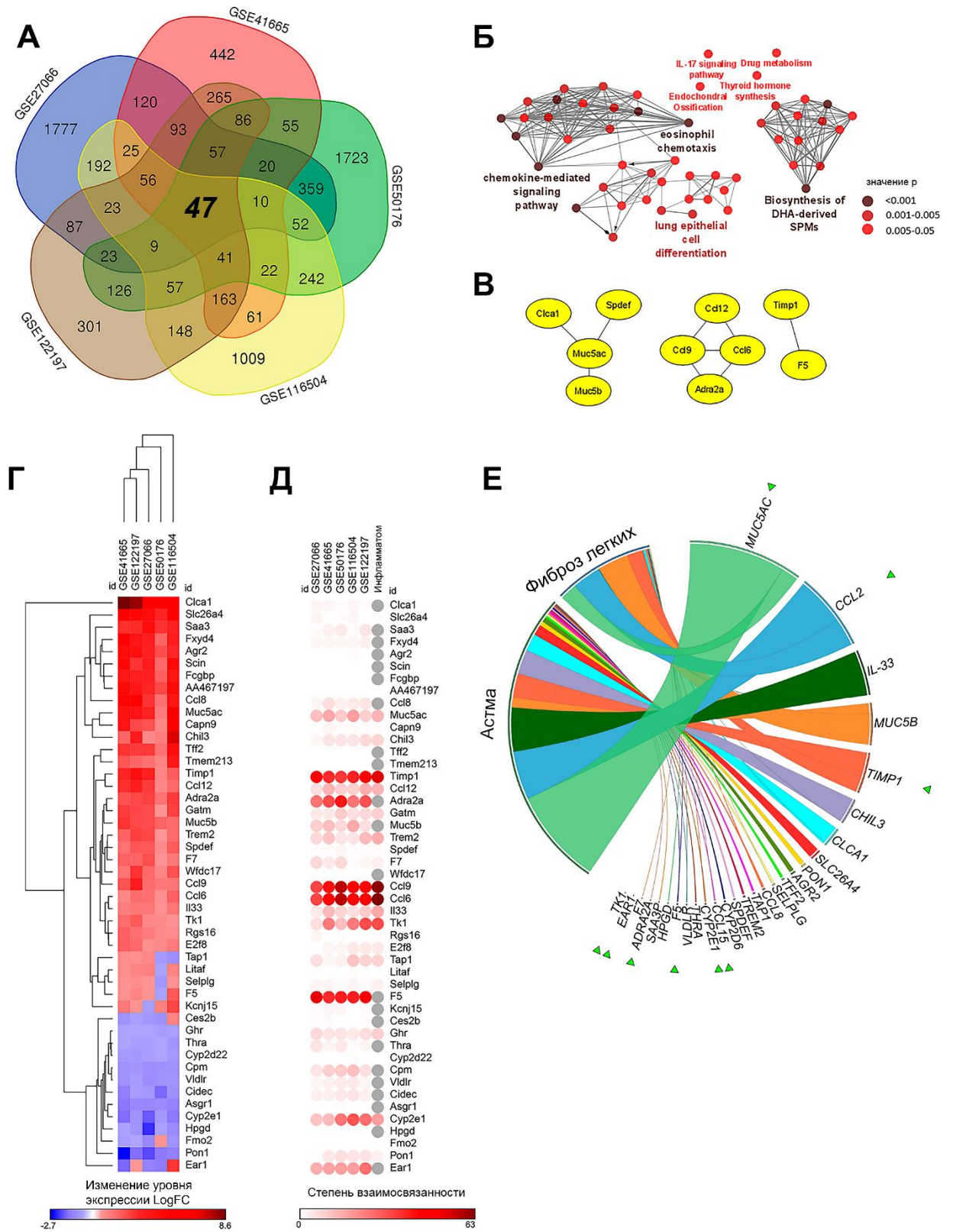


Рисунок 14. Узловые гены, вовлеченные в развитие острой астмы. (А) Диаграмма Венна, демонстрирующая дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ), общие для 5 независимых наборов транскриптомных данных. **(Б)** Функциональный анализ идентифицированных общих ДЭГ. Обогащение терминов по Gene Ontology (biological processes), KEGG, REACTOME и WikiPathways было выполнено с помощью плагина

ClueGo в программном обеспечении Cytoscape. Названия показаны для наиболее значимых терминов. Цвет узлов обозначает значимость обогащения. Отображены только сигнальные пути со значением $p < 0,05$ после коррекции по Холму-Бонферрони в случае множественных сравнений. **(В)** Генно-ассоциативная сеть, реконструированная с участием 47 ДЭГ, общих для всех астма-ассоциированных наборов данных, с помощью базы данных STRING (показатель уверенности $\geq 0,7$, максимальное количество интеракторов = 0). **(Г)** Тепловая карта, демонстрирующая уровни экспрессии 47 общих ДЭГ в независимых наборах транскриптомных данных. $\text{LogFC} = \text{Log}_2$ (разы изменения экспрессии). **(Д)** Тепловая карта, демонстрирующая степень взаимосвязанности 47 общих ДЭГ в независимых наборах транскриптомных данных. **(Е)** Совместное упоминание идентифицированных общих ДЭГ с ключевыми словами «астма» и «фиброз легких», согласно текст-майнинговому анализу и визуализированное с помощью Circos плота. Зеленые треугольники обозначают топ-10 наиболее взаимосвязанных генов.

Для анализа взаимодействий между 47 общими ДЭГ, была реконструирована генно-ассоциативная сеть с помощью базы данных STRING (Рисунок 14В). Обнаружено, что только 10 из 47 идентифицированных астма-специфических генов входили в слабо связанную сеть, в то время как остальные ДЭГ не образовывали связей друг с другом. Полученные результаты указывают на то, что идентифицированные астма-специфические гены могут быть участниками различных компартментов астма-ассоциированного регулома.

Далее выявленные ДЭГ были кластеризованы по уровням их экспрессии с помощью метода Евклидовых дистанций, в результате чего были сформированы два кластера, которые включали 34 up-регулируемых и 13 down-регулируемых генов (Рисунок 14Г). Дальнейший анализ степени взаимосвязанности идентифицированных ДЭГ в сетях белок-белковых взаимодействий показал, что ряд генов, таких как *Ccl6*, *Ccl9*, *F5*, *Timp1*, *Adra2a*, *Cyp2e1*, *Tk1*, *Ear1*, *Muc5ac*, *Ccl12*, обладают высокой степенью взаимосвязанности с астма-ассоциированным регуломом и могут играть регуляторную роль в патогенезе астмы (Рисунок 14Д).

3.7.2 Характеристика топ-10 наиболее взаимосвязанных генов, ассоциированных с острой астмой

К топ-10 наиболее взаимосвязанных в астма-ассоциированном регуломе генов относились:

1) гены, кодирующие про-воспалительные хемокины (*Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl12*), регулирующие хемотаксис моноцитов и Т-лимфоцитов и участвующие в развитии

широкого спектра воспалительных заболеваний, включая воспаление дыхательных путей аллергической этиологии [717–720];

2) ингибитор матриксной металлопротеиназы *Timp1*, повышенный уровень экспрессии которого связан с тяжелым течением некоторых легочных заболеваний, ассоциированных с воспалением, фиброзом и злокачественной трансформацией [721–724];

3) компонент слизи дыхательных путей *Muc5ac*, дисбаланс синтеза которого наблюдается при развитии астмы, ХОБЛ и легочного фиброза [725–729];

4) фактор коагуляции *F5*, участвующий в превращении протромбина в тромбин и, таким образом, в развитии воспаления легких [730];

5) цитохром *Cyp2e1*, член семейства цитохрома P450, вовлеченный в метаболизм ксенобиотиков и развитие астмы [731];

6) адренергический рецептор *Adra2a* и транскрипционный фактор *Ear1*, участвующие в регуляции симпатической нервной системы [732] и метаболических процессах [733], соответственно;

7) тимидин киназа 1 *Tk1*, фермент, играющий важную роль в репарации ДНК и используемый в качестве диагностического и прогностического биомаркера при различных новообразованиях, включая аденокарциному легких [734,735].

Более того, 6 из 10 идентифицированных астма-ассоциированных узловых генов (*Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl12*, *Timp1*, *Muc5ac*, *Cyp2e1*) присутствовали в инфламатоме грызунов, ранее идентифицированном в исследовании Wang et al. на 11 независимых моделях воспалительных заболеваний грызунов [582], что указывает на их ключевую регуляторную роль в остром воспалении (Рисунок 14Д).

Далее была определена степень исследованности идентифицированных 47 общих ДЭГ в области астмы и ее хронизации. Был проведен анализ совместного упоминания человеческих ортологов данных генов и ключевых слов «asthma» (астма) и «pulmonary fibrosis» (легочный фиброз) в текстах научных статей, депонированных в базе данных MEDLINE с помощью сервиса GenCLiP3. Было обнаружено, что только 26 из 47 исследуемых генов были ассоциированы с вышеупомянутыми заболеваниями легких (Рисунок 14Е), в число которых входили 9 генов из топ-10 генов, выявленных путем анализа сети белок-белковых взаимодействий: *Muc5ac*, *Ccl12* (человеческий ортолог *CCL2*), *Muc5b*, *Timp1*, *Ccl6* и *Ccl9* (человеческий ортолог *CCL15*), *Cyp2e1*, *F5* и *Adra2a*. Данные результаты подтверждают надежность данных, полученных с помощью подхода *in silico* (обнаруженные ключевые гены уже были широко исследованы в отношении патогенеза астмы), а также то, что данные гены могут считаться потенциальными новыми

молекулярными маркерами астмы и других воспалительных заболеваний легких. Более того, данные результаты указывают на возможные связи между узловыми генами, связанными с развитием острой астмы, такими как *Muc5ac*, *Ccl12*, и *Timp1*, и легочным фиброзом.

3.8 Идентификация ключевых астма-специфических генов, ассоциированных с пост-астматическим фиброзом легких

3.8.1 Биоинформатический анализ астма-специфических генов, потенциально ассоциированных с фиброзом легких

Для оценки вовлеченности идентифицированных астма-специфических генов в развитие легочного фиброза, была сконструирована генно-ассоциативная сеть, состоящая из топ-10 астма-ассоциированных узловых генов и их первых соседей, содержащихся в уже проанализированном астматическом регуломе и присутствовавших хотя бы в трех из пяти проанализированных наборов данных (Рисунок 15А). Было установлено, что сконструированная сеть содержала в себе четыре отдельных модуля: первый включал в себя 7 из 10 узловых генов (*Timp1*, *F5*, *Ccl12*, *Ccl6*, *Ccl9*, *Adra2a* и *Ear1*) и их партнеров, в то время как три остальных модуля содержали по одному гену – *Tk1*, *Muc5ac* и *Cyp2e1* (Рисунок 15А). Такая архитектура сети указывает на то, что выявленные узлы относятся к четырем различным компартментам астма-ассоциированного регулома и некоторые из них (*Timp1*, *F5*, *Ccl12*, *Ccl6*, *Ccl9*, *Adra2a* и *Ear1*) могут быть вовлечены в регуляцию схожих процессов.

Функциональная аннотация топ-10 узловых генов и их первых соседей показала их вовлеченность в процессы, ассоциированные не только с острой астмой (хемотаксис эозинофилов, дегрануляция нейтрофилов, активность хемокинов и хемокиновых сигнальных путей, коагуляция, острый воспалительный ответ, регуляция продукции цитокинов, каскад МАРК и гликозилирование муцинов), но и с ремоделированием легких и фиброзом (сам легочный фиброз, а также процессы, ассоциированные с клеточной пролиферацией, хемотаксисом, миграцией и адгезией; экстравазация и ангиогенез; пролиферация эндотелиальных и эпителиальных клеток; пролиферация/миграция гладкомышечных клеток; регенерация органов и тканей; регуляция wound healing, активности ферментов ВКМ и факторов роста) (Рисунок 15Б).

3.8.2 Идентификация потенциальных маркеров перехода острого астматического воспаления в пост-астматический фиброз

Для идентификации возможных маркеров перехода острого астматического воспаления в пост-астматический фиброз, 103 астма-специфических ДЭГ (топ-10 наиболее

взаимосвязанных генов и 93 их первых соседей) были сопоставлены с ключевыми генами, участвующими в патогенезе легочного фиброза согласно базе данных DisGeNET. Анализ диаграммы Венна выявил 24 гена, общих как для острой астмы, так и для фиброза легких, включая несколько астма-специфических ключевых гена *Timp1*, *Cyp2e1*, *Muc5ac* (Рисунок 15В). Анализ астматических генно-ассоциативных сетей показал, что все 24 гена характеризуются высокой степенью взаимосвязанности и, таким образом, могут быть ключевыми элементами патогенеза астмы и пост-астматического фиброза (Рисунок 15Г). К данным генам относятся следующие выявленные ДЭГ:

- 1) про-воспалительные цитокины/хемокины и их рецепторы (*Ccr3*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Cxcl12*, *Ccl2*);
- 2) регуляторы ВКМ (*Fn1*, *Timp1*, *Thbs1*, *Tnc*, *Mmp2*, *Spp1*);
- 3) компоненты системы комплемента (*C3*, *C3ar1*, *Cfd*);
- 4) инсулиноподобный фактор роста и его рецептор (*Igf1*, *Igf1r*);
- 5) основные компоненты слизи дыхательных путей *Muc5ac*, *Muc5b*;
- 6) белок антиоксидантной системы (*Cat*);
- 7) белок системы метаболизма ксенобиотиков (*Cyp2e1*);
- 8) регуляторы процессов бронхоконстрикции (*Cyslt1r*), врожденного иммунитета (*Arg1*), системы коагуляции (*F10*) и сокращения гладкомышечных клеток (*Grp*).

Для того чтобы определить, изучались ли данные гены в качестве регуляторов развития фибротических процессов, был проведен текст-майнинговый анализ. Учитывая хорошо известное сходство процессов фибротического ремоделирования в различных органах [144], был произведен поиск ассоциации данных генов не только с легочным фиброзом, но и с фиброзом печени и почек (Рисунок 15Д). Видно, что почти все гены в той или иной степени связаны с вышеупомянутыми заболеваниями: гены *Ccl2*, *Ccr2*, *Cxcl12*, *Timp1*, *Igf1*, *Spp1* и *Cat* были связаны с фибротическими процессами во всех трех органах и поэтому могут считаться возможными пан-фибротическими регуляторами; гены *Ccl4/Thbs* были ассоциированы с фибротическими изменениями как в печени, так и в почках; гены *Muc5b/Muc5ac/Grp* были более специфичными только для фиброза легких; ген *Cyp2e1* был специфичен только для фиброза печени, а ген *C3* был связан только с фиброзом почек.

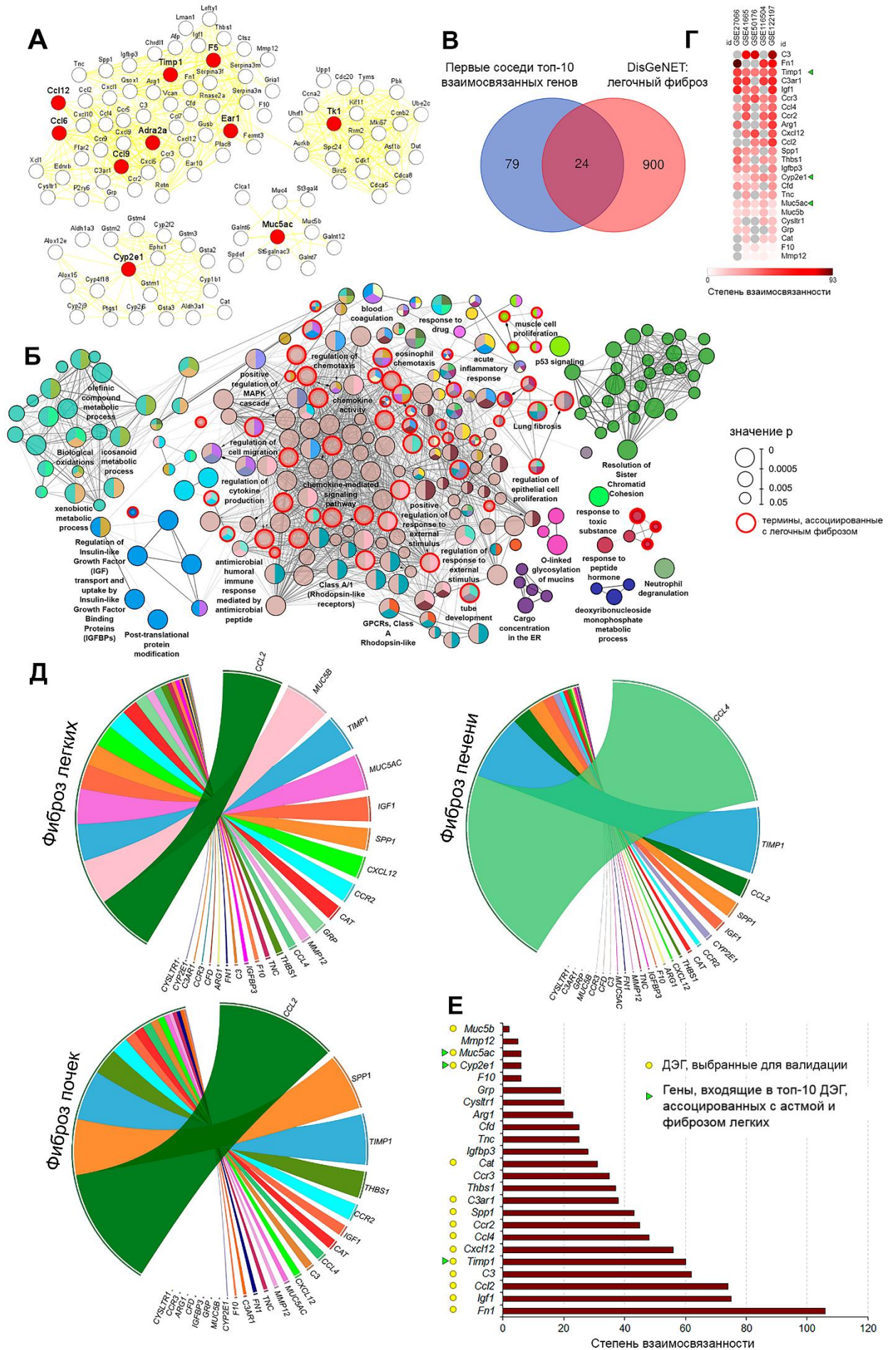


Рисунок 15. Вовлеченность ключевых генов, ассоциированных с острой астмой, в развитие легочного фиброза. (А) Сеть белок-белковых взаимодействий, сконструированная из топ-10 наиболее взаимосвязанных генов и их первых соседей. (Б) Функциональный анализ топ-10 наиболее взаимосвязанных ДЭГ и их первых соседей, присутствующих хотя бы в трех наборах транскриптомных данных. Обогащение терминов по базам данных Gene Ontology (biological processes), KEGG, REACTOME и WikiPathways было выполнено с помощью плагина ClueGo в программном обеспечении Cytoscape. Показаны названия наиболее значимых терминов. Цвет узлов отражает значимость обогащения термина. Показаны только процессы с значением $p < 0,05$ после коррекции Холма-Бонферрони в случае множественных сравнений. Красный контур указывает на узлы, относящиеся к процессам фиброзированию и ремоделированию легких. Различные генные кластеры отмечены разными цветами автоматически. (В) Диаграмма Венна, демонстрирующая гены, общие для топ-10 наиболее взаимосвязанных генов и их первых соседей, и генов, ассоциированных с развитием легочного фиброза в базе данных DisGeNET. (Г) Тепловая карта, показывающая степень взаимосвязанности 24 общих генов в каждом из независимых наборов транскриптомных данных. (Д) Анализ совместного упоминания 24 общих генов с ключевыми словами, ассоциированными с фиброзом легких, печени и почек, визуализированный с помощью Circos плота. (Е) Степень взаимосвязанности 24 общих генов в сети белок-белковых взаимодействий, сконструированной из генов, ассоциированных с фиброзом легких, согласно базе данных DisGeNET.

Далее был проведен анализ взаимосвязанности 24 общих для астмы и легочного фиброза генов в генно-ассоциативной сети, построенной из генов, ассоциированных с легочным фиброзом в базе данных DisGeNET. Большинство из проанализированных генов обладали высокой степенью взаимосвязи с фибротическим регулоном, а гены *Fnl*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3* и *Timp1* оказались наиболее взаимосвязанными (Рисунок 15Е).

Таким образом, в результате проведенного биоинформатического анализа наборов данных, ассоциированных с острым аллергическим воспалением дыхательных путей, были идентифицированы топ-10 ключевых генов (*Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl12*, *Timp1*, *Muc5ac*, *F5*, *Sup2e1*, *Adra2a*, *Ear1*, *Tk1*), характеризуемых: (1) узловой позицией в астма-ассоциированных генных сетях, (2) ассоциацией с молекулярными процессами, регулирующие развитие астмы и (3) тесной связью с «астма»- и «легочный фиброз»-ассоциированными терминами в текстах научных работ. Сравнение идентифицированных топ-10 узловых генов и их первых соседей с генами, ассоциированными с развитием

легочного фиброза в базе данных DisGeNET, позволило идентифицировать возможные маркерные гены перехода от острого астматического воспаления к пост-астматическому фиброзу (Рисунок 15Е). Учитывая проведенный анализ, топ-10 астматических генов, наиболее связанных с регуломом легочного фиброза (*Fn1*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Cxcl12*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Spp1*, *C3ar1*); ген *Cat*, выполняющий важную роль в развитии фиброза различных органов [736–738]; а также гены *Cyp2e1* и *Muc5ac/Muc5b*, более характерные для фиброза печени и легких, соответственно, были выбраны для дальнейшей валидации на *in vivo* модели.

3.9 *In vivo* модель овалбумин (ОВА)-индуцированной астмы

Учитывая тот факт, что ключевые моменты ремоделирования дыхательных путей, ткани легких и фиброгенеза в целом в случае астмы не могут быть полностью исследованы на пациентах, мышинные модели астмы являются важным инструментом в исследовании механизмов и идентификации потенциальных молекулярных маркеров и терапевтических мишеней данного заболевания. Среди этих моделей, острая астма, индуцированная у мышей путем ингаляционного введения раствора ОВА с предварительной сенсибилизацией животных смесью ОВА и гидроксида алюминия (ОВА/Al(OH)₃), является классической моделью, отражающей ранние этапы развития этого заболевания, представленные в основном острым воспалением дыхательных путей [430]. Дальнейшее увеличение циклов ингаляций ОВА приводит к развитию необратимых изменений в дыхательных путях, таких как их ремоделирование и фиброз [112,739].

3.9.1 Характеристика воспалительных изменений в легких мышей в острую фазу ОВА-индуцированной астмы

Динамика развития ОВА-индуцированной астмы как в острую фазу, так и в отдаленный период заболевания (т.е. подострую фазу) до развития необратимых изменений в легких была предложена в работах [740–742]. В нашем исследовании мышей линии Balb/C сенсибилизировали путем трех последовательных интраперитонеальных инъекций ОВА и Al(OH)₃ на 1, 7 и 14 дни, с последующей четырехкратной ингаляцией 2% раствора ОВА на 21, 22, 23 и 24 дни исследования (Рисунок 16А). Мышей выводили из эксперимента через 24 ч (острая фаза) и 4 недели (подострая фаза) после последней ингаляции ОВА, проводили забор бронхоальвеолярной жидкости и ткани легких для гистологического анализа и ОТ-ПЦР.

Хорошо известно, что развитие и прогрессирование астмы приводит к появлению признаков ремоделирования дыхательных путей, таких как воспалительная инфильтрация, гиперпродукция слизи и отложение белков ВКМ [112,743]. Мы показали, что ингаляции

ОВА приводят к развитию острого воспаления в дыхательной системе мышей, которое характеризовалось повышением в бронхоальвеолярной жидкости общего числа лейкоцитов (представленных в основном субпопуляцией гранулоцитов) в 44 раза и уровней TNF- α и IL-6 в 2,3 и 3,9 раза, соответственно, по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 16Б, В). Гистологически, легкие мышей с ОВА-индуцированной астмой характеризовались воспалительной инфильтрацией, представленной гранулоцитами с примесью моноцитов/макрофагов и локализованной преимущественно вокруг бронхов (Рисунок 17). Реактивная гиперпродукция слизи, которая является патогномоничным симптомом астмы [725,744] и идентифицируется с помощью PAS-реакции, была обнаружена в бронхиальном эпителии мышей с ОВА-индуцированной астмой в острую фазу воспаления. Окраска легких на компоненты ВКМ коллаген и эластин трихромом по Массону и по Ван Гизону, соответственно, показала базальное окрашивание стромы легких как у здоровых мышей, так и у мышей с острой астмой. Иммуногистохимическая окраска антителами к α -SMA также продемонстрировала базальное окрашивание стромальных структур легких и не выявила значительной разницы между здоровыми мышами и мышами с острой фазой астматического воспаления.

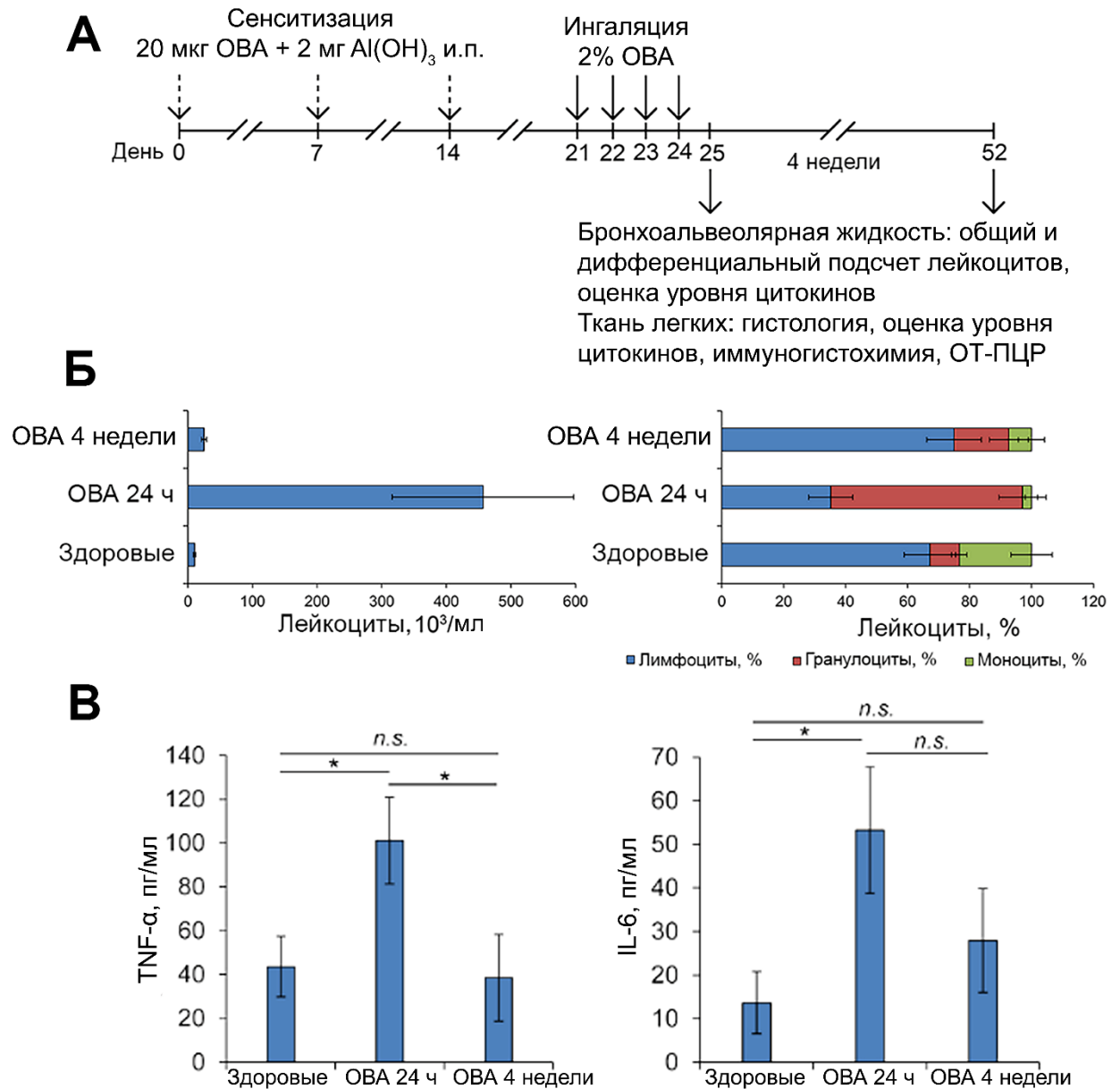


Рисунок 16. *In vivo* модель ОВА-индуцированной астмы. (А) Схема эксперимента. Мыши линии Balb/C были сенсибилизированы путем трехкратной интраперитонеальной (и.п.) инъекции смеси ОВА и гидроксида алюминия ($Al(OH)_3$); затем проводилась индукция астмы путем ингаляции 2% раствора ОВА в течение 4 дней. Образцы для анализа бронхоальвеолярной жидкости, а также гистологического и ОТ-ПЦР анализа были собраны через 24 ч (день 25) и 4 недели (день 52) после последней ингаляции ОВА. **(Б)** Общее число (слева) и соотношение субпопуляций (справа) лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости здоровых и ингалированных ОВА мышей через 24 ч и 4 недели после индукции. **(В)** Уровни про-воспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 в бронхоальвеолярной жидкости здоровых мышей и мышей с ОВА-индуцированной астмой. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного т-теста; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s – статистически не значимые различия.

3.9.2 Характеристика воспалительных изменений в легких мышей в подострую фазу ОВА-индуцированной астмы

Подострая фаза астматического воспаления, проанализированная через 4 недели после последней ингаляции ОВА, характеризовалась уменьшением числа лейкоцитов и гранулоцитов, а также уровней IL-6 и TNF- α в бронхоальвеолярной жидкости, практически до уровня здоровых животных (Рисунок 16Б, В). Гистологически, в легких наблюдалась остаточная воспалительная инфильтрация, а также снижение реактивной гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием (Рисунок 17). Однако, при оценке долгосрочных признаков ремоделирования ткани легких, были обнаружены признаки отложения компонентов ВКМ, разрастания соединительно-тканых волокон и начальной стадии перибронхиального легочного фиброза у мышей с подострой фазой астматического воспаления в отсутствие повторяющихся циклов ингаляций ОВА, которые, согласно литературным данным, необходимы для развития хронического астматического воспаления [112]. При окраске по Массону и по Ван Гизону было отмечено значительное увеличение количества коллагеновых и эластиновых волокон в дыхательных путях и легочной паренхиме мышей в подострой фазе по сравнению со здоровыми мышами и мышами в острой фазе астматического воспаления (Рисунок 17). Иммуногистохимическое окрашивание легких мышей через 4 недели после последней ингаляции ОВА показало значительное увеличение экспрессии α -SMA по сравнению со здоровыми мышами и мышами с острой астмой, что указывает на развитие легочного фиброза.

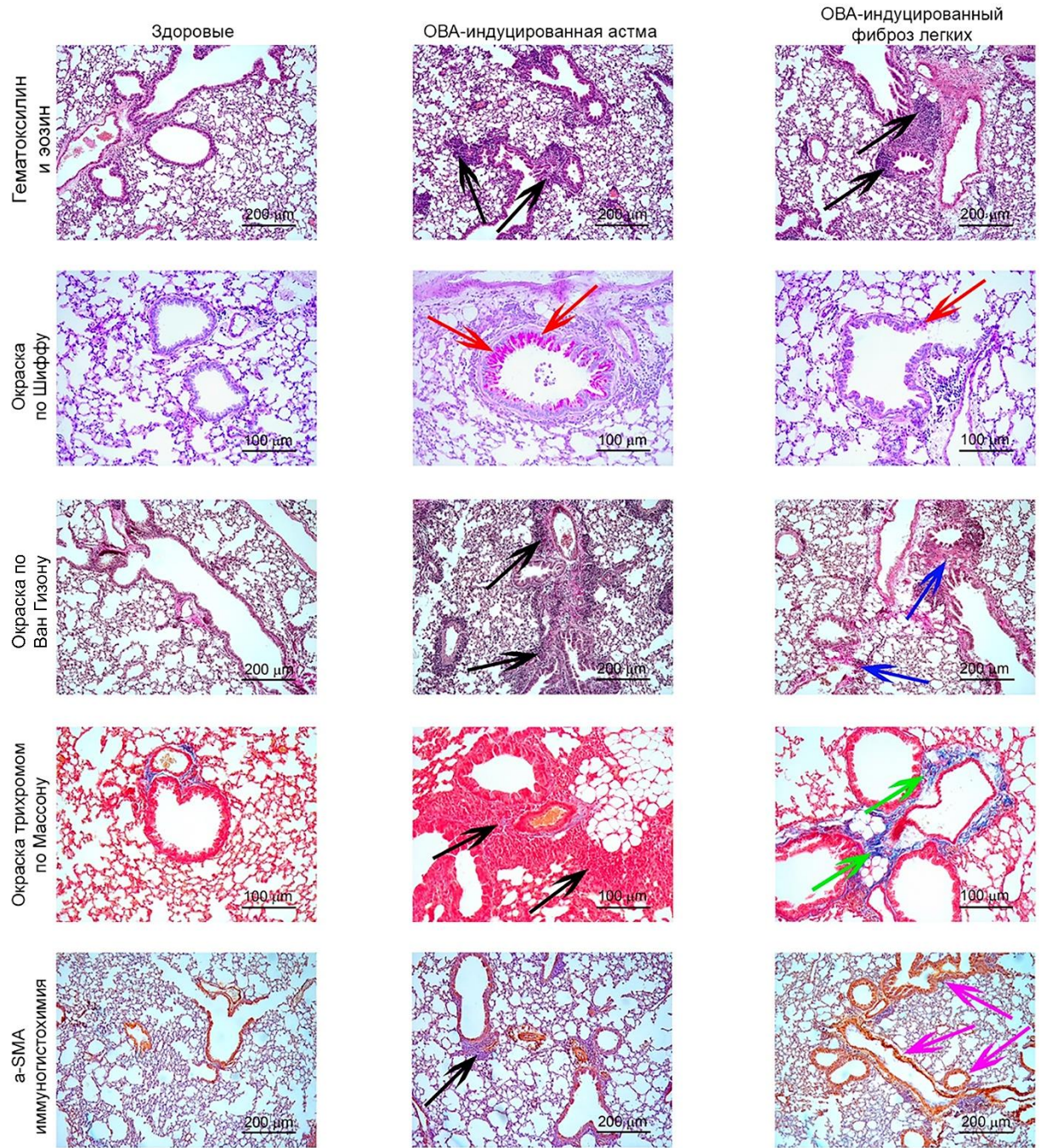


Рисунок 17. Патоморфологические изменения в ткани легких мышей при развитии ОВА-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза. Гистология легких здоровых мышей и мышей с ОВА-индуцированной астмой через 24 ч и 4 недели после последней ингаляции ОВА. Увеличение $\times 100$ (окраска гематоксилин и эозином, по Ван Гизону, α -SMA) и $\times 200$ (окраска по Шиффу и по Массону). Черными стрелками указана воспалительная инфильтрация в ткани легких; красными стрелками указана гиперпродукция слизи бронхиальным эпителием; синими стрелками указаны эластиновые волокна, окрашенные по Ван Гизону; зелеными стрелками указаны коллагеновые волокна, окрашенные по Массону.

окрашенные по Массону; фиолетовыми стрелками указаны компоненты стромы, окрашенные антителами к α -SMA.

Согласно опубликованным данным, развитие фибротических изменений в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой требует несколько циклов обработки аллергеном сенситизированных мышей на протяжении долгого периода времени [112,745]. В данной работе впервые показано, что инициация фибротических изменений в легких мышей с ОВА-индуцированной астмой возможна в отсутствие повторных циклов ингаляций ОВА. Таким образом, использованная модель ОВА-индуцированной астмы на данных временных точках отражает клиническую и гистологическую картину ранних стадий ремоделирования дыхательных путей и фиброза легких, которые формируются уже через 4 недели после последней ингаляции ОВА, что позволяет использовать данную модель в исследовании молекулярных механизмов, ассоциированных с развитием как острой астмы, так и пост-астматического фиброза.

3.10 Анализ паттернов экспрессии генов, ассоциированных с развитием астмы и легочного фиброза

3.10.1 Анализ уровней экспрессии идентифицированных ключевых генов в легких здоровых мышей и мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом

Уровни экспрессии ключевых генов, ассоциированных с развитием как острой астмы, так и легочного фиброза (*Fnl*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Cxcl12*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Spp1*, *C3ar1*, *Cat*, *Cyp2e1*, *Muc5ac* и *Muc5b*), идентифицированных с помощью биоинформатического анализа, были оценены в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой через 24 ч (острая астма) и 4 недели (пост-астматический фиброз) с помощью метода ОТ-ПЦР с использованием зондов TaqMan. Дополнительно, экспрессия маркеров, отражающих персистирующее воспаление (*Muc5ac*) и развитие фиброза (*Fnl*), была валидирована в ткани легких на белковом уровне с помощью иммуногистохимии. Полученные результаты представлены в Таблице 8 и на Рисунке 17.

Таблица 8. Уровни экспрессии генов, идентифицированных с помощью биоинформатического анализа в качестве молекулярных маркеров астмы и легочного фиброза, в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной острой астмой и пост-астматическим фиброзом.

Ген	Изменение уровней экспрессии генов (разы)						
	Данные полногеномного микрочипирования ¹					Экспериментальные данные ²	
	GSE27066 [#]	GSE41665 [#]	GSE50176 [#]	GSE116504 [#]	GSE122197 [#]	Астма ³	Фиброз ⁴
<i>Timp1</i>	9,4	8,2	1,9	3,6	17,9	45,7*	2,3*
<i>Ccl2</i>	н/д	н/д	2,4	3,2	7,2	29,5***	2,3*
<i>Igf1</i>	3,2	2,5	1,6	н/д	7,6	16,3*	1,7*
<i>Muc5b</i>	4,7	6,6	3,2	2,9	5,6	12,2*	2*
<i>C3</i>	1,4	1,6	1,9	н/д	3,2	10,8***	3,3*
<i>Fnl</i>	1,9	н/д	н/д	3,3	2,3	5,9*	2,3*
<i>Muc5ac</i>	3,1	3,9	1,2	6,7	3,9	5,7*	1,5
<i>C3ar1</i>	3,5	4,8	н/д	1,5	3,6	4,7***	-1,6
<i>Spp1</i>	1,9	3,3	1,5	н/д	5,8	3,4*	-1,6
<i>Ccr2</i>	н/д	2,3	н/д	2,1	3	3,3	1
<i>Cxcl12</i>	н/д	2,1	-1,7	н/д	-1,5	2	1,5
<i>Ccl4</i>	1,5	1,2	н/д	-1,5	1,6	1,8	-1,6
<i>Cyp2e1</i>	-3,5	-3	-1,8	-2,8	-1,9	-4,8***	-2,8***
<i>Cat</i>	-1,5	-1,5	н/д	-1,7	-1,5	-11,2	-9,6*

[#]GSE27066 и GSE41665 – платформа GPL1261 [Mouse430_2] Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array; индукционный агент: ОВА; источник: ткань легких. GSE50176 – платформа: GPL13912 Agilent-028005 SurePrint G3 Mouse GE 8 x 60 K Microarray; индукционный агент: углеродные нанотрубки; источник: ткань легких. GSE116504 – платформа: GPL21164 Agilent-074809 SurePrint G3 Mouse GE v2 8 x 60 K Microarray; индукционный агент: ОВА; источник: ткань легких. GSE122197 – платформа: GPL21810 Agilent-074809 SurePrint G3 Mouse GE v2 8 x 60 K Microarray; индукционный агент: ОВА; источник: ткань легких.

¹Данные экспрессии генов были получены путем сравнения ткани легких мышей с астмой с тканью легких здоровых мышей. В анализ вошли образцы, полученные через 24 ч после введения индуктора.

²Уровни экспрессии генов в экспериментальных группах были нормализованы на уровни экспрессии генов в здоровых животных. Шесть образцов из каждой группы были проанализированы в трех технических повторах.

³Легкие мышей через 24 ч после последней ингаляции ОВА (астма).

⁴Легкие мышей через 4 недели после последней ингаляции ОВА (фиброз).

Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного т-теста по Стьюденту; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, n.s. – нет статистически значимых отличий от здоровых животных. Н/д – нет данных.

Ткань легких здоровых животных характеризовалась низкими уровнями экспрессии исследуемых генов, который был принят нами за 1, в то время как ингаляции ОВА приводили к многократному увеличению их экспрессии (Таблица 8, Рисунок 18). Выявлено, что уровни экспрессии идентифицированных генов в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой изменялись более значительно при остром астматическом воспалении (24 ч после индукции), чем при пост-астматическом фиброзе (4 недели после индукции). Изменение экспрессии генов в ткани легких мышей с астматическим воспалением по сравнению со здоровыми контролями в этих двух временных точках было следующим (в порядке убывания): *Timp1* (45 раз при острой астме и 2,3 раза при пост-астматическом фиброзе), *Ccl2* (29 и 2,3 раза), *Igf1* (16 и 1,7 раз), *Muc5b* (12 и 2 раза), *C3* (10 и 3,3 раза), *Fnl* (5,9 и 2,3 раза). Гены *Spp1*, *C3ar1* и *Muc5ac* были статистически значимо у-регулированы только при остром астматическом воспалении (4,7; 3,4 и 1,8 раз, соответственно), в то время как в здоровых легких и легких с фиброзом уровни экспрессии данных генов были одинаковы (Рисунок 18). Уровни экспрессии *Cxcl12*, *Ccl4* и *Ccr2* были незначительно повышены в легких мышей с острой астмой и снижались до уровня здоровых мышей в легких с фиброзом. Гены *Cyp2e1* и *Cat*, уровни экспрессии которых были снижены в астма-ассоциированных наборах данных (Рисунок 14Г), были также значительно снижены в ткани легких мышей как с острой астмой, так и с пост-астматическим фиброзом: *Cat* в 11,2 и 9,6 раз, соответственно, и *Cyp2e1* в 4,8 и 2,8 раз, соответственно, по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 18).

Следует отметить, что уровень экспрессии гена *Cat* снижался при развитии острой астмы в той же степени, что и при ЛПС-индуцированном ОПЛ (см. раздел 3.6.1). Данный факт наталкивает на мысль, что при развитии воспаления, даже с такими различными индуцирующими агентами, как ЛПС, SARS-CoV-2 и ОВА, присутствуют общие звенья патогенеза, обуславливающие тяжесть и прогрессию заболевания, идентификация которых представляется актуальной задачей для дальнейших исследований.

Необходимо подчеркнуть, что изменения уровней экспрессии генов в экспериментальной модели схожи с изменениями, обнаруженными в микрочиповых наборах данных (Таблица 8).

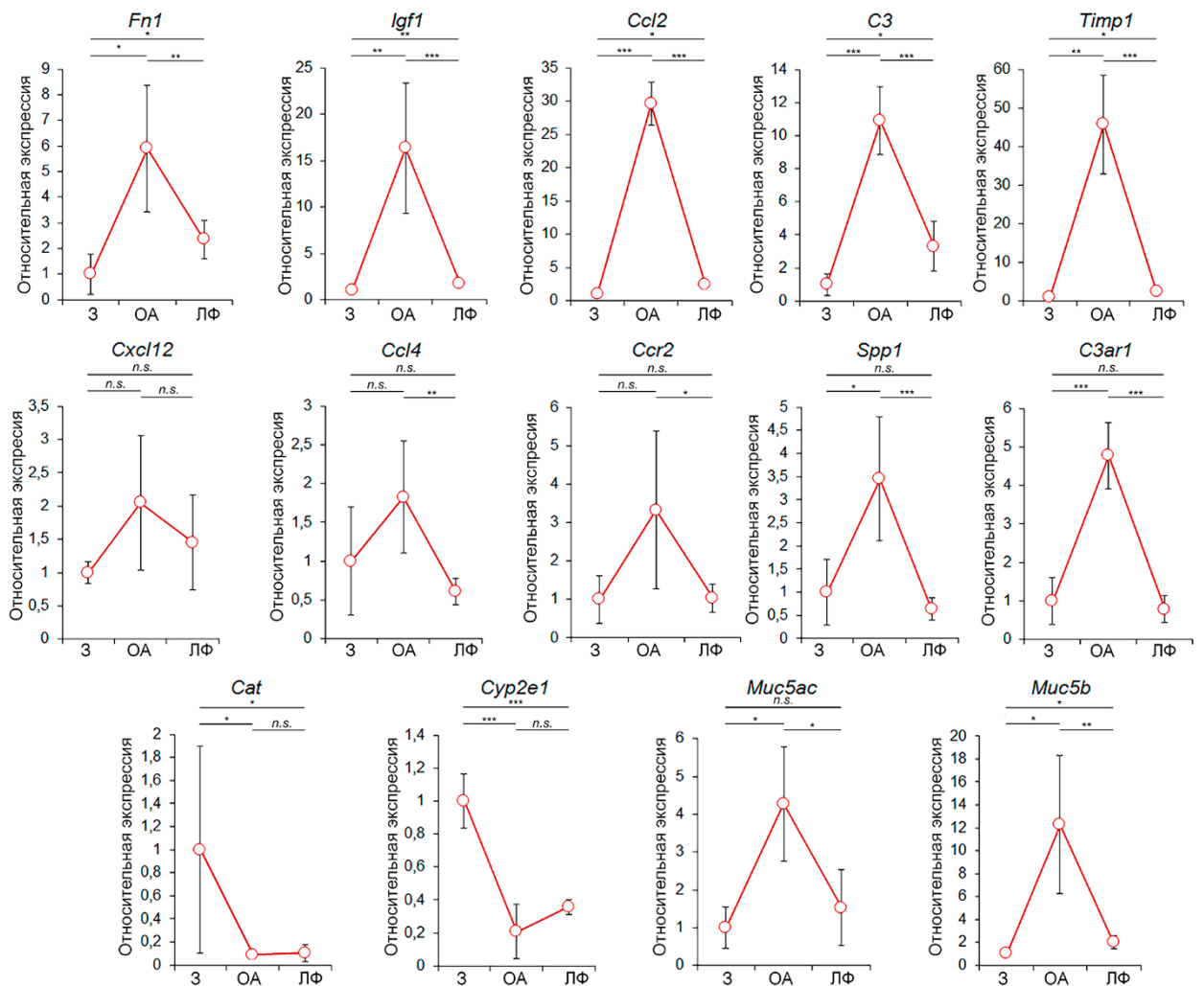


Рисунок 18. Экспрессия ключевых генов, идентифицированных с помощью биоинформатического анализа, в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой и пост-астматическим фиброзом. Данные экспрессии генов в ткани легких здоровых мышей (З), мышей с острой астмой (ОА) и легочным фиброзом (ЛФ). Уровни экспрессии нормализованы на уровень экспрессии гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (*Hprt*). Было проанализировано от трех до пяти образцов в каждой экспериментальной группе в трех технических повторах. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного т-теста по Стьюденту; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. – нет статистически значимых различий.

3.10.2 Оценка экспрессии *Fn1* и *Muc5ac* в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой и пост-астматическим фиброзом на белковом уровне

Далее была оценена экспрессия *Fn1* и *Muc5ac* на белковом уровне в здоровых легких, а также в легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом с помощью иммуногистохимического окрашивания. На Рисунке 19А показано, что не

наблюдалось значительной разницы в уровнях экспрессии Fn1 между здоровыми легкими и легкими с острым астматическим воспалением (базальное окрашивание бронхиального эпителия и стромы легких наблюдается в обеих группах), в то время как в легких с пост-астматическим фиброзом было обнаружено повышение экспрессии Fn1 в 2,3 и 9,7 раз по сравнению с тканью легких здоровых мышей и мышей острой астмой, соответственно (Рисунок 19А, Б). Уровень экспрессии белка Muc5ac был повышен как в легких с острым астматическим воспалением, так и с пост-астматическим фиброзом, особенно в области межальвеолярных перегородок, в 2,7 и 2,9 раз, соответственно, по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 19Б, В).

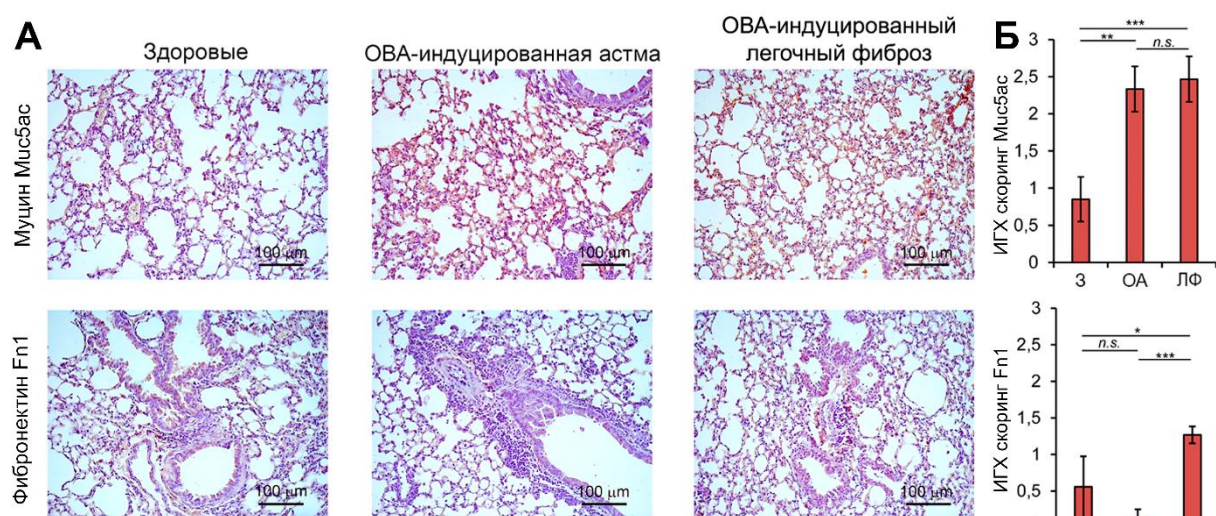


Рисунок 19. Изменение уровней экспрессии белковых продуктов генов *Muc5ac* и *Fn1* в тканях легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом. (А) Иммуногистохимическое окрашивание ткани легких здоровых мышей (З) и мышей с ОВА-индуцированной острой астмой (ОА) и пост-астматическим легочным фиброзом (ЛФ) первичными антителами к фибронектину Fn1 и муцину Muc5ac. Увеличение $\times 200$. **(Б)** Интенсивность иммуногистохимической окраски ткани легких была оценена с помощью полуколичественного метода, где 0 – нет экспрессии, 1 – слабая экспрессия, 2 – умеренная экспрессия, 3 – сильная экспрессия. Было исследовано по три образца из каждой группы. Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного т-теста по Стьюденту; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. – нет статистически значимых различий.

Полученные результаты согласуются с данными ОТ-ПЦР анализа: уровень мРНК *Fn1* был незначительно повышен в ткани легких при развитии фиброза, а экспрессия мРНК *Muc5ac* была значительно увеличена в астматических легких по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 18). Следует отметить, что при проведении ИГХ анализа

не было обнаружено повышения содержания Fn1 в легких с острой астмой и уменьшения Muc5ac в легких с фиброзом, обнаруженных с помощью ОТ-ПЦР анализа. Однако, факт наличия подобного расхождения между уровнем мРНК и уровнем белка хорошо известен: похожее соотношение экспрессии мРНК (высокий уровень) и белка (низкий уровень) Fn1 наблюдалось в острой фазе CCL₄-индуцированного повреждения печени, предшествовавшего развитию фиброза [746]. В случае Muc5ac, обнаруженная разница в уровнях экспрессии мРНК и белка может быть связана как с замедлением протеаза-зависимой деградации компонентов слизи, так и с нарушением мукоцилиарного клиренса в дыхательных путях при острой астме [747,748]. Учитывая то, что на взаимоотношения между уровнем мРНК и белка может влиять широкий спектр параметров, таких как действие различных модуляторов трансляции, занятость рибосом или время жизни белка [749], верификация обнаруженных генетических маркеров пост-астматического фиброза на уровне белков является потенциальной темой для будущих исследований.

Таким образом, валидация узловых генов, идентифицированных с помощью биоинформатического анализа, на *in vivo* модели ОВА-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза подтвердила надежность полученных биоинформатических данных: 11 из 14 проанализированных генов были дифференциально экспрессированы в легких мышей с астмой (up-регулируемые: *C3*, *C3ar1*, *Ccl2*, *Fn1*, *Igf1*, *Muc5ac*, *Muc5b*, *Spp1*, *Timp1*; down-регулируемые: *Cat*, *Cyp2e1*) по сравнению с тканями легких здоровых мышей, а уровень экспрессии 8 фиброз-ассоциированных ключевых генов значительно изменялся в легких мышей с пост-астматическим фиброзом (up-регулируемые: *C3*, *Ccl2*, *Fn1*, *Igf1*, *Muc5b*, *Timp1*; down-регулируемые: *Cat*, *Cyp2e1*) (Рисунок 18). Уровни экспрессии идентифицированных ключевых up-регулируемых генов достигли своего максимума в острую фазу воспаления, в то время как развитие легочного фиброза привело к уменьшению уровней их экспрессии до значительно меньших значений (*C3*, *Ccl2*, *Fn1*, *Igf1*, *Muc5b*, *Timp1*) или до уровня здоровых животных (*C3ar1*, *Muc5ac*, *Spp1*). Однако, несмотря на снижение экспрессии, узловая позиция данных генов в фиброз-ассоциированной сети (Рисунок 15E) доказывает их возможное вовлечение в регуляцию ранних фибротических изменений уже на стадии острого астматического воспаления.

3.11 Пересечение узловых генов, регулирующих развитие острой астмы и пост-астматического фиброза, и генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным легочным фиброзом

3.11.1 Идентификация и характеристика общих генов, регулирующих развитие астмы, пост-астматического фиброза и фиброза легких другой этиологии

Для того, чтобы выяснить, участвуют ли гены, регулирующие острое астматическое воспаление и пост-астматический фиброз, в развитии легочного фиброза другой этиологии, была выбрана модель блеомицин-индуцированного фиброза, поскольку блеомицин является известным цитотоксическим агентом, вызывающим повреждение ткани легких с последующей фибротической трансформацией [438].

Ре-анализ трех независимых транскриптомных наборов данных, полученных на моделях блеомицин-индуцированного фиброза, позволил идентифицировать 130 общих блеомицин-специфических ДЭГ (Рисунок 20А, левая панель). Дальнейшее сравнение данных генов с астматическим регуломом (острая астма и пост-астматический фиброз) показало низкую взаимосвязь астма-ассоциированных генов с блеомицин-ассоциированным регуломом – только 11 генов, включая 3 из топ-10 взаимосвязанных с острой астмой генов (*Ccl6*, *Ccl9*, *Timp1*) (Рисунок 14Д) и 5 генов с высокой степенью взаимосвязанности с легочным фиброзом по базе данных DisGeNET (*Igf1*, *Timp1*, *Spp1*, *Tnc*, *Mmp12*) (Рисунок 15Е) были идентифицированы как общие для астмы и пост-астматического фиброза и блеомицин-индуцированного фиброза (Рисунок 20А, правая панель), среди которых три гена (*Igf1*, *Spp1*, *Timp1*) показали наиболее тесную ассоциацию с фибротическими процессами в легких согласно базе данных DisGeNET, что указывает на возможную универсальность сигнальных путей, регулирующих развитие легочного фиброза различных этиологий.

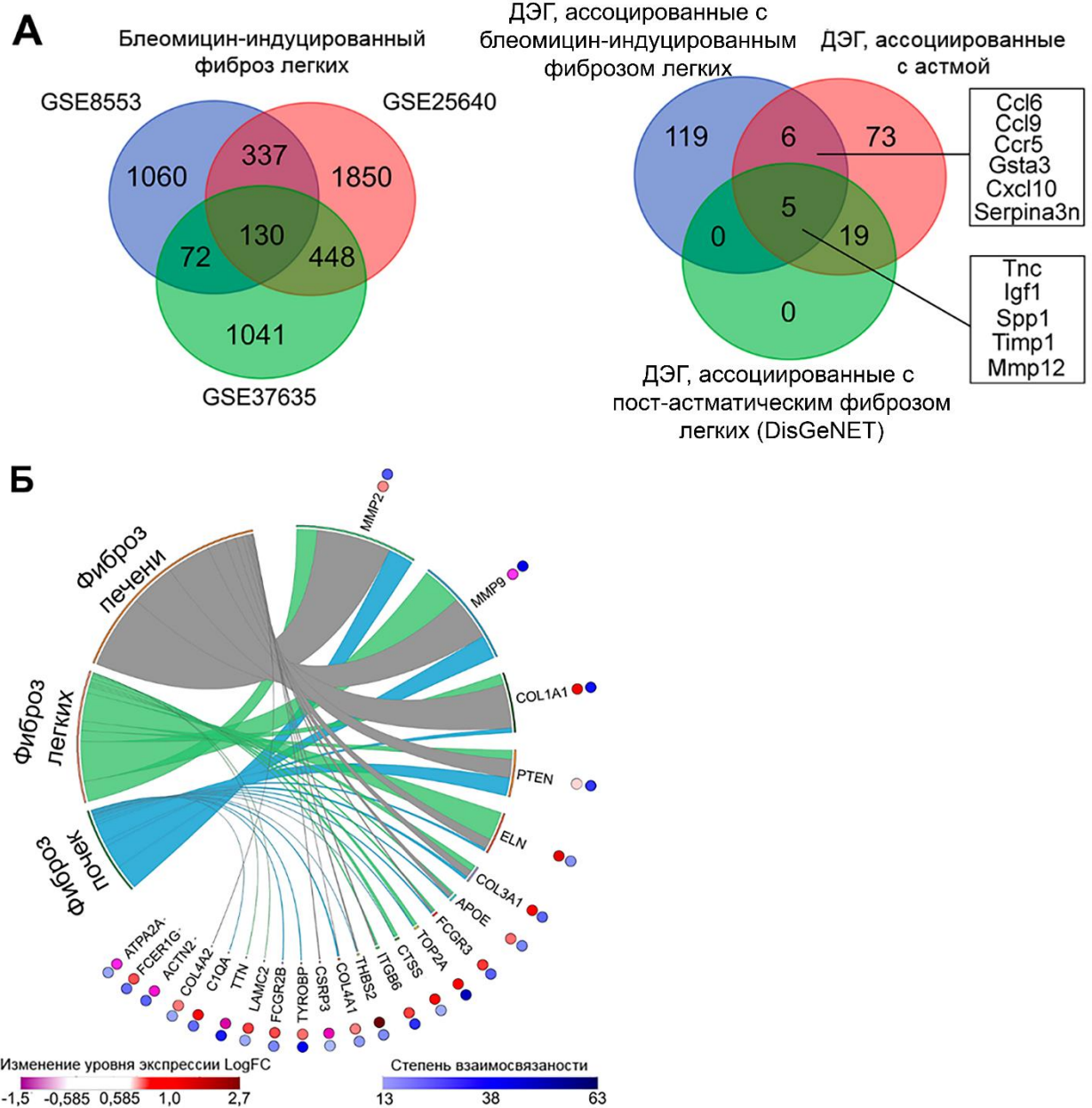


Рисунок 20. Вовлеченность генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом легких, в развитие астмы и пост-астматического фиброза. (А) Диаграмма Венна, демонстрирующая гены, общие для трех наборов транскриптомных данных и задействованные в развитии блеомицин-индуцированного фиброза легких (левая панель). Диаграмма Венна, демонстрирующая ДЭГ, общие для блеомицин-индуцированного фиброза, астма-ассоциированного воспаления и фиброза легких (правая панель). (Б) Анализ совместного упоминания идентифицированных ДЭГ, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом легких, с ключевыми словами, связанными с легочным, печеночным и почечным фиброзами в научной литературе, депонированной в базе данных MEDLINE. Анализ выполнен с помощью веб-сервиса GenClip3. Данные визуализированы с помощью Circos плота. Красные круги

представляют собой элементы тепловой карты, демонстрирующей уровни экспрессии ДЭГ в различных наборах транскриптомных данных. $\text{LogFC} = \text{Log}_2$ (разы изменения экспрессии). Синие круги представляют собой элементы тепловой карты, демонстрирующей степень взаимосвязанности ДЭГ в сети белок-белковых взаимодействий, реконструированной с помощью базы данных STRING (показатель уверенности $\geq 0,7$, максимальное число интеракторов = 0) в программном обеспечении Cytoscape.

Полученные результаты согласуются с опубликованными данными – белковые продукты данных генов являются известными регуляторами фиброза. Например, инсулино-подобный фактор роста IGF1 индуцирует ядерное фукозилирование белков в альвеолярных эпителиальных клетках с последующим их старением [750] и необходим для дифференциации миофибробластов [751]. Остеопонтин, кодируемый *Spp1*, может активировать MMP-7 и усиливать подвижность и пролиферацию фибробластов [752], а также вовлечен в регуляцию ЭМП в легких мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом [753]. Ингибитор металлопротеиназ TIMP1 участвует в поддержании равновесия между протеазами и анти-протеазами в легких, в то время как нарушение данного равновесия приводит к развитию идиопатического легочного фиброза [754]. Также TIMP1 регулирует пролиферацию фибробластов путем прямого взаимодействия с CD63 и интегрином $\beta 1$ на поверхности данных клеток [755].

Далее для оценки значимости выявленных блеомицин-специфичных ДЭГ (119 генов на Рисунке 20А) в качестве универсальных маркеров фиброза, были выбраны 23 узловых гена (23 из 119) в соответствии со следующими критериями: 1) степень взаимосвязанности с партнерами в сети белок-белковых взаимодействий > 20 и 2) однонаправленная экспрессия во всех базах данных блеомицин-индуцированного фиброза. Далее было проанализировано их совместное упоминание с терминами «pulmonary fibrosis» (легочной фиброз), «hepatic fibrosis» (печеночный фиброз) и «renal fibrosis» (почечный фиброз) с помощью текст-майнинга (Рисунок 20Б). Обнаружено, что регуляторы и компоненты ВКМ (*Mmp2*, *Mmp9*, *Colla1*, *Eln*, *Col3a1*), а также протеиновая фосфатаза *Pten* являются хорошо исследованными фиброз-ассоциированными генами и могут быть потенциальными пан-фибротическими маркерами, в то время как другие узловых гены (*ApoE*, *Fcgr3*, *Top2a*, *Ctss*, *Itgb6*, *Thbs2*, *Col4a1*, *Csrp3*, *Tyrobp*, *Fcgr2b*, *Lamc*, *Ttn*, *C1qa*, *Col4a2*, *Actn2*, *Fcer1g*, *Atpa2a*) практически не упоминались в связи с вышеуказанными фибротическими патологиями в опубликованных научных текстах, что

указывает на актуальность дальнейшего исследования данных генов в качестве новых маркеров фиброза.

3.11.2 Анализ уровней экспрессии генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом, на мышинной модели астмы и пост-астматического фиброза

Затем для оценки уровней экспрессии узловых генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом, в легких мышей с астмой и пост-астматическим фиброзом, были выбраны пан-фибротический регулятор *Coll1a1*, а также новые потенциальные маркеры легочного фиброза *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs2* и *Tyrobp*, ассоциированные по данным биоинформатического анализа только с фиброзом печени или почек.

Оказалось, что уровни экспрессии генов *Coll1a1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs2* и *Tyrobp* были повышены в 16,8; 6,7; 3,9; 2,9 и 1,5 раза, соответственно, в легких мышей с острым астматическим воспалением по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 21А). Хронизация воспаления и развитие легочного фиброза либо не влияли на вызванное острой астмой повышение уровней экспрессии (*Coll1a1*, *Col4a1*, *Col4a2*), либо снижали экспрессию генов почти до уровня здоровых мышей (*Thbs2*, *Tyrobp*).

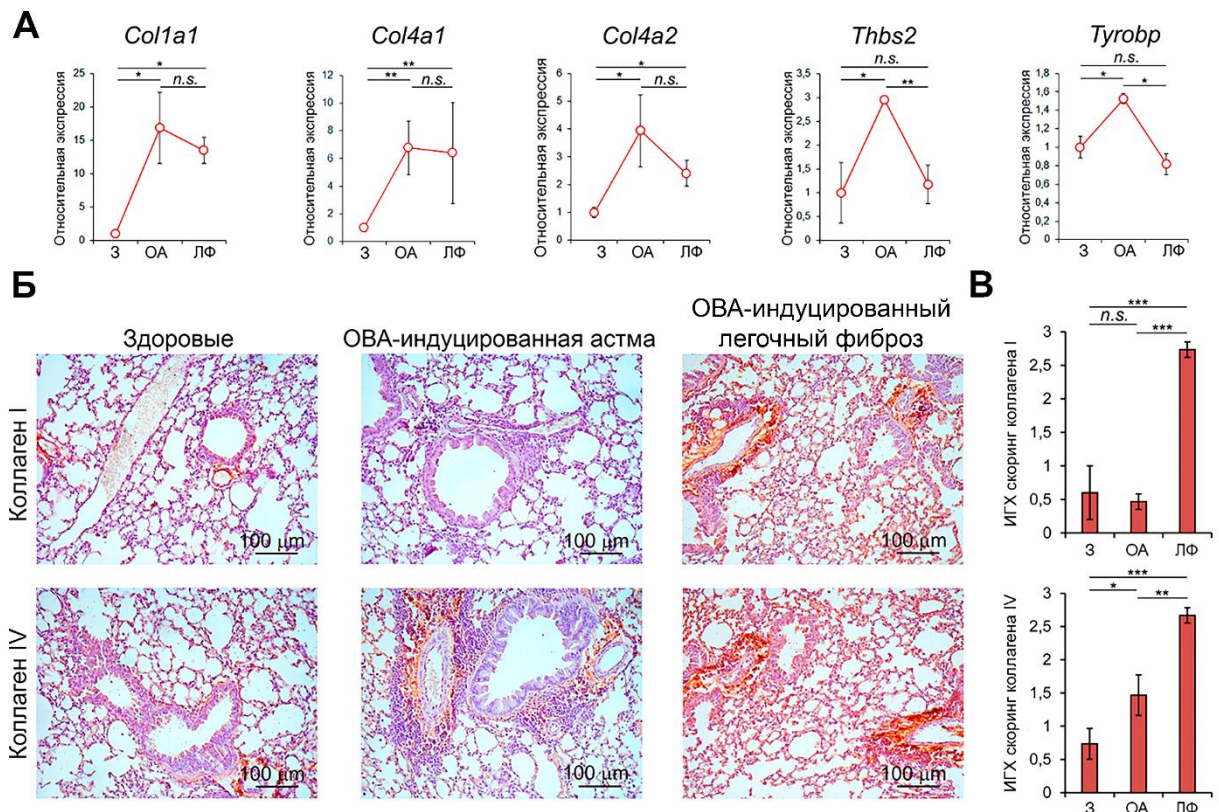


Рисунок 21. Анализ уровней экспрессии генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным легочным фиброзом, в легких мышей с ОВА-индуцированной астмой и пост-астматическим фиброзом. (А) Уровни экспрессии ДЭГ, ассоциированных

с блеомицин-индуцированным фиброзом, в легких здоровых мышей (З), мышей с острой астмой (ОА) и пост-астматическим легочным фиброзом (ЛФ). Относительные уровни экспрессии генов были нормализованы на уровень экспрессии референсного гена гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (*Hprt*). От трех до пяти образцов из каждой экспериментальной группы было проанализировано в трех технических повторах. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. **(Б)** Иммуногистохимия легких здоровых и экспериментальных животных, окрашенных антителами к коллагену I и IV. Увеличение $\times 200$. **(В)** Интенсивность иммуногистохимического окрашивания ткани легких была оценена полуколичественным методом, где 0 – отсутствие экспрессии, 1 – слабая экспрессия, 2 – умеренная экспрессия, 3 – сильная экспрессия. Было проанализировано по три образца из каждой экспериментальной группы. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного т-теста по Стьюденту; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. – нет статистически значимой разницы.

Ранее мы показали, что, согласно текст-майнингу, гены *Col4a1* и *Col4a2* слабо исследованы в области легочного фиброза (Рисунок 20Б). Однако при этом данные гены характеризуются высокой степенью взаимосвязанности с регуломом блеомицин-индуцированного фиброза и высокими уровнями экспрессии в легких мышей с острым астматическим воспалением и пост-астматическим фиброзом. В соответствии с этим, динамика их экспрессии в ткани легких, вместе с экспрессией гена *Colla1*, хорошо исследованного в области легочного фиброза, была валидирована на белковом уровне с помощью иммуногистохимического исследования. Как показано на Рисунке 21Б и В, стромальные компоненты здоровых и астматических легких окрашивались антителами к коллагену I и коллагену IV типа с одинаковой базальной интенсивностью, в то время как легкие с фиброзом характеризовались увеличением количества коллагенов I и IV типов в 4,5 и 3,6 раз, соответственно, по сравнению с контролем.

Эти данные хорошо согласуются с приведенными выше результатами, которые описывают развитие легочного фиброза у мышей через 4 недели после последней ингаляции ОВА (Рисунок 17). Несоответствие уровней экспрессии мРНК и белка у коллагенов I и IV типов имеют общую динамику с соотношением мРНК/белок у фибронектина Fn1, наблюдаемое в легких с острой астмой (Рисунок 18). Можно предположить, что повышение экспрессии коллагена IV типа является специфическим признаком начальных стадий фиброза легких: в работе Urushiyama et al. было показано значительное увеличение продукции коллагена IV типа α -SMA-положительными

миофибробластами на ранних стадиях фиброза при идиопатических интерстициальных пневмониях у людей [756].

3.11.3 Функциональный анализ *Col4a1* и *Col4a2* и исследование их роли в развитии легочного фиброза

Учитывая противоречивые данные о роли коллагена IV типа в развитии легочного фиброза [757–759], мы провели анализ вовлеченности генов *Col4a1* и *Col4a2* в регуляцию процессов, ассоциированных с развитием фиброза. Сравнение интерактомов *Col4a1* и *Col4a2* с интерактомом *Colla1*, ключевым участником легочного фиброза [760], показало их значительное сходство – 77% генов-соседей *Col4a1* и *Col4a2* в базе данных STRING оказались первыми соседями *Colla1* (Рисунок 22А). Дальнейшая функциональная аннотация генов-соседей, уникальных для *Col4a1* и *Col4a2* (Рисунок 22Б), показала их тесную взаимосвязь с фиброз-ассоциированными процессами, такими как синтез, организация и деградация ВКМ; биосинтез коллагенов; клеточная адгезия и миграция; пролиферация фибробластов и регуляция wound healing (Рисунок 22В). Более того, анализ базы данных DisGeNET показал, что гены *Col4a1* и *Col4a2*, и их уникальные партнеры в сети участвуют в регуляции целого спектра заболеваний, сопровождающихся фибротическими изменениями, такими как синдром Альпорта, гломерулонефрит, фиброзирующий альвеолит, цирроз и легочный фиброз (Рисунок 22В).

Таким образом, проведенный анализ доказывает участие идентифицированных астма-ассоциированных генов в регуляции легочного фиброза различной этиологии и указывает на возможность рассмотрения коллагена IV типа в качестве нового потенциального маркера раннего фиброза легких.

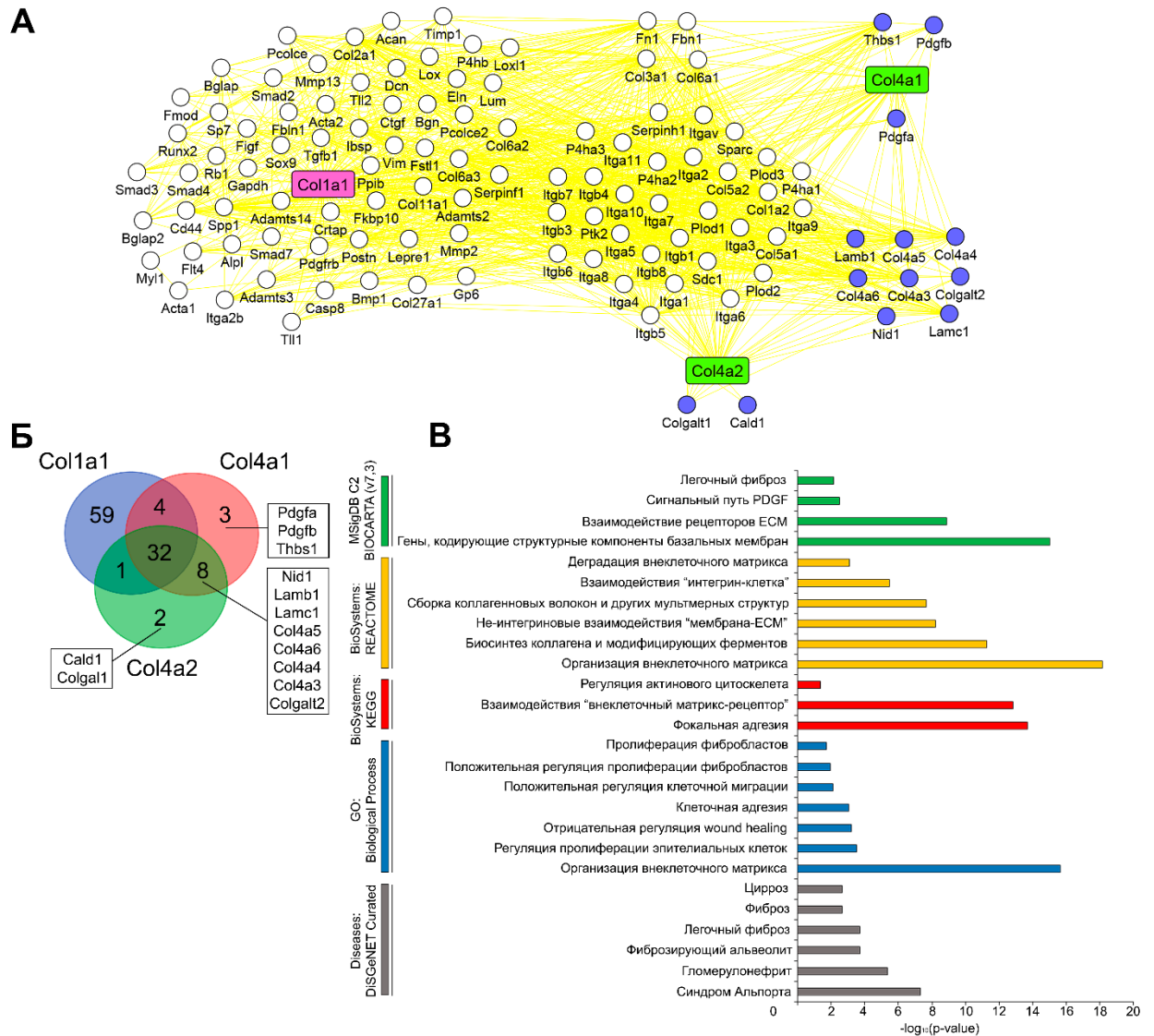


Рисунок 22. Функциональный анализ *Col4a1/Col4a2* и ассоциированных с ними генов и их роль в развитии фиброза. (А) Сеть белок-белковых взаимодействий, состоящая из генов *Coll1a1*, *Col4a1*, *Col4a2* и их первых соседей. Синим цветом отмечены гены, связанные с *Col4a1*, *Col4a2* или обоими генами одновременно. (Б) Диаграмма Венна, показывающая гены, общие между первыми соседями *Coll1a1*, *Col4a1* и *Col4a2*. (В) Гистограмма, визуализирующая функциональное обогащение *Col4a1*, *Col4a2* и их первых соседей. Функциональный анализ был проведен с помощью модуля ToppFun веб-сервиса ToppGene с использованием баз данных MSigDB Biocarta (v7,3), BioSystems: REACTOME и KEGG, Gene Ontology: biological processes и база данных DisGeNET curated. При использовании всех баз данных вводимый набор генов был одинаков и состоял из 15 генов с настройками по умолчанию: порог значимости 0,05 с поправкой по Бонферрони;

наличие хотя бы двух генов из вводимого набора в обогащённой категории; весь геном в качестве фона.

3.12 Взаимосвязь астма-ассоциированных генов с регуломом легочного фиброза

Проведенный комплексный анализ астматического регулома у мышей позволил идентифицировать ряд генов, ассоциированных не только с острой фазой заболевания, но и с фибротическим ремоделированием легких. Результаты данного анализа суммированы в генной сети, представленной на Рисунке 23. В данной генной сети ряд идентифицированных астма-специфических генов, таких как *Igf1*, *Spp1* и *Timp1*, являются известными регуляторами легочного фиброза; муцины *Muc5ac* и *Muc5b* играют ключевую роль в восстановлении гомеостаза легких, нарушенного в результате развития фиброза [761]; хемокины *Ccl2* и *Ccl12* вовлечены в рекрутирование фиброцитов и макрофагов в очагах фиброза [762]; каталаза *Cat* оказывает ингибирующее действие на развитие фиброз-ассоциированного повреждения митохондриальной ДНК в альвеолярных эпителиальных клетках и их апоптоз [763]. Кроме этого, проведенный анализ позволил идентифицировать несколько генов, которые, с одной стороны, обладают высокой степенью взаимосвязанности с фибротическим регуломом, а с другой – не исследованы в достаточной степени как возможные регуляторы легочного фиброза (Рисунок 23). Учитывая данные результаты, следующие гены и их белковые продукты могут считаться новыми потенциальными маркерами астма-ассоциированного фиброза легких:

- Фибронектин *Fn1*, опосредующий процессы клеточной адгезии путем связывания белков ВКМ [153] и иммобилизующий неактивный TGF- β -связывающий белок (LTBP-1), вовлеченный в активацию TGF- β [764]. *Fn1* стимулирует ЭМП альвеолярных эпителиальных клеток [765], опосредует инвазию фибробластов путем экспрессии на поверхности внеклеточных везикул [766], а также коррелирует с тяжестью течения астмы путем нарушения коагуляции и из-за своих про-тромботических свойств [767].
- Компонент комплемента C3 и его рецептор *C3ar1*, участвующие в ответе на множество типов повреждения легких [768–770], повышенный уровень экспрессии которых отмечался в легких мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом [771] и пациентов с легочным фиброзом [772]. Активированный компонент комплемента C3a стимулирует экспрессию TGF- β на человеческих альвеолярных эпителиальных клетках [771], а

фармакологическая блокада его рецептора $С3ar1$ ингибирует развитие блеомицин-индуцированного легочного фиброза у мышей [772].

- Тромбоспондин-1 ($Thbs1$), связывающий и активирующий неактивный $TGF-\beta$, а также участвующий в организации и сборке коллагеновых волокон [773].
- Хемокиновый рецептор $Ccr3$, играющий ключевую роль в накоплении и активации эозинофилов в дыхательных путях при аллергии [774], нейтрализация или нокаут которого приводит к значительно более легкому течению блеомицин-индуцированного фиброза у мышей [775] и фиброз-ассоциированного ремоделирования дыхательных путей в $IL-13$ трансген-индуцированной мышинной модели [776]. Более того, высокий уровень экспрессии $CCR3$ ассоциирован с ухудшением прогноза выживаемости у пациентов с легочным фиброзом [777].
- Цитохром $Cyp2e1$, уровень экспрессии которого понижен при хронических воспалительных заболеваниях у мышей, включая такие патологии как бронхиальная астма [778], фиброз печени, индуцированный $CCL4$ и лигированием желчного протока [779], а также у пациентов с заболеваниями легких, сопровождающихся развитием фиброза [780], что согласуется с данными, полученными в этом исследовании.
- Хемокины $Ccl6$ и $Ccl9$ (человеческий ортолог $CCL15$), обладающие хемотаксическим эффектом на моноциты и эозинофилы крови при тяжелой астме [781], и опосредующие мобильность фиброцитов [782]. Повышенные уровни $CCL15$ и $Ccl9$ были обнаружены в легких пациентов и мышей с хроническим аллергическим пневмонитом [783] и хронической болезнью трансплантат против хозяина [784], соответственно.
- Тенасцин-С (Tnc), прямое связывание которого с интегрином $\alpha v \beta 1$ на поверхности человеческих фибробластов приводит к активации сигналинга $TGF-\beta/Smad2/3$ с последующей дифференцировкой этих клеток в миофибробласты [785] и активацией продукции коллагена типа I [786].
- Интегрин $\alpha v \beta 6$ ($Itgb6$), участвующий в активации неактивного $TGF-\beta$ [787]. Нокаут данного гена эффективно ингибирует развитие как блеомицин-индуцированного фиброза, так и фиброза, индуцированного радиационным излучением, у мышей [788].

- Коллаген типа IV альфа 1 и коллаген типа IV альфа 2 (Col4a1 и Col4a2), кодирующие про-альфа 1 и про-альфа 2 цепи, соответственно, и представленные на базальной мембране клеток во всех органах [789]. Показано, что уровни экспрессии данных генов повышены при токсическом фиброзе печени [790] и фиброзе печени, индуцированном диетой с высоким содержанием жиров [791]. Более того, было проведено несколько исследований по оценке роли Col4a1 и Col4a2 в развитии легочного фиброза посредством модуляции сигнального пути TGF-β [792,793].

Следует отметить, что только часть генов из приведенного списка были валидированы как возможные маркеры пост-астматического фиброза (*Fnl*, *C3*, *C3ar1*, *Cyp2e1*, *Col4a1* и *Col4a2*); исследование маркерной функции при легочном фиброзе остальных генов (*Thbs1*, *Ccr3*, *Ccl6*, *Ccl9*, *Tnc* и *Itgb6*) является предметом дальнейших исследований.

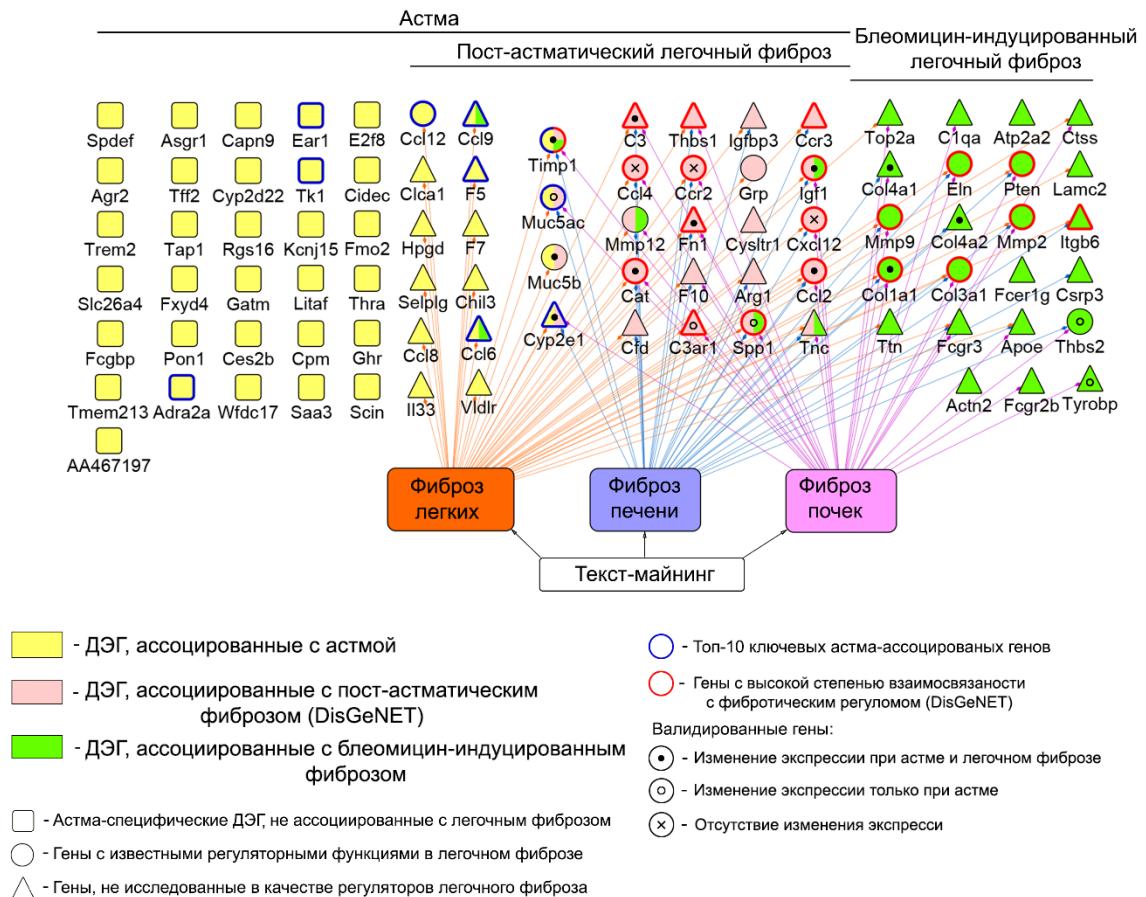


Рисунок 23. Взаимосвязь между астма-ассоциированными генами и регуломом легочного фиброза.

3.13 Экспрессия ключевых генов, ассоциированных с развитием пост-астматического и блеомицин-индуцированного легочного фиброза на мышинных моделях, у пациентов с хроническими патологиями легких

Известно, что ряд хронических заболеваний легких сопровождается ремоделированием дыхательных путей и легочным фиброзом [794,795]. Для того, чтобы оценить, насколько тесно гены, идентифицированные в качестве регуляторов развития легочного фиброза на мышинных моделях, связаны с хроническими заболеваниями легких человека, сопровождающимися фиброзом, уровни экспрессии данных генов были определены в тканях легких, полученных от пациентов с идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), хронической эмфиземой (Эм) и кистозным фиброзом (КФ) (Рисунок 24).

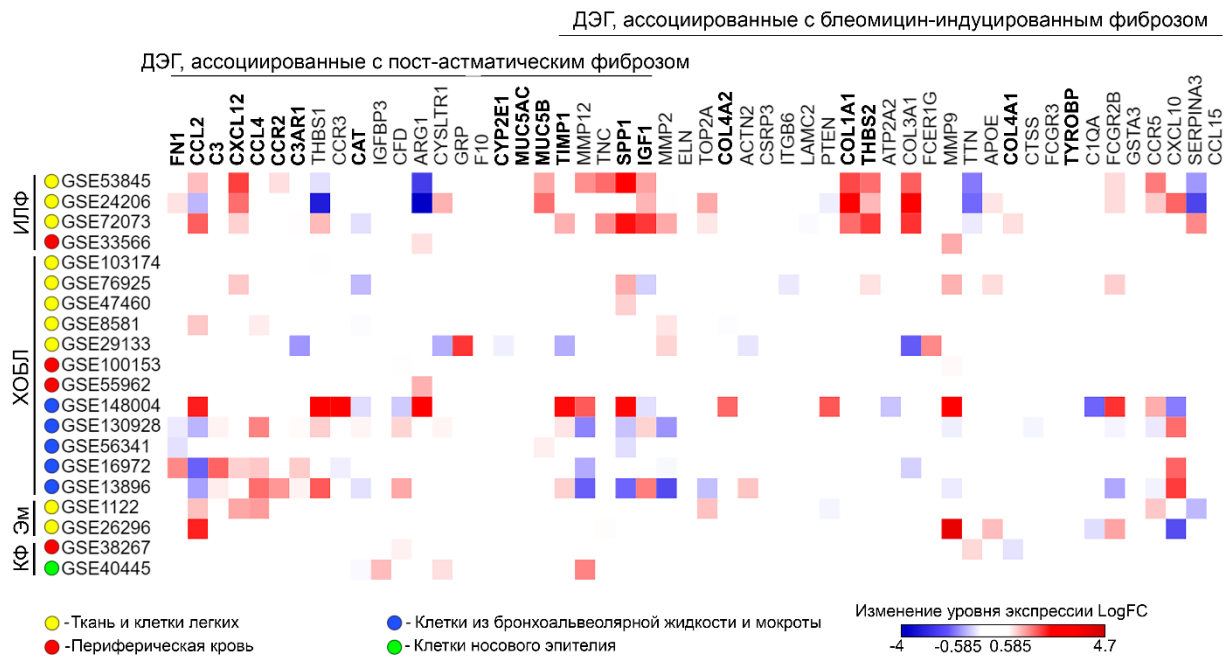


Рисунок 24. Уровни экспрессии астма- и блеомицин-специфичных ДЭГ в ткани легких пациентов с хроническими заболеваниями легких. Тепловая карта, демонстрирующая уровни экспрессии ДЭГ, связанных с пост-астматическим и блеомицин-индуцированным легочным фиброзом в человеческих наборах данных. Построение тепловой карты было выполнено с помощью Morpheus. $\text{LogFC} = \text{Log}_2$ (разы изменения экспрессии). Были использованы различные типы биологических материалов: ткань легких (GSE53845, GSE24206, GSE72073, GSE8581, GSE103174, GSE76925, GSE47460, GSE1122), периферическая кровь (GSE33566, GSE100153, GSE28267), альвеолярные макрофаги (GSE130928, GSE16972, GSE13896), мокрота (GSE148004), эпителиальные клетки малых дыхательных путей (GSE56341), лейкоциты из периферической крови (GSE55962), альвеолярные эпителиальные клетки II типа

(GSE29133), миелоидные клетки легких (GSE26296) и клетки носового эпителия (GSE40445). ИЛФ – идиопатический легочный фиброз, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, Эм – хроническая эмфизема, КФ – кистозный фиброз. Жирным шрифтом выделены гены, валидированные в данной работе на мышинной модели ОВА-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза.

Оказалось, что только при идиопатическом легочном фиброзе изменения в транскриптоме были схожи с профилем экспрессии генов, регулирующих развитие астмы и блеомицин-индуцированного легочного фиброза у мышей: ряд известных маркеров фиброза, включая *COL1A1*, *COL3A1*, *IGF1*, *CXCL12*, *SPP1* и *MUC5B*, были урегулированы в ткани легких, но не в периферической крови пациентов с ИЛФ (Рисунок 24). У пациентов с ХОБЛ, паттерны экспрессии генов, сходные с ИЛФ, были обнаружены в бронхоальвеолярной жидкости и мокроте, но не в ткани легких и периферической крови. Эмфизема и КФ были слабо ассоциированы с идентифицированными генами, что указывает на возможность использования мышинной модели пост-астматического фиброза для исследования аспектов патогенеза ИЛФ, но не ХОБЛ, КФ или эмфиземы.

Можно предположить, что наблюдаемые противоречия в характере изменения экспрессии ключевых фибротических генов могут быть обусловлены разницей в тяжести изучаемых патологий: в случае ИЛФ, проанализированные ткани легких были получены с помощью диагностической биопсии на ранней стадии заболевания [796,797], в то время как образцы от пациентов с ХОБЛ и хронической эмфиземой были собраны в ходе торакальных операций, проводимых при тяжелых случаях вышеупомянутых заболеваний [798–800]. Также на результаты анализа могли повлиять источники образцов: например, образцы крови и назальных эпителиальных клеток характеризовались практически полным отсутствием экспрессии идентифицированных фиброз-ассоциированных генов, а экспрессия данных генов в клетках, изолированных из бронхоальвеолярной жидкости и мокроты, значительно отличалась от экспрессии в ткани легких (Рисунок 24). Более того, следует отметить, что ИЛФ и ХОБЛ/эмфизема развиваются на различных этиологических и патогенетических фонах: в основе развития ИЛФ лежит нарушенный процесс wound healing, который ведет к активации про-фибротического сигналинга и ремоделированию легких [796], в то время как в основе развития ХОБЛ/эмфиземы лежит воспаление, инфекция и иммунные нарушения, также заканчивающиеся легочным фиброзом [674], что может приводить к определенным несоответствиям в паттерне экспрессии генов в ткани легких.

Таким образом, идентификация спектра одних и тех же ДЭГ в ткани легких мышей с пост-астматическим фиброзом и пациентов с ИЛФ демонстрирует наличие трансляционного моста между проанализированными патологиями. Обнаруженное сходство профилей экспрессии ключевых фибротических генов у мышей и пациентов с ИЛФ предполагает наличие близкой связи между идентифицированными генами и ранними стадиями ремоделирования легких. Отсутствие более выраженного пересечения между идентифицированными фиброз-ассоциированными генами может быть объяснено различными сроками развития фиброза у мышей (месяцы) и людей (годы и десятилетия). Однако для подтверждения данной гипотезы требуется дальнейшая оценка экспрессии идентифицированных ключевых генов в зависимости от тяжести легочной патологии.

Заключение

Таким образом, проведенный комплексный биоинформатический анализ с последующей валидацией полученных данных на мышинной модели позволил идентифицировать ряд генов, связанных с переходом острых воспалительных изменений в легких в легочный фиброз, представленных как хорошо известными пан-фибротическими регуляторами (*Cat*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Coll1a1*, *Cxcl12*, *Igf1*, *Muc5ac/Muc5b*, *Spp1*, *Timp1*), так и новыми генами (*C3*, *C3ar1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Cyp2e1*, *Fn1*, *Thbs1*, *Tyrbp*), опосредующими ранние фибротические изменения в легких уже на стадии острого и подострого воспаления. Кроме того, выявленные новые потенциальные гены (*Col4a1* и *Col4a2*), вовлеченные в развитие легочного фиброза различной этиологии, а также тесная ассоциация паттернов экспрессии фиброз-ассоциированных генов на мышинных моделях и генов, связанных с ИЛФ у человека, ясно демонстрируют необходимость их дальнейшего изучения в качестве потенциальных молекулярных маркеров/мишеней раннего легочного фиброза.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время не существует лекарственных препаратов, способных предотвратить прогрессирующее ремоделирование дыхательных путей и разрастание соединительной ткани в легких при фиброзе. Одобренные для применения в клинической практике пирфенидон и нинтеданиб стабилизируют состояние пациентов с легочным фиброзом, снижая частоту обострений и замедляя скорость падения функциональных показателей легких, но не приводят к полному излечению. Исследования по поиску новых препаратов для терапии легочного фиброза ведутся в нескольких направлениях, таких как поиск аналогов антифибротических молекул, разработка моноклональных антител к известным про-фибротическим факторам и ген-направленная терапия (см. раздел 1.6 литературного обзора).

Одной из самых распространенных причин легочного фиброза является предшествующий острый воспалительный процесс в легких. При невозможности элиминации из организма стимула, вызвавшего острое воспаление, происходит его хронизация. Причинами хронизации острого воспаления могут быть как дефекты в фагоцитарной системе организма, так и природа вещества, вызвавшего воспалительный стимул, препятствующая быстрой элиминации воспалительного агента из организма (см. раздел 1.1.7 литературного обзора). Наконец, в некоторых случаях, персистенция и хронизация воспаления в легких приводит к развитию легочного фиброза, ключевым моментом которого является дифференцировка и пролиферация миофибробластов – главных эффекторных клеток фиброза, функционирование которых в патологических условиях приводит к повышенному отложению компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и разрастанию соединительной ткани. Следовательно, поиск генов, регулирующих ключевые механизмы развития легочного фиброза в результате острого воспаления, которые могут являться как терапевтическими мишенями, так и диагностическими маркерами данного патологического процесса, является актуальной задачей.

В настоящее время ведутся работы по введению в клиническое использование нескольких потенциальных диагностических и прогностических маркеров тяжести течения острого повреждения легких (ОПЛ) и легочного фиброза. В отношении ОПЛ в качестве потенциальных прогностических маркеров рассматриваются про-воспалительные цитокины [478–480], компоненты сурфактанта [484] и антифибринолитической системы [489], а также матриксные металлопротеиназы [495]. К

потенциальным прогностическим маркерам легочного фиброза, помимо уже названных компонентов сурфактанта и матриксных металлопротеиназ, относят компоненты клеток Клара [500] и циркулирующие фибробласты [507] (см. раздел 1.5 литературного обзора).

В данной работе были идентифицированы ключевые гены, вовлеченные как в регуляцию острого воспаления легких у мышей различной этиологии, так и перехода острого воспаления в легочный фиброз. В отношении ОПЛ обнаружено, что уровень экспрессии ключевых генов, ответственных за регуляцию острого воспаления легких (*Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*, *Ptx3*, *Cat*, *Eln*), изменяется как при прогрессировании воспаления, так и в ответ на терапию противовоспалительными соединениями с различным механизмом действия. На *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ показано, что воспалительный процесс и последующее ремоделирование ВКМ являются ключевыми этапами в развитии ОПЛ, а ключевые гены, вовлеченные в эти процессы (*Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*, *Ptx3*, *Cat*, *Eln*), могут служить потенциальными прогностическими маркерами и терапевтическими мишенями ОПЛ. Кроме того, путем сопоставления ОПЛ-ассоциированных генов с профилем экспрессии генов в легких пациентов с COVID-19 были выявлены гены, обладающие регуляторной ролью как при прогрессировании ОПЛ, так и при развитии COVID-19 ассоциированного ОРДС (*SAA1*, *RSAD2*, *IFI44*, *RTP4*, и *MMP8*). Также, среди ОПЛ-ассоциированных генов, были идентифицированы гены, участвующие в процессах злокачественной трансформации ткани легких (*PTX3*, *SERPINE1*, *TIMP1*, *PLAUR*) посредством возможной регуляции ВКМ, играющего ключевую роль в озлокачествлении и метастазировании опухолей. Таким образом, показано, что гены *Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Serpine1*, *Ptx3* и *Mmp8* могут являться потенциальными маркерами/терапевтическими мишенями при развитии ОПЛ/ОРДС, а воспалительный процесс в легких является одним из основных триггеров, запускающих каскад реакций, приводящих к ремоделированию ВКМ и возможному развитию фиброза легких.

Следующим шагом нашей работы была идентификация и валидация генов, связанных с переходом острых воспалительных изменений в фиброз легких на *in vivo* модели ОВА-индуцированной астмы. В результате были найдены ключевые гены данного процесса, включая как хорошо известные про-фибротические регуляторы (*Igf1*, *Ccl2*, *Timp1*, *Cxcl12*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Spp1*, *Cat*, *Muc5ac*, *Muc5b*), так и новые (*Fnl C3 C3ar1 Cyp2e1 Thbs2*, *Tyrobp*) гены, участвующие в развитии ранних фибротических изменений легких. Следует подчеркнуть, что активация идентифицированных про-фибротических генов выявляется уже на стадии острого/подострого воспаления легких, и, таким образом, можно предположить, что данные гены контролируют переход острых воспалительных

процессов в легочный фиброз. Дальнейший анализ генов, регулирующих развитие легочного фиброза неаллергической этиологии, позволил идентифицировать новые потенциальные маркеры/мишени (*Col4a1*, *Col4a2*), вовлеченные в развитие фиброза легких, независимо от его этиологии. Таким образом, в результате проведенной работы были идентифицированы ключевые гены, участвующие в развитии острых воспалительных изменений в легких и контролирующие переход от острого воспаления к легочному фиброзу.

Главной проблемой, возникающей в результате анализа полученных в нашей работе данных, является вопрос о том, становятся ли изменение уровня экспрессии идентифицированных нами генов «первичным» событием, запускающим переход острых воспалительных изменений в легких в фиброз, или это всего лишь следствие регуляции экспрессии данных генов на более высоком уровне? Ответ на данный вопрос может дать изучение реакции организма на подавление экспрессии идентифицированных генов на *in vivo* модели легочного фиброза с последующей оценкой тяжести и скорости развития данной патологии. Проведение подобных экспериментов позволит подтвердить общность молекулярных механизмов, определяющих переход острых воспалительных процессов в фиброз легких. В настоящее время лечение большинства воспалительных состояний во многих органах, в том числе и легких, ограничивается симптоматической терапией, направленной на облегчение клинических симптомов воспаления путем воздействия на патогенетические звенья, лежащие ближе «к концу» регуляторной сети воспалительного каскада. Данный терапевтический подход хорошо зарекомендовал себя при лечении заболеваний, сопровождающихся острыми воспалительными изменениями, однако, в случае развития персистирующего хронического воспаления этот подход не предотвращает отдаленных последствий в виде фиброза и метаплазии. Проведенная в данной работе идентификация узловых генов, регулирующих развитие как острых воспалительных изменений в легких различной этиологии, так и их переход в хроническое воспаление, может пролить свет на процессы, лежащие «в начале» регуляторной сети воспалительного каскада и последующей фибротической трансформации ткани легких, что в будущем создаст платформу для разработки терапевтических средств, нацеленных на предотвращение хронизации и фиброзирование уже на стадии острого воспаления.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы ключевые гены (*Il-6, Ccl2, Cat, Serpine1, Eln, Timp1, Ptx3, Socs3*), ассоциированные с развитием острого повреждения легких (ОПЛ) различной этиологии.

2. На *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ показано:

а) введение липополисахарида (ЛПС) вызывает развитие выраженных воспалительных изменений в дыхательной системе мышей, а введение противовоспалительных соединений с разным механизмом действия препятствует прогрессированию ЛПС-индуцированных воспалительных изменений в легких мышей;

б) прогрессирование ЛПС-индуцированного ОПЛ вызывает активацию экспрессии ряда идентифицированных генов, а применение противовоспалительной терапии приводит к подавлению их экспрессии.

3. Выявлена связь между рядом ОПЛ-ассоциированных генов (*Saa1, Rsad2, Ifi44, Rtp4, Mmp8*) и COVID-19-ассоциированным регулолом. На модели ЛПС-индуцированного ОПЛ показана чувствительность данных генов к про-воспалительным стимулам и противовоспалительной терапии.

4. Обнаружены корреляции между рядом ОПЛ-ассоциированных генов (*PTX3, TIMP1, SERPINE1, PLAUR*) и неблагоприятным прогнозом для пациентов с опухолевыми заболеваниями легких.

5. Идентифицированы ключевые гены, ассоциированные с развитием острых астматических изменений в легких (*Ccl6, Ccl9, Ccl12, Timp1, Muc5ac, F5, Cyp2e1, Adra2a, Ear1, Tk1*). Показана потенциальная связь ряда астма-ассоциированных генов (*Fnl, Igf1, Ccl2, C3, Timp1, Cxcl12, Ccl4, Ccr2, Spp1, C3ar1*) с развитием легочного фиброза.

6. На *in vivo* модели острой и подострой овалбумин-индуцированной астмы показано:

а) морфологические признаки ремоделирования дыхательных путей и легочного фиброза появляются уже на стадии подострого астма-ассоциированного воспаления;

б) гены, ассоциированные с развитием острой астмы (*Timp1, Ccl2, Igf1, Muc5ac, Muc5b, C3, Fnl, Cat, Cyp2e1*), являются участниками ранних фибротических изменений в легких;

в) уровни экспрессии генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом (*Colla1, Col4a1, Col4a2, Thbs1* и *Tyropb*), повышались в ткани легких мышей с

острой астмой и пост-астматическим фиброзом, а гены *Col4a1* и *Col4a2* могут являться новыми потенциальными предикторами и ранними маркерами легочного фиброза.

7. Обнаружено, что профили экспрессии генов, ассоциированных с пост-астматическим и блеомицин-индуцированным фиброзом у мышей, обладают наибольшим сходством с ранним идиопатическим легочным фиброзом у человека, что предполагает наличие близкой связи между идентифицированными генами и начальными стадиями фиброза легких.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей работе использованы следующие сокращения:

АлТ – аланинаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

БА – бронхиальная астма

ВКМ – внеклеточный матрикс

ИБЛ – интерстициальные болезни легких

ИЛФ – идиопатический легочный фиброз

кДНК – комплементарная ДНК

ЛПС – липополисахарид

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛФК – лизофосфатидная кислота

ОВА – овальбумин

ОПЛ – острое повреждение легких

ОРДС – острый респираторный дистресс синдром

ОТ-ПЦР – количественная обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция в реальном времени

пДНК – плазмидные ДНК

ПМР – потенциальные мастер-регуляторы

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

фЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

COVID-19 – инфекция, вызванная коронавирусом, вызывающим острый тяжелый респираторный синдром-2

FDA – управление по контролю за продуктами и лекарствами США

FITC – флуоресцентный краситель изотиоцианат

IgE – иммуноглобулин E

NADP – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NSIP – неспецифическая интерстициальная пневмония

PPFE – плевропаренхимальный фиброэластоз

SARS-CoV-1/2 – коронавирус вызывающий острый тяжелый респираторный синдром-1/2

Th1/2 – Т-хелперы 1/2 типа

UIP – обычная интерстициальная пневмония

α -SMA – альфа-актин гладкомышечных клеток

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soriano J.B. et al. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // *Lancet Respir. Med.* Elsevier, 2020. Vol. 8, № 6. P. 585–596.
2. Meyer N.J., Gattinoni L., Calfee C.S. Acute respiratory distress syndrome // *Lancet* / ed. Drazen J.M. *N Engl J Med*, 2021. Vol. 398, № 10300. P. 622–637.
3. Jia Q. et al. Emerging roles of mechanosensitive ion channels in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome // *Respir. Res.* *Respir Res*, 2022. Vol. 23, № 1. P. 366.
4. Mowery N.T., Terzian W.T.H., Nelson A.C. Acute lung injury // *Curr. Probl. Surg.* Mosby, 2020. Vol. 57, № 5. P. 100777.
5. Chen X. et al. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome // *Inflamm. Res.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2020. Vol. 69, № 9. P. 883–895.
6. Mokra D. Acute Lung Injury – From Pathophysiology to Treatment // *Physiol. Res.* Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, 2020. Vol. 69, № Supplement 3. P. S353–S366.
7. Li L. et al. Acute lung injury in patients with COVID-19 infection // *Clin. Transl. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 10, № 1. P. 20–27.
8. Bellani G. et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries // *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* American Medical Association, 2016. Vol. 315, № 8. P. 788–800.
9. Fan E., Brodie D., Slutsky A.S. Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment // *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* American Medical Association, 2018. Vol. 319, № 7. P. 698–710.
10. Jamal M. et al. Immune dysregulation and system pathology in COVID-19 // *Virulence.* Bellwether Publishing, Ltd., 2021. Vol. 12, № 1. P. 918–936.
11. Ramasamy S., Subbian S. Critical determinants of cytokine storm and type I interferon response in COVID-19 pathogenesis // *Clin. Microbiol. Rev.* *Clin Microbiol Rev*, 2021. Vol. 34, № 3.
12. Spinelli E. et al. Respiratory drive in the acute respiratory distress syndrome: pathophysiology, monitoring, and therapeutic interventions // *Intensive Care Med.* Springer, 2020. Vol. 46, № 4. P. 606–618.

13. Kelly B.G. et al. A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. Vol. 166, № 4. P. 510–513.
14. Thille A.W. et al. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: A prospective cohort study of clinical autopsies // *Lancet Respir. Med.* Elsevier, 2013. Vol. 1, № 5. P. 395–401.
15. Glass D.S. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Molecular mechanisms and potential treatment approaches // *Respir. Investig.* Elsevier, 2020. Vol. 58, № 5. P. 320–335.
16. Mylvaganam R.J. et al. Recovering from a pandemic: pulmonary fibrosis after SARS-CoV-2 infection // *Eur. Respir. Rev.* European Respiratory Society, 2021. Vol. 30, № 162.
17. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine Storm // *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society, 2020. Vol. 383, № 23. P. 2255–2273.
18. Perez-Garcia J. et al. Pharmacogenetics of pediatric asthma: Current perspectives // *Pharmacogenomics. Pers. Med.* Dove Press, 2020. Vol. 13. P. 89–103.
19. Vasconcelos L.H.C. et al. Uncovering the Role of Oxidative Imbalance in the Development and Progression of Bronchial Asthma // *Oxid. Med. Cell. Longev.* Hindawi Limited, 2021. Vol. 2021.
20. Hough K.P. et al. Airway Remodeling in Asthma // *Front. Med.* Frontiers Media SA, 2020. Vol. 7. P. 191.
21. Mostaço-Guidolin L.B.B. et al. Defective fibrillar collagen organization by fibroblasts contributes to airway remodeling in asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2019. Vol. 200, № 4. P. 431–443.
22. Ito J.T. et al. Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies? // *Cells.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2019. Vol. 8, № 4. P. 342.
23. Bazan-Socha S. et al. Reticular basement membrane thickness is associated with growth- and fibrosis-promoting airway transcriptome profile-study in asthma patients // *Int. J. Mol. Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 22, № 3. P. 1–21.
24. Potaczek D.P. et al. Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes // *Cell. Signal.* Pergamon, 2020. Vol. 69. P. 109523.
25. Yoshida Y. et al. Changes in airway diameter and mucus plugs in patients with asthma exacerbation // *PLoS One.* Public Library of Science, 2020. Vol. 15, № 2. P. e0229238.
26. Chakraborty A. et al. Emerging Roles of Airway Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Cells.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 11, № 6. P. 1050.

27. Bu T., Wang L.F., Yin Y.Q. How do innate immune cells contribute to airway remodeling in copd progression? // *Int. J. COPD*. Dove Press, 2020. Vol. 15. P. 107–116.
28. Wnuk D. et al. Enhanced asthma-related fibroblast to myofibroblast transition is the result of profibrotic TGF- β /Smad2/3 pathway intensification and antifibrotic TGF- β /Smad1/5/(8)9 pathway impairment // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–16.
29. Hassoun D. et al. Bronchial smooth muscle cell in asthma: where does it fit? // *BMJ Open Respir. Res. Archives of Disease in childhood*, 2022. Vol. 9, № 1. P. e001351.
30. Cheng W.-H.H. et al. Pref-1 induced lung fibroblast differentiation by hypoxia through integrin $\alpha 5\beta 1$ /ERK/AP-1 cascade // *Eur. J. Pharmacol.* Elsevier, 2021. Vol. 909. P. 174385.
31. Insuela D.B.R. et al. Could Arachidonic Acid-Derived Pro-Resolving Mediators Be a New Therapeutic Strategy for Asthma Therapy? // *Front. Immunol.* Frontiers Media SA, 2020. Vol. 11. P. 1.
32. Li C. et al. Microrna-370 carried by m2 macrophage-derived exosomes alleviates asthma progression through inhibiting the fgf1/mapk/stat1 axis // *Int. J. Biol. Sci.* Ivyspring International Publisher, 2021. Vol. 17, № 7. P. 1795–1807.
33. Jacobs I. et al. Role of Eosinophils in Intestinal Inflammation and Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease: An Overlooked Villain? // *Front. Immunol.* Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 12. P. 4355.
34. Gans M.D., Gavrilova T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes // *Paediatr. Respir. Rev.* W.B. Saunders, 2020. Vol. 36. P. 118–127.
35. Usman K., Hsieh A., Hackett T.L. The role of mirnas in extracellular matrix repair and chronic fibrotic lung diseases // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2021. Vol. 10, № 7. P. 1706.
36. Schuster R. et al. The inflammatory speech of fibroblasts // *Immunol. Rev.* 2021. Vol. 302, № 1. P. 126–146.
37. Cameli P. et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis Treated With Pirfenidone or Nintedanib: A Real-Life Comparison Study // *Front. Mol. Biosci.* Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 7. P. 230.
38. Wang Y. et al. MBD2 serves as a viable target against pulmonary fibrosis by inhibiting macrophage M2 program // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science, 2021. Vol. 7, № 1.
39. Bai X. et al. Inhaled siRNA nanoparticles targeting IL11 inhibit lung fibrosis and improve

- pulmonary function post-bleomycin challenge // *Sci. Adv. American Association for the Advancement of Science*, 2022. Vol. 8, № 25.
40. Fusco R. et al. Adelmidrol: A new promising antioxidant and anti-inflammatory therapeutic tool in pulmonary fibrosis // *Antioxidants. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2020. Vol. 9, № 7. P. 1–14.
 41. Raghu G. et al. A Phase IIb Randomized Clinical Study of an Anti- α v β 6 Monoclonal Antibody in Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2022. Vol. 206, № 9. P. 1128–1139.
 42. Sgalla G. et al. Pamrevlumab for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis // *Expert Opin. Investig. Drugs. Taylor & Francis*, 2020. Vol. 29, № 8. P. 771–777.
 43. Zhang C. et al. CpG-oligodeoxynucleotides may be effective for preventing ionizing radiation induced pulmonary fibrosis // *Toxicol. Lett. Elsevier*, 2018. Vol. 292. P. 181–189.
 44. Li N. et al. Metformin alleviates crystalline silica-induced pulmonary fibrosis by remodeling endothelial cells to mesenchymal transition via autophagy signaling // *Ecotoxicol. Environ. Saf. Academic Press*, 2022. Vol. 245. P. 114100.
 45. Noble P.W., Barkauskas C.E., Jiang D. Pulmonary fibrosis: Patterns and perpetrators // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2012. Vol. 122, № 8. P. 2756–2762.
 46. Piotrowski W.J. et al. Guidelines of the Polish Respiratory Society on the Diagnosis and Treatment of Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases Other than Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Adv. Respir. Med. Adv Respir Med*, 2022. Vol. 90, № 5. P. 425–450.
 47. De Matteis S., Murgia N. Work-related interstitial lung disease: what is the true burden? // *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Int J Tuberc Lung Dis*, 2022. Vol. 26, № 11. P. 1001–1005.
 48. Andreikos D. et al. Statins' still controversial role in pulmonary fibrosis: What does the evidence show? // *Pulm. Pharmacol. Ther. Academic Press*, 2022. Vol. 77. P. 102168.
 49. Maher T.M. et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis // *Respir. Res. BioMed Central Ltd*, 2021. Vol. 22, № 1. P. 1–10.
 50. Duchemann B. et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris // *Eur. Respir. J. European Respiratory Society*, 2017. Vol. 50, № 2. P. 1602419.
 51. Tzouvelekis A., Bouros D. Estrogen Signaling and MicroRNAs in Lung Fibrosis. Sex, Hormones, and Rock Scars // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2019. Vol. 200, № 10. P. 1199–1200.

52. Dwyer D.N.O. et al. Lung Microbiota Contribute to Pulmonary Inflammation and Disease Progression in Pulmonary Fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2019. Vol. 199, № 9. P. 1127–1138.
53. Pardo A., Selman M. The interplay of the genetic architecture, aging, and environmental factors in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2021. Vol. 64, № 2. P. 163–172.
54. Ley B., Collard H.R., King T.E. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2011. Vol. 183, № 4. P. 431–440.
55. Uegami W. et al. MIXTURE of human expertise and deep learning—developing an explainable model for predicting pathological diagnosis and survival in patients with interstitial lung disease // *Mod. Pathol.* 2022 358. Nature Publishing Group, 2022. Vol. 35, № 8. P. 1083–1091.
56. Ryerson C.J. et al. Prevalence and prognosis of unclassifiable interstitial lung disease // *Eur. Respir. J.* Eur Respir J, 2013. Vol. 42, № 3. P. 750–757.
57. Denham J.W., Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury - A complex “wound” // *Radiother. Oncol.* 2002. Vol. 63, № 2. P. 129–145.
58. Fubini B., Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis // *Free Radic. Biol. Med.* Elsevier Inc., 2003. Vol. 34, № 12. P. 1507–1516.
59. Chen J., Stubbe J.A. Bleomycins: Towards better therapeutics // *Nat. Rev. Cancer.* 2005. Vol. 5, № 2. P. 102–112.
60. Kligerman S. Pathogenesis, Imaging, and Evolution of Acute Lung Injury // *Radiol. Clin.* North Am. Elsevier, 2022. Vol. 60, № 6. P. 925–939.
61. Saito S. et al. Novel mediators of idiopathic pulmonary fibrosis // *Clin. Sci.* Portland Press, 2022. Vol. 136, № 16. P. 1229–1240.
62. Reddy C.A., Wakwaya Y.T. Impact of gastroesophageal reflux disease on idiopathic pulmonary fibrosis and lung transplant recipients // *Curr. Opin. Gastroenterol.* Curr Opin Gastroenterol, 2022. Vol. 38, № 4. P. 411–416.
63. Duan J. et al. DNA methylation in pulmonary fibrosis and lung cancer // *Expert Rev. Respir. Med.* Expert Rev Respir Med, 2022. Vol. 16, № 5. P. 519–528.
64. Ruiz A. et al. Telomere Shortening and Its Association with Cell Dysfunction in Lung Diseases // *Int. J. Mol. Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2022. Vol. 23, № 1.
65. Ruaro B. et al. Gastroesophageal Reflux Disease in Idiopathic Pulmonary Fibrosis:

- Viewer or Actor? To Treat or Not to Treat? // *Pharmaceuticals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2022. Vol. 15, № 8. P. 1033.
66. Bédard Méthot D., Leblanc É., Lacasse Y. Meta-analysis of Gastroesophageal Reflux Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Chest. Elsevier*, 2019. Vol. 155, № 1. P. 33–43.
 67. Crisan-Dabija R. et al. “A Chain Only as Strong as Its Weakest Link”: An Up-to-Date Literature Review on the Bidirectional Interaction of Pulmonary Fibrosis and COVID-19 // *J. Proteome Res. American Chemical Society*, 2020. Vol. 19, № 11. P. 4327.
 68. Kessler A., Heightman M., Brennan E. Post-COVID-19 respiratory problems: burden and management // *Curr. Opin. Support. Palliat. Care. Curr Opin Support Palliat Care*, 2022. Vol. 16, № 4. P. 203–209.
 69. King T.E., Pardo A., Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis // *Lancet. Elsevier Inc.*, 2011. Vol. 378, № 9807. P. 1949–1961.
 70. Raghu G., Selman M. Nintedanib and pirfenidone: New antifibrotic treatments indicated for idiopathic pulmonary fibrosis offer hopes and raises questions // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2015. Vol. 191, № 3. P. 252–254.
 71. Feng X., Jia A. Protective effect of carvacrol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice // *Inflammation. Springer New York LLC*, 2014. Vol. 37, № 4. P. 1091–1101.
 72. Lee J.W. et al. 3,4,5-Trihydroxycinnamic acid attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via downregulating inflammatory molecules and upregulating HO-1/AMPK activation // *Int. Immunopharmacol. Elsevier B.V.*, 2018. Vol. 64. P. 123–130.
 73. Zhang H. et al. Apelin-13 Administration Protects Against LPS-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome Activation // *Cell. Physiol. Biochem. S. Karger AG*, 2018. Vol. 49, № 5. P. 1918–1932.
 74. Yang J. et al. Ginsenoside Rg3 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via MerTK-dependent activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway // *Front. Pharmacol. Frontiers Media S.A.*, 2018. Vol. 9, № AUG.
 75. Ksiazek T.G. et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome // *N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society*, 2003. Vol. 348, № 20. P. 1953–1966.
 76. Gonzales J. et al. Streptococcus pneumoniae and Its Virulence Factors H₂O₂ and Pneumolysin Are Potent Mediators of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease // *Toxins (Basel). NLM (Medline)*, 2021. Vol. 13, № 2.

77. Lucas R. et al. Impact of bacterial toxins in the lungs // *Toxins (Basel)*. MDPI AG, 2020. Vol. 12, № 4.
78. Klomp M. et al. From virus to inflammation, how influenza promotes lung damage // *J. Leukoc. Biol.* John Wiley and Sons Inc., 2021. Vol. 110, № 1. P. 115–122.
79. Shah R.D., Wunderink R.G. *Viral Pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome* // *Clin. Chest Med.* Elsevier Inc, 2017. Vol. 38, № 1. P. 113–125.
80. Zhang H. et al. Salidroside protects against ventilation-induced lung injury by inhibiting the expression of matrix metalloproteinase-9 // *Pharm. Biol.* Taylor & Francis, 2021. Vol. 59, № 1. P. 760–768.
81. Goligher E.C., Douflé G., Fan E. Update in mechanical ventilation, sedation, and outcomes 2014 // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2015. Vol. 191, № 12. P. 1367–1373.
82. Agrawal D.K. et al. A Damaged-Informed Lung Ventilator Model for Ventilator Waveforms // *Front. Physiol.* Front Physiol, 2021. Vol. 12.
83. Radbel J. et al. Disease-modifying treatment of chemical threat agent–induced acute lung injury // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Blackwell Publishing Inc., 2020. Vol. 1480, № 1. P. 14–29.
84. Pauluhn J. Phosgene inhalation toxicity: Update on mechanisms and mechanism-based treatment strategies // *Toxicology.* Elsevier Ireland Ltd, 2021. Vol. 450.
85. Laskin D.L., Malaviya R., Laskin J.D. Role of Macrophages in Acute Lung Injury and Chronic Fibrosis Induced by Pulmonary Toxicants // *Toxicol. Sci.* Oxford University Press, 2019. Vol. 168, № 2. P. 287–301.
86. Triantafyllou G.A. et al. Vaping-associated acute lung injury: A case series // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2019. Vol. 200, № 11. P. 1430–1431.
87. Kasson E. et al. Using a mixed methods approach to identify public perception of vaping risks and overall health outcomes on Twitter during the 2019 EVALI outbreak // *Int. J. Med. Inform.* Int J Med Inform, 2021. Vol. 155. P. 104574.
88. Zhang C.N. et al. The role of extracellular vesicles in traumatic brain injury-induced acute lung injury // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society Rockville, MD , 2021. Vol. 321, № 5. P. L885–L891.
89. Ziaka M., Exadaktylos A. Brain–lung interactions and mechanical ventilation in patients with isolated brain injury // *Crit. Care.* BioMed Central, 2021. Vol. 25, № 1. P. 358.
90. Sever I.H. et al. Protective effect of oxytocin through its anti-inflammatory and antioxidant role in a model of sepsis-induced acute lung injury: Demonstrated by CT and histological findings // *Exp. Lung Res.* Exp Lung Res, 2021. Vol. 47, № 9. P. 426–435.

91. Jiao Y. et al. Exosomal miR-30d-5p of neutrophils induces M1 macrophage polarization and primes macrophage pyroptosis in sepsis-related acute lung injury // *Crit. Care. BioMed Central*, 2021. Vol. 25, № 1. P. 356.
92. Kong L. et al. Sitagliptin activates the p62–Keap1–Nrf2 signalling pathway to alleviate oxidative stress and excessive autophagy in severe acute pancreatitis-related acute lung injury // *Cell Death Dis. Cell Death Dis*, 2021. Vol. 12, № 10. P. 928.
93. He Y.Q. et al. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms // *Pharmacol. Res. Academic Press*, 2021. Vol. 163.
94. Blázquez-Prieto J. et al. The emerging role of neutrophils in repair after acute lung injury // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society*, 2018. Vol. 59, № 3. P. 289–294.
95. Chen T. et al. Recent developments of small molecules with anti-inflammatory activities for the treatment of acute lung injury // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier Masson s.r.l.*, 2020. Vol. 207.
96. Hussell T., Bell T.J. Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context // *Nat. Rev. Immunol. Nat Rev Immunol*, 2014. Vol. 14, № 2. P. 81–93.
97. Gwyer Findlay E., Hussell T. Macrophage-mediated inflammation and disease: A focus on the lung // *Mediators Inflamm. Hindawi Limited*, 2012. Vol. 2012.
98. Byrne A.J. et al. Pulmonary macrophages: Key players in the innate defence of the airways // *Thorax. BMJ Publishing Group Ltd*, 2015. Vol. 70, № 12. P. 1189–1196.
99. Garbi N., Lambrecht B.N. Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. Springer*, 2017. Vol. 469, № 3–4. P. 561–572.
100. Mulugeta S., Nureki S.I., Beers M.F. Lost after translation: Insights from pulmonary surfactant for understanding the role of alveolar epithelial dysfunction and cellular quality control in fibrotic lung disease // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. American Physiological Society*, 2015. Vol. 309, № 6. P. L507–L525.
101. Puntorieri V. et al. The effects of exogenous surfactant administration on ventilation-induced inflammation in mouse models of lung injury // *BMC Pulm. Med. BioMed Central*, 2013. Vol. 13, № 1. P. 67.
102. Zebialowicz Ahlström J. et al. Synthetic surfactant with a recombinant surfactant protein C analogue improves lung function and attenuates inflammation in a model of acute respiratory distress syndrome in adult rabbits // *Respir. Res. BioMed Central Ltd.*, 2019. Vol. 20, № 1. P. 1–13.
103. Zarrilli G. et al. The immunopathological and histological landscape of COVID-19-

- mediated lung injury // *Int. J. Mol. Sci.* MDPI AG, 2021. Vol. 22, № 2. P. 1–11.
104. Gouda M.M., Shaikh S.B., Bhandary Y.P. Inflammatory and Fibrinolytic System in Acute Respiratory Distress Syndrome // *Lung*. Springer New York LLC, 2018. Vol. 196, № 5. P. 609–616.
 105. Borczuk A.C. Pulmonary pathology of COVID-19: a review of autopsy studies // *Curr. Opin. Pulm. Med.* NLM (Medline), 2021. Vol. 27, № 3. P. 184–192.
 106. Mohanty S.K. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19)- A natomic pathology perspective on current knowledge // *Diagn. Pathol.* BioMed Central, 2020. Vol. 15, № 1.
 107. Stern J., Pier J., Litonjua A.A. Asthma epidemiology and risk factors // *Semin. Immunopathol.* Springer, 2020. Vol. 42, № 1. P. 5–15.
 108. Alessandrini F. et al. Mimicking Antigen-Driven Asthma in Rodent Models—How Close Can We Get? // *Front. Immunol.* Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 11. P. 2394.
 109. Agache I., Akdis C.A. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine // *Allergol. Int.* Japanese Society of Allergology, 2016. Vol. 65, № 3. P. 243–252.
 110. Dharmage S.C., Perret J.L., Custovic A. Epidemiology of asthma in children and adults // *Front. Pediatr.* Frontiers Media SA, 2019. Vol. 7, № JUN. P. 246.
 111. To T. et al. Global asthma prevalence in adults: Findings from the cross-sectional world health survey // *BMC Public Health.* BioMed Central Ltd, 2012. Vol. 12, № 1. P. 1–8.
 112. Sethi G.S., Naura A.S. Progressive increase in allergen concentration abrogates immune tolerance in ovalbumin-induced murine model of chronic asthma // *Int. Immunopharmacol.* Elsevier, 2018. Vol. 60. P. 121–131.
 113. Mims J.W. Asthma: Definitions and pathophysiology // *Int. Forum Allergy Rhinol.* John Wiley and Sons Inc, 2015. Vol. 5, № S1. P. S2–S6.
 114. Holloway J.W., Yang I.A., Holgate S.T. Genetics of allergic disease // *J. Allergy Clin. Immunol.* Mosby, 2010. Vol. 125, № 2 SUPPL. 2. P. S81–S94.
 115. Bunyavanich S., Schadt E.E. Systems biology of asthma and allergic diseases: A multiscale approach // *J. Allergy Clin. Immunol.* Mosby, 2015. Vol. 135, № 1. P. 31–42.
 116. Tohidinik H.R., Mallah N., Takkouche B. History of allergic rhinitis and risk of asthma; a systematic review and meta-analysis // *World Allergy Organ. J.* Elsevier, 2019. Vol. 12, № 10. P. 100069.
 117. Turek E.M. et al. Airway microbial communities, smoking and asthma in a general population sample // *EBioMedicine.* Elsevier, 2021. Vol. 71. P. 103538.
 118. Pfeffer P.E., Mudway I.S., Grigg J. Air Pollution and Asthma: Mechanisms of Harm and

- Considerations for Clinical Interventions // *Chest*. Elsevier, 2021. Vol. 159, № 4. P. 1346–1355.
119. Miethel S. et al. Obesity and asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* Mosby, 2020. Vol. 146, № 4. P. 685–693.
120. Tan J., Bernstein J.A. Occupational asthma: An overview topical collection on occupational allergies // *Curr. Allergy Asthma Rep.* Springer, 2014. Vol. 14, № 5. P. 1–7.
121. Malo J.L., Vandemplas O. Definitions and Classification of Work-Related Asthma // *Immunol. Allergy Clin.* Elsevier, 2011. Vol. 31, № 4. P. 645–662.
122. Agache I. et al. Untangling asthma phenotypes and endotypes // *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. Vol. 67, № 7. P. 835–846.
123. Holgate S.T. et al. Asthma // *Nat. Rev. Dis. Prim.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 1, № 1. P. 1–22.
124. Valero A. et al. Allergic respiratory disease: Different allergens, different symptoms // *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 72, № 9. P. 1306–1316.
125. Lambrecht B.N., Hammad H. The airway epithelium in asthma // *Nat. Med.* 2012. Vol. 18, № 5. P. 684–692.
126. Johansson M.W. Activation states of blood eosinophils in asthma // *Clin. Exp. Allergy.* Blackwell Publishing Ltd, 2014. Vol. 44, № 4. P. 482–498.
127. Broide D. New perspectives on mechanisms underlying chronic allergic inflammation and asthma in 2007 // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. Vol. 122, № 3. P. 475–480.
128. Holt P.G. et al. Pathogenic mechanisms of allergic inflammation: Atopic asthma as a paradigm // *Adv. Immunol.* Academic Press Inc., 2009. Vol. 104, № C. P. 51–113.
129. Holtzman M.J. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens // *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation, 2012. Vol. 122, № 8. P. 2741–2748.
130. McGee H.S., Agrawal D.K. Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2009. Vol. 180, № 3. P. 211–225.
131. Peters S.P. Asthma Phenotypes: Nonallergic (Intrinsic) Asthma // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* Elsevier, 2014. Vol. 2, № 6. P. 650–652.
132. Matucci A. et al. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? // *Respir. Res.* BioMed Central Ltd., 2018. Vol. 19, № 1. P. 1–10.
133. Green B.J. et al. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in

- treatment resistant severe asthma // PLoS One. Public Library of Science, 2014. Vol. 9, № 6. P. e100645.
134. Peters M.C. et al. Measures of gene expression in sputum cells can identify T H2-high and TH2-low subtypes of asthma // J. Allergy Clin. Immunol. Mosby, 2014. Vol. 133, № 2. P. 388-394.e5.
 135. Uddin M. et al. Prosurvival activity for airway neutrophils in severe asthma // Thorax. BMJ Publishing Group Ltd, 2010. Vol. 65, № 8. P. 684–689.
 136. Bittar H.E.T., Yousem S.A., Wenzel S.E. Pathobiology of severe asthma // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. Annual Reviews, 2015. Vol. 10. P. 511–545.
 137. Gordon I.O. et al. Endobronchial biopsy: A guide for asthma therapy selection in the era of bronchial thermoplasty // J. Asthma. Taylor & Francis, 2013. Vol. 50, № 6. P. 634–641.
 138. Dunican E.M., Watchorn D.C., Fahy J. V. Autopsy and imaging studies of mucus in asthma: Lessons learned about disease mechanisms and the role of mucus in airflow obstruction // Ann. Am. Thorac. Soc. American Thoracic Society, 2018. Vol. 15. P. S184–S191.
 139. Thomas B. et al. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma // J. Allergy Clin. Immunol. Mosby, 2010. Vol. 126, № 4. P. 722-729.e2.
 140. Lam M., Lamanna E., Bourke J.E. Regulation of Airway Smooth Muscle Contraction in Health and Disease // Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC, 2019. Vol. 1124. P. 381–422.
 141. James A.L. et al. Airway smooth muscle proliferation and inflammation in asthma // J. Appl. Physiol. American Physiological Society, 2018. Vol. 125, № 4. P. 1090–1096.
 142. Liu Y. et al. Emodin ameliorates ovalbumin-induced airway remodeling in mice by suppressing airway smooth muscle cells proliferation // Int. Immunopharmacol. Elsevier, 2020. Vol. 88. P. 106855.
 143. Elliot J.G. et al. Inflammation-dependent and independent airway remodelling in asthma // Respirology. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 23, № 12. P. 1138–1145.
 144. Distler J.H.W. et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis // Nat. Rev. Rheumatol. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 15, № 12. P. 705–730.
 145. Morgenstern D.E. et al. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* // J. Exp. Med. The Rockefeller University Press, 1997. Vol. 185, № 2. P. 207–218.
 146. Leung C.C., Yu I.T.S., Chen W. Silicosis // Lancet. Elsevier, 2012. Vol. 379, № 9830. P. 2008–2018.

147. Hannah J.R., D’Cruz D.P. Pulmonary Complications of Systemic Lupus Erythematosus // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* Thieme Medical Publishers, Inc., 2019. Vol. 40, № 2. P. 227–234.
148. Ahmadinejad F. et al. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress // *Antioxidants*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2017. Vol. 6, № 3. P. 51.
149. Oczypok E.A., Perkins T.N., Oury T.D. All the “RAGE” in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses // *Paediatr. Respir. Rev.* W.B. Saunders, 2017. Vol. 23. P. 40–49.
150. Yousuf A. et al. T2 Biologics for Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2019. Vol. 7, № 5. P. 1405–1416.
151. Wynn T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases // *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation, 2007. Vol. 117, № 3. P. 524–529.
152. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G., Hinz B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: Answered and unanswered questions // *F1000Research*. Faculty of 1000 Ltd, 2016. Vol. 5.
153. Upagupta C. et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis // *Eur. Respir. Rev.* European Respiratory Society, 2018. Vol. 27, № 148.
154. Harkness L.M. et al. Tumstatin regulates the angiogenic and inflammatory potential of airway smooth muscle extracellular matrix // *J. Cell. Mol. Med.* Wiley-Blackwell, 2017. Vol. 21, № 12. P. 3288–3297.
155. Li Z. et al. Longitudinal virological changes and underlying pathogenesis in hospitalized COVID-19 patients in Guangzhou, China // *Sci. China Life Sci.* Science Press (China), 2021. Vol. 64, № 12. P. 2129–2143.
156. Postma D.S., Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006. Vol. 3, № 5. P. 434–439.
157. Bloemen K. et al. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung // *Immunol. Lett.* Elsevier, 2007. Vol. 113, № 1. P. 6–18.
158. Thunnissen E. et al. Elastin in pulmonary pathology: relevance in tumours with a lepidic or papillary appearance. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint // *Histopathology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2022. Vol. 80, № 3. P. 457–467.
159. Olczyk P., Mencner Ł., Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing // *Biomed Res. Int.* Hindawi Limited, 2014. Vol.

- 2014.
160. Herrera J., Henke C.A., Bitterman P.B. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2018. Vol. 128, № 1. P. 45–53.
 161. Parker M.W. et al. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2014. Vol. 124, № 4. P. 1622–1635.
 162. Liu F. et al. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. American Physiological Society*, 2015. Vol. 308, № 4. P. L344–L357.
 163. Burgstaller G. et al. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease // *Eur. Respir. J. European Respiratory Society*, 2017. Vol. 50, № 1. P. 1601805.
 164. Reeves S.R. et al. Asthmatic airway epithelial cells differentially regulate fibroblast expression of extracellular matrix components // *J. Allergy Clin. Immunol. NIH Public Access*, 2014. Vol. 134, № 3. P. 663.
 165. Patel N.M. et al. Pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis // *Chest. Elsevier*, 2007. Vol. 132, № 3. P. 998–1006.
 166. Zheng M. et al. Long noncoding RNA COPDA1 promotes airway smooth muscle cell proliferation in chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society*, 2019. Vol. 61, № 5. P. 584–596.
 167. de Almeida L.G.N. et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology // *Pharmacol. Rev. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2022. Vol. 74, № 3. P. 712–768.
 168. Gill S.E., Parks W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing // *Int. J. Biochem. Cell Biol. Pergamon*, 2008. Vol. 40, № 6–7. P. 1334–1347.
 169. Parks W.C., Wilson C.L., López-Boado Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity // *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group*, 2004. Vol. 4, № 8. P. 617–629.
 170. Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis // *J. Exp. Med. The Rockefeller University Press*, 2011. Vol. 208, № 7. P. 1339–1350.
 171. Laville D. et al. Immune escape is an early event in pre-invasive lesions of lung squamous cell carcinoma // *Diagnostics. MDPI AG*, 2020. Vol. 10, № 7.
 172. Denisov E. V. et al. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression // *Lung Cancer. Elsevier*

- Ireland Ltd, 2019. Vol. 135. P. 21–28.
173. Carsana L. et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study // *Lancet Infect. Dis.* Lancet Publishing Group, 2020. Vol. 20, № 10. P. 1135–1140.
 174. Margaroli C. et al. Spatial mapping of SARS-CoV-2 and H1N1 lung injury identifies differential transcriptional signatures // *Cell Reports Med.* Cell Press, 2021. Vol. 2, № 4.
 175. Denisov E. V. et al. Gene expression profiling revealed 2 types of bronchial basal cell hyperplasia and squamous metaplasia with different progression potentials // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* Lippincott Williams and Wilkins, 2020. Vol. 28, № 6. P. 477–483.
 176. Du C. et al. MAPK/FoxA2-mediated cigarette smoke-induced squamous metaplasia of bronchial epithelial cells // *Int. J. COPD.* Dove Medical Press Ltd., 2017. Vol. 12. P. 3341–3351.
 177. Zeng Z. et al. Imaging manifestations and pathological analysis of severe pneumonia caused by human infected avian influenza (H7N9) // *Radiol. Infect. Dis.* Elsevier BV, 2015. Vol. 1, № 2. P. 64–69.
 178. Lee J.D. et al. Integration of transcriptomics, proteomics and metabolomics identifies biomarkers for pulmonary injury by polyhexamethylene guanidine phosphate (PHMG-p), a humidifier disinfectant, in rats // *Arch. Toxicol.* Springer, 2020. Vol. 94, № 3. P. 887–909.
 179. Kim B.R. et al. SOX2 and PI3K Cooperate to Induce and Stabilize a Squamous-Committed Stem Cell Injury State during Lung Squamous Cell Carcinoma Pathogenesis // *PLoS Biol.* Public Library of Science, 2016. Vol. 14, № 11. P. 1002581.
 180. Gohy S. et al. Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease // *Sci. Rep.* Nature Research, 2019. Vol. 9, № 1.
 181. Rao W. et al. Regenerative Metaplastic Clones in COPD Lung Drive Inflammation and Fibrosis // *Cell.* Cell Press, 2020. Vol. 181, № 4. P. 848-864.e18.
 182. Inamura K. Clinicopathological characteristics and mutations driving development of early lung adenocarcinoma: Tumor initiation and progression // *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG, 2018. Vol. 19, № 4.
 183. Zhang H., Guo L., Chen J. Rationale for lung adenocarcinoma prevention and drug development based on molecular biology during carcinogenesis // *OncoTargets and Therapy.* Dove Medical Press Ltd., 2020. Vol. 13. P. 3085–3091.
 184. Kadara H. et al. Early events in the molecular pathogenesis of lung cancer // *Cancer Prevention Research.* American Association for Cancer Research Inc., 2016. Vol. 9, № 7.

- P. 518–527.
185. Hosseini M., Salvatore M. Is pulmonary fibrosis a precancerous disease? // *Eur. J. Radiol.* Elsevier, 2023. Vol. 160. P. 110723.
 186. Majo J. et al. Pathology and natural history of organ fibrosis // *Curr. Opin. Pharmacol.* Elsevier, 2019. Vol. 49. P. 82–89.
 187. Travis W.D. et al. American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Lung Association, 2002. Vol. 165, № 2. P. 277–304.
 188. Smith M.L. Update on Pulmonary Fibrosis: Not All Fibrosis Is Created Equally // *Arch. Pathol. Lab. Med.* Allen Press, 2016. Vol. 140, № 3. P. 221–229.
 189. Travis W.D. et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2013. Vol. 188, № 6. P. 733–748.
 190. Hashimoto N. et al. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 113, № 2. P. 243–252.
 191. Bucala R. et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. // *Mol. Med.* BioMed Central, 1994. Vol. 1, № 1. P. 71–81.
 192. Kuwana M. et al. Human circulating CD14 + monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation // *J. Leukoc. Biol.* Wiley, 2003. Vol. 74, № 5. P. 833–845.
 193. Postlethwaite A.E., Shigemitsu H., Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: Possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004. Vol. 16, № 6. P. 733–738.
 194. Willis B.C. et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1: Potential role in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology Inc., 2005. Vol. 166, № 5. P. 1321–1332.
 195. Foxman E.F., Campbell J.J., Butcher E.C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis // *J. Cell Biol.* The Rockefeller University Press, 1997. Vol. 139, № 5. P. 1349–1360.
 196. Pilling D. et al. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts // *PLoS One.* Public Library of Science, 2009. Vol. 4, № 10.
 197. Phillips R.J. et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and

- mediate fibrosis // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2004. Vol. 114, № 3. P. 438–446.
198. Russo F.P. et al. The Bone Marrow Functionally Contributes to Liver Fibrosis // *Gastroenterology. Elsevier*, 2006. Vol. 130, № 6. P. 1807–1821.
199. Yan J. et al. Role of bone marrow-derived fibroblasts in renal fibrosis // *Front. Physiol. Frontiers Media SA*, 2016. Vol. 7, № FEB. P. 61.
200. Haudek S.B. et al. Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2006. Vol. 103, № 48. P. 18284–18289.
201. Varcoe R.L. et al. The role of the fibrocyte in intimal hyperplasia // *J. Thromb. Haemost. John Wiley & Sons, Ltd*, 2006. Vol. 4, № 5. P. 1125–1133.
202. Mori L. et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow // *Exp. Cell Res. Academic Press*, 2005. Vol. 304, № 1. P. 81–90.
203. Lassance L. et al. Fibrocyte migration, differentiation and apoptosis during the corneal wound healing response to injury // *Exp. Eye Res. NIH Public Access*, 2018. Vol. 170. P. 177–187.
204. Metz C.N. Fibrocytes: A unique cell population implicated in wound healing // *Cell. Mol. Life Sci. Springer*, 2003. Vol. 60, № 7. P. 1342–1350.
205. Kisseleva T. et al. Fibrocyte-like cells recruited to the spleen support innate and adaptive immune responses to acute injury or infection // *J. Mol. Med. NIH Public Access*, 2011. Vol. 89, № 10. P. 997–1013.
206. Collins D. et al. Phagocytosis by Fibrocytes as a Mechanism to Decrease Bacterial Burden and Increase Survival in Sepsis // *Shock. NIH Public Access*, 2019. Vol. 51, № 4. P. 464–471.
207. Smadja D.M. et al. Cooperation between human fibrocytes and endothelial colony-forming cells increases angiogenesis via the CXCR4 pathway // *Thromb. Haemost. NIH Public Access*, 2014. Vol. 112, № 5. P. 1002–1013.
208. Schmidt M. et al. Identification of Circulating Fibrocytes as Precursors of Bronchial Myofibroblasts in Asthma // *J. Immunol. American Association of Immunologists*, 2003. Vol. 171, № 1. P. 380–389.
209. Higashiyama R. et al. Negligible Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Collagen Production During Hepatic Fibrogenesis in Mice // *Gastroenterology. Elsevier*, 2009. Vol. 137, № 4. P. 1459-1466.e1.
210. Bellini A. et al. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic

- and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients // *Mucosal Immunol.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 5, № 2. P. 140–149.
211. Hartlapp I. et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo // *FASEB J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2001. Vol. 15, № 12. P. 2215–2224.
 212. Hong K.M. et al. Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice // *FASEB J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 19, № 14. P. 2029–2031.
 213. García-de-Alba C. et al. Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: Possible role in migration and homing // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2010. Vol. 182, № 9. P. 1144–1152.
 214. Chiang H.Y., Chu P.H., Lee T.H. R1R2 peptide ameliorates pulmonary fibrosis in mice through fibrocyte migration and differentiation // *PLoS One.* Public Library of Science, 2017. Vol. 12, № 10.
 215. Tomasek J.J. et al. Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2002. Vol. 3, № 5. P. 349–363.
 216. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair // *J. Invest. Dermatol.* Elsevier, 2007. Vol. 127, № 3. P. 526–537.
 217. Hinz B. Masters and servants of the force: The role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission // *Eur. J. Cell Biol.* Urban & Fischer, 2006. Vol. 85, № 3–4. P. 175–181.
 218. Hinz B. et al. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions // *Mol. Biol. Cell.* American Society for Cell Biology, 2004. Vol. 15, № 9. P. 4310–4320.
 219. Rehan V.K., Torday J.S. The lung alveolar lipofibroblast: An evolutionary strategy against neonatal hyperoxic lung injury // *Antioxidants Redox Signal.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2014. Vol. 21, № 13. P. 1893–1904.
 220. Habiél D.M., Hogaboam C.M. Heterogeneity of Fibroblasts and Myofibroblasts in Pulmonary Fibrosis // *Curr. Pathobiol. Rep.* Springer, 2017. Vol. 5, № 2. P. 101–110.
 221. Rehan V.K., Torday J.S. Hyperoxia augments pulmonary lipofibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation // *Cell Biochem. Biophys.* Springer, 2003. Vol. 38, № 3. P. 239–249.
 222. Rehan V.K. et al. Mechanism of nicotine-induced pulmonary fibroblast transdifferentiation // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological

- Society, 2005. Vol. 289, № 4 33-4. P. 667–676.
223. Hecker L. et al. Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD // *Exp. Cell Res.* Academic Press, 2011. Vol. 317, № 13. P. 1914–1921.
224. Kheirollahi V. et al. Metformin induces lipogenic differentiation in myofibroblasts to reverse lung fibrosis // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–16.
225. Bartis D. et al. Epithelial–mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? // *Thorax.* BMJ Publishing Group Ltd, 2014. Vol. 69, № 8. P. 760–765.
226. Nieto M.A. et al. Emt: 2016 // *Cell.* Elsevier, 2016. Vol. 166, № 1. P. 21–45.
227. Onder T.T. et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways // *Cancer Res.* American Association for Cancer Research, 2008. Vol. 68, № 10. P. 3645–3654.
228. Hill C. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Contributes to Pulmonary Fibrosis via Aberrant Epithelial/Fibroblastic Cross-Talk // *J. Lung Heal. Dis.* Sciaccess Publishers LLC, 2019. Vol. 3, № 2. P. 31–35.
229. Marmai C. et al. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 2011. Vol. 301, № 1. P. 71–78.
230. Rock J.R. et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2011. Vol. 108, № 52. P. E1475.
231. Degryse A.L. et al. TGF β signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 2011. Vol. 300, № 6. P. L887.
232. Yao L. et al. Paracrine signalling during ZEB1-mediated epithelial–mesenchymal transition augments local myofibroblast differentiation in lung fibrosis // *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group, 2019. Vol. 26, № 5. P. 943–957.
233. Chanda D. et al. Developmental Reprogramming in Mesenchymal Stromal Cells of Human Subjects with Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6.
234. Lehmann M., Baarsma H.A., Königshoff M. WNT Signaling in Lung Aging and Disease // *Ann. Am. Thorac. Soc.* American Thoracic Society, 2016. Vol. 13, № Supplement_5. P. S411–S416.
235. Herriges M., Morrissey E.E. Lung development: Orchestrating the generation and

- regeneration of a complex organ // *Dev. The Company of Biologists*, 2014. Vol. 141, № 3. P. 502–513.
236. Morrisey E.E., Hogan B.L.M. Preparing for the First Breath: Genetic and Cellular Mechanisms in Lung Development // *Dev. Cell. Cell Press*, 2010. Vol. 18, № 1. P. 8–23.
237. Joannes A. et al. FGF9 and FGF18 in idiopathic pulmonary fibrosis promote survival and migration and inhibit myofibroblast differentiation of human lung fibroblasts in vitro // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. American Physiological Society*, 2016. Vol. 310, № 7. P. L615–L629.
238. Königshoff M. et al. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis // *PLoS One. Public Library of Science*, 2008. Vol. 3, № 5. P. e2142.
239. Selman M., Pardo A., Kaminski N. Idiopathic pulmonary fibrosis: Aberrant recapitulation of developmental programs? // *PLoS Med. Public Library of Science*, 2008. Vol. 5, № 3. P. 0373–0380.
240. Landi C. et al. Common molecular pathways targeted by nintedanib in cancer and IPF: A bioinformatic study // *Pulm. Pharmacol. Ther. Academic Press*, 2020. Vol. 64. P. 101941.
241. Aschner Y., Downey G.P. Transforming Growth Factor- β : Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society*, 2016. Vol. 54, № 5. P. 647–655.
242. Juban G. et al. AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF- β 1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy // *Cell Rep. Cell Press*, 2018. Vol. 25, № 8. P. 2163-2176.e6.
243. Meyer A. et al. Platelet TGF- β 1 contributions to plasma TGF- β 1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload // *Blood. American Society of Hematology*, 2012. Vol. 119, № 4. P. 1064–1074.
244. Celada L.J. et al. PD-1 up-regulation on CD4⁺ T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF- β 1 production // *Sci. Transl. Med. American Association for the Advancement of Science*, 2018. Vol. 10, № 460.
245. Falcone D.J. et al. Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors. Role of plasminogen activation // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 1993. Vol. 268, № 16. P. 11951–11958.
246. Frangogiannis N.G. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2020. Vol. 217, № 3.
247. Russo I. et al. Protective Effects of Activated Myofibroblasts in the Pressure-Overloaded Myocardium Are Mediated Through Smad-Dependent Activation of a Matrix-Preserving Program // *Circ. Res. NLM (Medline)*, 2019. Vol. 124, № 8. P. 1214–1227.

248. Krafts K.P. Tissue repair: The hidden drama // *Organogenesis*. Taylor & Francis, 2010. Vol. 6, № 4. P. 225–233.
249. Fernandez I.E., Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: From targeting to biomarkers // *Proc. Am. Thorac. Soc. American Thoracic Society*, 2012. Vol. 9, № 3. P. 111–116.
250. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis // *Immunity*. Cell Press, 2016. Vol. 44, № 3. P. 450–462.
251. Travis M.A., Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity // *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews*, 2014. Vol. 32. P. 51–82.
252. Nevers T. et al. Th1 effector T cells selectively orchestrate cardiac fibrosis in nonischemic heart failure // *J. Exp. Med. The Rockefeller University Press*, 2017. Vol. 214, № 11. P. 3311–3329.
253. Wilson M.S., Wynn T.A. Pulmonary fibrosis: Pathogenesis, etiology and regulation // *Mucosal Immunol. Nature Publishing Group*, 2009. Vol. 2, № 2. P. 103–121.
254. Degryse A.L. et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. American Physiological Society Bethesda, MD*, 2010. Vol. 299, № 4. P. 442–452.
255. Logan C.Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Annual Reviews*, 2004. Vol. 20. P. 781–810.
256. Nusse R., Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities // *Cell*. Cell Press, 2017. Vol. 169, № 6. P. 985–999.
257. Pongracz J.E., Stockley R.A. Wnt signalling in lung development and diseases // *Respir. Res. BioMed Central*, 2006. Vol. 7, № 1. P. 1–10.
258. Wu B., Crampton S.P., Hughes C.C.W. Wnt Signaling Induces Matrix Metalloproteinase Expression and Regulates T Cell Transmigration // *Immunity*. Cell Press, 2007. Vol. 26, № 2. P. 227–239.
259. Qu B. et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway may regulate the expression of angiogenic growth factors in hepatocellular carcinoma // *Oncol. Lett. Spandidos Publications*, 2014. Vol. 7, № 4. P. 1175–1178.
260. Pandur P., Maurus D., Kühl M. Increasingly complex: New players enter the Wnt signaling network // *BioEssays*. John Wiley & Sons, Ltd, 2002. Vol. 24, № 10. P. 881–884.
261. Zhang Y. et al. A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration // *Nat. Genet. Nature Publishing Group*, 2008. Vol. 40, № 7. P. 862–870.

262. Flozak A.S. et al. β -Catenin/T-cell factor signaling is activated during lung injury and promotes the survival and migration of alveolar epithelial cells // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 2010. Vol. 285, № 5. P. 3157–3167.
263. Xu W. et al. Wnt5a reverses the inhibitory effect of hyperoxia on transdifferentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells // *J. Physiol. Biochem. Springer Netherlands*, 2015. Vol. 71, № 4. P. 823–838.
264. Vuga L.J. et al. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society*, 2009. Vol. 41, № 5. P. 583–589.
265. Chilos M. et al. Aberrant Wnt/ β -catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Pathol. American Society for Investigative Pathology Inc.*, 2003. Vol. 162, № 5. P. 1495–1502.
266. Kim T.H. et al. Blockade of the Wnt/ β -catenin pathway attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. // *Tohoku J. Exp. Med. Tohoku University Medical Press*, 2011. Vol. 223, № 1. P. 45–54.
267. Hamburg-Shields E. et al. Sustained β -catenin activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular matrix protein-coding genes // *J. Pathol. John Wiley & Sons, Ltd*, 2015. Vol. 235, № 5. P. 686–697.
268. Aumiller V. et al. WNT/ β -catenin signaling induces IL-1 β expression by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society*, 2013. Vol. 49, № 1. P. 96–104.
269. Zhou B. et al. Interactions between β -catenin and transforming growth factor- β signaling pathways mediate epithelial- mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP) // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 2012. Vol. 287, № 10. P. 7026–7038.
270. Hasaneen N.A. et al. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) promotes lung fibroblast proliferation, survival and differentiation to myofibroblasts // *Respir. Res. BioMed Central Ltd.*, 2016. Vol. 17, № 1. P. 1–14.
271. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, 2003. Vol. 9, № 6. P. 669–676.
272. Koch S., Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. Vol. 2, № 7. P. 1–22.
273. Kaner R.J., Crystal R.G. Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung // *Mol. Med. Johns Hopkins University Press*, 2001. Vol. 7, № 4. P. 240–246.

274. Chanda D. et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis // *Mol. Aspects Med.* Pergamon, 2019. Vol. 65. P. 56–69.
275. Medford A.R.L., Millar A.B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): paradox or paradigm? // *Thorax.* BMJ Publishing Group Ltd, 2006. Vol. 61, № 7. P. 621–626.
276. Varet J. et al. VEGF in the lung: A role for novel isoforms // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society Bethesda, MD, 2010. Vol. 298, № 6. P. 768–774.
277. Chen C.M., Wang L.F. High-dose vascular endothelial growth factor increases surfactant protein gene expressions in preterm rat lung // *Early Hum. Dev.* Elsevier, 2007. Vol. 83, № 9. P. 581–584.
278. Leung D.W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen // *Science* (80-.). American Association for the Advancement of Science, 1989. Vol. 246, № 4935. P. 1306–1309.
279. Kuhn H. et al. High concentrations of vascular endothelial growth factor reduce stretch-induced apoptosis of alveolar type II cells // *Respirology.* John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 15, № 2. P. 343–348.
280. Ando M. et al. Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *Lung.* Springer, 2010. Vol. 188, № 3. P. 247–252.
281. Arai T. et al. Platelet-derived growth factor can predict survival and acute exacerbation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *J. Thorac. Dis.* AME Publishing Company, 2022. Vol. 14, № 2. P. 278–294.
282. Murray L.A. et al. Antifibrotic role of vascular endothelial growth factor in pulmonary fibrosis // *JCI Insight.* American Society for Clinical Investigation, 2017. Vol. 2, № 16.
283. Amano H. et al. The role of vascular endothelial growth factor receptor 1 tyrosine kinase signaling in bleomycin-induced pulmonary fibrosis // *Biomed. Pharmacother.* Elsevier Masson, 2019. Vol. 117. P. 109067.
284. Mura M. et al. Functions of type II pneumocyte-derived vascular endothelial growth factor in alveolar structure, acute inflammation, and vascular permeability // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2010. Vol. 176, № 4. P. 1725–1734.
285. Le Cras T.D. et al. VEGF causes pulmonary hemorrhage, hemosiderosis, and air space enlargement in neonatal mice // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 2004. Vol. 287, № 1 31-1. P. 10.
286. Probst C.K. et al. Vascular permeability in the fibrotic lung // *Eur. Respir. J.* 2020. Vol. 56, № 1.

287. Barratt S.L. et al. Differential expression of VEGF-Axxx isoforms is critical for development of pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2017. Vol. 196, № 4. P. 479–493.
288. Ebina M. et al. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2004. Vol. 169, № 11. P. 1203–1208.
289. Tzouvelekis A., Anevlavis S., Bouros D. Angiogenesis in interstitial Lung Diseases: A pathogenetic hallmark or a bystander? // *Respir. Res. BioMed Central*, 2006. Vol. 7, № 1. P. 1–13.
290. Ingham P.W., McMahon A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles // *Genes Dev. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001. Vol. 15, № 23. P. 3059–3087.
291. Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila // *Nature. Nature Publishing Group*, 1980. Vol. 287, № 5785. P. 795–801.
292. Fernandes-Silva H., Correia-Pinto J., Moura R.S. Canonical sonic hedgehog signaling in early lung development // *J. Dev. Biol. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2017. Vol. 5, № 1. P. 3.
293. Taipale J. et al. Patched acts catalytically to suppress the activity of smoothened // *Nature*. 2002. Vol. 418, № 6900. P. 892–897.
294. Humke E.W. et al. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins // *Genes Dev. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2010. Vol. 24, № 7. P. 670–682.
295. Sasaki H. et al. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 β floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro // *Development. The Company of Biologists*, 1997. Vol. 124, № 7. P. 1313–1322.
296. Oliver T.G. et al. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: A critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Vol. 100, № 12. P. 7331–7336.
297. Astorga J., Carlsson P. Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4 // *Development. The Company of Biologists*, 2007. Vol. 134, № 20. P. 3753–3761.
298. Bolaños A.L. et al. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. American Physiological Society Bethesda, MD*, 2012. Vol. 303, № 11.
299. Cigna N. et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- β -

- dependent myofibroblastic differentiation in humans: Involvement in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2012. Vol. 181, № 6. P. 2126–2137.
300. Horn A. et al. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis // *Arthritis Rheum.* John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 64, № 8. P. 2724–2733.
 301. Liu L. et al. Hedgehog signaling in neonatal and adult lung // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2013. Vol. 48, № 6. P. 703–710.
 302. Moshai E.F. et al. Targeting the Hedgehog-Glioma-associated oncogene homolog pathway inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2014. Vol. 51, № 1. P. 11–25.
 303. Xu K., Moghal N., Egan S.E. Notch signaling in lung development and disease // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, New York, NY, 2012. Vol. 727. P. 89–98.
 304. Bray S.J. Notch signalling in context // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 17, № 11. P. 722–735.
 305. Kaviani N. New Insights into the Mechanism of Notch Signalling in Fibrosis // *Open Rheumatol. J.* Bentham Science Publishers Ltd., 2012. Vol. 6, № 1. P. 96–102.
 306. Nosedá M. et al. Smooth muscle α -actin is a direct target of Notch/CSL // *Circ. Res.* 2006. Vol. 98, № 12. P. 1468–1470.
 307. Hu B. et al. Mesenchymal deficiency of notch1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2015. Vol. 185, № 11. P. 3066–3075.
 308. Liu Y. et al. Artesunate ameliorates lung fibrosis via inhibiting the notch signaling pathway // *Exp. Ther. Med.* Spandidos Publications, 2017. Vol. 14, № 1. P. 561–566.
 309. Ornitz D.M., Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 4, № 3. P. 215–266.
 310. Kranenburg A.R. et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with enhanced bronchial expression of FGF-1, FGF-2, and FGFR-1 // *J. Pathol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 206, № 1. P. 28–38.
 311. Guzy R.D. et al. Fibroblast growth factor 2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to bleomycin // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2015. Vol. 52, № 1. P. 116–128.
 312. MacKenzie B.A. et al. Increased FGF1-FGFRc expression in idiopathic pulmonary fibrosis // *Respir. Res.* BioMed Central Ltd., 2015. Vol. 16, № 1.
 313. Volckaert T. et al. Parabronchial smooth muscle constitutes an airway epithelial stem cell niche in the mouse lung after injury // *J. Clin. Invest.* 2011. Vol. 121, № 11. P. 4409–

- 4419.
314. Stevens N.C. et al. Metabolomics of Lung Microdissections Reveals Region- And Sex-Specific Metabolic Effects of Acute Naphthalene Exposure in Mice // *Toxicol. Sci.* Oxford Academic, 2021. Vol. 184, № 2. P. 214–222.
 315. Shimbori C. et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- β 1-induced lung fibrosis // *J. Pathol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 240, № 2. P. 197–210.
 316. Tanaka T. et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast // *Eur. Respir. J.* 2002. Vol. 20, № 2. P. 359–368.
 317. Biernacka A., Dobaczewski M., Frangogiannis N.G. TGF- β signaling in fibrosis // *Growth Factors.* 2011. Vol. 29, № 5. P. 196–202.
 318. Hagimoto N. et al. TGF- β 1 as an Enhancer of Fas-Mediated Apoptosis of Lung Epithelial Cells // *J. Immunol.* The American Association of Immunologists, 2002. Vol. 168, № 12. P. 6470–6478.
 319. Cucoranu I. et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor- β 1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts // *Circ. Res.* 2005. Vol. 97, № 9. P. 900–907.
 320. Gharaee-Kermani M. et al. Recent Advances in Molecular Targets and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Focus on TGF- β Signaling and the Myofibroblast // *Curr. Med. Chem.* Bentham Science Publishers Ltd., 2009. Vol. 16, № 11. P. 1400–1417.
 321. Cutroneo K.R. et al. Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF- β 1 induced collagen gene expression // *J. Cell. Physiol.* 2007. Vol. 211, № 3. P. 585–589.
 322. Epstein F.H., Border W.A., Noble N.A. Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis // *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society, 1994. Vol. 331, № 19. P. 1286–1292.
 323. Sime P.J. et al. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung // *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation, 1997. Vol. 100, № 4. P. 768–776.
 324. Sheppard D. Transforming growth factor β : A central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006. Vol. 3, № 5. P. 413–417.
 325. Gauldie J. et al. TGF- β , Smad3 and the process of progressive fibrosis // *Biochem. Soc. Trans.* Portland Press Ltd, 2007. Vol. 35, № 4. P. 661–664.
 326. Chambers R.C. et al. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1 // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 45. P. 35584–35591.
 327. Atamas S.P. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis // *Life Sci.* 2002. Vol. 72, №

6. P. 631–643.
328. Atamas S.P., White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma // *Cytokine Growth Factor Rev. Elsevier BV*, 2003. Vol. 14, № 6. P. 537–550.
329. Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: Role of TGF- β and CTGF // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2002. Vol. 14, № 6. P. 681–685.
330. Bonniaud P. et al. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003. Vol. 168, № 7. P. 770–778.
331. Kottmann R.M. et al. Determinants of initiation and progression of idiopathic pulmonary fibrosis // *Respirology.* 2009. Vol. 14, № 7. P. 917–933.
332. Re S. Lo et al. Platelet-derived growth factor-producing CD4 + foxp3 +regulatory T lymphocytes promote lung fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. Vol. 184, № 11. P. 1270–1281.
333. Osornio-Vargas A.R. et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA, -AB, and -BB induce differential chemotaxis of early-passage rat lung fibroblasts in vitro. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995. Vol. 12, № 1. P. 33–40.
334. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis // *Rheumatology.* 2009. Vol. 47, № SUPPL. 5. P. v2–v4.
335. Bonner J.C. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases // *Cytokine Growth Factor Rev. Elsevier BV*, 2004. Vol. 15, № 4. P. 255–273.
336. Abdollahi A. et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 201, № 6. P. 925–935.
337. Daniels C.E. et al. Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010. Vol. 181, № 6. P. 604–610.
338. Aono Y. et al. Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005. Vol. 171, № 11. P. 1279–1285.
339. Mio T. et al. Proliferative characteristics of fibroblast lines derived from open lung biopsy specimens of patients with IPF (UIP) // *Chest.* 1992. Vol. 102, № 3. P. 832–837.
340. Hetzel M. et al. Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts // *Lung.* 2005. Vol. 183, № 4. P. 225–237.
341. Bonner J.C. et al. Differential proliferation of rat lung fibroblasts induced by the platelet-derived growth factor-AA, -AB, and -BB isoforms secreted by rat alveolar macrophages. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991. Vol. 5, № 6. P. 539–547.
342. Hsu E., Feghali-Bostwick C.A. Insulin-like growth factor-II is increased in systemic

- sclerosis-associated pulmonary fibrosis and contributes to the fibrotic process via jun N-terminal kinase- and phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathways // *Am. J. Pathol. American Society for Investigative Pathology Inc.*, 2008. Vol. 172, № 6. P. 1580–1590.
343. Maeda A. et al. Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-I in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice // *Chest. American College of Chest Physicians*, 1996. Vol. 109, № 3. P. 780–786.
344. King T.E. et al. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial // *Lancet. Elsevier B.V.*, 2009. Vol. 374, № 9685. P. 222–228.
345. Raghu G. et al. A Placebo-Controlled Trial of Interferon Gamma-1b in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *N. Engl. J. Med. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*, 2004. Vol. 350, № 2. P. 125–133.
346. Kim J.H. et al. Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon- γ // *Am. J. Pathol. American Society for Investigative Pathology Inc.*, 2005. Vol. 167, № 5. P. 1231–1241.
347. Gurujeyalakshmi G., Giri S.N. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: Downregulation of TGF- β and procollagen I and III gene expression // *Exp. Lung Res. Informa Healthcare*, 1995. Vol. 21, № 5. P. 791–808.
348. Duncan M.R., Berman B. Γ Interferon Is the Lymphokine and B Interferon the Monokine Responsible for Inhibition of Fibroblast Collagen Production and Late But Not Early Fibroblast Proliferation // *J. Exp. Med.* 1985. Vol. 162, № 2. P. 516–527.
349. Wynn T.A. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm // *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group*, 2004. Vol. 4, № 8. P. 583–594.
350. Mozaffarian A. et al. Mechanisms of Oncostatin M-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis // *J. Immunol. The American Association of Immunologists*, 2008. Vol. 181, № 10. P. 7243–7253.
351. Langdon C. et al. Oncostatin M Regulates Eotaxin Expression in Fibroblasts and Eosinophilic Inflammation in C57BL/6 Mice // *J. Immunol. The American Association of Immunologists*, 2003. Vol. 170, № 1. P. 548–555.
352. Richards C.D. et al. Modulation of extracellular matrix using adenovirus vectors. // *Biochem. Soc. Trans.* 2002. Vol. 30, № 2. P. 107–111.
353. Ihn H., Tamaki K. Oncostatin M Stimulates the Growth of Dermal Fibroblasts Via a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Pathway // *J. Immunol. The American*

- Association of Immunologists, 2000. Vol. 165, № 4. P. 2149–2155.
354. Ihn H., LeRoy E.C., Trojanowska M. Oncostatin M stimulates transcription of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene via the Sp1/Sp3-binding site // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 39. P. 24666–24672.
 355. Scaffidi A.K. et al. Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts // *Br. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 136, № 5. P. 793–801.
 356. Schrier D.J., Phan S.H., McGarry B.M. The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation // *Am. Rev. Respir. Dis. American Lung Association*, 1983. Vol. 127, № 5. P. 614–617.
 357. Okazaki T. et al. Impairment of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in CD28-Deficient Mice // *J. Immunol. American Association of Immunologists*, 2001. Vol. 167, № 4. P. 1977–1981.
 358. Piguet P.F. et al. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis // *J. Exp. Med. The Rockefeller University Press*, 1989. Vol. 170, № 3. P. 655–663.
 359. Sharma S.K. et al. The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Public Health Association*, 1996. Vol. 154, № 1. P. 193–200.
 360. Maggi E. et al. Thymic regulatory T cells // *Autoimmun. Rev. Elsevier*, 2005. Vol. 4, № 8. P. 579–586.
 361. Daniil Z. et al. CD8+ T lymphocytes in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *Respir. Res. BioMed Central*, 2005. Vol. 6, № 1. P. 1–8.
 362. Parra E.R. et al. Inflammatory cell phenotyping of the pulmonary interstitium in idiopathic interstitial pneumonia // *Respiration. Karger Publishers*, 2007. Vol. 74, № 2. P. 159–169.
 363. Fireman E. et al. Predictive value of response to treatment of T-lymphocyte subpopulations in idiopathic pulmonary fibrosis // *Eur. Respir. J.* 1998. Vol. 11, № 3. P. 706–711.
 364. Marchal-Sommé J. et al. Cutting Edge: Nonproliferating Mature Immune Cells Form a Novel Type of Organized Lymphoid Structure in Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *J. Immunol. American Association of Immunologists*, 2006. Vol. 176, № 10. P. 5735–5739.
 365. Reynolds H.Y. Lung inflammation and fibrosis: An alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2005. Vol. 171, № 2. P. 98–102.
 366. Bocchino M. et al. Reactive oxygen species are required for maintenance and

- differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis // PLoS One. Public Library of Science, 2010. Vol. 5, № 11. P. e14003.
367. Kiemle-Kallee J. et al. Alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis display a more monocyte-like immunophenotype and an increased release of free oxygen radicals // Eur. Respir. J. 1991. Vol. 4, № 4. P. 400–406.
368. Schaberg T. et al. Increased number of alveolar macrophages expressing surface molecules of the CD11/CD18 family in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis is related to the production of superoxide anions by these cells // Am. Rev. Respir. Dis. American Lung Association, 1993. Vol. 147, № 6 I. P. 1507–1513.
369. Ye Q. et al. Decreased expression of haem oxygenase-1 by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis // Eur. Respir. J. European Respiratory Society, 2008. Vol. 31, № 5. P. 1030–1036.
370. Scotton C.J. et al. Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury // J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation, 2009. Vol. 119, № 9. P. 2550–2563.
371. Howell D.C.J. et al. Absence of proteinase-activated receptor-1 signaling affords protection from bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis // Am. J. Pathol. Elsevier, 2005. Vol. 166, № 5. P. 1353–1365.
372. Martinet Y. et al. Exaggerated Spontaneous Release of Platelet-Derived Growth Factor by Alveolar Macrophages from Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis // N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society, 1987. Vol. 317, № 4. P. 202–209.
373. Nagaoka I., Trapnell B.C., Crystal R.G. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis // J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation, 1990. Vol. 85, № 6. P. 2023–2027.
374. Zhang Y. et al. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. // J. Immunol. 1993. Vol. 150, № 9. P. 4188–4196.
375. Prasse A. et al. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18 // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006. Vol. 173, № 7. P. 781–792.
376. Migliaccio C.T. et al. The IL-4R α pathway in macrophages and its potential role in silica-induced pulmonary fibrosis // J. Leukoc. Biol. John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 83, № 3. P. 630–639.
377. Mora A.L. et al. Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in

- herpesvirus-induced lung fibrosis // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. Vol. 35, № 4. P. 466–473.
378. Murray L.A. et al. TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P // *Int. J. Biochem. Cell Biol. Int J Biochem Cell Biol*, 2011. Vol. 43, № 1. P. 154–162.
379. Murray L.A. et al. Serum amyloid P therapeutically attenuates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis via its effects on macrophages // *PLoS One. PLoS One*, 2010. Vol. 5, № 3. P. e9683–e9683.
380. Shum A.K. et al. BPIFB1 is a lung-specific autoantigen associated with interstitial lung disease // *Sci. Transl. Med. American Association for the Advancement of Science*, 2013. Vol. 5, № 206.
381. Jongerius I. et al. The Role of Complement in Transfusion-Related Acute Lung Injury // *Transfus. Med. Rev. W.B. Saunders*, 2019. Vol. 33, № 4. P. 236–242.
382. Lin S. et al. Regulatory T cells and acute lung injury: Cytokines, uncontrolled inflammation, and therapeutic implications // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, 2018. Vol. 9, № JUL. P. 1545.
383. Bartz R.R., Piantadosi C.A. Clinical review: Oxygen as a signaling molecule // *Crit. Care. BioMed Central*, 2010. Vol. 14, № 5. P. 234.
384. Richter K. et al. Redox-fibrosis: Impact of TGFβ1 on ROS generators, mediators and functional consequences // *Redox Biol. Elsevier*, 2015. Vol. 6. P. 344–352.
385. Kinnula V.L., Crapo J.D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. Am J Respir Crit Care Med*, 2003. Vol. 167, № 12. P. 1600–1619.
386. Gonzalez-Gonzalez F.J. et al. Reactive oxygen species as signaling molecules in the development of lung fibrosis // *Transl. Res. Mosby*, 2017. Vol. 190. P. 61–68.
387. Thannickal V.J. et al. Fibrosis: Ultimate and proximate causes // *Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation*, 2014. Vol. 124, № 11. P. 4673–4677.
388. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis // *Journal of Pathology. John Wiley & Sons, Ltd*, 2008. Vol. 214, № 2. P. 199–210.
389. Djudjaj S., Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis // *Mol. Aspects Med. Pergamon*, 2019. Vol. 65. P. 16–36.
390. Iwaisako K. et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2014. Vol. 111, № 32.
391. Kisseleva T., Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its

- regression // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2020 183. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 18, № 3. P. 151–166.
392. Ebrahimi H., Naderian M., Sohrabpour A.A. New Concepts on Reversibility and Targeting of Liver Fibrosis; A Review Article // *Middle East J. Dig. Dis. Iranian Society of Gastroenterology and Hepatology*, 2018. Vol. 10, № 3. P. 133–148.
393. McAnulty R.J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol. Pergamon*, 2007. Vol. 39, № 4. P. 666–671.
394. Park W.Y. et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society* New York, NY, 2001. Vol. 164, № 10 I. P. 1896–1903.
395. Berthiaume Y., Matthay M.A. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury // *Respir. Physiol. Neurobiol. Elsevier*, 2007. Vol. 159, № 3. P. 350–359.
396. Mikacenic C. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia // *Crit. Care. BioMed Central Ltd.*, 2018. Vol. 22, № 1. P. 1–8.
397. Domscheit H. et al. Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents // *Front. Physiol. Frontiers Media S.A.*, 2020. Vol. 11.
398. Nova Z., Skovierova H., Calkovska A. Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury // *Int. J. Mol. Sci. MDPI AG*, 2019. Vol. 20, № 4.
399. Zhou H. et al. Ferroptosis was involved in the oleic acid-induced acute lung injury in mice // *Sheng Li Xue Bao. NLM (Medline)*, 2019. Vol. 71, № 5. P. 689–697.
400. Yu P.J. et al. Praeruptorin D and e attenuate lipopolysaccharide/hydrochloric acid induced acute lung injury in mice // *Eur. J. Pharmacol. Elsevier*, 2013. Vol. 710, № 1–3. P. 39–48.
401. Amarelle L. et al. Hyperoxia and Lungs: What We Have Learned From Animal Models // *Front. Med. Frontiers Media S.A.*, 2021. Vol. 8. P. 235.
402. Nosaka N. et al. Autophagy Protects Against Developing Increased Lung Permeability and Hypoxemia by Down Regulating Inflammasome Activity and IL-1 β in LPS Plus Mechanical Ventilation-Induced Acute Lung Injury // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, 2020. Vol. 11. P. 207.
403. Jiang K. et al. Barbaloin protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by inhibiting the ROS-mediated PI3K/AKT/NF- κ B pathway // *Int. Immunopharmacol. Elsevier B.V.*, 2018. Vol. 64. P. 140–150.
404. Soromou L.W. et al. Astragaloside attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF- κ B signaling pathway // *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun. Academic Press, 2012. Vol. 419, № 2. P. 256–261.
405. Zhang B. et al. Antiinflammatory effects of matrine in LPS-induced acute lung injury in mice // *Eur. J. Pharm. Sci.* Elsevier, 2011. Vol. 44, № 5. P. 573–579.
406. Ye R., Liu Z. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway // *Exp. Mol. Pathol.* Academic Press, 2020. Vol. 113. P. 104350.
407. Tapping R.I. et al. Toll-Like Receptor 4, But Not Toll-Like Receptor 2, Is a Signaling Receptor for Escherichia and Salmonella Lipopolysaccharides // *J. Immunol. J Immunol*, 2000. Vol. 165, № 10. P. 5780–5787.
408. Al-Ani B. et al. Lipopolysaccharide induces acute lung injury and alveolar haemorrhage in association with the cytokine storm, coagulopathy and AT1R/JAK/STAT augmentation in a rat model that mimics moderate and severe Covid-19 pathology // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2022. Vol. 49, № 4. P. 483–491.
409. Memar M.Y. et al. Hyperbaric oxygen therapy: Antimicrobial mechanisms and clinical application for infections // *Biomed. Pharmacother.* Elsevier Masson, 2019. Vol. 109. P. 440–447.
410. Aggarwal N.R. et al. Oxygen Exposure Resulting in Arterial Oxygen Tensions Above the Protocol Goal Was Associated With Worse Clinical Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome // *Crit. Care Med.* NIH Public Access, 2018. Vol. 46, № 4. P. 517–524.
411. Zhang L. et al. Intermittent hyperbaric oxygen exposure mobilizing peroxiredoxin 6 to prevent oxygen toxicity // *J. Physiol. Sci.* Springer Tokyo, 2019. Vol. 69, № 5. P. 779–790.
412. Schuster D.P. ARDS: Clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. Vol. 149, № 1. P. 245–260.
413. Derks C.M., Jacobovitz Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid: a systematic morphologic study // *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology, 1977. Vol. 87, № 1. P. 143–158.
414. Ulrich K. et al. Keratinocyte growth factor therapy in murine oleic acid-induced acute lung injury // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 2005. Vol. 288, № 6 32-6. P. 1179–1192.
415. Gonçalves-De-Albuquerque C.F. et al. Acute respiratory distress syndrome: Role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation // *Mediators Inflamm.* Hindawi Publishing Corporation, 2015. Vol. 2015.

416. Glasbey J.C. et al. Timing of nasogastric tube insertion and the risk of postoperative pneumonia: an international, prospective cohort study // *Color. Dis.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 22, № 12. P. 2288–2297.
417. Suresh M. V. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -induced regulation of lung injury in pulmonary aspiration is mediated through NF- κ B // *FASEB BioAdvances.* Wiley-Blackwell, 2022. Vol. 4, № 5. P. 309.
418. Puri G., Naura A.S. Critical role of mitochondrial oxidative stress in acid aspiration induced ALI in mice // *Toxicol. Mech. Methods.* Taylor & Francis, 2020. Vol. 30, № 4. P. 266–274.
419. Yano T. et al. Keratinocyte Growth Factor Reduces Lung Damage Due to Acid Instillation in Rats // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Public Health Association, 1996. Vol. 15, № 4. P. 433–442.
420. Folkesson H.G. et al. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms // *J. Clin. Invest.* J Clin Invest, 1995. Vol. 96, № 1. P. 107–116.
421. Dreyfuss D., Saumon G. Ventilator-induced lung injury: Lessons from experimental studies // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society New York, NY, 1998. Vol. 157, № 1. P. 294–323.
422. Dos Santos C.C., Slutsky A.S. Invited review: Mechanisms of ventilator-induced lung injury: A perspective // *J. Appl. Physiol.* American Physiological Society, 2000. Vol. 89, № 4. P. 1645–1656.
423. Network T.A.R.D.S. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome // *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society, 2000. Vol. 342, № 18. P. 1301–1308.
424. Wolthius E.K. Lung protective mechanical ventilation // *Lung protective mechanical ventilation.* Amsterdam: UvA-DARE (Digital Academic Repository), 2008. P. 86–94.
425. Wang H.M. et al. Ventilator-associated lung injury superposed to oleic acid infusion or surfactant depletion: Histopathological characteristics of two porcine models of acute lung injury // *Eur. Surg. Res.* Karger Publishers, 2010. Vol. 45, № 3–4. P. 121–133.
426. Huang H., Kamm R.D., Lee R.T. Cell mechanics and mechanotransduction: Pathways, probes, and physiology // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* American Physiological Society, 2004. Vol. 287, № 1 56-1. P. 1–11.
427. Xiao R., Chen R. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a potential novel biomarker for ventilator-associated lung injury // *Mol. Med. Rep.* Spandidos Publications, 2017. Vol.

- 15, № 6. P. 3535–3540.
428. Kuiper J.W. et al. High tidal volume mechanical ventilation-induced lung injury in rats is greater after acid instillation than after sepsis-induced acute lung injury, but does not increase systemic inflammation: An experimental study // *BMC Anesthesiol. BioMed Central*, 2011. Vol. 11, № 1. P. 1–10.
429. Azman S. et al. Traditional Medicinal Plants Conferring Protection Against Ovalbumin-Induced Asthma in Experimental Animals: A Review // *J. Asthma Allergy. Dove Press*, 2021. Vol. 14. P. 641–662.
430. Casaro M. et al. OVA-Induced Allergic Airway Inflammation Mouse Model // *Methods in Molecular Biology. Methods Mol Biol*, 2019. Vol. 1916. P. 297–301.
431. Won J. et al. Inhaled delivery of Interferon-lambda restricts epithelial-derived Th2 inflammation in allergic asthma // *Cytokine. Elsevier*, 2019. Vol. 119, № November 2018. P. 32–36.
432. Shin Y.S., Takeda K., Gelfand E.W. Understanding asthma using animal models // *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 2009. Vol. 1, № 1. P. 10–18.
433. Alper S., Janssen W.J., Gorska M.M. Mouse Models of Asthma // *Methods Mol. Biol. Humana Press, New York, NY*, 2018. Vol. 1809. P. 351–362.
434. Degryse A.L., Lawson W.E. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Med. Sci. Elsevier*, 2011. Vol. 341, № 6. P. 444–449.
435. Brandt J., Gerrites V. Bleomycin // *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier Inc.*, 2007. P. 1–6.
436. Moeller A. et al. The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? // *Int. J. Biochem. Cell Biol. Pergamon*, 2008. Vol. 40, № 3. P. 362–382.
437. El-Bassouny D.R. et al. Role of nuclear factor-kappa B in bleomycin induced pulmonary fibrosis and the probable alleviating role of ginsenoside: histological, immunohistochemical, and biochemical study // *Anat. Cell Biol. Korean Association of Anatomists*, 2021. Vol. 54, № 4. P. 448–464.
438. Liu T., De Los Santos F.G., Phan S.H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis // *Methods Mol. Biol. / ed. Rittié L. Humana Press Inc.*, 2017. Vol. 1627. P. 27–42.
439. Matute-Bello G., Frevert C.W., Martin T.R. Animal models of acute lung injury // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. American Physiological Society*, 2008. Vol. 295, № 3. P. 379–399.
440. McDonald S. et al. Pulmonary changes induced by combined mouse β -interferon (rMuIFN- β) and irradiation in normal mice - toxic versus protective effects // *Radiother.*

- Oncol. Elsevier, 1993. Vol. 26, № 3. P. 212–218.
441. Wang J. et al. Metformin Attenuates Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis in a Murine Model // *Radiat. Res.* Allen Press, 2017. Vol. 188, № 1. P. 105–113.
442. Li W. et al. Effects of phycocyanin on pulmonary and gut microbiota in a radiation-induced pulmonary fibrosis model // *Biomed. Pharmacother.* Elsevier Masson, 2020. Vol. 132. P. 110826.
443. Andersson-Sjöland A. et al. Fibrocytes and the tissue niche in lung repair // *Respir. Res.* BioMed Central Ltd., 2011. Vol. 12, № 1. P. 1–7.
444. Groves A.M. et al. Role of Infiltrating Monocytes in the Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis // *Radiat. Res.* Radiation Research Society, 2018. Vol. 189, № 3. P. 300–311.
445. Ghobadi G. et al. Lung irradiation induces pulmonary vascular remodelling resembling pulmonary arterial hypertension // *Thorax.* BMJ Publishing Group Ltd, 2012. Vol. 67, № 4. P. 334–341.
446. Weber K. et al. Aerosols of synthetic amorphous silica do not induce fibrosis in lungs after inhalation: Pathology working group review of histopathological specimens from a subchronic 13-week inhalation toxicity study in rats // *Toxicol. Res. Appl.* SAGE PublicationsSage UK: London, England, 2018. Vol. 2. P. 239784731880527.
447. Wu Q. et al. miR-138 inhibits epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by regulating ZEB2 // *Toxicology.* Elsevier, 2021. Vol. 461. P. 152925.
448. Karkale S. et al. Oropharyngeal administration of silica in Swiss mice: A robust and reproducible model of occupational pulmonary fibrosis // *Pulm. Pharmacol. Ther.* Academic Press, 2018. Vol. 51. P. 32–40.
449. Li C. et al. Dioscin exerts protective effects against crystalline silica-induced pulmonary fibrosis in mice // *Theranostics.* Ivyspring International Publisher, 2017. Vol. 7, № 17. P. 4255–4275.
450. Barbarin V. et al. The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis // *Respir. Res.* BioMed Central, 2005. Vol. 6, № 1. P. 1–13.
451. Moore B.B. et al. Animal models of fibrotic lung disease // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2013. Vol. 49, № 2. P. 167–179.
452. RIGGS J.L. et al. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum // *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology, 1958. Vol. 34, № 6. P. 1081–1097.
453. Roberts S.N. et al. A novel model for human interstitial lung disease: Hapten-driven lung

- fibrosis in rodents // *J. Pathol.* John Wiley & Sons, Ltd, 1995. Vol. 176, № 3. P. 309–318.
454. Moore B.B., Hogaboam C.M. Murine models of pulmonary fibrosis // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 2008. Vol. 294, № 2. P. 152–160.
455. Bevelander M. et al. Nitrogen Dioxide Promotes Allergic Sensitization to Inhaled Antigen // *J. Immunol.* J Immunol, 2007. Vol. 179, № 6. P. 3680–3688.
456. Fattouh R. et al. House dust mite facilitates ovalbumin-specific allergic sensitization and airway inflammation // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Am J Respir Crit Care Med, 2005. Vol. 172, № 3. P. 314–321.
457. Haczku A. et al. The late asthmatic response is linked with increased surface tension and reduced surfactant protein B in mice // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 2002. Vol. 283, № 4 27-4.
458. James A.L., Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases // *Eur. Respir. J.* Eur Respir J, 2007. Vol. 30, № 1. P. 134–155.
459. Bates J.H.T. et al. The synergistic interactions of allergic lung inflammation and intratracheal cationic protein // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Am J Respir Crit Care Med, 2008. Vol. 177, № 3. P. 261–268.
460. Harrison J.H., Lazo J.S. Plasma and pulmonary pharmacokinetics of bleomycin in murine strains that are sensitive and resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988. Vol. 247, № 3. P. 1052–1058.
461. Piguet P.F. et al. Resistance of TNF/LT α double deficient mice to bleomycin-induced fibrosis // *Int. J. Exp. Pathol.* John Wiley & Sons, Ltd, 1997. Vol. 78, № 1. P. 43–48.
462. Hattori N. et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice // *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation, 2000. Vol. 106, № 11. P. 1341–1350.
463. Annes J.P., Rifkin D.B., Munger J.S. The integrin α V β 6 binds and activates latent TGF β 3 // *FEBS Lett.* No longer published by Elsevier, 2002. Vol. 511, № 1–3. P. 65–68.
464. Strandjord T.P. et al. Collagen accumulation is decreased in SPARC-null mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 1999. Vol. 277, № 3 21-3.
465. Betsuyaku T. et al. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2000. Vol. 157, № 2. P. 525–535.
466. Cross L.J.M., Matthay M.A. Biomarkers in Acute Lung Injury: Insights into the Pathogenesis of Acute Lung Injury // *Crit. Care Clin.* Elsevier, 2011. Vol. 27, № 2. P. 355–377.
467. Spadaro S. et al. Biomarkers for Acute Respiratory Distress syndrome and prospects for

- personalised medicine // *J. Inflamm. (United Kingdom)*. BioMed Central Ltd., 2019. Vol. 16, № 1. P. 1–11.
468. Rowaiye A.B. et al. Attenuating the effects of novel COVID-19 (SARS-CoV-2) infection-induced cytokine storm and the implications // *J. Inflamm. Res.* Dove Press, 2021. Vol. 14. P. 1487–1510.
469. Ramirez J.A. et al. Adults Hospitalized with Pneumonia in the United States: Incidence, Epidemiology, and Mortality // *Clin. Infect. Dis.* Oxford Academic, 2017. Vol. 65, № 11. P. 1806–1812.
470. Storms A.D. et al. Rates and risk factors associated with hospitalization for pneumonia with ICU admission among adults // *BMC Pulm. Med.* BioMed Central, 2017. Vol. 17, № 1.
471. Bellani G. et al. The LUNG SAFE study: A presentation of the prevalence of ARDS according to the Berlin Definition! // *Crit. Care.* BioMed Central, 2016. Vol. 20, № 1.
472. Martínez R. et al. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia // *Eur. Respir. J.* European Respiratory Society, 2011. Vol. 37, № 2. P. 393–399.
473. Calfee C.S. et al. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: Latent class analysis of data from two randomised controlled trials // *Lancet Respir. Med.* NIH Public Access, 2014. Vol. 2, № 8. P. 611–620.
474. Calfee C.S. et al. Distinct molecular phenotypes of direct vs indirect ARDS in single-center and multicenter studies // *Chest.* Elsevier, 2015. Vol. 147, № 6. P. 1539–1548.
475. Fergeson J.E., Patel S.S., Lockey R.F. Acute asthma, prognosis, and treatment // *J. Allergy Clin. Immunol.* Mosby, 2017. Vol. 139, № 2. P. 438–447.
476. Shieh J.-M. et al. Elevation of IL-6 and IL-33 Levels in Serum Associated with Lung Fibrosis and Skeletal Muscle Wasting in a Bleomycin-Induced Lung Injury Mouse Model // *Mediators Inflamm.* Hindawi Limited, 2019. P. 1–12.
477. Papiris S.A. et al. High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations // *Cytokine.* Academic Press, 2018. Vol. 102. P. 168–172.
478. Santa Cruz A. et al. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia // *Front. Immunol.* Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 12. P. 263.
479. Horspool A.M. et al. Interplay of Antibody and Cytokine Production Reveals CXCL13 as a Potential Novel Biomarker of Lethal SARS-CoV-2 Infection // *mSphere.* American Society for Microbiology, 2021. Vol. 6, № 1.
480. Perreau M. et al. The cytokines HGF and CXCL13 predict the severity and the mortality

- in COVID-19 patients // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2021. Vol. 12, № 1. P. 1–10.
481. Parsons P.E. et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury // *Crit. Care Med.* 2005. Vol. 33, № 1. P. 1–6.
482. Dolinay T. et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2012. Vol. 185, № 11. P. 1225–1234.
483. Lee Y.L. et al. Systemic and bronchoalveolar cytokines as predictors of in-hospital mortality in severe community-acquired pneumonia // *J. Crit. Care.* W.B. Saunders, 2010. Vol. 25, № 1. P. 176.e7-176.e13.
484. Tong M. et al. Serum surfactant protein D in COVID-19 is elevated and correlated with disease severity // *BMC Infect. Dis.* BioMed Central Ltd, 2021. Vol. 21, № 1. P. 1–7.
485. Naderi N., Rahimzadeh M. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) as a clinical marker for severe COVID-19: A systematic review and meta-analyses // *Virology.* Academic Press, 2022. Vol. 566. P. 106–113.
486. Thickett D.R., Armstrong L., Millar A.B. A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2002. Vol. 166, № 10. P. 1332–1337.
487. Kong Y. et al. VEGF-D: A novel biomarker for detection of COVID-19 progression // *Crit. Care.* BioMed Central Ltd., 2020. Vol. 24, № 1. P. 1–4.
488. Stern J.-B. et al. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are // *Crit. Care Med.* 2000. Vol. 28, № 7. P. 2326–2333.
489. Agrawal A. et al. Pathogenetic and predictive value of biomarkers in patients with ALI and lower severity of illness: Results from two clinical trials // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society Bethesda, MD, 2012. Vol. 303, № 8. P. 634–639.
490. Monteiro A.C.C. et al. Thrombomodulin is associated with increased mortality and organ failure in mechanically ventilated children with acute respiratory failure: biomarker analysis from a multicenter randomized controlled trial // *Crit. Care.* BioMed Central Ltd, 2021. Vol. 25, № 1. P. 1–9.
491. Chandel N.S. et al. Keratinocyte growth factor expression is suppressed in early acute lung injury/acute respiratory distress syndrome by smad and c-Abl pathways // *Crit. Care Med.* Lippincott Williams and Wilkins, 2009. Vol. 37, № 5. P. 1678–1684.
492. Brunetta E. et al. Macrophage expression and prognostic significance of the long

- pentraxin PTX3 in COVID-19 // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2021. Vol. 22, № 1. P. 19–24.
493. Hästbacka J. et al. Serum MMP-8 and TIMP-1 in critically ill patients with acute respiratory failure: TIMP-1 is associated with increased 90-day mortality // *Anesth. Analg.* Lippincott Williams and Wilkins, 2014. Vol. 118, № 4. P. 790–798.
494. Zeng H.L. et al. Proteomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in critical COVID-19 patients // *FEBS J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 288, № 17. P. 5190–5200.
495. da Silva-Neto P. V. et al. Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress // *Biomolecules.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 12, № 5. P. 604.
496. Van Oort P.M. et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor for the prediction of ventilator-associated pneumonia // *ERJ Open Res.* European Respiratory Society, 2019. Vol. 5, № 1.
497. Conrad C. et al. ADAM8 signaling drives neutrophil migration and ARDS severity // *JCI Insight.* American Society for Clinical Investigation, 2022. Vol. 7, № 3.
498. Ohshimo S. et al. Baseline KL-6 predicts increased risk for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis // *Respir. Med.* W.B. Saunders, 2014. Vol. 108, № 7. P. 1031–1039.
499. Yoshikawa T. et al. Surfactant protein A as a biomarker of outcomes of anti-fibrotic drug therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *BMC Pulm. Med.* BioMed Central, 2020. Vol. 20, № 1. P. 1–11.
500. Hasegawa M. et al. Use of serum Clara cell 16-kDa (CC16) Levels as a potential indicator of active pulmonary fibrosis in systemic sclerosis // *J. Rheumatol.* The Journal of Rheumatology, 2011. Vol. 38, № 5. P. 877–884.
501. Rosas I.O. et al. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis // *PLoS Med.* Public Library of Science, 2008. Vol. 5, № 4. P. 0623–0633.
502. Bauer Y. et al. MMP-7 is a predictive biomarker of disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *ERJ Open Res.* European Respiratory Society, 2017. Vol. 3, № 1.
503. Todd J.L. et al. Circulating matrix metalloproteinases and tissue metalloproteinase inhibitors in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in the multicenter IPF-PRO Registry cohort // *BMC Pulm. Med.* BioMed Central Ltd., 2020. Vol. 20, № 1. P. 1–12.

504. Ge J. et al. Association of ADAM17 Expression Levels in Patients with Interstitial Lung Disease // *Immunol. Invest.* Taylor & Francis, 2020. Vol. 49, № 1–2. P. 134–145.
505. Tajiri M. et al. Serum level of periostin can predict long-term outcome of idiopathic pulmonary fibrosis // *Respir. Investig.* Elsevier, 2015. Vol. 53, № 2. P. 73–81.
506. Fujiwara A. et al. Correlation between circulating fibrocytes, and activity and progression of interstitial lung diseases // *Respirology.* John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 17, № 4. P. 693–698.
507. Odackal J. et al. Circulating fibrocytes as prognostic biomarkers of autoimmune interstitial lung disease // *ERJ Open Res.* European Respiratory Society, 2020. Vol. 6, № 4. P. 00481–02020.
508. Gui X. et al. Prognostic Value of Serum Osteopontin in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Biomed Res. Int.* Hindawi Limited, 2020. Vol. 2020.
509. Vadasz Z. et al. Lysyl oxidase-a possible role in systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension: A multicentre study // *Rheumatol. (United Kingdom).* Oxford Academic, 2019. Vol. 58, № 9. P. 1547–1555.
510. Guiot J. et al. Raised serum levels of IGFBP-1 and IGFBP-2 in idiopathic pulmonary fibrosis // *BMC Pulm. Med.* BioMed Central Ltd., 2016. Vol. 16, № 1. P. 1–7.
511. Guiot J. et al. Serum IGFBP-2 in systemic sclerosis as a prognostic factor of lung dysfunction // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–10.
512. Silva E.M. et al. High systemic IL-6 is associated with worse prognosis in patients with non-small cell lung cancer // *PLoS One.* Public Library of Science, 2017. Vol. 12, № 7. P. e0181125.
513. Adegunsoye A. et al. Circulating Plasma Biomarkers of Survival in Antifibrotic-Treated Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Chest.* Elsevier, 2020. Vol. 158, № 4. P. 1526–1534.
514. Bhargava M., Wendt C.H. Biomarkers in acute lung injury // *Transl. Res.* Mosby, 2012. Vol. 159, № 4. P. 205–217.
515. Jalkanen V. et al. SuPAR and PAI-1 in critically ill, mechanically ventilated patients // *Intensive Care Med.* Springer, 2013. Vol. 39, № 3. P. 489–496.
516. González-López A., Albaiceta G.M. Repair after acute lung injury: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities // *Crit. Care.* BioMed Central Ltd., 2012. Vol. 16, № 2. P. 1–7.
517. Singh K.P. et al. Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries // *ERJ Open Res.* European Respiratory Society, 2019. Vol. 5, № 4. P. 00182–02019.

518. Zhang Y. et al. Elevated plasma level of Pentraxin 3 is associated with emphysema and mortality in smokers // *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd, 2021. Vol. 76, № 4. P. 335–342.
519. D’Alonzo D., De Fenza M., Pavone V. COVID-19 and pneumonia: a role for the uPA/uPAR system // *Drug Discov. Today*. Elsevier Current Trends, 2020. Vol. 25, № 8. P. 1528–1534.
520. Salisbury M.L. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Gender-age-physiology index stage for predicting future lung function decline // *Chest*. Elsevier, 2016. Vol. 149, № 2. P. 491–498.
521. Ray P. et al. Statistical Evaluation of a Biomarker // *Anesthesiology*. American Society of Anesthesiologists, 2010. Vol. 112, № 4. P. 1023–1040.
522. Kohno N. et al. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6 // *Chest*. Elsevier, 1989. Vol. 96, № 1. P. 68–73.
523. Aloisio E. et al. Prognostic role of Krebs von den Lungen-6 (KL-6) measurement in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis // *Clin. Chem. Lab. Med.* De Gruyter Open Ltd, 2021. Vol. 59, № 8. P. 1400–1408.
524. Ishii H. et al. High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia // *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd, 2003. Vol. 58, № 1. P. 52–57.
525. Hant F.N. et al. Surfactant protein D and KL-6 as serum biomarkers of interstitial lung disease in patients with scleroderma // *J. Rheumatol. The Journal of Rheumatology*, 2009. Vol. 36, № 4. P. 773–780.
526. Singh G., Katyal S.L. Clara Cells and Clara Cell 10 kD Protein (CC10) // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society New York, NY, 1997. Vol. 17, № 2. P. 141–143.
527. Olewicz-Gawlik A. et al. Serum Clara cell 16-kDa protein levels and lung impairment in systemic sclerosis patients // *Rev. Bras. Reumatol. Sociedade Brasileira de Reumatologia*, 2016. Vol. 56, № 4. P. 309–313.
528. Jessen H. et al. Turnover of type I and III collagen predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis // *Respir. Res.* BioMed Central Ltd, 2021. Vol. 22, № 1. P. 1–8.
529. Zhong S., Khalil R.A. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease // *Biochem. Pharmacol.* Elsevier, 2019. Vol. 164. P. 188–204.
530. Vetrone S.A. et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β // *J. Clin. Invest.* American

- Society for Clinical Investigation, 2009. Vol. 119, № 6. P. 1583–1594.
531. Conway S.J. et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease // *Cell. Mol. Life Sci.* Springer, 2014. Vol. 71, № 7. P. 1279–1288.
532. Okamoto M. et al. Ability of Periostin as a New Biomarker of Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, 2019. Vol. 1132. P. 79–87.
533. Lamort A.S. et al. Osteopontin as a Link between Inflammation and Cancer: The Thorax in the Spotlight // *Cells* 2019, Vol. 8, Page 815. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 8, № 8. P. 815.
534. Chopra V. et al. Lysyl Oxidase Like-2 (LOXL2): An Emerging Oncology Target // *Adv. Ther.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 3, № 2. P. 1900119.
535. Kumar P. et al. Periostin promotes liver fibrogenesis by activating lysyl oxidase in hepatic stellate cells // *J. Biol. Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2018. Vol. 293, № 33. P. 12781–12792.
536. Jones J.I., Clemmons D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions // *Endocr. Rev.* Oxford Academic, 1995. Vol. 16, № 1. P. 3–34.
537. Ruan W., Ying K. Abnormal expression of IGF-binding proteins, an initiating event in idiopathic pulmonary fibrosis? // *Pathol. - Res. Pract.* Urban & Fischer, 2010. Vol. 206, № 8. P. 537–543.
538. Oku H. et al. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis // *Eur. J. Pharmacol.* Elsevier, 2008. Vol. 590, № 1–3. P. 400–408.
539. Azuma A. et al. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Am J Respir Crit Care Med, 2005. Vol. 171, № 9. P. 1040–1047.
540. King T.E. et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *N. Engl. J. Med.* New England Journal of Medicine (NEJM/MMS), 2014. Vol. 370, № 22. P. 2083–2092.
541. Wollin L. et al. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the Tyrosine Kinase inhibitor Nintedanib in Experimental Models Of Lung Fibrosiss // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, 2014. Vol. 349, № 2. P. 209–220.
542. Hilberg F. et al. BIBF 1120: Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68, № 12. P. 4774–4782.
543. Richeldi L. et al. Efficacy of a Tyrosine Kinase Inhibitor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

- // N. Engl. J. Med. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS), 2011. Vol. 365, № 12. P. 1079–1087.
544. Richeldi L. et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis // N. Engl. J. Med. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS), 2014. Vol. 370, № 22. P. 2071–2082.
545. Pilling D. et al. Inhibition of Fibrocyte Differentiation by Serum Amyloid P // J. Immunol. American Association of Immunologists, 2003. Vol. 171, № 10. P. 5537–5546.
546. Pilling D. et al. Reduction of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by Serum Amyloid P // J. Immunol. American Association of Immunologists, 2007. Vol. 179, № 6. P. 4035–4044.
547. Raghu G. et al. Effect of recombinant human pentraxin 2 vs placebo on change in forced vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis a randomized clinical trial // JAMA - J. Am. Med. Assoc. American Medical Association, 2018. Vol. 319, № 22. P. 2299–2307.
548. Kono M. et al. Plasma CCN2 (connective tissue growth factor; CTGF) is a potential biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) // Clin. Chim. Acta. 2011. Vol. 412, № 23–24. P. 2211–2215.
549. Bonniaud P. et al. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in “fibrosis-resistant” Balb/c mouse lungs // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004. Vol. 31, № 5. P. 510–516.
550. Wang X. et al. A novel single-chain-Fv antibody against connective tissue growth factor attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice // Respirology. 2011. Vol. 16, № 3. P. 500–507.
551. Gorina E. et al. PRAISE, a randomized, placebo-controlled, double-blind Phase 2 clinical trial of pamrevlumab (FG-3019) in IPF patients // Eur. Respir. J. European Respiratory Society, 2017. Vol. 50, № suppl 61. P. OA3400.
552. Gagnon L. et al. A Newly Discovered Antifibrotic Pathway Regulated by Two Fatty Acid Receptors: GPR40 and GPR84 // Am. J. Pathol. Elsevier Inc., 2018. Vol. 188, № 5. P. 1132–1148.
553. Kolilekas L., Papiris S., Bouros D. Existing and emerging treatments for idiopathic pulmonary fibrosis // Expert Review of Respiratory Medicine. Taylor & Francis, 2019. Vol. 13, № 3. P. 229–239.
554. Aoki J., Inoue A., Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids. 2008. Vol. 1781, № 9. P. 513–518.
555. Montesi S.B. et al. Docosatetraenoyl LPA is elevated in exhaled breath condensate in

- idiopathic pulmonary fibrosis // *BMC Pulm. Med.* BMC Pulm Med, 2014. Vol. 14, № 1. P. 5.
556. Maher T.M. et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of GLPG1690, a novel autotaxin inhibitor, to treat idiopathic pulmonary fibrosis (FLORA): a phase 2a randomised placebo-controlled trial // *Lancet Respir. Med.* Elsevier, 2018. Vol. 6, № 8. P. 627–635.
557. Ruigrok M.J.R. et al. Gene therapy strategies for idiopathic pulmonary fibrosis: recent advances, current challenges, and future directions // *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* Cell Press, 2021. Vol. 20. P. 483–496.
558. Prelich G. Gene overexpression: Uses, mechanisms, and interpretation // *Genetics.* Oxford University Press, 2012. Vol. 190, № 3. P. 841–854.
559. Epperly M.W. et al. Intratracheal injection of adenovirus containing the human MnSOD transgene protects athymic nude mice from irradiation-induced organizing alveolitis // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1999. Vol. 43, № 1. P. 169–181.
560. Epperly M.W. et al. Magnesium superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposome pulmonary radioprotective gene therapy: Modulation of irradiation-induced mRNA for IL-1, TNF- α , and TGF- β correlates with delay of organizing alveolitis/fibrosis // *Biol. Blood Marrow Transplant.* Carden Jennings Publishing Co. Ltd, 1999. Vol. 5, № 4. P. 204–214.
561. Nakao A. et al. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice // *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation, 1999. Vol. 104, № 1. P. 5–11.
562. de Ceuninck van Capelle C., Spit M., ten Dijke P. Current perspectives on inhibitory SMAD7 in health and disease // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* Taylor & Francis, 2020. Vol. 55, № 6. P. 691–715.
563. Sisson T.H. et al. Treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by transfer of urokinase-type plasminogen activator genes // *Hum. Gene Ther.* 1999. Vol. 10, № 14. P. 2315–2323.
564. Povedano J.M. et al. Therapeutic effects of telomerase in mice with pulmonary fibrosis induced by damage to the lungs and short telomeres // *Elife.* eLife Sciences Publications, Ltd, 2018. Vol. 7.
565. Fichtner-Feigl S. et al. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis // *Nat. Med.* 2006. Vol. 12, № 1. P. 99–106.
566. Hou J. et al. Co-delivery of siPTPN13 and siNOX4 via (myo)fibroblasttargeting polymeric micelles for idiopathic pulmonary fibrosis therapy // *Theranostics.* Ivyspring International Publisher, 2021. Vol. 11, № 7. P. 3244–3261.

567. Zhao J. et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* American Physiological Society, 2002. Vol. 282, № 3 26-3. P. 585–593.
568. Dong X.-S. et al. Effects of RNA interference-induced Smad3 gene silencing on pulmonary fibrosis caused by paraquat in mice // *Exp. Biol. Med.* 2012. Vol. 237, № 5. P. 548–555.
569. Garbuzenko O.B. et al. Combinatorial treatment of idiopathic pulmonary fibrosis using nanoparticles with prostaglandin E and siRNA(s) // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* Elsevier Inc., 2017. Vol. 13, № 6. P. 1983–1992.
570. Rose-John S., Winthrop K., Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017. Vol. 13, № 7. P. 399–409.
571. Coomes E.A., Haghbayan H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis // *Rev. Med. Virol.* John Wiley and Sons Ltd, 2020. Vol. 30, № 6. P. 1–9.
572. Gschwandtner M., Derler R., Midwood K.S. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis // *Front. Immunol.* Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10. P. 2759.
573. Bekele Feyissa Y. et al. The Role of CXCL13 in Antibody Responses to HIV-1 Infection and Vaccination // *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 12.
574. Grünwald B., Schoeps B., Krüger A. Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1 // *Trends Cell Biol.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 29, № 1. P. 6–19.
575. Robert S. et al. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis // *Bioscience Reports.* Portland Press Ltd, 2016. Vol. 36, № 4.
576. Dreymueller D., Uhlig S., Ludwig A. Adam-family metalloproteinases in lung inflammation: Potential therapeutic targets // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* American Physiological Society, 2015. Vol. 308, № 4. P. L325–L343.
577. Zhao C., Isenberg J.S., Popel A.S. Human expression patterns: qualitative and quantitative analysis of thrombospondin-1 under physiological and pathological conditions // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* Blackwell Publishing Inc., 2018. Vol. 22, № 4. P. 2086–2097.
578. Yang J.D., Ma L., Zhu Z. SERPINE1 as a cancer-promoting gene in gastric adenocarcinoma: facilitates tumour cell proliferation, migration, and invasion by regulating EMT // *J. Chemother.* Taylor and Francis Ltd., 2019. Vol. 31, № 7–8. P. 408–

- 418.
579. Saetre P. et al. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains // *BMC Psychiatry*. BioMed Central, 2007. Vol. 7. P. 46.
580. Carow B., Rottenberg M.E. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation // *Front. Immunol.* Frontiers Research Foundation, 2014. Vol. 5, № FEB. P. 58.
581. Zarei Ghobadi M. et al. Identifying novel biomarkers of the pediatric influenza infection by weighted co-expression network analysis // *Virol. J.* BioMed Central Ltd., 2019. Vol. 16, № 1.
582. Wang I.M. et al. Systems analysis of eleven rodent disease models reveals an inflammatome signature and key drivers // *Mol. Syst. Biol.* 2012. Vol. 8, № 594. P. 1–16.
583. Garlanda C. et al. PTX3, a humoral pattern recognition molecule, in innate immunity, tissue repair, and cancer // *Physiol. Rev.* American Physiological Society, 2018. Vol. 98, № 2. P. 623–639.
584. Kaushal J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 16. P. 192–199.
585. Vindin H., Mithieux S.M., Weiss A.S. Elastin architecture // *Matrix Biol.* Elsevier B.V., 2019. Vol. 84. P. 4–16.
586. Li J. et al. Elastin is a key factor of tumor development in colorectal cancer // *BMC Cancer*. BioMed Central Ltd., 2020. Vol. 20, № 1. P. 1–12.
587. Wilson S.J. et al. Airway Elastin is increased in severe asthma and relates to proximal wall area: histological and computed tomography findings from the U-BIOPRED severe asthma study // *Clin. Exp. Allergy*. Blackwell Publishing Ltd, 2021. Vol. 51, № 2. P. 296–304.
588. Mecham R.P. Elastin in lung development and disease pathogenesis // *Matrix Biol.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 73. P. 6–20.
589. Gill S.E., Yamashita C.M., Veldhuizen R.A.W. Lung remodeling associated with recovery from acute lung injury // *Cell Tissue Res.* Springer, 2017. Vol. 367, № 3. P. 495–509.
590. Zhang H. et al. The Role of Innate Immunity in Pulmonary Infections // *Biomed Res. Int.* Hindawi Limited, 2021. Vol. 2021.
591. Liang Q. et al. Validation of novel hub genes and molecular mechanisms in acute lung injury using an integrative bioinformatics approach // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). Oxford Academic, 2021. Vol. 53, № 3. P. 342–353.
592. Tu Q. et al. Gypenosides inhibit inflammatory response and apoptosis of endothelial and epithelial cells in LPS-induced ALI: A study based on bioinformatic analysis and in vivo/vitro experiments // *Drug Des. Devel. Ther.* Dove Press, 2021. Vol. 15. P. 289–303.

593. Schreiber M.L. Acute respiratory distress syndrome // MEDSURG Nurs. / ed. Drazen J.M. Massachusetts Medical Society, 2018. Vol. 27, № 1. P. 562–572.
594. Zhu Y. et al. The protective role of Zingerone in a murine asthma model via activation of the AMPK/Nrf2/HO-1 pathway // Food Funct. Royal Society of Chemistry (RSC), 2021. Vol. 12, № 7. P. 3120–3131.
595. Arican O. et al. Serum levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity // Mediators Inflamm. Hindawi, 2005. Vol. 2005, № 5. P. 273–279.
596. Meijsing S.H. Mechanisms of glucocorticoid-regulated gene transcription // Adv. Exp. Med. Biol. Springer New York LLC, 2015. Vol. 872. P. 59–81.
597. McMaster A., Ray D.W. Drug Insight: Selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. Nature Publishing Group, 2008. Vol. 4, № 2. P. 91–101.
598. Markov A. V. et al. Soloxolone methyl inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced lung inflammation // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–15.
599. Hu L.N. et al. Protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on LPS-induced injury in intestinal epithelial cells // Chin. J. Nat. Med. China Pharmaceutical University, 2013. Vol. 11, № 1. P. 24–29.
600. Luo L. et al. Glycyrrhizin Attenuates Kainic Acid-Induced Neuronal Cell Death in the Mouse Hippocampus // Exp. Neurobiol. The Korean Society for Brain and Neural Science, 2013. Vol. 22, № 2. P. 107–115.
601. Deeb D. et al. Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism // Biochem. Pharmacol. Elsevier, 2010. Vol. 79, № 3. P. 350–360.
602. Fukumitsu S. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of pentacyclic triterpenoids maslinic acid through NF- κ B inactivation // Mol. Nutr. Food Res. Wiley-VCH Verlag, 2016. Vol. 60, № 2. P. 399–409.
603. Markov A. V. et al. Dual effect of soloxolone methyl on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo // Int. J. Mol. Sci. MDPI AG, 2020. Vol. 21, № 21. P. 1–35.
604. Lang S. et al. CXCL10/IP-10 Neutralization Can Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats // PLoS One. Public Library of Science, 2017. Vol. 12, № 1. P. e0169100.
605. Grommes J. et al. Disruption of Platelet-derived Chemokine Heteromers Prevents Neutrophil Extravasation in Acute Lung Injury // Am. J. Respir. Crit. Care Med.

- American Thoracic Society - AJRCCM, 2012. Vol. 185, № 6. P. 628–636.
606. Mokra D., Mokry J. Oxidative Stress in Experimental Models of Acute Lung Injury BT - Oxidative Stress in Lung Diseases: Volume 2 / ed. Chakraborti S. et al. Singapore: Springer Singapore, 2020. P. 25–57.
 607. Daamen A.R. et al. Comprehensive transcriptomic analysis of COVID-19 blood, lung, and airway // *Sci. Rep. Nature Research*, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–19.
 608. Couvineau A., Gomariz R.P., Tan Y.V. Editorial: GPCR in Inflammatory and Cancer Diseases // *Front. Endocrinol. (Lausanne). Frontiers Media S.A.*, 2020. Vol. 11. P. 588157.
 609. Hollebeeck S. et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model // *Toxicol. Lett. Elsevier*, 2011. Vol. 206, № 3. P. 268–275.
 610. Deme P., Narasimhulu C.A., Parthasarathy S. Identification and evaluation of anti-inflammatory properties of aqueous components extracted from sesame (*Sesamum indicum*) oil // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. Elsevier*, 2018. Vol. 1087–1088. P. 61–69.
 611. Noreen S., Maqbool I., Madni A. Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic // *European Journal of Pharmacology. Elsevier B.V.*, 2021. Vol. 894. P. 173854.
 612. Nct. BARCONA: a Study of Effects of Bardoxolone Methyl in Participants With SARS-Corona Virus-2 (COVID-19) [Electronic resource] // <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04494646>. 2020. URL: <https://www.cochranelibrary.com/central/doi/10.1002/central/CN-02145749/full>.
 613. Renaud L. et al. Prominence of IL6, IGF, TLR, and Bioenergetics Pathway Perturbation in Lung Tissues of Scleroderma Patients With Pulmonary Fibrosis // *Front. Immunol. Front Immunol*, 2020. Vol. 11.
 614. Fraser E. et al. Multi-Modal Characterization of Monocytes in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Reveals a Primed Type I Interferon Immune Phenotype // *Front. Immunol. Frontiers Media SA*, 2021. Vol. 12.
 615. Xia Y. et al. Identification of key modules and hub genes associated with lung function in idiopathic pulmonary fibrosis // *PeerJ. PeerJ Inc.*, 2020. Vol. 8. P. e9848.
 616. Zhang L., Sun Y. Muscle-Bone Crosstalk in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Front. Endocrinol. (Lausanne). Frontiers Media SA*, 2021. Vol. 12.
 617. Dong T. et al. Sputum and salivary protein biomarkers and point-of-care biosensors for the management of COPD // *Analyst. The Royal Society of Chemistry*, 2020. Vol. 145, №

5. P. 1583–1604.
618. Christenson S.A. The role of genomic profiling in identifying molecular phenotypes in obstructive lung diseases // *Current opinion in pulmonary medicine. Curr Opin Pulm Med*, 2020. Vol. 26, № 1. P. 84–89.
619. Chung K.F. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. 2005. Vol. 4, № 6. P. 619–625.
620. Shoki A.H. et al. Systematic review of blood biomarkers in cystic fibrosis pulmonary exacerbations // *Chest*. Chest, 2013. Vol. 144, № 5. P. 1659–1670.
621. Dhooche B. et al. Lung inflammation in cystic fibrosis: Pathogenesis and novel therapies // *Clin. Biochem. Elsevier*, 2014. Vol. 47, № 7–8. P. 539–546.
622. Martinović Kaliterna D., Petrić M. Biomarkers of skin and lung fibrosis in systemic sclerosis // <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1670062>. Taylor & Francis, 2019. Vol. 15, № 11. P. 1215–1223.
623. Vuga L.J. et al. C-X-C motif chemokine 13 (CXCL13) is a prognostic biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2014. Vol. 189, № 8. P. 966–974.
624. Eide H.A. et al. Non-small cell lung cancer is characterised by a distinct inflammatory signature in serum compared with chronic obstructive pulmonary disease // *Clin. Transl. Immunol. Wiley-Blackwell*, 2016. Vol. 5, № 11. P. e109.
625. Frija-Masson J. et al. Bacteria-driven peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic fibrosis // *Eur. Respir. J. European Respiratory Society*, 2017. Vol. 49, № 4.
626. Faner R. et al. Network analysis of lung transcriptomics reveals a distinct b-cell signature in emphysema // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2016. Vol. 193, № 11. P. 1242–1253.
627. Taniguchi T. et al. CXCL13 produced by macrophages due to Fli1 deficiency may contribute to the development of tissue fibrosis, vasculopathy and immune activation in systemic sclerosis // *Exp. Dermatol. John Wiley & Sons, Ltd*, 2018. Vol. 27, № 9. P. 1030–1037.
628. ZhangHai-Tao et al. MMP-9 1562C>T Gene Polymorphism and Efficacy of Glucocorticoid Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients // <https://home.liebertpub.com/gtmb>. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 2015. Vol. 19, № 11. P. 591–597.
629. Zhang Y. et al. Expression of Matrix Metalloproteinase-2, Matrix Metalloproteinase-9, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1, and Changes in Alveolar Septa in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Med. Sci. Monit. Med Sci Monit*, 2020. Vol.

26. P. e925278.
630. Paci P. et al. Integrated transcriptomic correlation network analysis identifies COPD molecular determinants // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2020. Vol. 10, № 1.
631. Li H. et al. TIMP-1 and MMP-9 expressions in COPD patients complicated with spontaneous pneumothorax and their correlations with treatment outcomes // *Pakistan J. Med. Sci. Professional Medical Publications*, 2020. Vol. 36, № 2. P. 192.
632. Tarique A.A. et al. Differential expression of genes and receptors in monocytes from patients with cystic fibrosis // *J. Cyst. Fibros. Elsevier B.V.*, 2019. Vol. 18, № 3. P. 342–348.
633. Xu L. et al. Differing Expression of Cytokines and Tumor Markers in Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema Compared to Emphysema and Pulmonary Fibrosis // <http://dx.doi.org/10.1080/15412555.2017.1278753>. Taylor & Francis, 2017. Vol. 14, № 2. P. 245–250.
634. Zhou X.-M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ in induced sputum is correlated with MMP-9/TIMP-1 imbalance and formation of emphysema in COPD patients // *J. Thorac. Dis. AME Publications*, 2017. Vol. 9, № 10. P. 3703.
635. Karman J. et al. Lung gene expression and single cell analyses reveal two subsets of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients associated with different pathogenic mechanisms // *PLoS One. Public Library of Science*, 2021. Vol. 16, № 3.
636. Hao W. et al. Increased chemokines levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Correlation with quantitative computed tomography metrics // *Br. J. Radiol. Br J Radiol*, 2021. Vol. 94, № 1118.
637. Henrot P. et al. Chemokines in COPD: From implication to therapeutic use // *International Journal of Molecular Sciences. Int J Mol Sci*, 2019. Vol. 20, № 11.
638. Hisert K.B. et al. CFTR Modulator Therapy Enhances Peripheral Blood Monocyte Contributions to Immune Responses in People With Cystic Fibrosis // *Front. Pharmacol. Front Pharmacol*, 2020. Vol. 11.
639. Polverino F. et al. A disintegrin and metalloproteinase domain-8: A novel protective proteinase in chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. Am J Respir Crit Care Med*, 2018. Vol. 198, № 10. P. 1254–1267.
640. Oreo K.M. et al. Sputum ADAM8 expression is increased in severe asthma and COPD // *Clin. Exp. Allergy. Clin Exp Allergy*, 2014. Vol. 44, № 3. P. 342–352.
641. Todd J.L. et al. Peripheral blood proteomic profiling of idiopathic pulmonary fibrosis biomarkers in the multicentre IPF-PRO Registry // *Respir. Res. Respir Res*, 2019. Vol. 20, № 1.

642. Kaiser R. et al. The role of circulating thrombospondin-1 in patients with precapillary pulmonary hypertension // *Respir. Res.* *Respir Res*, 2016. Vol. 17, № 1.
643. Savarimuthu Francis S.M. et al. Genes and gene ontologies common to airflow obstruction and emphysema in the lungs of patients with COPD // *PLoS One.* *PLoS One*, 2011. Vol. 6, № 3.
644. Springer J. et al. Transcriptional down-regulation of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in chronic obstructive pulmonary disease // *J. Occup. Med. Toxicol.* *J Occup Med Toxicol*, 2013. Vol. 8, № 1.
645. Kopp B.T. et al. Whole-blood transcriptomic responses to lumacaftor/ivacaftor therapy in cystic fibrosis // *J. Cyst. Fibros.* *J Cyst Fibros*, 2020. Vol. 19, № 2. P. 245–254.
646. Kim S.H. et al. A proteomics-based analysis of blood biomarkers for the diagnosis of COPD acute exacerbation // *Int. J. COPD.* *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021. Vol. 16. P. 1497–1508.
647. Wang H. et al. Elevated circulating PAI-1 levels are related to lung function decline, systemic inflammation, and small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease // *Int. J. COPD.* *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016. Vol. 11, № 1. P. 2369–2376.
648. Waschki B. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is elevated in patients with COPD independent of metabolic and cardiovascular function // *Int. J. COPD.* *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017. Vol. 12. P. 981–987.
649. Jiang Y. et al. Urokinase-type plasminogen activator system and human cationic antimicrobial protein 18 in serum and induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Respirology.* *Respirology*, 2010. Vol. 15, № 6. P. 939–946.
650. Xiao W. et al. Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation // *Chest.* *Chest*, 2005. Vol. 128, № 4. P. 2316–2326.
651. Huang Q. et al. The clinical value of suPAR in diagnosis and prediction for patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis // *Ther. Adv. Respir. Dis.* *Ther Adv Respir Dis*, 2020. Vol. 14.
652. Manetti M. et al. A genetic variation located in the promoter region of the UPAR (CD87) gene is associated with the vascular complications of systemic sclerosis // *Arthritis Rheum.* *Arthritis Rheum*, 2011. Vol. 63, № 1. P. 247–256.
653. Estany S. et al. Lung fibrotic tenascin-C upregulation is associated with other extracellular matrix proteins and induced by TGF β 1 // *BMC Pulm. Med.* *BMC Pulm Med*, 2014. Vol. 14, № 1.

654. López-Sánchez M. et al. Inflammatory markers and circulating extracellular matrix proteins in patients with chronic obstructive pulmonary disease and left ventricular diastolic dysfunction // *Clin. Respir. J. Clin Respir J*, 2017. Vol. 11, № 6. P. 859–866.
655. Willis-Owen S.A.G. et al. COPD is accompanied by co-ordinated transcriptional perturbation in the quadriceps affecting the mitochondria and extracellular matrix // *Sci. Rep. Sci Rep*, 2018. Vol. 8, № 1.
656. Brissett M. et al. Localized expression of tenascin in systemic sclerosis-associated pulmonary fibrosis and its regulation by insulin-like growth factor binding protein 3 // *Arthritis Rheum. Arthritis Rheum*, 2012. Vol. 64, № 1. P. 272–280.
657. Hu H. et al. Increased MMP8 levels in atopic chronic obstructive pulmonary disease: A study testing multiple immune factors in atopic and non-atopic patients // *Int. J. COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020. Vol. 15. P. 1839–1848.
658. Sng J.H.J. et al. MMP-8, MMP-9 and Neutrophil Elastase in Peripheral Blood and Exhaled Breath Condensate in COPD // *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis. COPD*, 2017. Vol. 14, № 2. P. 238–244.
659. Koo H.K. et al. Relationship between plasma matrix metalloproteinase levels, pulmonary function, bronchodilator response, and emphysema severity // *Int. J. COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016. Vol. 11, № 1. P. 1129–1137.
660. Roderfeld M. et al. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation // *J. Cyst. Fibros. J Cyst Fibros*, 2009. Vol. 8, № 5. P. 338–347.
661. Rostami M.R., Bradic M. The derepression of transposable elements in lung cells is associated with the inflammatory response and gene activation in idiopathic pulmonary fibrosis // *Mob. DNA. BioMed Central Ltd*, 2021. Vol. 12, № 1.
662. Vlachogiannis N.I. et al. Association Between DNA Damage Response, Fibrosis and Type I Interferon Signature in Systemic Sclerosis // *Front. Immunol. Front Immunol*, 2020. Vol. 11.
663. Christmann R.B. et al. Association of interferon- and transforming growth factor β -regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis // *Arthritis Rheumatol. Arthritis Rheumatol*, 2014. Vol. 66, № 3. P. 714–725.
664. Hilzendeger C. et al. Reduced sputum expression of interferon-stimulated genes in severe COPD // *Int. J. COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016. Vol. 11, № 1. P. 1485–1494.
665. Hamon Y. et al. Proteolytic cleavage of the long pentraxin PTX3 in the airways of cystic fibrosis patients // *Innate Immun. Innate Immun*, 2013. Vol. 19, № 6. P. 611–622.
666. Iwata Y. et al. Increased serum pentraxin 3 in patients with systemic sclerosis // *J.*

- Rheumatol. J Rheumatol, 2009. Vol. 36, № 5. P. 976–983.
667. Tan D.B.A. et al. Protein Network Analysis Identifies Changes in the Level of Proteins Involved in Platelet Degranulation, Proteolysis and Cholesterol Metabolism Pathways in AECOPD Patients // COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis. COPD, 2020. Vol. 17, № 1. P. 29–33.
668. Hisata S. et al. Reversal of emphysema by restoration of pulmonary endothelial cells // J. Exp. Med. J Exp Med, 2021. Vol. 218, № 8.
669. Pérez-Peiró M. et al. Iron replacement and redox balance in non-anemic and mildly anemic iron deficiency copd patients: Insights from a clinical trial // Biomedicines. Biomedicines, 2021. Vol. 9, № 9.
670. Neves C. et al. Inflammatory and oxidative biomarkers as determinants of functional capacity in patients with COPD assessed by 6-min walk test-derived outcomes // Exp. Gerontol. Exp Gerontol, 2021. Vol. 152.
671. Pandey S. et al. Vitamin D, C-reactive protein, and oxidative stress markers in chronic obstructive pulmonary disease // Tzu Chi Med. J. Tzu Chi Med J, 2021. Vol. 33, № 1. P. 80–86.
672. Bel'skaya L. V. et al. Salivary metabolic profile of patients with lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease of varying severity and their comorbidity: A preliminary study // Diagnostics. Diagnostics (Basel), 2020. Vol. 10, № 12.
673. Brandsma C.A. et al. A large lung gene expression study identifying fibulin-5 as a novel player in tissue repair in COPD // Thorax. Thorax, 2015. Vol. 70, № 1. P. 21–32.
674. Patel B., Priefer R. Impact of chronic obstructive pulmonary disease, lung infection, and/or inhaled corticosteroids use on potential risk of lung cancer // Life Sci. Pergamon, 2022. Vol. 294. P. 120374.
675. An H.J. et al. The prognostic role of tissue and serum MMP-1 and TIMP-1 expression in patients with non-small cell lung cancer // Pathol. Res. Pract. Urban & Fischer, 2016. Vol. 212, № 5. P. 357–364.
676. Kong H.J. et al. Crosstalk between YAP and TGF β regulates SERPINE1 expression in mesenchymal lung cancer cells // Int. J. Oncol. Spandidos Publications, 2020. Vol. 58, № 1. P. 111–121.
677. Zhu C. et al. The urokinase-type plasminogen activator and inhibitors in resectable lung adenocarcinoma // Pathol. Res. Pract. Urban & Fischer, 2020. Vol. 216, № 4. P. 152885.
678. Hu T. et al. Pentraxin 3 (PTX-3) Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid as a Lung Cancer Biomarker // Dis. Markers. Hindawi Limited, 2020. Vol. 2020.
679. Eble J.A., Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis // Clin.

- Exp. Metastasis. Springer, 2019. Vol. 36, № 3. P. 171–198.
680. Inomata S.I. et al. Acute lung injury as an adverse of gefitinib // *Anticancer. Drugs*. 2004. Vol. 15, № 5. P. 461–467.
681. Linskens R.K. et al. Severe acute lung injury induced by gemcitabine // *Neth. J. Med.* No longer published by Elsevier, 2000. Vol. 56, № 6. P. 232–235.
682. Trisolini R. et al. Acute lung injury associated with 5-fluorouracil and oxaliplatin combined chemotherapy // *Eur. Respir. J.* 2001. Vol. 18, № 1. P. 243–245.
683. Kim H.J. et al. Risk factors of postoperative acute lung injury following lobectomy for nonsmall cell lung cancer // *Medicine (Baltimore)*. Wolters Kluwer Health, 2019. Vol. 98, № 13. P. e15078.
684. Kaczka D.W. Oscillatory ventilation redux: alternative perspectives on ventilator-induced lung injury in the acute respiratory distress syndrome // *Curr. Opin. Physiol.* Elsevier, 2021. Vol. 21. P. 36–43.
685. Yim J., Lim H.H., Kwon Y. COVID-19 and pulmonary fibrosis: therapeutics in clinical trials, repurposing, and potential development // *Arch. Pharm. Res.* Nature Publishing Group, 2021. Vol. 44, № 5. P. 499–513.
686. Greten F.R., Grivennikov S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences // *Immunity*. Cell Press, 2019. Vol. 51, № 1. P. 27–41.
687. Boys I.N. et al. RTP4 Is a Potent IFN-Inducible Anti-flavivirus Effector Engaged in a Host-Virus Arms Race in Bats and Other Mammals // *Cell Host Microbe*. Cell Press, 2020. Vol. 28, № 5. P. 712-723.e9.
688. Dediego M.L. et al. Interferon-induced protein 44 interacts with cellular fk506-binding protein 5, negatively regulates host antiviral responses, and supports virus replication // *MBio*. American Society for Microbiology, 2019. Vol. 10, № 4.
689. Xie Z. et al. Generation of pRSAD2 gene knock-in pig via CRISPR/Cas9 technology // *Antiviral Res.* Elsevier, 2020. Vol. 174. P. 104696.
690. Shaath H. et al. Single-Cell Transcriptome Analysis Highlights a Role for Neutrophils and Inflammatory Macrophages in the Pathogenesis of Severe COVID-19 // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 9, № 11. P. 2374.
691. Vastrad B., Vastrad C., Tengli A. Bioinformatics analyses of significant genes, related pathways, and candidate diagnostic biomarkers and molecular targets in SARS-CoV-2/COVID-19 // *Gene Reports*. Elsevier, 2020. Vol. 21. P. 100956.
692. Bhatia M., Zemans R.L., Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2012. Vol. 46, № 5. P. 566–572.

693. Abouelasrar Salama S. et al. Serum Amyloid A1 (SAA1) Revisited: Restricted Leukocyte-Activating Properties of Homogeneous SAA1 // *Front. Immunol. Frontiers*, 2020. Vol. 11. P. 843.
694. Zhou H. et al. Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Fragments from Serum Amyloid A // *J. Immunol. American Association of Immunologists*, 2017. Vol. 199, № 3. P. 1105–1112.
695. Zemans R.L., Matthay M.A. What drives neutrophils to the alveoli in ARDS? // *Thorax. BMJ Publishing Group Ltd*, 2017. Vol. 72, № 1. P. 1–3.
696. Nieri D. et al. C-C motive chemokine ligand 2 and thromboinflammation in COVID-19-associated pneumonia: A retrospective study // *Thromb. Res. Pergamon*, 2021. Vol. 204. P. 88–94.
697. Sierra B. et al. Association of early nasopharyngeal immune markers with COVID-19 clinical outcome: Predictive value of CCL2/MCP-1 // *Open Forum Infect. Dis. Oxford Academic*, 2020. Vol. 7, № 10. P. 1–5.
698. Meizlish M.L. et al. A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19 // *Blood Adv. American Society of Hematology*, 2021. Vol. 5, № 5. P. 1164–1177.
699. Li H. et al. Serum Amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis // *J. Infect. W.B. Saunders*, 2020. Vol. 80, № 6. P. 646–655.
700. Sarma A. et al. COVID-19 ARDS is characterized by a dysregulated host response that differs from cytokine storm and is modified by dexamethasone. // *Res. Sq.* 2021.
701. Cavalcanti L.F. et al. Decreased plasma H₂O₂ levels are associated with the pathogenesis leading to COVID-19 worsening and mortality // *Free Radic. Res. Taylor & Francis*, 2023. P. 1–11.
702. Delgado-Roche L., Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection // *Arch. Med. Res. Elsevier*, 2020. Vol. 51, № 5. P. 384–387.
703. Doni A., Garlanda C., Mantovani A. Innate immunity, hemostasis and matrix remodeling: PTX3 as a link // *Semin. Immunol. Academic Press*, 2016. Vol. 28, № 6. P. 570–577.
704. Yang K. et al. Identification of SERPINE1, PLAU and ACTA1 as biomarkers of head and neck squamous cell carcinoma based on integrated bioinformatics analysis // *Int. J. Clin. Oncol. Springer Tokyo*, 2019. Vol. 24, № 9. P. 1030–1041.
705. Liu C., Yao Y., Wang W. Pentraxin-3 as a prognostic marker in patients with small-cell lung cancer // *Med. Oncol. Humana Press Inc.*, 2014. Vol. 31, № 10. P. 1–6.
706. Herrero R., Sanchez G., Lorente J.A. New insights into the mechanisms of pulmonary

- edema in acute lung injury // *Ann. Transl. Med.* AME Publications, 2018. Vol. 6, № 2. P. 32–32.
707. Zhang F. et al. Doxycycline alleviates paraquat-induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 // *Int. Immunopharmacol.* Elsevier, 2019. Vol. 72. P. 243–251.
708. Ge L. et al. Design and discovery of novel thiazole derivatives as potential MMP inhibitors to protect against acute lung injury in sepsis rats: Via attenuation of inflammation and apoptotic oxidative stress // *RSC Adv.* Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 7, № 52. P. 32909–32922.
709. Solun B., Shoenfeld Y. Inhibition of metalloproteinases in therapy for severe lung injury due to COVID-19 // *Med. Drug Discov.* Elsevier, 2020. Vol. 7. P. 100052.
710. Moretti L. et al. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation // *J. Biol. Chem.* J Biol Chem, 2022. Vol. 298, № 2. P. 101530.
711. Pollock J., Chalmers J.D. The immunomodulatory effects of macrolide antibiotics in respiratory disease // *Pulm. Pharmacol. Ther.* Pulm Pharmacol Ther, 2021. Vol. 71.
712. Adcock I.M. et al. The Use of Inhaled Corticosteroids for Patients with COPD Who Continue to Smoke Cigarettes: An Evaluation of Current Practice // *Am. J. Med.* Am J Med, 2022. Vol. 135, № 3. P. 302–312.
713. Facchinetti F. et al. Tanimilast, A Novel Inhaled Pde4 Inhibitor for the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Front. Pharmacol.* Frontiers Media SA, 2021. Vol. 12.
714. Rydman E.M. et al. Inhalation of rod-like carbon nanotubes causes unconventional allergic airway inflammation // *Part. Fibre Toxicol.* BioMed Central, 2014. Vol. 11, № 1. P. 1–17.
715. Nakagome K., Nagata M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation // *Front. Immunol.* NLM (Medline), 2018. Vol. 9. P. 2220.
716. Bannenberg G., Serhan C.N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* Elsevier, 2010. Vol. 1801, № 12. P. 1260–1273.
717. Du X. et al. CCL6 produced by eosinophils drives allergic airway inflammation in mice // *Eur. Respir. J.* European Respiratory Society, 2019. Vol. 54, № suppl 63. P. PA4363.
718. Wang N. et al. OMICs approaches-assisted identification of macrophages-derived MIP-1 γ as the therapeutic target of botanical products TNTL in diabetic retinopathy // *Cell Commun. Signal.* BioMed Central, 2019. Vol. 17, № 1. P. 1–14.
719. Lindborg J.A. et al. Molecular and cellular identification of the immune response in

- peripheral ganglia following nerve injury // *J. Neuroinflammation*. BioMed Central, 2018. Vol. 15, № 1. P. 1–17.
720. Popiolek-Barczyk K. et al. The CCL2/CCL7/CCL12/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates the complement system in microglia // *Mol. Cell. Probes*. Academic Press, 2020. Vol. 54. P. 101671.
721. Chen G. et al. Upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP9)/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and MMP2/TIMP2 ratios may be involved in lipopolysaccharide-induced acute lung injury // *J. Int. Med. Res.* SAGE Publications Sage UK: London, England, 2020. Vol. 48, № 4. P. 1–10.
722. Wu X., Guo L., Ye G. Remifentanyl ameliorates lung injury in neonate rats with acute respiratory distress by down-regulating TIMP1 expression // *Am. J. Transl. Res.* e-Century Publishing Corporation, 2020. Vol. 12, № 10. P. 6325–6334.
723. Kulshrestha R. et al. Beneficial effects of N-acetylcysteine on protease-antiprotease balance in attenuating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats // *Iran. J. Basic Med. Sci.* Mashhad University of Medical Sciences, 2020. Vol. 23, № 3. P. 396–405.
724. Shen D.D. et al. Liuweibuqi capsules improve pulmonary function in stable chronic obstructive pulmonary disease with lung-qi deficiency syndrome by regulating STAT4/STAT6 and MMP-9/TIMP-1 // *Pharm. Biol.* Taylor & Francis, 2019. Vol. 57, № 1. P. 744–752.
725. Kim Y.H. et al. Novel glutathione-containing dry-yeast extracts inhibit eosinophilia and mucus overproduction in a murine model of asthma // *Nutr. Res. Pract.* Nutr Res Pract, 2017. Vol. 11, № 6. P. 461–469.
726. Radicioni G. et al. Airway mucin MUC5AC and MUC5B concentrations and the initiation and progression of chronic obstructive pulmonary disease: an analysis of the SPIROMICS cohort // *Lancet Respir. Med.* Elsevier, 2021. Vol. 9, № 11. P. 1241–1254.
727. Garić D. et al. Fenretinide favorably affects mucins (MUC5AC/MUC5B) and fatty acid imbalance in a manner mimicking CFTR-induced correction // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* Elsevier, 2020. Vol. 1865, № 2. P. 158538.
728. Tan H.T.T. et al. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice // *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 74, № 2. P. 294–307.
729. Zhang Q. et al. The Possible Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis considering MUC5B // *Biomed Res. Int.* Hindawi Limited, 2019. Vol. 2019.

730. Pitchford S. et al. Pharmacological strategies for targeting platelet activation in asthma // *Curr. Opin. Pharmacol.* Elsevier, 2019. Vol. 46. P. 55–64.
731. Chen J.J. et al. A comprehensive review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism // *Drug Metab. Rev.* Taylor & Francis, 2019. Vol. 51, № 2. P. 178–195.
732. Xu D. et al. Potential Role of ADRA2A Genetic Variants in the Etiology of ADHD Comorbid With Tic Disorders // *J. Atten. Disord.* SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 2021. Vol. 25, № 1. P. 33–43.
733. Xing C. et al. Sleep Disturbance Induces Increased Cholesterol Level by NR1D1 Mediated CYP7A1 Inhibition // *Front. Genet.* Frontiers, 2020. Vol. 11. P. 1702.
734. Fanelli G.N. et al. Immunohistochemistry for thymidine kinase-1 (Tk1): A potential tool for the prognostic stratification of breast cancer patients // *J. Clin. Med.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2021. Vol. 10, № 22. P. 5416.
735. Ren J. et al. A Novel Prognostic Model of Early-Stage Lung Adenocarcinoma Integrating Methylation and Immune Biomarkers // *Front. Genet.* Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 11.
736. Tavares L.A. et al. Cymbopogon winterianus essential oil attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a murine model // *Pharmaceutics.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2021. Vol. 13, № 5.
737. Choi S. et al. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of modafinil in nonalcoholic liver disease // *Biomed. Pharmacother.* Elsevier Masson, 2021. Vol. 144. P. 112372.
738. Beshay O.N. et al. Resveratrol reduces gentamicin-induced EMT in the kidney via inhibition of reactive oxygen species and involving TGF- β /Smad pathway // *Life Sci.* Life Sci, 2020. Vol. 258.
739. Shilovskiy I.P. et al. Experimental protocol for development of adjuvant-free murine chronic model of allergic asthma // *J. Immunol. Methods.* Elsevier, 2019. Vol. 468. P. 10–19.
740. Ma P. et al. Comparative RNA-Seq Transcriptome Analysis on Pulmonary Inflammation in a Mouse Model of Asthma–COPD Overlap Syndrome // *Front. Cell Dev. Biol.* Frontiers Media SA, 2021. Vol. 9. P. 568.
741. Hannoodee S., Nasuruddin D.N. Acute inflammatory response // *Nature.* StatPearls Publishing, 1965. Vol. 206, № 4979. P. 20.
742. Fleit H.B. Chronic Inflammation // *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms.* StatPearls Publishing, 2014. P. 300–314.
743. Zhang J. et al. Role of liver-X-receptors in airway remodeling in mice with chronic allergic asthma // *Exp. Ther. Med.* Spandidos Publications, 2021. Vol. 22, № 3.

744. Liu X. et al. Yupingfeng San inhibits NLRP3 inflammasome to attenuate the inflammatory response in asthma mice // *Front. Pharmacol. Frontiers Media SA*, 2017. Vol. 8, № DEC.
745. Duechs M.J. et al. Development of a novel severe triple allergen asthma model in mice which is resistant to dexamethasone and partially resistant to TLR7 and TLR9 agonist treatment // *PLoS One. Public Library of Science*, 2014. Vol. 9, № 3. P. 91223.
746. Liu X.Y. et al. Fibronectin expression is critical for liver fibrogenesis in vivo and in vitro // *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 14, № 4. P. 3669–3675.
747. Innes A.L. et al. Ex vivo sputum analysis reveals impairment of protease-dependent mucus degradation by plasma proteins in acute asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2009. Vol. 180, № 3. P. 203–210.
748. Bonser L.R. et al. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2016. Vol. 126, № 6. P. 2367–2371.
749. Maier T., Güell M., Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples // *FEBS Lett.* No longer published by Elsevier, 2009. Vol. 583, № 24. P. 3966–3973.
750. Sun W. et al. Regulation of the IGF1 signaling pathway is involved in idiopathic pulmonary fibrosis induced by alveolar epithelial cell senescence and core fucosylation // *Aging (Albany. NY). Impact Journals, LLC*, 2021. Vol. 13, № 14. P. 18852–18869.
751. Hernandez D.M. et al. IPF pathogenesis is dependent upon TGF β induction of IGF-1 // *FASEB J. John Wiley & Sons, Ltd*, 2020. Vol. 34, № 4. P. 5363–5388.
752. Drakopanagiotakis F. et al. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis // *Matrix Biol. Elsevier*, 2018. Vol. 68–69. P. 404–421.
753. Hatipoglu O.F. et al. Osteopontin silencing attenuates bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis by regulating epithelial–mesenchymal transition // *Biomed. Pharmacother. Elsevier Masson*, 2021. Vol. 139. P. 111633.
754. Menou A., Duitman J.W., Crestani B. The impaired proteases and anti-proteases balance in Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Matrix Biol. Elsevier*, 2018. Vol. 68–69. P. 382–403.
755. Dong J., Ma Q. TIMP1 promotes multi-walled carbon nanotube-induced lung fibrosis by stimulating fibroblast activation and proliferation // *Nanotoxicology. Taylor and Francis Ltd*, 2017. Vol. 11, № 1. P. 41–51.
756. Urushiyama H. et al. Role of α 1 and α 2 chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts // *Lab. Investig. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 95, № 8. P. 872–885.

757. Luzina I.G. et al. Transcriptomic evidence of immune activation in macroscopically normal-appearing and scarred lung tissues in idiopathic pulmonary fibrosis // *Cell. Immunol.* Academic Press, 2018. Vol. 325. P. 1–13.
758. Lindahl G.E. et al. Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease // *Respir. Res.* BioMed Central, 2013. Vol. 14, № 1. P. 1–14.
759. Booth A.J. et al. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* American Thoracic Society, 2012. Vol. 186, № 9. P. 866–876.
760. Phan T.H.G. et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis // *Cell. Mol. Life Sci.* Springer, 2021. Vol. 78, № 5. P. 2031–2057.
761. Ballester B., Milara J., Cortijo J. Mucins as a new frontier in pulmonary fibrosis // *J. Clin. Med.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 8, № 9. P. 1447.
762. He C., Brent Carter A. C(C)Learning the role of chemokines in pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2020. Vol. 62, № 5. P. 546–547.
763. Kim S.J. et al. Mitochondrial catalase overexpressed transgenic mice are protected against lung fibrosis in part via preventing alveolar epithelial cell mitochondrial DNA damage // *Free Radic. Biol. Med.* Pergamon, 2016. Vol. 101. P. 482–490.
764. Klingberg F. et al. The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- β -binding protein-1 to the fibroblast matrix // *J. Cell Sci.* Company of Biologists Ltd, 2018. Vol. 131, № 5.
765. Deng Z. et al. The extracellular matrix and mechanotransduction in pulmonary fibrosis // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Pergamon, 2020. Vol. 126. P. 105802.
766. Chanda D. et al. Fibronectin on the surface of extracellular vesicles mediates fibroblast invasion // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2019. Vol. 60, № 3. P. 279–288.
767. Bazan-Socha S. et al. Increased blood levels of cellular fibronectin in asthma: Relation to the asthma severity, inflammation, and prothrombotic blood alterations // *Respir. Med.* W.B. Saunders, 2018. Vol. 141. P. 64–71.
768. Ballanti E. et al. Complement and autoimmunity // *Immunol. Res.* 2013. Vol. 56, № 2–3. P. 477–491.
769. Duehrkop C. et al. C1 Esterase Inhibitor Reduces Lower Extremity Ischemia/Reperfusion Injury and Associated Lung Damage // *PLoS One.* Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 8. P. e72059.
770. Leach H.G. et al. Endothelial cells recruit macrophages and contribute to a fibrotic milieu

- in bleomycin lung injury // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2013. Vol. 49, № 6. P. 1093–1101.
771. Gu H. et al. Contribution of the anaphylatoxin receptors, C3aR and C5aR, to the pathogenesis of pulmonary fibrosis // *FASEB J.* FASEB, 2016. Vol. 30, № 6. P. 2336–2350.
772. Gu H. et al. Crosstalk between TGF- β 1 and complement activation augments epithelial injury in pulmonary fibrosis // *FASEB J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 28, № 10. P. 4223–4234.
773. Rosini S. et al. Thrombospondin-1 promotes matrix homeostasis by interacting with collagen and lysyl oxidase precursors and collagen cross-linking sites // *Sci. Signal.* American Association for the Advancement of Science, 2018. Vol. 11, № 532.
774. Fulkerson P.C. et al. A central regulatory role for eosinophils and the eotaxin/CCR3 axis in chronic experimental allergic airway inflammation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2006. Vol. 103, № 44. P. 16418–16423.
775. Huaux F. et al. Role of eotaxin-1 (CCL11) and CC chemokine receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis // *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology, 2005. Vol. 167, № 6. P. 1485–1496.
776. Fulkerson P.C., Fischetti C.A., Rothenberg M.E. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling // *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology, 2006. Vol. 169, № 6. P. 2117–2126.
777. Qiu L. et al. A novel prognostic signature for idiopathic pulmonary fibrosis based on five-immune-related genes // *Ann. Transl. Med.* AME Publications, 2021. Vol. 9, № 20. P. 1570–1570.
778. Stoilov I. et al. The cytochromes P450 (CYP) response to allergic inflammation of the lung // *Arch. Biochem. Biophys.* Academic Press, 2006. Vol. 456, № 1. P. 30–38.
779. Xu J. et al. The role of human cytochrome P450 2E1 in liver inflammation and fibrosis // *Hepatology.* Commun. John Wiley and Sons Inc, 2017. Vol. 1, № 10. P. 1043–1057.
780. Helmig S., Döhrel J., Joachim S. Decreased Cyp2E1 mRNA expression in human leucocytes in patients with fibrotic and inflammatory lung diseases // *Int. J. Mol. Med.* Spandidos Publications, 2010. Vol. 26, № 1. P. 143–149.
781. Shimizu Y., Dobashi K. CC-chemokine CCL15 expression and possible implications for the pathogenesis of IgE-related severe asthma // *Mediators Inflamm.* 2012. Vol. 2012.
782. PANG N. et al. Endothelial cell-derived CCL15 mediates the transmigration of fibrocytes through the CCL15-CCR1 axis in vitro // *Mol. Med. Rep.* Spandidos Publications, 2020. Vol. 22, № 6. P. 5339–5347.

783. Watanabe M. et al. C-C Motif Chemokine Ligand 15 May Be a Useful Biomarker for Predicting the Prognosis of Patients with Chronic Hypersensitivity Pneumonitis // *Respiration*. 2019. Vol. 98, № 3. P. 212–220.
784. Du J. et al. Murine chronic graft-versus-host disease proteome profiling discovers CCL15 as a novel biomarker in patients // *Blood*. American Society of Hematology, 2018. Vol. 131, № 15. P. 1743–1754.
785. Katoh D. et al. Tenascin-C Induces Phenotypic Changes in Fibroblasts to Myofibroblasts with High Contractility through the Integrin $\alpha\beta 1$ /Transforming Growth Factor β /SMAD Signaling Axis in Human Breast Cancer // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2020. Vol. 190, № 10. P. 2123–2135.
786. Choi Y.E. et al. Effects of tenascin c on the integrity of extracellular matrix and skin aging // *Int. J. Mol. Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 21, № 22. P. 1–17.
787. Koivisto L. et al. Integrin $\alpha\beta 6$: Structure, function and role in health and disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Pergamon, 2018. Vol. 99. P. 186–196.
788. Conroy K.P., Kitto L.J., Henderson N.C. Av Integrins: Key Regulators of Tissue Fibrosis // *Cell Tissue Res.* Springer Verlag, 2016. Vol. 365, № 3. P. 511–519.
789. Meuwissen M.E.C. et al. The expanding phenotype of COL4A1 and COL4A2 mutations: Clinical data on 13 newly identified families and a review of the literature // *Genet. Med.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 17, № 11. P. 843–853.
790. Ippolito D.L. et al. Gene expression patterns associated with histopathology in toxic liver fibrosis // *Toxicol. Sci.* Oxford Academic, 2016. Vol. 149, № 1. P. 67–88.
791. Yin X. et al. Glucose fluctuation increased hepatocyte apoptosis under lipotoxicity and the involvement of mitochondrial permeability transition opening // *J. Mol. Endocrinol.* 2015. Vol. 55, № 3. P. 169–181.
792. Wilson S.E. et al. Corneal fibroblast collagen type IV negative feedback modulation of TGF beta: A fibrosis modulating system likely active in other organs // *Matrix Biol.* Elsevier, 2022.
793. Kato M. et al. Tranilast inhibits pulmonary fibrosis by suppressing TGF β /SMAD2 pathway // *Drug Des. Devel. Ther.* Dove Press, 2020. Vol. 14. P. 4593–4603.
794. Lommatzsch M. et al. Risk Assessment for Patients with Chronic Respiratory Conditions in the Context of the SARS-CoV-2 Pandemic Statement of the German Respiratory Society with the Support of the German Association of Chest Physicians // *Respiration*. Karger Publishers, 2022. Vol. 101, № 3. P. 307–320.
795. Dhanjal D.S. et al. Concepts of advanced therapeutic delivery systems for the

- management of remodeling and inflammation in airway diseases // *Future Med. Chem.* Future Science Group, 2022. Vol. 14, № 4. P. 271–288.
796. DePianto D.J. et al. Heterogeneous gene expression signatures correspond to distinct lung pathologies and biomarkers of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis // *Thorax*. BMJ Publishing Group, 2015. Vol. 70, № 1. P. 48–56.
797. Meltzer E.B. et al. Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: Proof-of-principle // *BMC Med. Genomics*. BioMed Central, 2011. Vol. 4, № 1. P. 1–13.
798. Morrow J.D. et al. Functional interactors of three genome-wide association study genes are differentially expressed in severe chronic obstructive pulmonary disease lung tissue // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–11.
799. Golpon H.A. et al. Emphysema lung tissue gene expression profiling // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2004. Vol. 31, № 6. P. 595–600.
800. Bhattacharya S. et al. Molecular biomarkers for quantitative and discrete COPD phenotypes // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2009. Vol. 40, № 3. P. 359–367.