

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

САВИН ИННОКЕНТИЙ АНДРЕЕВИЧ

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

**Об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы**

**Особенности структурно-функциональных изменений в лёгких на
релевантных моделях острого и хронического воспаления, вызванного
наночастицами промышленных аэрозолей и другими агентами**

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.04 Биохимия

Аспирант _____ Савин И.А.

Научный руководитель _____ к.м.н. Сенькова А.В.

Новосибирск-2022

Работа выполнена в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель: **Сенькова Александра Васильевна**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Россия.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность.

Известно, что одной из основных причин легочного фиброза является предшествующее острое воспаление легких, переходящее в персистирующее хроническое воспаление. Самыми распространенными причинами развития острых воспалительных изменений в легких является острое повреждение легких (ОПЛ) и острый респираторный дистресс синдром (ОРДС), а одной из основных патологий, ведущих к хронизации воспалительного процесса в легких, является бронхиальная астма.

ОПЛ, часто являющееся клиническим предшественником ОРДС, это специфическая форма повреждения легких, характеризующаяся обширным повреждением альвеол, не кардиогенным отеком легких, а также легочным и системным нейтрофил-ассоциированным воспалением, что приводит к легочной недостаточности и гипоксемии [1–4]. Ежегодно ОРДС диагностируется более чем у 3 миллионов пациентов по всему миру, а смертность от данной патологии варьирует от 35% до 46% [5,6]. В течение нескольких последних лет заболеваемость и смертность от ОПЛ/ОРДС значительно возросла в результате пандемии новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-2019) [7,8].

Бронхиальная астма – это гетерогенное легочное заболевание, главными отличительными признаками которого являются персистирующее воспаление дыхательных путей [9], обратимое нарушение проходимости и гиперреактивность дыхательных путей [10]. Структурные изменения дыхательных путей, ассоциированные с прогрессией и хронизацией астмы объединены под широким термином «ремоделирование дыхательных путей» [11,12], который включает в себя клеточные и внеклеточные изменения в больших и малых дыхательных путях: отложение компонентов внеклеточного матрикса [13], нарушение барьерной и транспортной функции эпителия дыхательных путей [14], гиперплазию бокаловидных клеток с гиперсекрецией слизи [15–18], повышенную пролиферацию гладкомышечных клеток и миофибробластов [19–21], что, в конечном итоге, может привести к формированию легочного фиброза.

Быстрая и ранняя диагностика тяжелого течения ОПЛ/ОРДС, а также осложнений и обострений бронхиальной астмы, которые в последующем могут привести к развитию легочного фиброза, с помощью специфических биологических маркеров позволило бы снизить смертность от данных заболеваний, в том числе от COVID-19 ассоциированной легочной недостаточности и последующего фиброза легких. Следовательно, идентификация и валидация биологических маркеров как тяжелого течения острого воспаления легких, так и его перехода в легочной фиброз является актуальной задачей.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлась идентификация потенциальных генов мастер-регуляторов, вовлеченных в развитие легочного воспаления различной этиологии, а также ключевых молекулярных маркеров перехода от острого воспаления легких к легочному фиброзу.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Поиск потенциальных мастер-регуляторов, вовлеченных в развитие острого воспаления в легких различной этиологии и его переход в легочной фиброз.
2. Валидация идентифицированных генов на *in vivo* моделях ЛПС-индуцированного острого повреждения легких без лечения и после его коррекции противовоспалительными соединениями, а также овальбумин-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза.
3. Оценка морфологических изменений в легких с острым воспалением различной этиологии и легочным фиброзом.
4. Исследование функциональной взаимосвязи между идентифицированными генами мастер-регуляторами и развитием воспалительного процесса в легких при COVID-19, а также опухолевыми и хроническими заболеваниями легких человека.

Научная новизна и практическая значимость.

В данном исследовании впервые были идентифицированы и валидированы гены мастер-регуляторы, вовлеченные в развитие острого воспаления в легких различной этиологии: гены, отвечающие за воспаление (*Il-6*) и модуляцию внеклеточного матрикса (*Timp1, Serpine1, Ccl2, Mmp8, Ptx3*), могут являться ключевыми регуляторами развития острого воспаления в легких и могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров тяжелого течения заболевания.

В данной работе впервые были выявлены новые, ранее не исследованные в отношении развития легочного фиброза гены (*C3, C3ar1, Col4a1, Col4a2, Cyp2e1, Fn1, THbs1, Tyrobp*), ответственные за развитие ранних фибротических изменений в легких уже на стадии острого и подострого воспаления, которые могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров и молекулярных мишеней для терапии раннего легочного фиброза.

Также в данной работе впервые была выявлена связь между некоторыми генами – регуляторами развития острого воспаления в легких и COVID-19-ассоциированным регуломом, что позволяет использовать *in vivo* модель ЛПС-индуцированного ОПЛ как потенциальную платформу для разработки противовоспалительной терапии, нацеленной на ранние этапы повреждения легких, индуцированных SARS-CoV-2. Более того, впервые была показана ассоциация между повышенной экспрессией генов, участвующих в развитии воспалительного ответа при ОПЛ и ухудшением выживаемости у пациентов с аденокарциномой легких (LUAD) и плоскоклеточным раком легкого (LUSC), а такие гены как *TIMP1, SERPINE1, PLAUR* и *PTX3* могут быть использованы в качестве маркеров прогрессии опухолевых заболеваний легких.

Наконец, впервые в данной работе была проанализирована экспрессия новых идентифицированных генов, ответственных за развитие фибротических изменений в легких, в материале, полученном от пациентов, страдающих такими хроническими воспалительными заболеваниями как идиопатический легочный фиброз, хроническая обструктивная болезнь легких, хроническая эмфизема и муковисцидоз, что может быть использовано для создания прогностических маркерных панелей тяжести течения данных заболеваний.

Личный вклад автора.

Основная часть работ была выполнена автором лично, либо с его непосредственным участием, в частности все работы с *in vivo* моделями, а также валидация результатов биоинформатического анализа с помощью qRT-PCR. Биоинформатический анализ был проведен совместно с сотрудником лаборатории

биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины к.б.н. Марковым Андреем Владимировичем.

Апробация работы.

По результатам данного исследования опубликовано 10 работ и 1 в печати, из них: 2 статьи опубликованы в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК, 1 находится в печати и 8 тезисов конференций (в 5 из них докладчик – Савин И.А.).

1. Sen'kova A.V., **Savin I.A.**, Brenner E.V., Zenkova M.A., Markov A.V. Core genes involved in the regulation of acute lung injury and their association with COVID-19 and tumor progression: A bioinformatics and experimental study. *PLoS ONE*. 2021; 16(11): e0260450. doi: 10.1371/journal.pone.0260450.

2. **Savin I.A.**, Markov A.V., Zenkova M.A., Sen'kova A.V. Asthma and post-asthmatic fibrosis: a search for new promising molecular markers of transition from acute inflammation to pulmonary fibrosis. *Biomedicines*. 2022; 10(5):1017. doi: 10.3390/biomedicines10051017.

3. Sen'kova A.V., **Savin I.A.**, Odarenko K.V., Salomatina O.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A., Markov A.V. Protective effect of soloxolone methyl and its novel derivatives in carrageenan- and LPS-driven acute inflammation: pharmacological profiling and mechanism of action. *Int J Mol Sci*. 2022 (в печати).

4. **Савин И.А.**, Сенькова А.В., Марков А.В., Зенкова М.А. Идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием острого воспаления и фиброза легких. Доклад на научной конференции с элементами школы молодых ученых «Biotop 2020: актуальные вопросы современной биологии», 21-24 декабря 2020 г., г. Новосибирск, Россия.

5. **Савин И.А.**, Сенькова А.В., Марков А.В., Зенкова М.А. Поиск новых прогностических маркеров и молекулярных мишеней легочного фиброза и их валидация на мышинной модели овальбумин-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза. Доклад на научной школе-конференции для молодых ученых «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины», 22-24 ноября 2021 г., г. Новосибирск, Россия.

6. **И.А. Савин**, А.В. Сенькова, А.В. Марков, О.В. Саломатина, Н.Ф. Салахутдинов, М.А. Зенкова. Идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием острого повреждения легких и изменение их экспрессии под действием полусинтетического тритерпеноида солоксолон метила. Доклад на первой всероссийской школы для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021, 4-9 июля 2021 г., г. Новосибирск, Россия.

7. **Savin I.A.**, Markov A.V., Zenkova M.A., Sen'kova A.V. Identification of new promising markers of transition from acute inflammation to pulmonary fibrosis on the model of ovalbumin-induced asthma. Постерный доклад на всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24-28 июля 2022 г., г. Новосибирск, Россия.

8. Sen'kova A.V., **Savin I.A.**, Zenkova M.A., Markov A.V. Key genes involved in the development of acute lung injury and their association with COVID-19 and lung cancers. Постерный доклад на всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24-28 июля 2022 г., г. Новосибирск, Россия.

9. Odarenko K.V., Sen'kova A.V., **Savin I.A.**, Salomatina O.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A., Markov A.V. Molecular aspects of the effects of semisynthetic triterpenoids on LPS-driven acute lung injury and inflammation-associated epithelial mesenchymal transition of tumor cells. Постерный доклад на всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24-28 июля 2022 г., г. Новосибирск, Россия.

10. **И.А. Савин**, А.В. Сенькова, А.В. Марков, М.А. Зенкова. Идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием воспаления и опухолевой трансформации. Постерный доклад на II Объединенном научном форуме: VII съезд физиологов СНГ, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «белки и пептиды», 3-7 октября 2022 г., г. Сочи, Россия.

11. А.В. Сенькова, **И.А. Савин**, А.В. Марков, М.А. Зенкова. Поиск и валидация генов-мишеней, участвующих в развитии воспаления легких, на модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких. Устный доклад на II Объединенном научном форуме: VII съезд физиологов СНГ, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «белки и пептиды», 3-7 октября 2022 г., г. Сочи, Россия

Благодарности.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю к.м.н. Сеньковой Александре Васильевне за чуткое руководство и бесконечное терпение; 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; заведующей лабораторией д.б.н., чл.-корр. Зенковой Марине Аркадьевне за идеологическое направление и концептуальную поддержку работы; а также всем сотрудникам лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН за поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования.

Идентификация потенциальных генов мастер-регуляторов, участвующих в развитии острого и хронического воспаления легких, а также легочного фиброза, проводилась с помощью биоинформатического анализа баз данных полногеномного микрочипирования материала, полученного от мышинных моделей острого и хронического воспаления легких различной этиологии, а также от пациентов, страдающих хроническими воспалительными заболеваниями легких. Поиск потенциальных генов мастер-регуляторов включал: идентификацию дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ), функциональную аннотацию ДЭГ, составление сети белок-белковых взаимодействий и определение наиболее взаимосвязанных ДЭГ, текст-майнинг анализ, а также анализ корреляции уровня экспрессии ДЭГ и выживаемости пациентов с опухолевыми заболеваниями легких (LUAD и LUSC). Поиск баз данных полногеномного микрочипирования проводился с использованием сервиса Gene Expression Omnibus (GEO) по ключевым словам, ассоциированным с острыми и хроническими воспалительными процессами в легких. Идентификация ДЭГ между контрольными образцами и образцами с заболеванием проводилась с помощью сервиса GEO2R, который позволяет проводить сравнение между двумя и более базами данных, депонированных в GEO. Использовались значения p , скорректированные с помощью стандартного метода исключения ложноположительных результатов Бенджамина-Хохберга. Скорректированное значение $p < 0.05$ и $|\text{Изменение экспрессии}| > 1.5$ были приняты за пороговые значения. Функциональная аннотация ДЭГ была выполнена с помощью плагина ClueGo v.2.5.1 в программном обеспечении Cytoscape v.3.8.1. ДЭГ были проанализированы с помощью последних версий баз данных Gene Ontology (биологические процессы), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, REACTOME и Wikipathways. Результаты с значением $p \leq 0.05$ считались статистически значимыми. Сеть белок-белковых взаимодействий была сконструирована на основе данных, депонированных в базе данных Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Genomes (STRING), использовался показатель достоверности > 0.7 . Рассматривалось взаимодействие белков на основе следующих источников: опубликованные результаты экспериментов по высокопроизводительному секвенированию, предсказания на основе геномного окружения, ко-экспрессия, автоматический текст-майнинг и сети белок-белковых взаимодействий в других базах данных. Сети были визуализированы с помощью программного обеспечения Cytoscape как ненаправленные или иерархичные сети. Для идентификации наиболее

взаимосвязанных белков, наиболее вероятно выполняющих мастер-регуляторную роль, число связей каждого белка с его соседями было подсчитано с использованием плагина NetworkAnalyzer. За пороговое значение было принято наличие 10 связей. Белки с меньшим количеством связей исключались из анализа. Анализ совместного упоминания ДЭГ и ключевых слов, ассоциированных с патологией легких в текстах научных статей, депонированных в базе данных MEDLINE, был произведен с помощью веб-сервиса GenClip3. Поиск производился 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), asthma (астма), pulmonary fibrosis (легочной фиброз), lung fibrosis (фиброз легких), hepatic fibrosis (печеночный фиброз), liver fibrosis (фиброз печени), renal fibrosis (почечный фиброз), kidney fibrosis (фиброз почек). Анализ вовлеченности идентифицированных ДЭГ в прогрессию LUAD и LUSC, анализ корреляции экспрессии ДЭГ и выживаемости пациентов был проведен с помощью данных, депонированных в The Cancer Genome Atlas (TCGA). Также на основе данных TCGA были построены графики выживаемости Каплана-Мейера с использованием сервиса OncoLnc.

Валидация данных биоинформатического анализа была проведена с использованием *in vivo* моделей ЛПС-индуцированного ОПЛ и овалбумин (ОВА)-индуцированной бронхиальной астмы и пост-астматического фиброза. Для модели ЛПС-индуцированного ОПЛ использовались мыши линии Balb/C 6-8 недельного возраста. При проведении эксперимента, мыши были случайным образом разделены на пять групп, по 6 мышей в каждой. ОПЛ было индуцировано путем интраназального (и.н.) введения ЛПС (штамм *E. coli* 055:B5) в дозе 10 мкг на мышь под изофлурановой анестезией. В качестве соединений с известной противовоспалительной активностью были использованы полусинтетическое производное 18 β H-глицирретовой кислоты солоксолон метил (СМ) и глюкокортикостероид дексаметазон. СМ в дозе 10 мг/кг и дексаметазон в дозе 1 мг/кг растворяли в смеси диметилсульфоксид (ДМСО): кунжутное масло (1:9) и вводили мышам per os с помощью желудочного зонда за 1 час до введения ЛПС. Мышей выводили из эксперимента через 24 часа после индукции воспаления.

Для модели ОВА-индуцированной бронхиальной астмы использовались мыши линии Balb/C 6-8 недельного возраста. При проведении эксперимента мыши были случайным образом разделены на 3 группы по 9 мышей в каждой. Для индукции астмы сначала мыши были сенситизированы путем интраперитонеальной (и.п.) инъекции 20 мкг ОВА и 2 мг гидроксида алюминия (Al(OH)₃), растворенных в 200 мкл физиологического

раствора на 0, 7 и 14 день. Затем на 21, 22, 23 и 24 день мышам проводили ингаляции 2% ОВА, растворенным в физиологическом растворе. Ингаляции проводились в течение 30 мин с помощью небулайзера Omron NE-C28 Plus в индукционной камере из оргстекла. Мышей выводили из эксперимента через 24 часа и 4 недели после последней ингаляции овальбумина.

При выведении мышей из экспериментов производили забор бронхоальвеолярной жидкости для оценки клеточного состава и уровня про-воспалительных цитокинов, тканей легких для гистологического, гистохимического и иммуногистохимического исследований, а также оценки уровня экспрессии генов.

Для сбора бронхоальвеолярной жидкости легкие животных промывали 1 мл ледяного физиологического раствора. Далее образцы центрифугировали на скорости 1500 оборотов в минуту при температуре 4°C в течение 10 минут и отбирали супернатант для последующего исследования. Осажденные клетки ресуспендировали в 50 мкл физиологического раствора и проводили подсчет общего числа лейкоцитов с помощью камеры Горяева после разведения суспензии клеток в растворе Тюрка в соотношении 1:20. Для определения соотношения популяций лейкоцитов, суспензию клеток помещали на гистологическое стекло и окрашивали по Романовскому-Гимзе.

Оценку уровня про-воспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 в бронхоальвеолярной жидкости проводили с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) согласно инструкции производителя: 50 мкл супернатанта и 50 мкл раствора для образцов были перенесены в лунки с иммобилизованными моноклональными антителами к TNF- α и IL-6, к ним было добавлено 50 мкл раствора с биотинилированными антителами к TNF- α или IL-6. Данный раствор инкубировался в течение 2 ч при комнатной температуре и 400 оборотах в минуту на термостатическом шейкере ST-3M. Затем в лунки последовательно добавляли 100 мкл раствора стрептавидина, связанного с пероксидазой хрена и 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре и 400 оборотах в минуту (для стрептавидина связанного с пероксидазой хрена) и 30 мин при комнатной температуре без доступа света (для ТМБ). Перед добавлением каждого раствора лунки были промыты по 5 раз промывочным буфером. По окончании инкубации с ТМБ, стоп раствор был добавлен в каждую лунку. Измерение абсорбции проводили на длине волны 450 нм.

Была проведена морфологическая оценка структурных изменений в легких при развитии острых и хронических воспалительных процессов. Для проведения гистологического исследования легкие были зафиксированы в 10% забуференном формалине, дегидратированы в восходящих концентрациях этанола и ксилола и

заклучены в парафин. Парафиновые блоки были нарезаны на микротоме и окрашены гематоксилином и эозином. Уровень экспрессии нейтральных муцинов в ткани легких был определен с помощью окраски по Шиффу (PAS-реакция). Оценку интенсивности отложения соединительной ткани в легких проводили с помощью окраски трихромом по Массону (коллагеновые волокна) и по ван Гизону (эластиновые волокна). Для иммуногистохимического исследования, срезы легких были депарафинизированы и регидратированы. Демаскировка антигенов была проведена путем обработки в микроволновой печи при мощности 700 W. Далее образцы инкубировали с первичными антителами к TNF- α (ab212899, Abcam), Muc5ac (ab3649, Abcam), fibronectin (PA5-29578, Thermo Fisher Scientific), α -SMA (ab5694, Abcam), collagen I (MA1-26771, Thermo Fisher Scientific) и collagen IV (MA1-22148, Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Затем, срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, обрабатывали 3,3'-диаминобензидином (Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit, ab64261, Abcam) и докрашивали гематоксилином Майера. Все гистологические срезы анализировали с помощью микроскопа AxioStar Plus, оснащенного камерой AxioCam MRc5 (Zeiss) при увеличении $\times 100$ и $\times 400$.

Оценку уровней экспрессии идентифицированных потенциальных мастер-регуляторов проводили с помощью qRT-PCR с зондами TaqMan. Суммарную РНК выделяли из легких экспериментальных животных с помощью реагента TRIzol согласно инструкции производителя. Ткань легких помещали в 1.5 мл пробирки, наполненные 1 г лизирующей матрицы D и 1 мл реагента TRIzol, и гомогенизировали на скорости 6.0 м/с в течение 40 сек. После гомогенизации содержимое пробирок кроме лизирующей матрицы переносили в новые 1.5 мл пробирки. кДНК получали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащий ОТ-буфер, 0.5 мкг суммарной РНК, 250 единиц обратной ревертазы M-MuLV-RN и 100 микромоляр гексануклеотидного праймера. Реакцию синтеза кДНК проводили при 42°C в течение 60 минут. Амплификация кДНК проводилась в объеме 25 мкл, в котором содержалось 5 мкл кДНК, 12.5 мкл HS-qPCR двухкратного мастер-микса, 0.25 микромоляр специфических прямых и обратных праймеров, а также 0.25 микромоляр зондов с красителем ROX (для генов домашнего хозяйства) и FAM (для идентифицированных генов) (таблица с последовательностями праймеров приведена в Приложении). Для получения специфических продуктов использовали 50 циклов: 94°C в течение 10 секунд; 60°C в течение 30 секунд. Список использованных ген-специфических праймеров приведен в Приложении. Относительный уровень экспрессии генов был нормализован на ген домашнего хозяйства HPRT по методу $\Delta\Delta Ct$.

Результаты и обсуждение.

Идентификация ключевых генов, вовлеченных в развитие острого воспаления легких различной этиологии.

Для идентификации потенциальных ключевых генов, регулирующих развитие острого воспаления в легких как одного из проявлений ОПЛ, оценивали изменение экспрессии генов в воспаленной ткани по сравнению со здоровыми легкими путем ре-анализа данных кДНК микрочипов из следующих наборов данных: GSE58654 (гипероксия), GSE80011 (грипп), GSE130936 (ЛПС) и GSE94522 (блеомицин) с помощью сервиса GEO2R (Рисунок 1). Анализ выявленных дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) (изменение экспрессии > 1.5 , $p > 0.05$) с помощью диаграммы Венна приведен на Рисунке 1А. Было выявлено 58 ДЭГ, общих для всех проанализированных наборов данных. Функциональная аннотация идентифицированных ДЭГ показала достоверное обогащение по терминам, ассоциированным с регуляцией продукции цитокинов, иммунным ответом и легочным фиброзом.

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 1Б). Далее для идентификации регуляторной роли общих ДЭГ, были реконструированы сети белок-белковых взаимодействий для всех проанализированных наборов данных с помощью базы данных STRING. Затем в сконструированных сетях была установлена степень взаимосвязанности каждого из 58 ДЭГ, ассоциированных с ОПЛ (Рисунок 1В).

В топ-10 взаимосвязанных генов входили: (а) про-воспалительные цитокины и хемокины (*Il-6*, *Cxcl13*, *Ccl2*), которые принимают участие в широком спектре воспалительных заболеваний [22–25] и (б) регуляторы взаимодействий клеток с другими клетками и внеклеточным матриксом, включая *Timp1*, ингибитор матриксных металлопротеиназ, ответственных за деградацию внеклеточного матрикса [26,27]; *Adam8*, мембранный белок, ответственный за коммуникации между клетками, а также клетками и внеклеточным матриксом [28]; *Thbs1*, адгезивный гликопротеин, который также опосредует взаимодействия между клетками и внеклеточным матриксом [29]; а также *Serpina3n* и *Serpine1*, ингибиторы сериновых протеаз, вовлеченные в ремоделирование внеклеточного матрикса и имеющие отношение к развитию воспалительных процессов [30,31]. Более того, в топ-10 ОПЛ ассоциированных ключевых генов также входили *Socs3*, супрессирующий регулятор цитокинового сигналинга и сигнального пути JAK1/STAT3

[32], и *Rtp4*, ген, индуцируемый интерфероном I типа, вовлеченный в реакции иммунного ответа и противовирусной защиты [33] (Рисунок 1В).

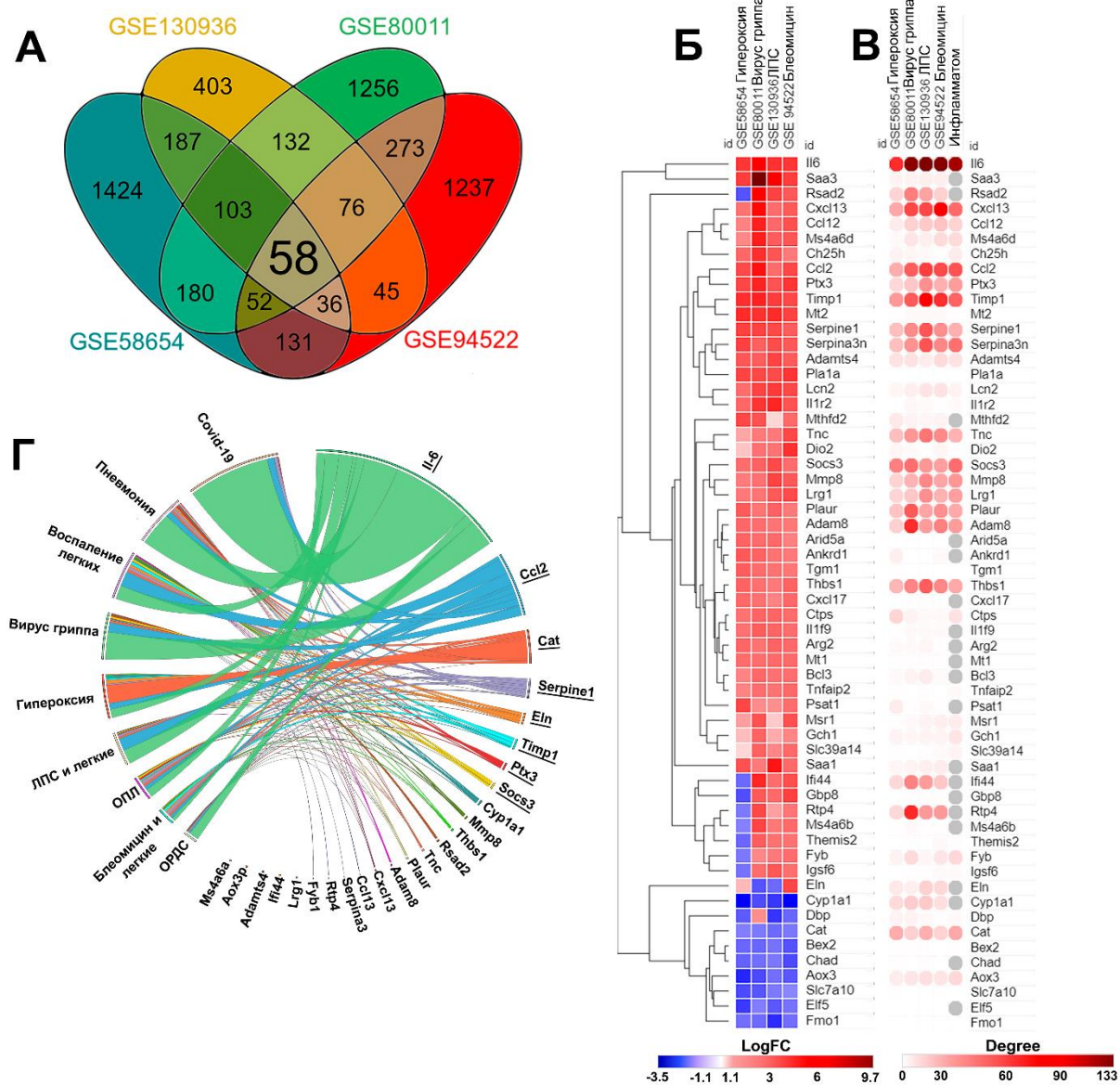


Рисунок 1. Ключевые гены, вовлеченные в развитие остро́го повреждения легких (ОПЛ), идентифицированные с помощью биоинформатического анализа. (А) Венн диаграмма, иллюстрирующая ДЭГ, общие для четырех независимых наборов данных. **(Б)** Циркос плот, иллюстрирующий результаты текст-майнингового анализа. **(В)** Тепловая карта, демонстрирующая уровень экспрессии ДЭГ в независимых наборах данных. **(Г)** Тепловая карта, демонстрирующая степень взаимосвязанности ДЭГ в независимых наборах данных.

Как показано на Рисунке 1В, к числу ДЭГ, обладающих высоким показателем взаимосвязанности и входящих в топ-25 ключевых генов, входят регуляторы гомеостаза внеклеточного матрикса (урокиназовый активатор плазминогена (*Plaur*), матриксная металлопротеиназа 8 (*Mmp8*), эластин (*Eln*), металлопептидаза ADAM с тромбоспондином 1 мотив 4 (*Adamts4*), тенасцин С (*Tnc*)), участники иммунного ответа (интерферон индуцируемый протеин 44 (*Ifi44*), вайперин (*Rsad2*), пентраксин 3 (*Ptx3*), липокалин 2

(*Lcn2*)), регуляторы передачи сигналов (обогащенный лейцином альфа-2 гликопротеин 1 (*Lrg*), адаптивный протеин, стимулирующий адгезию и дегрануляцию (*Fyb1*), мембранный 4-доменный белок А6А (*Ms4aba*)), а также гены, кодирующие ключевой антиоксидантный фермент каталазу (*Cat*), цитохром Р450 (*Cyp1a1*), и псевдоген альдегид оксидазы (*Aox3p*).

Далее, для анализа степени исследованности этих 25 узловых генов и их белковых продуктов относительно легочного воспаления/повреждения, совместное упоминание названий генов и ключевых слов, ассоциированных с легочной патологией, было проанализировано в текстах научных статей, депонированных в базе данных MEDLINE, с помощью веб-сервиса GenCLiP3 (Рисунок 1Г). 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 1Г). Кроме того, текст-майнинговый анализ включал в себя как гены из списка топ-10 взаимосвязанных генов (*Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*), так и гены из списка топ-25 взаимосвязанных генов: *Ptx3*, один из компонентов гуморального иммунитета, выполняющий сложную регуляторную роль в воспалительных процессах, а также в процессах организации и ремоделирования внеклеточного матрикса [34], *Cat*, ключевой фермент антиоксидантной системы [35], и *Eln*, главный компонент эластиновых волокон, которые являются неотъемлемой частью внеклеточного матрикса и содержание которых может как увеличиваться, так и уменьшаться при развитии воспаления [36–39].

Учитывая участие этих генов в регуляции повреждения легких и их узловую позицию в ОПЛ-ассоциированных сетях, *Il-6* (место в списке генов = 1), *Timp1* (3), *Ccl2* (4), *Socs3* (7), *Serpine1* (9), *Ptx3* (16), *Cat* (18), и *Eln* (21) были выбраны для валидации их участия в процессе ОПЛ на *in vivo* модели острого повреждения легких.

Модель острого повреждения легких.

Было подробно изучено развитие ЛПС-индуцированного ОПЛ у мышей без лечения и после терапии противовоспалительными соединениями: мышам вводили полусинтетический тритерпеноид солоксолон метил (СМ) и кортикостероид дексаметазон за 1 ч до введения ЛПС (Рисунок 2А). Изменения в легких анализировали через 24 часа после введения ЛПС. Как видно на Рисунке 2Б, интраназальное введение ЛПС приводило к развитию 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 TNF- α в 261 раз, а также

нарастанием в ткани легких уровня TNF- α и IL-1 β в 1,9 и 23 раза, соответственно, по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 2В и 2Г).

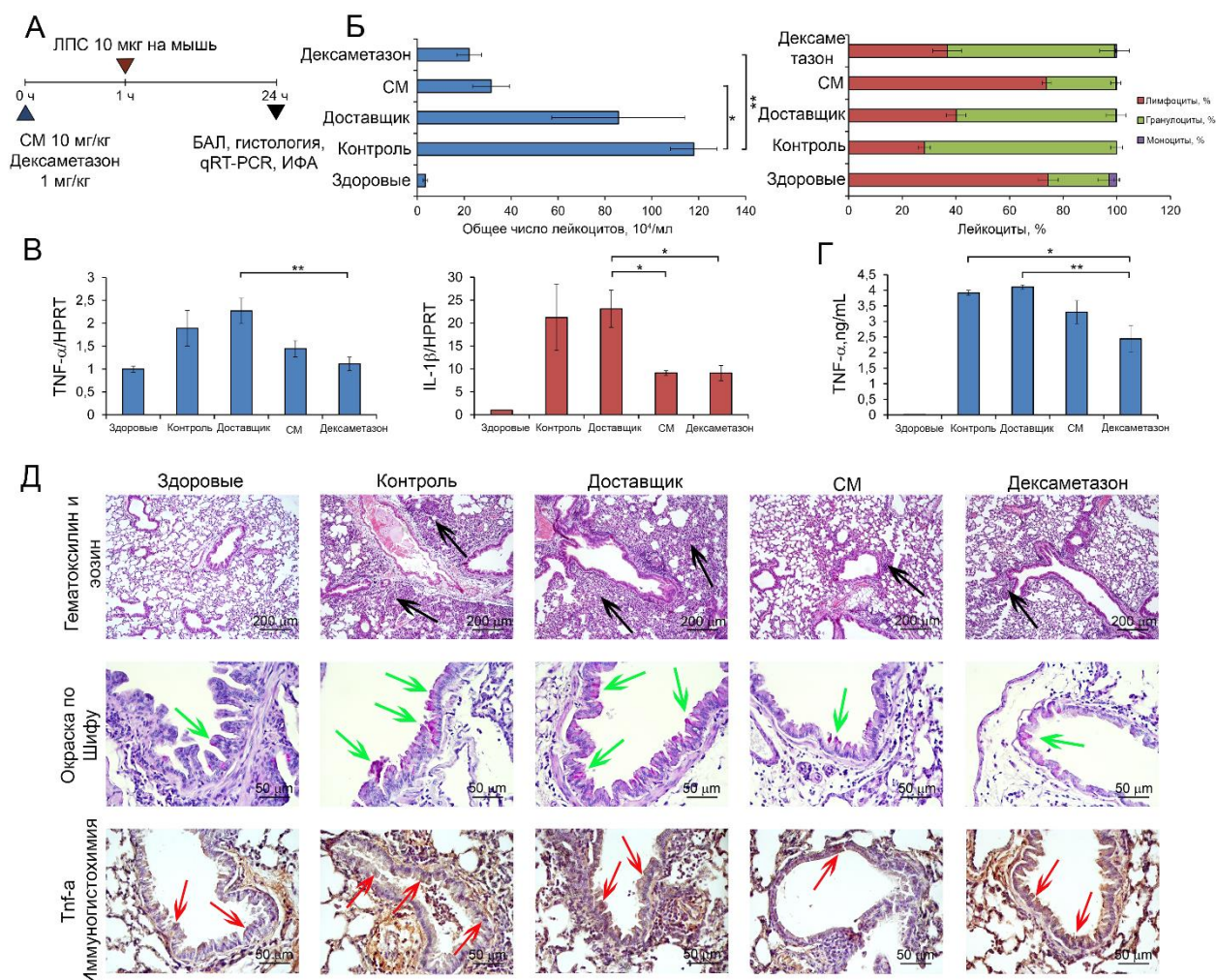


Рисунок 2. Солоксолон метил (СМ) и дексаметазон эффективно подавляют развитие ОПЛ *in vivo*. (А) Схема эксперимента. (Б) Общее число (слева) и соотношение субпопуляций (справа) лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости экспериментальных животных. (В, Г) Уровни про-воспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β в ткани легких и бронхоальвеолярной жидкости. (Д) Репрезентативные гистологические фотографии ткани легких здоровых мышей, а также мышей с ОПЛ без лечения и получавших противовоспалительную терапию.

Гистологически, ткань легких мышей с ОПЛ характеризовалась значительной нейтрофильной воспалительной инфильтрацией, циркуляторными нарушениями (венозное полнокровие, кровоизлияния, интерстициальный и альвеолярный отеки) и деструктивными изменениями в бронхиальном и альвеолярном эпителии (Рисунок 2Д, верхняя панель). Более того, присутствовала реактивная гиперпродукция слизи (Рисунок 2Д, средняя панель). Иммуногистохимическое окрашивание срезов легких антителами к TNF- α показало, что здоровые легкие характеризуются базальной экспрессией данного цитокина, а введение ЛПС значительно увеличило количество TNF- α в ткани легких, особенно в бронхиальном эпителии, по сравнению со здоровыми животными.

Введение противовоспалительных соединений СМ и дексаметазона предотвращало развитие ЛПС-индуцированного острого воспаления в дыхательной системе мышей, снижая общее число лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости в 2,7 и 5,3 раза, соответственно, по сравнению с контролем (Рисунок 2Б). Оценка уровня провоспалительных цитокинов в ткани легких и бронхоальвеолярной жидкости показала, что оба противовоспалительных соединения значительно уменьшали экспрессию TNF- α и IL-1 β в легких мышей с ОПЛ по сравнению с контролем (Рисунок 2В, 2Г).

Гистологический анализ показал, что введение противовоспалительных соединений приводило к значительному подавлению воспалительных изменений в легких мышей с ОПЛ, вызывая значительное уменьшение воспалительной инфильтрации, циркуляторных и деструктивных изменений в ткани легких (Рисунок 2Е, верхняя панель). Окраска по Шиффу показала, что СМ и дексаметазон эффективно подавляли реактивную гиперпродукцию слизи (Рисунок 2Е, средняя панель). Иммуногистохимическая окраска легких показала, что терапия СМ, но не дексаметазоном, значительно снижала уровень TNF- α в легких (Рисунок 2Д, нижняя панель).

Данные результаты демонстрируют, что введение ЛПС приводит к развитию воспалительного процесса в легких, который в значительной степени подавляется противовоспалительными соединениями с различным механизмом действия. Таким образом, описанная мышьяная модель ОПЛ может использоваться как платформа для валидации роли ключевых генов в развитии легочного воспаления и оценки их чувствительности к противовоспалительной терапии.

Анализ паттернов экспрессии генов, ассоциированных с развитием ОПЛ.

Уровни экспрессии генов *Il-6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, *Ptx3*, и *Socs3* (Рисунок 1Б, подчеркнутые гены), идентифицированных как мастер-регуляторы развития ОПЛ, были проанализированы с помощью qRT-PCR с зондами TaqMan в ткани легких.

Легкие здоровых животных характеризовались очень низким уровнем экспрессии исследуемых генов, который был принят нами за 1 (Таблица 1), в то время как введение ЛПС приводило к значительному увеличению их экспрессии. Так, например, уровень экспрессии *Il-6* возрос в 260 раз, *Ccl2* в 250, *Timp1* в 120, *Socs3* в 35, *Serpine1* в 25, *Ptx3* в 4 и *Eln* в 2 раза. Падение уровня экспрессии наблюдалось только у гена *Cat* в 2 раза (Таблица 1).

Терапия СМ или дексаметазоном в некоторой степени предотвращала иррегуляцию генов, ассоциированных с ОПЛ, в то же время уровень экспрессии *Cat* увеличивался после введения СМ и дексаметазона по сравнению с контролем.

Таким образом, экспрессия некоторых генов, идентифицированных в качестве регуляторов развития воспалительного процесса при ОПЛ (*Il6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, и *Socs3*), значительно изменялась при развитии ОПЛ, а также при проведении противовоспалительной терапии СМ и дексаметазоном, что указывает на участие указанных генов в развитии воспалительного ответа.

Таблица 1. Уровень экспрессии мастер-регуляторов ОПЛ в ткани легких экспериментальных животных.

ID Гена	Экспериментальные данные*, Изменение экспрессии (Разы)			
	ОПЛ**	Доставщик**	СМ**	Дексаметазон**
<i>Il-6</i>	258.8	252.8	137.9	167.3
<i>Ccl2</i>	244.9	310.6	164.6	179.6
<i>Cat</i>	-1.9	-2.6	-2.1	-2.1
<i>Serpine1</i>	25.2	36.4	18.5	20.8
<i>Eln</i>	2.1	1.4	-1.2	-1.5
<i>Timp1</i>	117.8	154.6	108.2	98.2
<i>Ptx3</i>	3.5	3.9	4.0	3.4
<i>Socs3</i>	35.0	37.7	23.1	24.4

*Уровень экспрессии был нормализован на уровень экспрессии гена в ткани легких здоровых мышей.

Идентификация и валидация ключевых генов развития COVID-19 на *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ.

58 общих ДЭГ, участвующих в развитии легочного воспаления у мышей (Рисунок 1А), были пересечены с генами, которые участвуют в развитии COVID-19. Данный анализ показал, что у 15 из 58 ОПЛ-ассоциированных ДЭГ повышается уровень экспрессии при развитии изменений в легких, индуцированных SARS-CoV-2, из которых 13 были up-регулированы и 2 down-регулированы (Рисунок 3А). Анализ сети белок-белковых взаимодействий, построенной из генов, ассоциированных с развитием COVID-19, показал, что несколько идентифицированных генов (*SAA1*, *RSAD2*, *IFI44*, *RTP4* и *CCL2*) обладали высоким уровнем взаимосвязанности в данной сети (от 21 до 44 связей), что говорит об их возможной регуляторной роли в развитии повреждения легких, индуцированного инфекцией SARS-CoV-2 (Рисунок 3Б). Эти данные согласуются с данными текст-майнингового анализа, где наблюдается совместное упоминание *CCL2*, *MMP8* и COVID-19 в текстах научных статей (Рисунок 1Б).

Затем были идентифицированы первые соседи 15 общих генов в COVID-19 ассоциированном регуломе (Рисунок 3В) с последующей функциональной аннотацией реконструированной сети. Данный анализ продемонстрировал, что ОПЛ ассоциированные гены и их партнеры вовлечены в регуляцию процессов, связанных с иммунным ответом на вирусную и бактериальную инфекцию, что говорит о возможной регуляторной роли ряда ОПЛ-ассоциированных ДЭГ в развитии COVID-19.

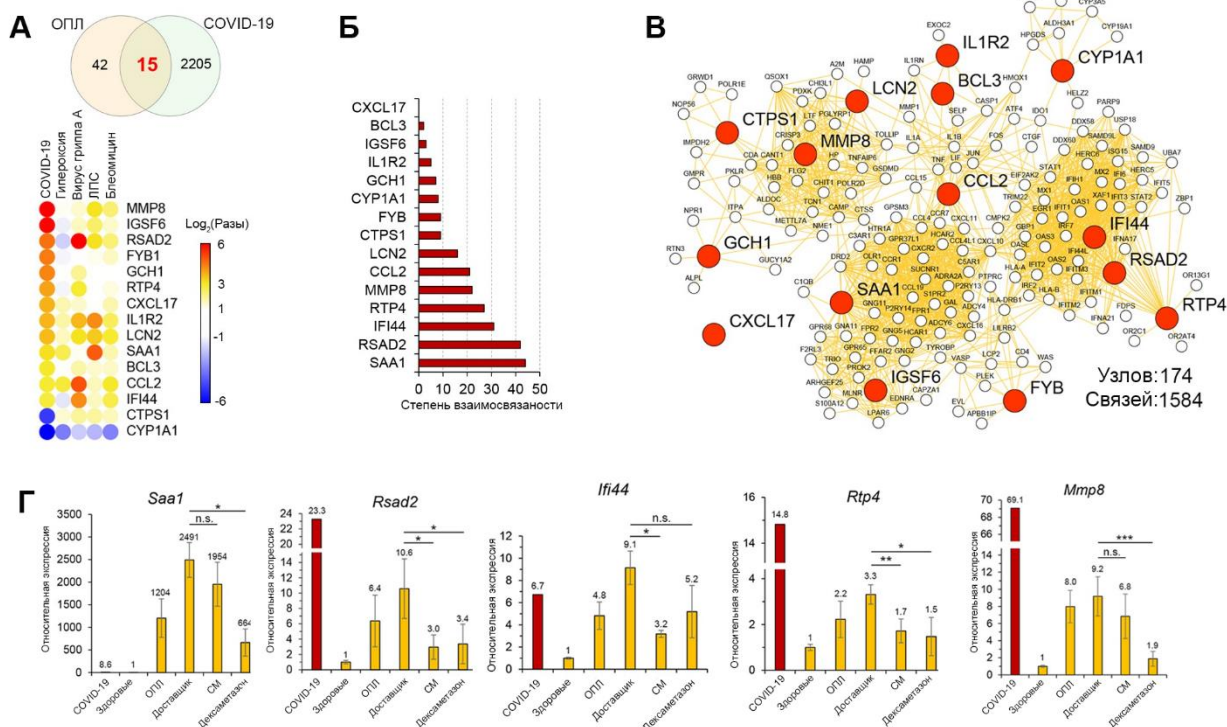


Рисунок 3. Вовлечение ОПЛ-ассоциированных ДЭГ в регуляцию повреждения легких, индуцированного с инфекцией SARS-CoV-2 у людей. (А) Верхняя панель: Венн диаграмма общих генов, регулирующих развитие ОПЛ у мышей и COVID-19 у человека. Нижняя панель: Тепловая карта, иллюстрирующая экспрессию 15 общих генов. (Б) Значение степени взаимодействия ОПЛ-ассоциированных генов в регуломе COVID-19. (В) Сеть белок-белковых взаимодействий, показывающая первых соседей 15 генов, общих для ОПЛ мышей и COVID-19 человека. (Г) Уровень экспрессии топ-5 ОПЛ-ассоциированных генов в регуломе COVID-19 в легких здоровых и экспериментальных животных.

Затем уровень экспрессии топ-5 ОПЛ-ассоциированных генов, наиболее взаимосвязанных с регуломом COVID-19 (*Saa1*, *Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4* и *Mmp8*), был проанализирован в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ. Введение ЛПС значительно увеличило экспрессию всех вышеуказанных генов в ткани легких (Рисунок 3Г). Терапия мышей СМ и дексаметазоном привела к значительному снижению ЛПС-индуцированного повышения экспрессии ОПЛ/COVID-19 ассоциированных генов – 4 из 5 (*Saa1*, *Rsad2*, *Rtp4* и *Mmp8*) в случае дексаметазона и 3 из 5 (*Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4*) в случае СМ (Рисунок 3Г). Таким образом, данные результаты подтверждают наличие «трансляционного моста» между регуломами ОПЛ мышей и людей.

Связь идентифицированных ОПЛ-ассоциированных ключевых генов с прогрессирующим злокачественных новообразований легких.

Учитывая близкую связь острого и хронического воспаления, легочного фиброза, метаплазии, дисплазии и злокачественной трансформации, была проанализирована связь идентифицированных ОПЛ-ассоциированных генов с выживаемостью пациентов с аденокарциномой легких (LUAD) и плоскоклеточным раком легких (LUSC) с помощью базы данных TCGA (Рисунок 4). Анализ показал, что из топ-25 ключевых генов, ассоциированных с острым воспалением легких, 14 могут влиять на скорость прогрессирования злокачественных новообразований легких и ассоциированы с ухудшением прогноза пациентов с LUAD и LUSC. Уп-регуляция *IL-6*, *CCL2*, *PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1*, *MMP8*, *PLAUR*, *ADAM8*, *THBS1*, и *SERPINA3* была ассоциирована с ухудшением прогноза выживаемости у 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 как маркеров тяжести злокачественных новообразований легких.

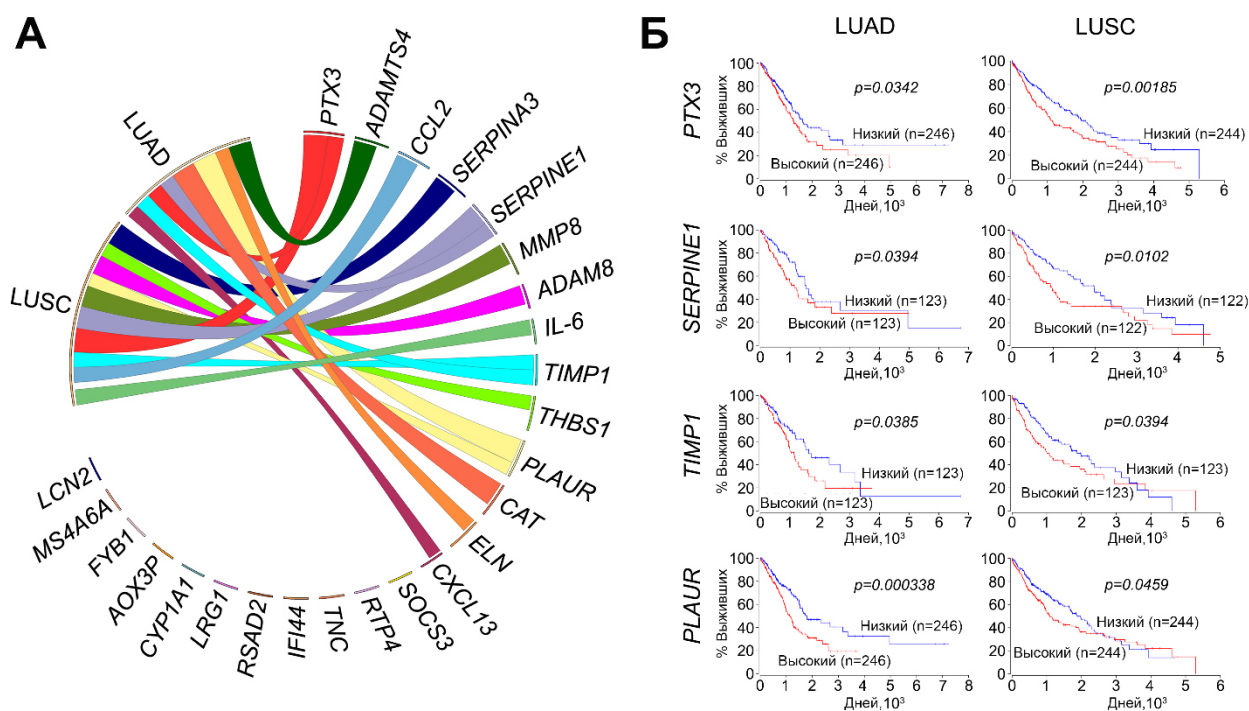


Рисунок 4. Ассоциация идентифицированных ДЭГ с выживаемостью пациентов с аденокарциномой легких (LUAD) и плоскоклеточным раком легких (LUSC). (А) Данные анализа выживаемости, представленные в виде Циркос-плота. Ширина полосы прямо пропорциональна величине p . (Б) Выживаемость пациентов с LUAD и LUSC в зависимости от уровня экспрессии конкретного гена в ткани легких.

В результате литературного поиска было обнаружено, что большинство из исследуемых генов (*IL-6*, *CXCL13*, *TIMP1*, *CCL2*, *ADAM8*, *THBS1*, *SOCS3*, *SERPINA3*, *SERPINE1*, *PLAUR*, *TNC*, *MMP8*, *IFI44*, *RSAD2*, *PTX3*, *LRG1* и *ELN*) вовлечены в патогенез неопухолевых хронических заболеваний легких, которые могут служить фоном для злокачественной трансформации, таких как идиопатический легочной фиброз [40,41], хронический бронхит, хроническая эмфизема и хроническая обструктивная болезнь легких [42,43], бронхоэктатическая болезнь легких и муковисцидоз [44,45], а также системный склероз, сопровождающийся легочным фиброзом [46,47].

Таким образом, показано, что идентифицированные ОПЛ-ассоциированные ключевые гены вовлечены в развитие не только острого воспаления легких, вызванного различными этиологическими факторами, но и в хронической легочной патологии и злокачественной трансформации легких.

Идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием ОВА-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза.

Для идентификации ключевых генов, ассоциированных с астматическим воспалением и пост-астматическим фиброзом легких, были проанализированы уровни экспрессии генов в легких мышей с астмой в сравнении с легкими здоровых мышей с помощью ре-анализа кДНКовых данных полногеномного микрочипирования (GSE41665, GSE116504, GSE122197, GSE27066 и GSE50176), депонированных в базе данных GEO с использованием сервиса GEO2R (Рисунок 5). Анализ диаграммы Венна выявил 47 ДЭГ, общих для всех наборов данных (Рисунок 5А). Функциональная аннотация выявила, что данные ДЭГ ассоциированы с такими процессами, как регуляция хемокиновых сигнальных путей, хемотаксис эозинофилов и дифференцировка эпителиальных клеток легких, которые хорошо изучены в отношении развития астмы [48].

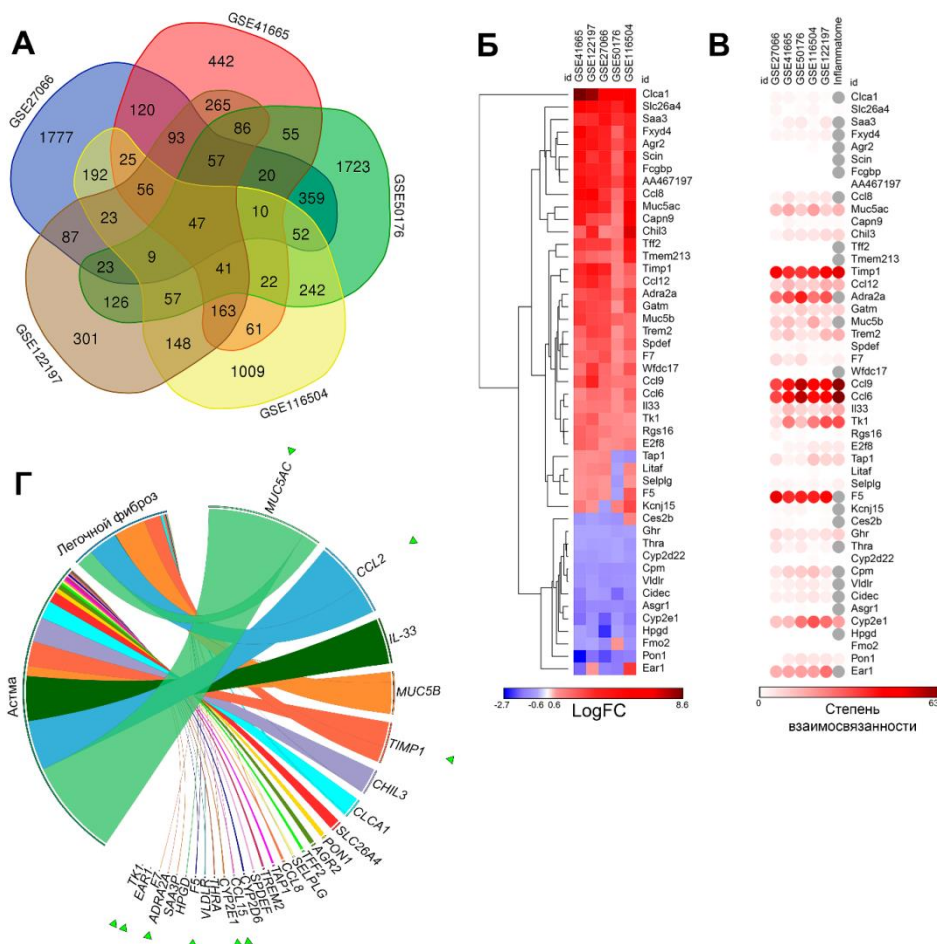


Рисунок 5. Ключевые гены, вовлеченные в развитие ОВА-индуцированной астмы. (А) Венн-диаграмма, показывающая общие гены для 5 независимых наборов транскриптомных данных. **(Б)** Тепловая карта, демонстрирующая уровень экспрессии 47 общих ДЭГ в независимых наборах транскриптомных данных. **(В)** Тепловая карта, демонстрирующая уровень взаимосвязанности 47 общих ДЭГ в независимых наборах транскриптомных данных. **(Г)** Совместное упоминание идентифицированных ДЭГ с ключевыми словами «asthma» и «pulmonary fibrosis», визуализированное с помощью Циркос-плота. Зеленые треугольники обозначают топ-10 взаимосвязанных генов.

Далее выявленные ДЭГ были кластеризованы по уровню их экспрессии с помощью метода Евклидовых дистанций, в результате чего были сформированы два кластера, в которых содержались 34 up-регулируемых и 13 down-регулируемых генов (Рисунок 5В). Дальнейший анализ показал, что некоторые гены обладают высокой степенью взаимосвязанности и могут являться вероятными участниками патогенеза астмы (Рисунок 5Г). К топ-10 взаимосвязанных генов относились:

1) гены, кодирующие про-воспалительные хемокины (*Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl12*), участвующие в развитии широкого спектра воспалительных заболеваний, включая воспаление дыхательных путей [49–52];

2) ингибитор матричной металлопротеиназы *Timp1*, повышенный уровень экспрессии которого утяжеляет течение некоторых легочных заболеваний, ассоциированных с воспалением, фиброзом и злокачественной трансформацией [53–56];

3) компонент слизи дыхательных путей *Muc5ac*, который синтезируется в больших количествах при развитии астмы, ХОБЛ и легочного фиброза [57–61];

4) фактор коагуляции *F5*, участвующий в превращении протромбина в тромбин и, таким образом, в развитии воспаления легких [62];

5) цитохром *Cyp2e1*, член семейства цитохрома P450, вовлеченный в метаболизм ксенобиотиков и развитие астмы [63];

6) адренергический рецептор *Adra2a* и транскрипционный фактор *Ear1*, вовлеченные в регуляцию симпатической нервной системы [64] и метаболические процессы [65], соответственно;

7) тимидин киназа 1 *Tk1*, фермент, участвующий в репарации ДНК и используемый в качестве диагностического и прогностического биомаркера при различных новообразованиях, включая и аденокарциному легких [66,67].

Дополнительно была определена степень исследованности идентифицированных ДЭГ в области астмы и ее хронизации. Был проведен анализ совместного упоминания человеческих ортологов данных генов и ключевых слов «asthma» (астма) или «pulmonary fibrosis» (легочной 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 5Б), в число которых входили 9 из топ-10 генов, выявленных анализом сети белок-белковых взаимодействий: *Muc5ac*, *Ccl12* (человеческий ортолог *CCL2*), *Muc5b*, *Timp1*, *Ccl6* и *Ccl9* (человеческий ортолог *CCL15*), *Cyp2e1*, *F5*, и *Adra2a*.

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

Для идентификации генов, которые могли бы быть вовлечены в развитие пост-астматического фиброза, была сконструирована сеть белок-белковых взаимодействий, состоящая из 10 идентифицированных ключевых генов и их первых соседей, содержащихся в уже проанализированном астматическом регуломе (первые соседи должны присутствовать хотя бы в 3 из 5 проанализированных наборов данных) (Рисунок 6А). Оказалось, что сконструированная сеть содержала в себе 4 отдельных модуля: первый включал в себя 7 из 10 ключевых генов (*Timp1*, *F5*, *Ccl12*, *Ccl6*, *Ccl9*, *Adra2a* и *Ear1*) и их партнеров, в то время как три других модуля содержали по одному гену – *Tk1*, *Muc5ac* и *Cyp2e1* (Рисунок 6А). Функциональная аннотация топ-10 ключевых генов и их первых соседей показала, что они вовлечены в процессы, ассоциированные не только с острой астмой, но и с ремоделированием легких и фиброзом.

Для идентификации возможных маркеров перехода острого астматического воспаления в пост-астматический фиброз, 103 астма-специфичных ДЭГ (топ-10 взаимосвязанных генов и 93 их первых соседей) были пересечены с ключевыми генами, участвующими в патогенезе легочного фиброза согласно базе данных DisGeNET. Анализ диаграммы Венна выявил 24 общих генов (Рисунок 6Б). Анализ астма-ассоциированных сетей белок-белковых взаимодействий показал, что все 24 гена характеризуются высокой степенью взаимосвязи (Рисунок 6В). К данным генам относятся следующие ДЭГ:

- 1) про-воспалительные цитокины/хемокины и их рецепторы (*Ccr3*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Cxcl12*, *Ccl2*);
- 2) регуляторы внеклеточного матрикса (*Fnl*, *Timp1*, *Thbs1*, *Tnc*, *Mmp2*, *Spp1*);
- 3) компоненты системы комплемента (*C3*, *C3ar1*, *Cfd*);
- 4) инсулиноподобный фактор роста и его рецептор (*Igf1*, *Igf1r*);
- 5) муцины *Muc5ac*, *Muc5b*;
- 6) белки антиоксидантной системы (*Cat* и *Cyp2e1*);
- 7) регуляторы процессов бронхоконстрикции (*Cysl1r1*), врожденного иммунитета (*Arg1*), 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 [68], был произведен поиск ассоциации данных генов не только с легочным фиброзом, но и с фиброзом печени и почек (Рисунок 6Г). Почти все гены были в той или иной степени связаны с фибротическими заболеваниями, а 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.

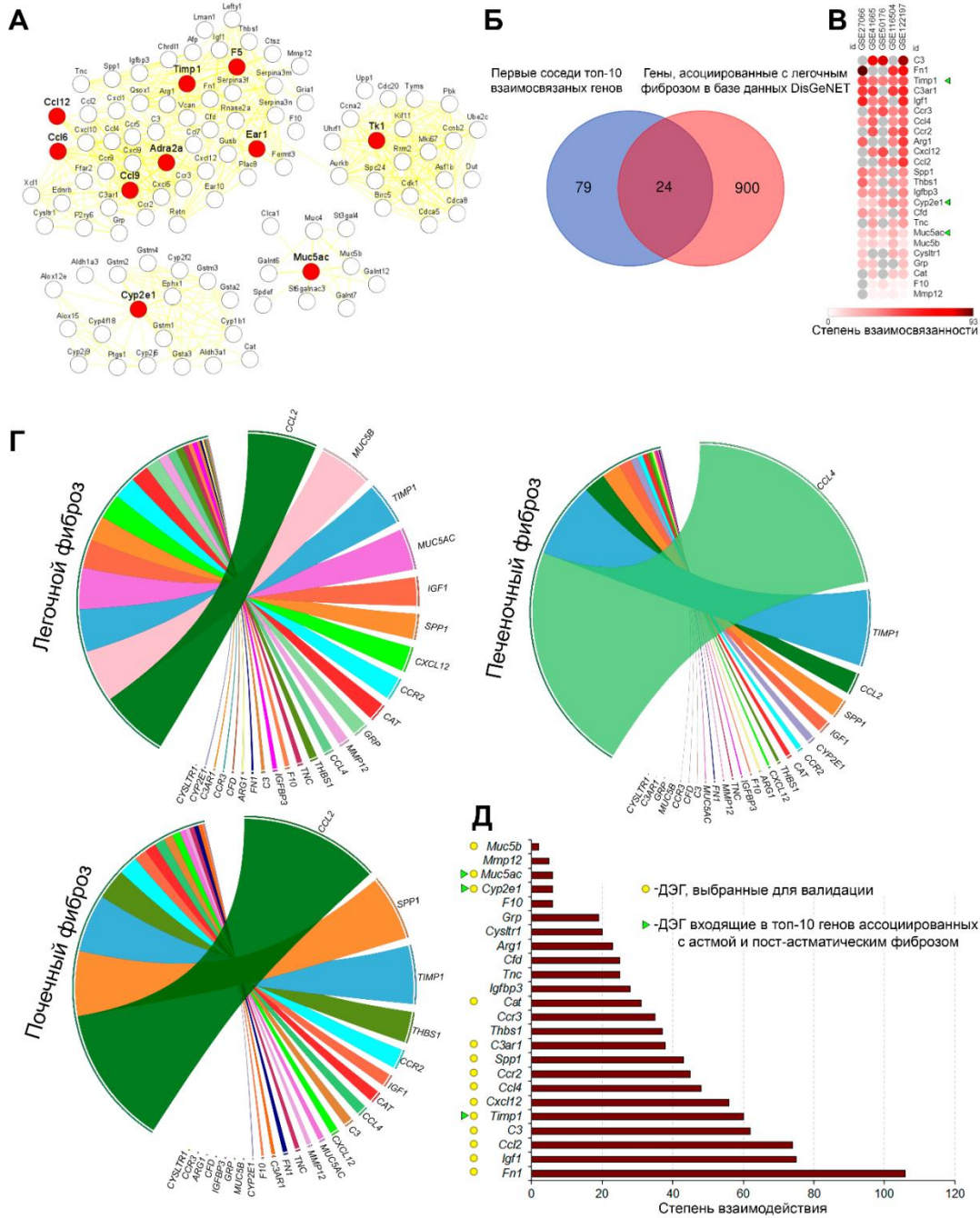


Рисунок 6. Вовлеченность ключевых генов, ассоциированных с ОВА-индуцированной астмой, в развитие легочного фиброза. (А) Сеть белок-белковых взаимодействий, сконструированная из топ-10 взаимосвязанных генов и их первых соседей. **(Б)** Диаграмма Венна, демонстрирующая гены, общие между топ-10 взаимосвязанных генов и их первых соседей, и генов, ассоциированных с развитием легочного фиброза в базе данных DisGeNET. **(В)** Тепловая карта, показывающая степень взаимосвязанности 24 общих генов в каждом из независимых наборов транскриптомных данных. **(Г)** Анализ совместного упоминания 24 общих генов с ключевыми словами, ассоциированными с фиброзом легких, печени и почек, визуализированный с помощью Циркос плота. **(Д)** Степень взаимосвязанности 24 общих генов в сети белок-белковых взаимодействий, сконструированной из генов, ассоциированных с фиброзом легких, согласно базе данных DisGeNET.

Для оценки степени взаимосвязанности идентифицированных генов с регулоном легочного фиброза, была сконструирована сеть белок-белковых взаимодействий из всех ассоциированных с фиброзом генов согласно базе данных DisGeNET (Рисунок 6Д). Оказалось, что большинство проанализированных генов, в том числе *Fnl*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3* и *Timp1*, обладали большим количеством взаимосвязей с фибротическим регулоном.

Учитывая проведенный анализ, топ-10 астматических генов, наиболее связанных с регулоном легочного фиброза (*Fnl*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Cxcl12*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Spp1*, *C3ar1*), *Cat*, выполняющий важную роль в развитии фиброза различных органов [69–71], а также *Сур2е1* и *Мис5ас/Мис5б*, более характерные для фиброза печени и легких соответственно, были выбраны для дальнейшей валидации на мышинной модели ОВА-индуцированной астмы.

Модель ОВА-индуцированной астмы.

Мыши линии Balb/C были сенситизированы с помощью трех последовательных интраперитонеальных инъекций 20 мкг ОВА вместе с 2 мг Al(OH)₃ на 1, 7 и 14 день, и последующей четырехкратной ингаляцией 2% раствора ОВА на 21, 22, 23 и 24 дни (Рисунок 7А). Мышей выводили из эксперимента через 24 часа (острая фаза) и 4 недели (подострая фаза) после последней ингаляции ОВА, проводили забор бронхоальвеолярной жидкости и ткани легких для гистологического анализа и qRT-PCR.

Ингаляции ОВА приводили к развитию острого воспаления в дыхательной системе мышей, которое характеризовалось повышением общего числа лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости в 44 раза, представленное в основном субпопуляцией гранулоцитов и сопровождаемое увеличением уровня TNF- α и IL-6 в 2,3 и 3,9 раз, соответственно, по сравнению со здоровыми животными (Рисунок 7Б). Гистологически, легкие мышей с ОВА-индуцированной астмой характеризовались воспалительной инфильтрацией, представленной гранулоцитами с примесью моноцитов/макрофагов, и локализованной вокруг бронхов (Рисунок 7В). Гиперпродукция слизи, которая является патогномоничным симптомом астмы и идентифицируется с помощью реакции Шиффа, была обнаружена в бронхиальном эпителии мышей с ОВА-индуцированной астмой в острую фазу воспаления легких (Рисунок 7В). Окраска легких на компоненты внеклеточного матрикса по ван Гизону и трихромом по Масону показала базальную окраску как у здоровых мышей, так и у мышей с острой астмой (Рисунок 7В). Иммуногистохимическая окраска антителами к α -SMA не выявила значительной разницы между здоровыми мышами и мышами с острой фазой астматического воспаления.

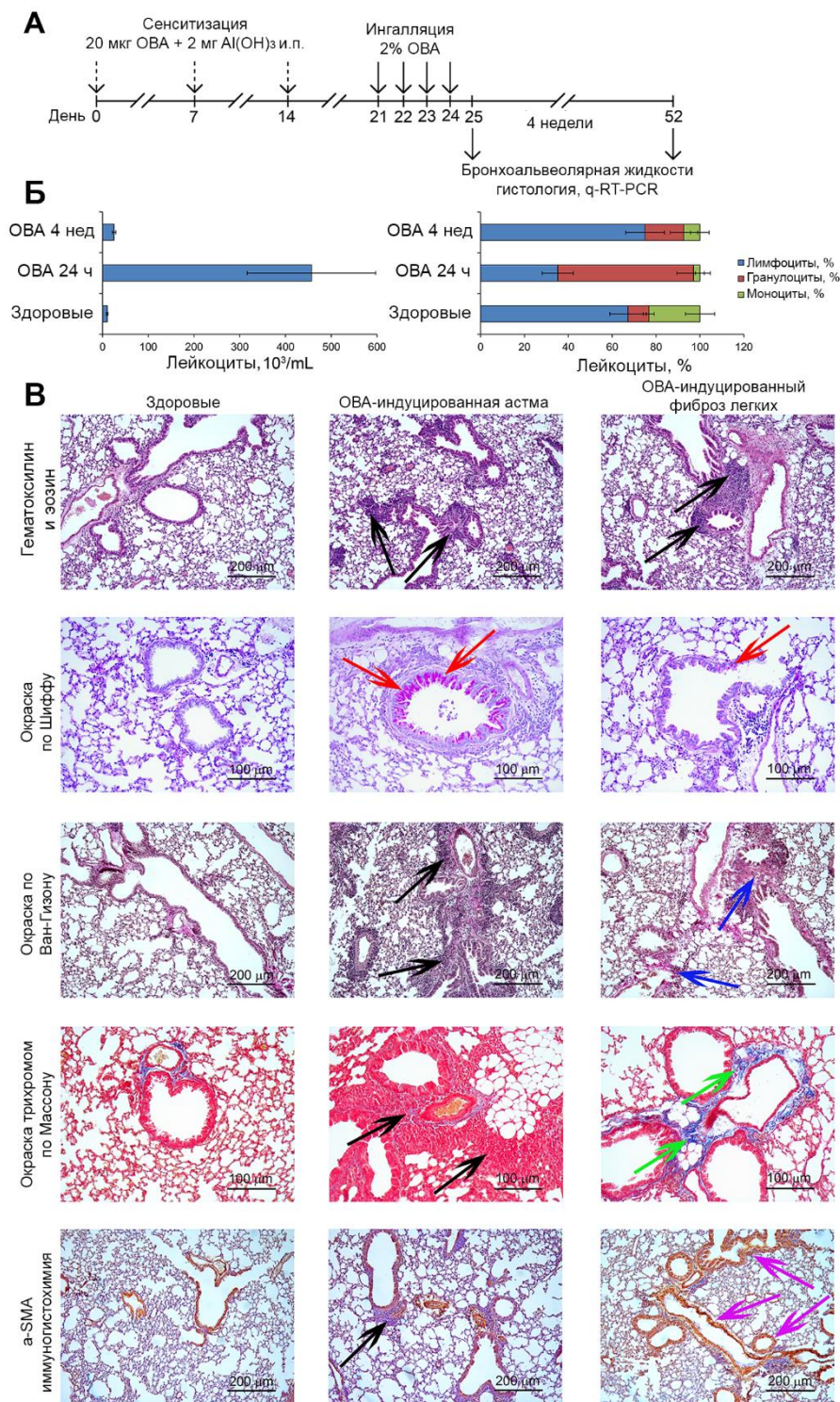


Рисунок 7. Модель ОВА-индуцированной астмы. (А) Схема эксперимента. **(Б)** Общее число (слева) и соотношение субпопуляций (справа) лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости. **(В)** Гистологические фотографии легких здоровых и мышей с ОВА-индуцированной астмой через 24 часа и 4 недели после последней ингаляции ОВА.

Подострая фаза астматического воспаления характеризовалась уменьшением числа лейкоцитов и гранулоцитов, а также IL-6 и TNF- α в бронхоальвеолярной жидкости (Рисунок 7Б). Гистологически, в легких наблюдалась остаточная воспалительная инфильтрация, а также снижение секреции слизи бронхиальным эпителием (Рисунок 7В).

Однако, при оценке долгосрочных признаков ремоделирования легких, были обнаружены признаки обширной депозиции соединительно-тканых волокон и начальной стадии перибронхиального легочного фиброза у мышей с подострой фазой воспаления. Было отмечено значительное увеличение количества коллагеновых и эластиновых волокон по сравнению со здоровыми мышами и мышами в острой фазе астматического воспаления. Иммуногистохимическое исследование легких мышей с пост-астматическим фиброзом показало значительное увеличение экспрессии α -SMA по сравнению со здоровыми мышами и мышами с острой фазой воспаления (Рисунок 7B).

Анализ паттерна экспрессии генов, ассоциированных с развитием астмы и легочного фиброза.

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 острым и подострым астматическим воспалением с помощью qRT-PCR с зондами TaqMan. Дополнительно, экспрессия маркеров, отражающих персистирующее воспаление (*Muc5ac*) и развитие фиброза (*Fnl*) была валидирована на уровне белка с помощью иммуногистохимии (Рисунок 8).

Ткань легких здоровых животных характеризовалась низким уровнем экспрессии исследуемых генов, который был принят нами за 1, в то время как ингаляции ОВА привели к многократному увеличению уровня их экспрессии (Рисунок 8А). Выявлено, что при остром астматическом воспалении изменение экспрессии генов было значительно более выражено по сравнению с поста-астматическим фиброзом для следующих генов: *Timp1* (45 раз при остром воспалении и 2.3 раза при подостром воспалении), *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 значительно up-регулируемы только при остром астматическом воспалении (4,7, 3, и 1.8 раз, соответственно) (Рисунок 8А). *Cyp2e1* и *Cat* были значительно down-регулируемы как при остром, так и подостром астматическом воспалении: *Cat* в 11.2 и 9.6 раз, соответственно, и *Cyp2e1* в 4.8 и 2.8 раз, соответственно, по сравнению со здоровыми животными.

Далее были оценены уровни белков Fnl и Muc5ac в здоровых легких, а также в легких мышей с острым астматическим воспалением и пост-астматическим фиброзом с помощью иммуногистохимии. На Рисунке 8Б показано, что в экспрессии Fnl не наблюдалось значительной разницы между здоровыми легкими и легкими с острым астматическим воспалением, в то время как в легких с пост-астматическим фиброзом было обнаружено

незначительное

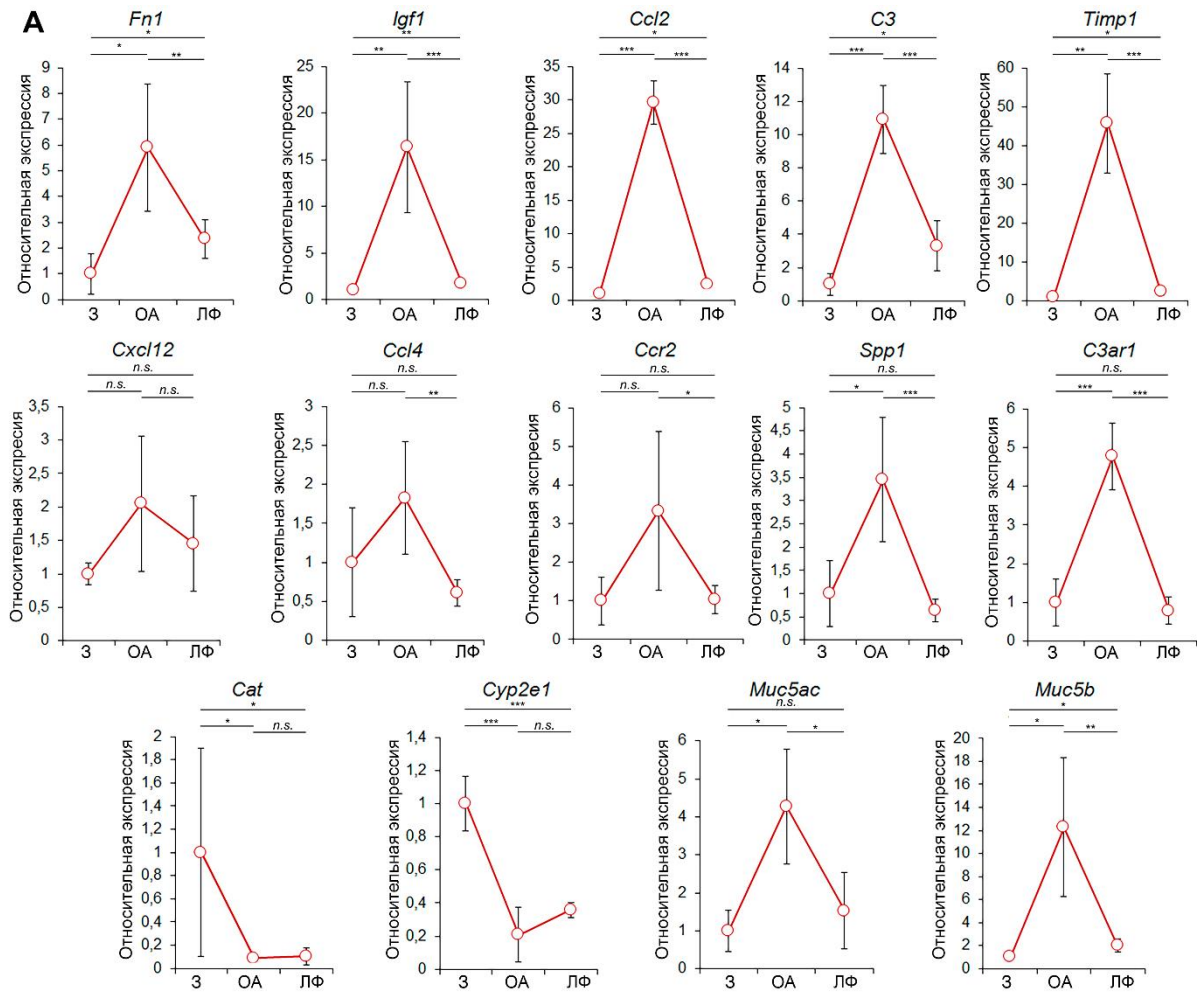
повышение

экспрессии

Fn1

(Рисунок

8Б).



Б

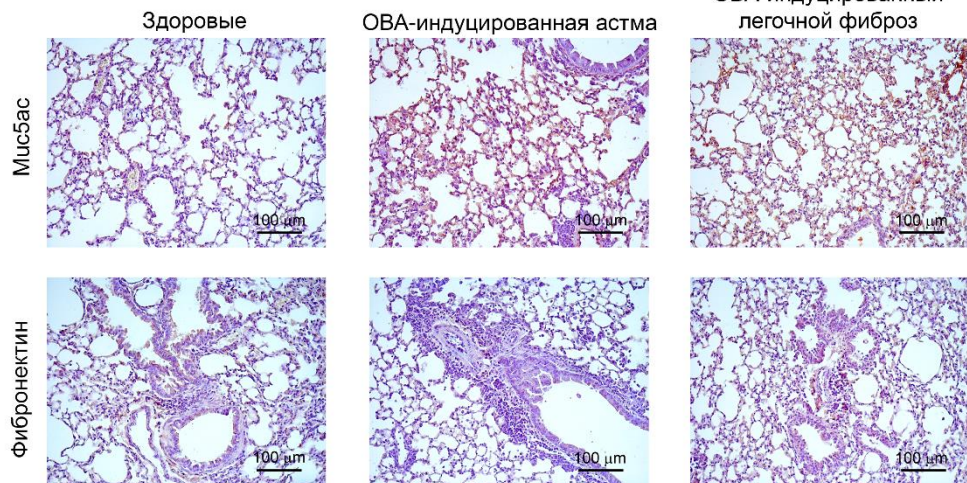


Рисунок 8. Экспрессия ключевых генов, идентифицированных с помощью биоинформатического анализа, в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой и пост-астматическим фиброзом. (А) Данные экспрессии генов в ткани легких здоровых мышей (З), мышей с острой астмой (ОА) и легочным фиброзом (ЛФ). **(Б)** Гистологические фотографии легких здоровых и экспериментальных животных, окрашенные антителами к фибронектину и компоненту слизи Muc5ac.

Уровень экспрессии белка Muc5ac был повышен как в легких с острым астматическим воспалением, так и пост-астматическим фиброзом, особенно в области межальвеолярных перегородок (Рисунок 8Б).

Таким образом, данные qRT-PCR и иммуногистохимического анализов подтвердили результаты, полученные при проведении биоинформатического анализа: гены *Fnl*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Muc5b*, *Muc5ac*, *Cat* и *Cyp2e1* могут являться регуляторами ранних фибротических изменений в легких, происходящих еще в стадию острого астматического воспаления.

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

Для того, чтобы обнаружить, участвуют ли гены, регулирующие острое астматическое воспаление и пост-астматический фиброз, в развитии легочного фиброза другой этиологии, была выбрана модель блеомицин-индуцированного фиброза. Ре-анализ трех независимых транскриптомных наборов данных, полученных от моделей блеомицин-индуцированного фиброза, идентифицировал 130 общих блеомицин-специфических ДЭГ, регулирующих данную патологию (Рисунок 9А, верхняя панель). Дальнейшее пересечение данных генов с астматическим регуломом (Рисунок 9А, нижняя панель) показало, что 11 астма-специфичных генов были ассоциированы с развитием блеомицин-индуцированного легочного фиброза.

Далее, для оценки значимости выявленных блеомицин-специфичных ДЭГ как универсальных маркеров фиброза, были выбраны 23 узловых гена и проанализировано их совместное упоминание с терминами «pulmonary fibrosis» (легочный фиброз), «hepatic fibrosis» (печеночный фиброз), и «renal fibrosis» (почечный фиброз) с помощью текст-майнинга. Оказалось, что гены *ApoE*, *Fcgr3*, *Top2a*, *Ctss*, *Itgb6*, *Thbs2*, *Col4a1*, *Csrp3*, *Tyrobp*, *Fcgr2b*, *Lamc*, *Ttn*, *Clqa*, *Col4a2*, *Actn2*, *Fcer1g*, *Atpa2a* практически не упоминались в связи с вышеуказанными фибротическими патологиями в опубликованных научных текстах (Рисунок 9Б).

Затем, уровень экспрессии генов, специфических для блеомицин-индуцированного легочного фиброза и мало исследованных в данной области (*Coll1a1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs2* и *Tyrobp*), был оценен с помощью qRT-PCR. Оказалось, что экспрессия *Coll1a1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs2* и *Tyrobp* была увеличена в 16.8, 6.7, 3.9, 2.9 и 1.5 раза, соответственно, в легких с острым астматическим воспалением (Рисунок 9В). Подострое воспаление и развитие легочного фиброза либо не повлияло на уровень экспрессии (*Coll1a1*, *Col4a1*, *Col4a2*), либо снизило экспрессию генов почти до уровня здоровых

мышей (*Thbs2*, *Tyrobp*).

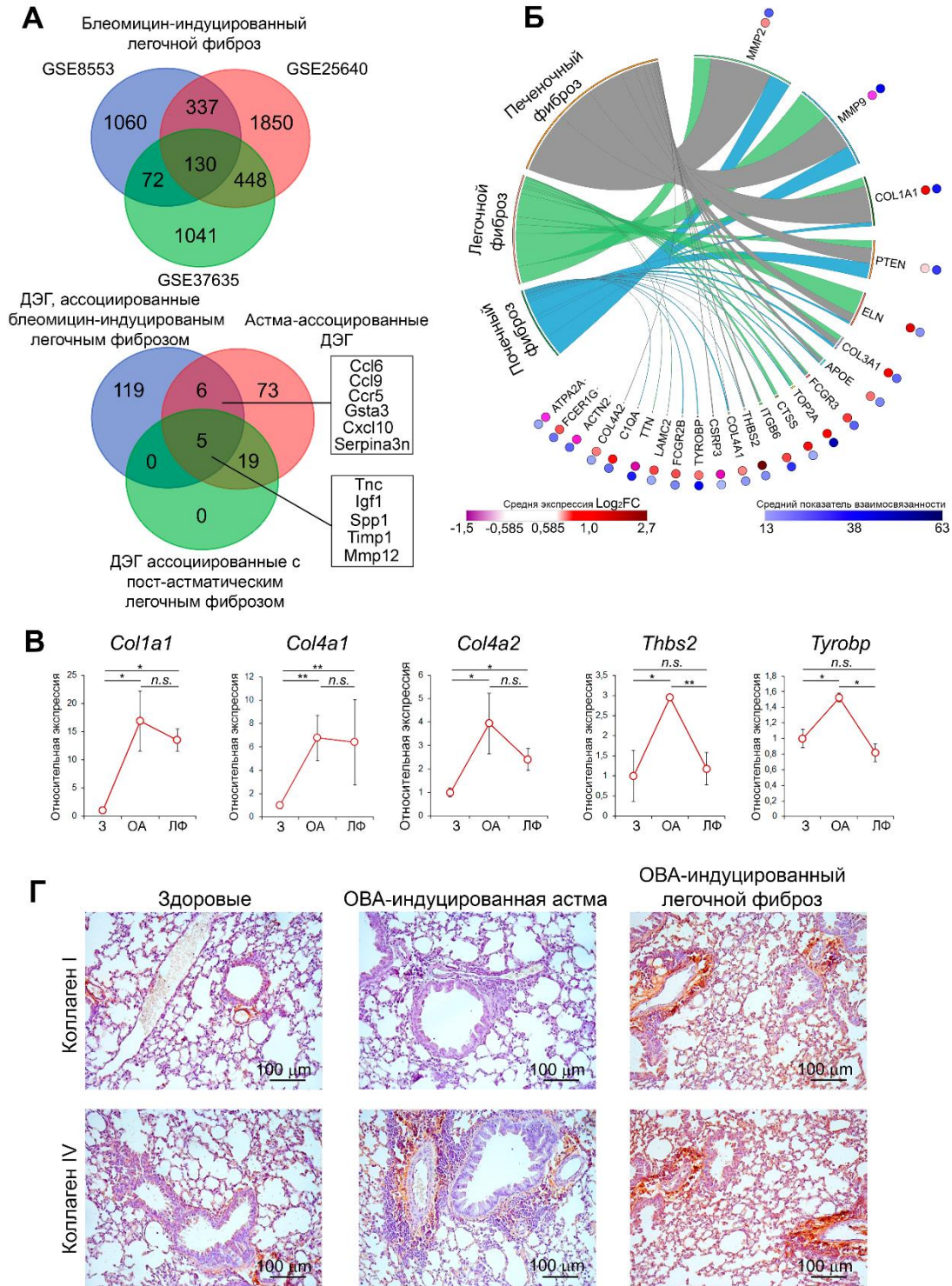


Рисунок 9. Вовлеченность генов, ассоциированных с блеомин-индуцированным фиброзом легких, в развитие астмы и пост-астматического фиброза. (А) Венн диаграмма пересечения ДЭГ, задействованных в развитии блеомин-индуцированного фиброза легких (верхняя панель). Венн диаграмма пересечения ДЭГ, участвующих в развитии блеомин-индуцированного фиброза, и топ-10 астматических генов и их первых соседей (нижняя панель). **(Б)** Анализ совместного упоминания идентифицированных ДЭГ с ключевыми словами, связанными с легочным, печеночным и почечным фиброзами. **(В)** Уровень экспрессии ДЭГ, ассоциированных с фиброзом, в легких здоровых и

экспериментальных животных. (Г) Иммуногистохимические фотографии легких здоровых и экспериментальных животных, окрашенные антителами к коллагену I и IV.

Поскольку *Col4a1* и *Col4a2* были слабо исследованы в области легочного фиброза согласно текст-майнингу и в то же время обладали высокой степенью взаимосвязанности с регуломом блеомицин-индуцированного фиброза и характеризовались высоким уровнем экспрессии в легких с острым астматическим воспалением и пост-астматическим фиброзом, уровень их экспрессии в ткани легких был также верифицирован с помощью иммуногистохимического анализа. Было обнаружено, что при развитии пост-астматического фиброза, уровень экспрессии коллагена I и IV типов значительно возрастал (Рисунок 9Г).

Определение уровня экспрессии ДЭГ, ассоциированных с развитием пост-астматического и блеомицин-индуцированного легочного фиброза, у пациентов с хроническими патологиями легких.

Для того, чтобы определить, как изменяются гены, идентифицированные в качестве регуляторов развития легочного фиброза на мышинной модели, при хронических заболеваниях легких, сопровождающихся фиброзом, у людей, был определен уровень экспрессии данных генов в тканях легких, полученных от пациентов, страдающих идиопатическим легочным фиброзом, хронической обструктивной болезнью легких, хронической эмфиземой и муковисцидозом (Рисунок 10).

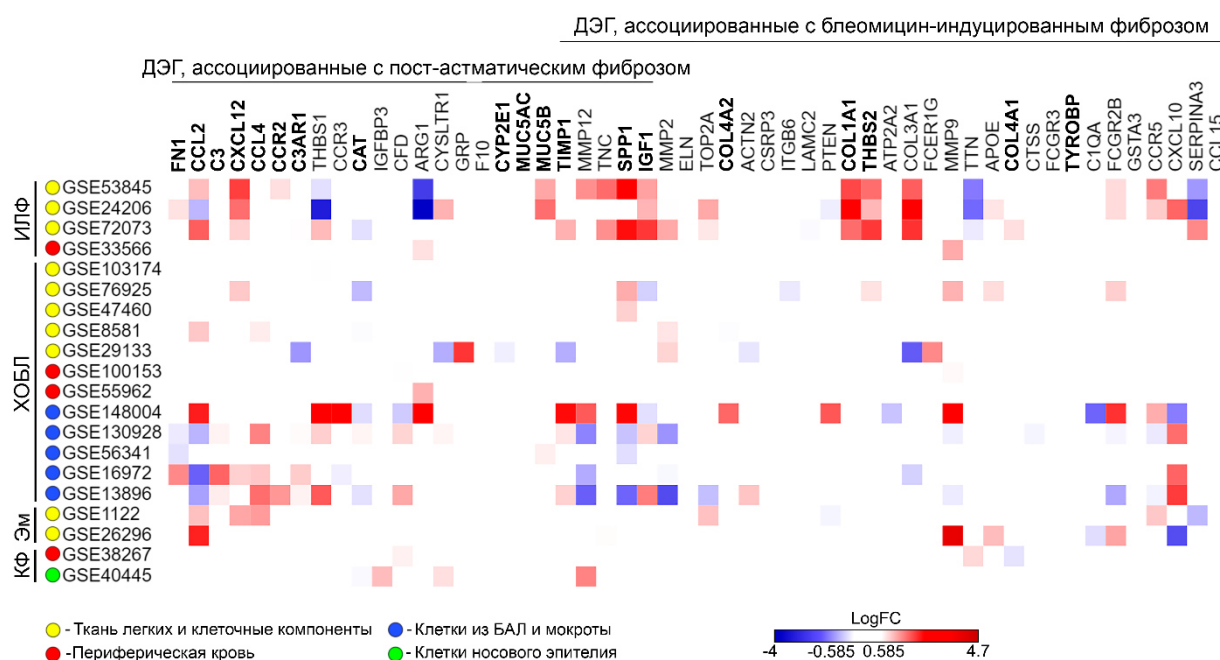


Рисунок 10. Уровень экспрессии ДЭГ, ассоциированных с пост-астматическим и блеомицин-индуцированным легочным фиброзом, в легких пациентов, страдающих хроническими легочными заболеваниями. ИЛФ – идиопатический легочный фиброз, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, Эм – хроническая эмфизема, КФ – кистозный фиброз (муковисцидоз).

Оказалось, что только идиопатический легочный фиброз характеризовался схожим профилем экспрессии генов, регулирующих развитие астмы и легочного фиброза у мышей: несколько известных маркеров фиброза, включая *COL1A1*, *COL3A1*, *IGF1*, *CXCL12*, *SPP1* и *MUC5B* были up-регулированы в ткани легких пациентов с идиопатическим легочным фиброзом (Рисунок 10).

Выводы:

1. Показано, что воспалительный процесс и последующее ремоделирование внеклеточного матрикса является ключевыми этапами в развитии ОПЛ, а ключевые гены, вовлеченные в эти процессы (*Il-6*, *Timp1*, *Serpine1*, *Ccl2*, *Mmp8*, *Ptx3*), могут являться потенциальными прогностическими маркерами и терапевтическими мишенями ОПЛ.

2. Показано, что *in vivo* модель ЛПС-индуцированного ОПЛ может использоваться в качестве платформы для разработки подходов противовоспалительной терапии при SARS-CoV-2-ассоциированном повреждении легких, а модель ОВА-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза может быть использована при изучении ранних фибротических изменений легких различной этиологии.

3. Обнаружено, что гены *TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR* и *PTX3*, играющие ключевую роль в развитии ОПЛ, могут являться маркерными генами тяжести и прогрессии злокачественных новообразований легких.

4. Показано, что гены *C3*, *C3ar1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Cyp2e1*, *Fn1*, *Thbs1* и *Tyrobp*, ассоциированные с развитием острой астмы, являются участниками ранних фибротических изменений в легких.

5. Обнаружено, что пост-астматический фиброз у мышей обладает наибольшим сходством с ранним идиопатическим легочным фиброзом у людей, а гены *Col4a1* и *Col4a2* могут являться потенциальными предикторами и ранними маркерами развития легочного фиброза.

Список использованной литературы:

1. Feng, X.; Jia, A. Protective Effect of Carvacrol on Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice. *Inflammation* **2014**, *37*, 1091–1101, doi:10.1007/s10753-014-9833-1.
2. Lee, J.W.; Chun, W.; Kwon, O.K.; Park, H.A.; Lim, Y.; Lee, J.H.; Kim, D.Y.; Kim, J.H.; Lee, H.K.; Ryu, H.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.* **2018**, *64*, 123–130, doi:10.1016/j.intimp.2018.08.015.
3. Zhang, H.; Chen, S.; Zeng, M.; Lin, D.; Wang, Y.; Wen, X.; Xu, C.; Yang, L.; Fan, X.; Gong, Y.; 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.* **2018**, *49*, 1918–1932, doi:10.1159/000493653.
4. Yang, J.; Li, S.; Wang, L.; Du, F.; Zhou, X.; Song, Q.; Zhao, J.; Fang, R. Ginsenoside Rg3 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via MerTK-dependent activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fphar.2018.00850.
5. Bellani, G.; Laffey, J.G.; Pham, T.; Fan, E.; Brochard, L.; Esteban, A.; Gattinoni, L.; Van Haren, F.M.P.; Larsson, A.; McAuley, D.F.; 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.* **2016**, *315*, 788–800, doi:10.1001/jama.2016.0291.
6. Fan, E.; Brodie, D.; Slutsky, A.S. Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2018**, *319*, 698–710.
7. Jamal, M.; Bangash, H.I.; Habiba, M.; Lei, Y.; Xie, T.; Sun, J.; Wei, Z.; Hong, Z.; Shao, L.; Zhang, Q. Immune dysregulation and system pathology in COVID-19. *Virulence* **2021**, *12*, 918–936.
8. Ramasamy, S.; Subbian, S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2021**, *34*, doi:10.1128/CMR.00299-20.
9. Perez-Garcia, J.; Espuela-Ortiz, A.; Lorenzo-Diaz, F.; Pino-Yanes, M. Pharmacogenetics of Pediatric Asthma: Current Perspectives. *Pharmgenomics. Pers. Med.* **2020**, *13*, 89, doi:10.2147/PGPM.S201276.
10. Carr, T.F.; Bleeker, E. Asthma heterogeneity and severity. *World Allergy Organ. J.* **2016**, *9*, doi:10.1186/S40413-016-0131-2.
11. Hough, K.P.; Curtiss, M.L.; Blain, T.J.; Liu, R.-M.; Trevor, J.; Deshane, J.S.; Thannickal,

- V.J. Airway Remodeling in Asthma. *Front. Med.* **2020**, *7*, 191, doi:10.3389/FMED.2020.00191.
12. Mostaçõ-Guidolin, L.B.B.; Osei, E.T.T.; Ullah, J.; Hajimohammadi, S.; Fouadi, M.; Li, X.; Li, V.; Shaheen, F.; Yang, C.X.X.; Chu, F.; et al. Defective fibrillar collagen organization by fibroblasts contributes to airway remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *200*, 431–443, doi:10.1164/rccm.201810-1855OC.
 13. Ito, J.T.; Lourenço, J.D.; Righetti, R.F.; Tibério, I.F.L.C.; Prado, C.M.; Lopes, F.D.T.Q.S. Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies? *Cells* **2019**, *8*, 342, doi:10.3390/CELLS8040342.
 14. Bazan-Socha, S.; Buregwa-Czuma, S.; Jakiela, B.; Zareba, L.; Zawlik, I.; Myszka, A.; Soja, J.; Okon, K.; Zarychta, J.; Kozlik, P.; et al. Reticular Basement Membrane Thickness Is Associated with Growth- and Fibrosis-Promoting Airway Transcriptome Profile-Study in Asthma Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 998, doi:10.3390/IJMS22030998.
 15. Potaczek, D.P.; Miethe, S.; Schindler, V.; Alhamdan, F.; Garn, H. Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes. *Cell. Signal.* **2020**, *69*, 109523, doi:10.1016/J.CELLSIG.2019.109523.
 16. Reeves, S.R.; Kolstad, T.; Lien, T.-Y.; Elliott, M.; Ziegler, S.F.; Wight, T.N.; Debley, J.S. Asthmatic airway epithelial cells differentially regulate fibroblast expression of extracellular matrix components. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 663, doi:10.1016/J.JACI.2014.04.007.
 17. Chakraborty, A.; Mastalerz, M.; Ansari, M.; Schiller, H.B.; Staab-Weijnitz, C.A. Emerging Roles of Airway Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cells* **2022**, *11*, 1050, doi:10.3390/CELLS11061050.
 18. Bu, T.; Wang, L.F.; Yin, Y.Q. How do innate immune cells contribute to airway remodeling in copd progression? *Int. J. COPD* **2020**, *15*, 107–116.
 19. Harkness, L.M.; Weckmann, M.; Kopp, M.; Becker, T.; Ashton, A.W.; Burgess, J.K. Tumstatin regulates the angiogenic and inflammatory potential of airway smooth muscle extracellular matrix. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 3288, doi:10.1111/JCMM.13232.
 20. Koopmans, T.; Crutzen, S.; Menzen, M.H.; Halayko, A.J.; Hackett, T.L.; Knight, D.A.; Gosens, R. Selective targeting of CREB-binding protein/ β -catenin inhibits growth of and extracellular matrix remodelling by airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 3327–3341, doi:10.1111/bph.13620.
 21. Cheng, W.-H.; Lee, K.-Y.; Yu, M.-C.; Chen, J.-Y.; Lin, C.-H.; Chen, B.-C. Pref-1 induced

- lung fibroblast differentiation by hypoxia through integrin $\alpha 5\beta 1$ /ERK/AP-1 cascade. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *909*, 174385, doi:10.1016/J.EJP HAR.2021.174385.
22. 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**, *13*, 399–409, doi:10.1038/nrrheum.2017.83.
 23. Coomes, E.A.; Haghbayan, H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* **2020**, *30*, 1–9, doi:10.1002/rmv.2141.
 24. Gschwandtner, M.; Derler, R.; Midwood, K.S. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2759, doi:10.3389/fimmu.2019.02759.
 25. Bekele Feyissa, Y.; Chiodi, F.; Sui, Y.; Berzofsky, J.A. The Role of CXCL13 in Antibody Responses to HIV-1 Infection and Vaccination. *Front. Immunol.* **2021**, *12*.
 26. Grünwald, B.; Schoeps, B.; Krüger, A. Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 6–19, doi:10.1016/j.tcb.2018.08.006.
 27. Robert, S.; Gicquel, T.; Victoni, T.; Valença, S.; Barreto, E.; Bailly-Maître, B.; Boichot, E.; Lagente, V. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Biosci. Rep.* **2016**, *36*.
 28. Dreymueller, D.; Uhlig, S.; Ludwig, A. Adam-family metalloproteinases in lung inflammation: Potential therapeutic targets. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2015**, *308*, L325–L343.
 29. Zhao, C.; Isenberg, J.S.; Popel, A.S. Human expression patterns: qualitative and quantitative analysis of thrombospondin-1 under physiological and pathological conditions. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 2086–2097.
 30. 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.* **2019**, *31*, 408–418, doi:10.1080/1120009X.2019.1687996.
 31. Saetre, P.; Emilsson, L.; Axelsson, E.; Kreuger, J.; Lindholm, E.; Jazin, E. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. *BMC Psychiatry* **2007**, *7*, 46, doi:10.1186/1471-244X-7-46.
 32. Carow, B.; Rottenberg, M.E. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 58, doi:10.3389/fimmu.2014.00058.
 33. Zarei Ghobadi, M.; Mozhgani, S.H.; Farzanehpour, M.; Behzadian, F. Identifying novel biomarkers of the pediatric influenza infection by weighted co-expression network analysis. *Virol. J.* **2019**, *16*, doi:10.1186/s12985-019-1231-8.

34. Garlanda, C.; Bottazzi, B.; Magrini, E.; Inforzato, A.; Mantovani, A. PTX3, a humoral pattern recognition molecule, in innate immunity, tissue repair, and cancer. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 623–639, doi:10.1152/physrev.00016.2017.
35. Kaushal, J.; Mehandia, S.; Singh, G.; Raina, A.; Arya, S.K. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *16*, 192–199, doi:10.1016/j.bcab.2018.07.035.
36. Vindin, H.; Mithieux, S.M.; Weiss, A.S. Elastin architecture. *Matrix Biol.* **2019**, *84*, 4–16, doi:10.1016/j.matbio.2019.07.005.
37. Li, J.; Xu, X.; Jiang, Y.; Hansbro, N.G.; Hansbro, P.M.; Xu, J.; Liu, G. Elastin is a key factor of tumor development in colorectal cancer. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 1–12, doi:10.1186/s12885-020-6686-x.
38. Wilson, S.J.; Ward, J.A.; Pickett, H.M.; Baldi, S.; Sousa, A.R.; Sterk, P.J.; Chung, K.F.; Djukanovic, R.; Dahlen, B.; Billing, B.; 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* **2021**, *51*, 296–304, doi:10.1111/cea.13813.
39. Mecham, R.P. Elastin in lung development and disease pathogenesis. *Matrix Biol.* **2018**, *73*, 6–20, doi:10.1016/j.matbio.2018.01.005.
40. Xia, Y.; Lei, C.; Yang, D.; Luo, H. Identification of key modules and hub genes associated with lung function in idiopathic pulmonary fibrosis. *PeerJ* **2020**, *8*, doi:10.7717/peerj.9848.
41. Todd, J.L.; Vinisko, R.; Liu, Y.; Neely, M.L.; Overton, R.; Flaherty, K.R.; Noth, I.; Newby, L.K.; Lasky, J.A.; Oلمان, M.A.; 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.* **2020**, *20*, 1–12, doi:10.1186/S12890-020-1103-4/FIGURES/5.
42. Chung, K.F. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2005**, *4*, 619–625.
43. Faner, R.; Cruz, T.; Casserras, T.; Lopez-Giraldo, A.; Noell, G.; Coca, I.; Tal-Singer, R.; Miller, B.; Rodriguez-Roisin, R.; Spira, A.; et al. Network analysis of lung transcriptomics reveals a distinct b-cell signature in emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 1242–1253, doi:10.1164/rccm.201507-1311OC.
44. Dhooghe, B.; Noël, S.; Huaux, F.; Leal, T. Lung inflammation in cystic fibrosis: Pathogenesis and novel therapies. *Clin. Biochem.* **2014**, *47*, 539–546, doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.12.020.

45. Tarique, A.A.; Sly, P.D.; Cardenas, D.G.; Luo, L.; Stow, J.L.; Bell, S.C.; Wainwright, C.E.; Fantino, E. Differential expression of genes and receptors in monocytes from patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2019**, *18*, 342–348, doi:10.1016/j.jcf.2018.07.012.
46. Martinović Kaliterna, D.; Petrić, M. Biomarkers of skin and lung fibrosis in systemic sclerosis. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1670062> **2019**, *15*, 1215–1223, doi:10.1080/1744666X.2020.1670062.
47. Taniguchi, T.; Miyagawa, T.; Toyama, S.; Yamashita, T.; Nakamura, K.; Saigusa, R.; Ichimura, Y.; Takahashi, T.; Toyama, T.; Yoshizaki, A.; 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.* **2018**, *27*, 1030–1037, doi:10.1111/exd.13724.
48. Nakagome, K.; Nagata, M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2220, doi:10.3389/FIMMU.2018.02220/BIBTEX.
49. Du, X.; Li, F.; Shao, Z.; Zhang, C.; Li, W.; Chen, Z.; Ying, S.; Shen, H. CCL6 produced by eosinophils drives allergic airway inflammation in mice. *Eur. Respir. J.* **2019**, *54*, PA4363, doi:10.1183/13993003.CONGRESS-2019.PA4363.
50. Wang, N.; Zhang, C.; Xu, Y.; Li, S.; Tan, H.-Y.; Xia, W.; Feng, Y. OMICs approaches-assisted identification of macrophages-derived MIP-1 γ as the therapeutic target of botanical products TNTL in diabetic retinopathy. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 1–14, doi:10.1186/S12964-019-0396-5.
51. Lindborg, J.A.; Niemi, J.P.; Howarth, M.A.; Liu, K.W.; Moore, C.Z.; Mahajan, D.; Zigmond, R.E. Molecular and cellular identification of the immune response in peripheral ganglia following nerve injury. *J. Neuroinflammation* **2018**, *15*, 1–17, doi:10.1186/s12974-018-1222-5.
52. Popiolek-Barczyk, K.; Ciechanowska, A.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Oggioni, M.; Mercurio, D.; De Simoni, M.G.; Mika, J. 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* **2020**, *54*, 101671, doi:10.1016/J.MCP.2020.101671.
53. Chen, G.; Ge, D.; Zhu, B.; Shi, H.; Ma, Q. 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.* **2020**, *48*, 1–10, doi:10.1177/0300060520919592.
54. Wu, X.; Guo, L.; Ye, G. Remifentanil ameliorates lung injury in neonate rats with acute

- respiratory distress by down-regulating TIMP1 expression. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 6325.
55. Kulshrestha, R.; Pandey, A.; Jaggi, A.; Bansal, S. Beneficial effects of N-acetylcysteine on protease-antiprotease balance in attenuating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2020**, *23*, 396, doi:10.22038/IJBMS.2020.39031.9261.
 56. Shen, D.D.; Yang, Z.H.; Huang, J.; Yang, F.; Lin, Z.W.; Ou, Y.F.; Hu, M.H. 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.* **2019**, *57*, 744–752, doi:10.1080/13880209.2019.1666151.
 57. Kim, Y.H.; Choi, Y.J.; Lee, E.J.; Kang, M.K.; Park, S.J.S.H.; Kim, D.Y.; Oh, H.; Park, S.J.S.H.; Kang, Y.H. Novel glutathione-containing dry-yeast extracts inhibit eosinophilia and mucus overproduction in a murine model of asthma. *Nutr. Res. Pract.* **2017**, *11*, 461–469, doi:10.4162/nrp.2017.11.6.461.
 58. Radicioni, G.; Ceppe, A.; Ford, A.A.; Alexis, N.E.; Barr, R.G.; Bleecker, E.R.; Christenson, S.A.; Cooper, C.B.; Han, M.K.; Hansel, N.N.; 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.* **2021**, doi:10.1016/S2213-2600(21)00079-5.
 59. Garić, D.; De Sanctis, J.B.; Dumut, D.C.; Shah, J.; Peña, M.J.; Youssef, M.; Petrof, B.J.; Kopriva, F.; Hanrahan, J.W.; Hajdich, M.; 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* **2020**, *1865*, 158538, doi:10.1016/J.BBALIP.2019.158538.
 60. Tan, H.-T.T.; Hagner, S.; Ruchti, F.; Radzikowska, U.; Tan, G.; Altunbulakli, C.; Eljaszewicz, A.; Moniuszko, M.; Akdis, M.; Akdis, C.A.; et al. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. *Allergy* **2019**, *74*, 294–307, doi:10.1111/ALL.13619.
 61. Zhang, Q.; Wang, Y.; Qu, D.; Yu, J.; Yang, J. The Possible Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis considering MUC5B. *Biomed Res. Int.* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/9712464.
 62. Pitchford, S.; Cleary, S.; Arkless, K.; Amison, R. Pharmacological strategies for targeting platelet activation in asthma. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2019**, *46*, 55–64, doi:10.1016/J.COPH.2019.03.012.
 63. Chen, J.J.; Jiang, S.; Wang, J.; Renukuntla, J.; Sirimulla, S.; Chen, J.J. A comprehensive

- review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism. *Drug Metab. Rev.* **2019**, *51*, 178–195, doi:10.1080/03602532.2019.1632889.
64. Xu, D.; Liu, L.; Li, H.; Sun, L.; Yang, L.; Qian, Q.; Wang, Y. Potential Role of ADRA2A Genetic Variants in the Etiology of ADHD Comorbid With Tic Disorders. *J. Atten. Disord.* **2021**, *25*, 33–43, doi:10.1177/1087054718757646.
65. Xing, C.; Huang, X.; Zhang, Y.; Zhang, C.; Wang, W.; Wu, L.; Ding, M.; Zhang, M.; Song, L. Sleep Disturbance Induces Increased Cholesterol Level by NR1D1 Mediated CYP7A1 Inhibition. *Front. Genet.* **2020**, *0*, 1702, doi:10.3389/FGENE.2020.610496.
66. Fanelli, G.N.; Scarpitta, R.; Cinacchi, P.; Fuochi, B.; Szumera-Ciećkiewicz, A.; Ieso, K. De; Ferrari, P.; Fontana, A.; Miccoli, M.; Naccarato, A.G.; et al. Immunohistochemistry for Thymidine Kinase-1 (TK1): A Potential Tool for the Prognostic Stratification of Breast Cancer Patients. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5416, doi:10.3390/JCM10225416.
67. Ren, J.; Yang, Y.; Li, C.; Xie, L.; Hu, R.; Qin, X.; Zhang, M. A Novel Prognostic Model of Early-Stage Lung Adenocarcinoma Integrating Methylation and Immune Biomarkers. *Front. Genet.* **2021**, *11*, doi:10.3389/FGENE.2020.634634/FULL.
68. Distler, J.H.W.; Györfi, A.-H.; Ramanujam, M.; Whitfield, M.L.; Königshoff, M.; Lafyatis, R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2019**, *15*, 705–730, doi:10.1038/s41584-019-0322-7.
69. Tavares, L.A.; Rezende, A.A.; Santos, J.L.; Estevam, C.S.; Silva, A.M.O.; Schneider, J.K.; Cunha, J.L.S.; Droppa-Almeida, D.; Correia-Neto, I.J.; Cardoso, J.C.; et al. Cymbopogon winterianus Essential Oil Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in a Murine Model. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/PHARMACEUTICS13050679.
70. Choi, S.; Kim, J.A.; Li, H.; Jo, S.E.; Lee, H.; Kim, T.H.; Kim, M.; Kim, S.J.; Suh, S.H. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of modafinil in nonalcoholic liver disease. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *144*, 112372, doi:10.1016/J.BIOPHA.2021.112372.
71. Beshay, O.N.; Ewees, M.G.; Abdel-Bakky, M.S.; Hafez, S.M.N.A.; Abdelrehim, A.B.; Bayoumi, A.M.A. Resveratrol reduces gentamicin-induced EMT in the kidney via inhibition of reactive oxygen species and involving TGF- β /Smad pathway. *Life Sci.* **2020**, *258*, doi:10.1016/J.LFS.2020.118178.

Приложение.

Table 1. Последовательности праймеров, использованных в данной работе.

Gene	Type	Sequence
<i>Il-6</i>	Прямой	5'-AAACCGCTATGAAGTTCCTCTC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-TTGTCACCAGCATCAGTCCCAAGA-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GTGGTATCCTCTGTGAAGTCTC-3'
<i>Ccl2</i>	Прямой	5'-TCCACTACSTTTTCCACAACC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-AAGGCATCACAGTCCGAGTCACAC-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GGATCCACACCTTGCATTTAAG-3'
<i>Catalase</i>	Прямой	5'-TTCCATCSTTTATCCATAGCCAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACTCCAGAAGTCCCAGACCATGTCA-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GAATCCCTCGGTCACTGAAC-3'
<i>Serpine1</i>	Прямой	5'-ACACACAGCCAACCACAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACAGCCAACAAGAGCCAATCACAAG-BHQ1-3'
	Обратный	5'-TCCCAGAGACCAGAACCAG-3'
<i>Elastin</i>	Прямой	5'-CTTATAAAGCTGCCGCCAAA-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACTCCGCCAACTCCAACACCA-BHQ1-3'
	Обратный	5'-ACTCCACCAACTCCAACAC-3'
<i>Timp1</i>	Прямой	5'-CTCAAAGACCTATAGTGCTGGC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACTCACTGTTTGTGGACGGATCAGG-BHQ1-3'
	Обратный	5'-CAAAGTGACGGCTCTGGTAG-3'
<i>Ptx3</i>	Прямой	5'-AGCAAATTTTCGCCTCTCCAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-AAGCAGGATCGCAGGGAGGTG-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GTCCATTGTCTATTTTCGTTGTCC-3'
<i>Socs3</i>	Прямой	5'-CCTATGAGAAAGTGACCCAGC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CCCCTCTGACCSTTTTGCTCCTT-BHQ1-3'
	Обратный	5'-TTTGTGCTTGTGCCATGTG-3'
<i>Mmp8</i>	Прямой	5'-CATATCTCTGTTCTGGCCCTTC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-TACCCAACGGTCTTCAGGCTGC-BHQ1-3'
	Обратный	5'-CAGGTCATAGCCACTTAGAGC-3'
<i>Rsad2</i>	Прямой	5'-TGGATGTTGGCGTGGAAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-TCTGAAGCGTGGCGGAAAGTATGT-BHQ1-3'
	Обратный	5'-CTGTAGCTGGTCGGAGTTTC-3'
<i>Rtp4</i>	Прямой	5'-GTTCCCGATGACTTCAGTAC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-TTGGCAGGTTCCAGTGTCCAGAT-BHQ1-3'
	Обратный	5'-CTGAGCAGAGGTCCAAC TTC-3'
<i>Ifi44</i>	Прямой	5'-GAACTATACCCATGACCCACTG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CCACCAGCTCAGAAGAGTGCATTTCA-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GTAATCAGATCCAGGCTATCCAC-3'
<i>Saa1</i>	Прямой	5'-CAGGATGAAGCTACTCACCAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CATTTGTTACGAGGCTTCCAAGGG-BHQ1-3'
	Обратный	5'-CTTCATGTCAGTGTAGGCTCG-3'
<i>HPRT</i>	Прямой	5'-CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-ROX)-CTTGCTGGTGA AAAAGGACCT-BHQ2-3'
	Обратный	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCC-3'
<i>TNF-α</i>	Прямой	5'-TCAGCCTCTTCTCATTCCTG-3'
	Обратный	5'-TGAAGAGAACCTGGGAGTAG-3'
<i>Il-1β</i>	Прямой	5'-TGCAGAGTTC CCAACTGGTACAT-3'
	Обратный	5'-GTGCTGCCTAATGTCCCCTTGAAT-3'
<i>GAPDH</i>	Прямой	5'-AAGAGAGGCCCTATCCCAAC-3'
	Обратный	5'-GCAGCGAACTTTATTGATGG-3'
<i>Fn1</i>	Прямой	5'-CCAATTACGAACAAGACCAGAAG-3'
	Зонд	((5,6)-FAM-5'-ACAGAGCACCATTTGGAATTTCCGC-3'-BHQ1
	Обратный	5'-ACCCTCAGAAGTACAGTCCG-3'
<i>Igf1</i>	Прямой	5'-TGGATGCTCTTCAGTTCTGTG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-TTGAAGTAAAAGCCCCTCGGTCCAC-BHQ1-3'
	Обратный	5'-AGTACATCTCCAGTCTCCTCAG-3'

<i>Ccl2</i>	Прямой	5'-TCCAACCTTTCCACAACC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-AAGGCATCACAGTCCGAGTCACAC-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GGATCCACACCTTGCATTTAAG-3'
<i>C3</i>	Прямой	5'-GTTTATTCCTTCATTTCCGCTGG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACACCCTGATTGGAGCTAGTGGC-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GATGGTTATCTCTGGGTCACC-3'
<i>Timpl</i>	Прямой	5'-CTCAAAGACCTATAGTGCTGGC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACTCACTGTTTGTGGACGGATCAGG-BHQ1-3'
	Обратный	5'-CAAAGTGACGGCTCTGGTAG-3'
<i>Cxcl12</i>	Прямой	5'-ACTCCAAACTGTGCCCTC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACAGACAAGTGTGCATTGACCCGA-BHQ1-3'
	Обратный	5'-GTCTACTGGAAAGTCCTTTGGG-3'
<i>Ccl4</i>	Прямой	5'-AAACCTAACCCGAGCAAC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-TTTCTTACACCTCCCGGCAGC-3'-BHQ1
	Обратный	5'-CTCCAAGTCACTCATGTACTCAG-3'
<i>Ccr2</i>	Прямой	5'-GCTCTACATTCACCTCCAC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CCCAACCGAGACCTCTTGCTCC-BHQ1-3'
	Обратный	5'-ACCACTGTCTTTGAGGCTTG-3'
<i>Spp1</i>	Прямой	5'-CTACGACCATGAGATTGGCAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-AATCAGTCACTTTCACGGGAGGG-BHQ1-3'
	Обратный	5'-TCTTCAGAGGACACAGCATTC-3'
<i>Muc5b</i>	Прямой	5'-TGCCTATCAAAGTGTGGGAC-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CTCGTAGTGGAAGTGGCAAGGCT-3'-BHQ1
	Обратный	5'-GAGCACGGAGGTACAGTTATC-3'
<i>Ccr3</i>	Прямой	5'-AAAGGACTTAGCAAAATTCACCAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CACACCTATGAATATGAGTGGGCACC-BHQ1-3'
	Обратный	5'-AGTACAGTGGAGGCAGGAG-3'
<i>C3ar1</i>	Прямой	5'-TTGGTCTCACTTGTCTATTGGG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACCAGCCATTGCCTAGCAGT-BHQ1-3'
	Обратный	5'-TCTTCATCTTACGCCAGCTAC-3'
<i>Muc5ac</i>	Прямой	5'-GAGTGACAGCAAGATGGAGG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CCCACAAAAGCACCAGGCCAAT-3'-BHQ1
	Обратный	5'-TCATCAAAGTTCCACACAGG-3'
<i>Col1a1</i>	Прямой	5'-AGTTGGTGCTAAGGGTGAAG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CTCTGAAGGTCCCCAGGGTGTG-3'-BHQ1
	Обратный	5'-TTTAGCGCCAGGTTGTCC-3'
<i>Col4a1</i>	Прямой	5'-CAGGTTTGACAGGTGAAGTTG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-AAAGGTCAGAAAGGAGAGAGCTGCC-3'-BHQ1
	Обратный	5'-CTTAGCCCCAGGTTGTCC-3'
<i>Col4a2</i>	Прямой	5'-ACGGACAGAAGGGTGAAGG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-ACATAGGACAGCCAGGACCCAAC-3'-BHQ1
	Обратный	5'-ACAAGTGTGATGTCAGATGGG-3'
<i>Thbs2</i>	Прямой	5'-TGGAATCGGAGATGCTTGTG-3'
	Зонд	5'-((5,6)-FAM)-CCTTCTCATCGCTCACACCGTCATT-3'-BHQ1
	Обратный	5'-GTCTCCAACCTCATCCTGTGC-3'

Отчет о проверке на заимствования №1



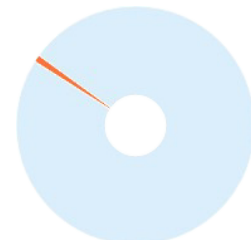
Автор: Савин Иннокентий Андреевич
Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 9
Начало загрузки: 01.09.2022 08:44:51
Длительность загрузки: 00:00:45
Имя исходного файла: Научный доклад Савин_fin_woref.docx
Название документа: Научный доклад Савин_fin_woref
Языки текста документа: русский, английский
Размер текста: 69 кБ
Символов в тексте: 70491
Слов в тексте: 8786
Число предложений: 405
Способ извлечения текста: OCR

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 01.09.2022 08:45:37
Длительность проверки: 00:00:51
Комментарии: не указано
Поиск с учетом редактирования: да
Модули поиска: eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ, СМИ России и СНГ, Сводная коллекция ЭБС, Сводная коллекция РГБ, Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по Интернету, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Цитирование, Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования, Патенты СССР, РФ, СНГ, Медицина, Кольцо вузов, Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана, ИПС Адилет, Интернет Плюс, Издательство Wiley, Диссертации НББ, Библиография, Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), Шаблонные фразы



ЗАИМСТВОВАНИЯ

1,06%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

98,94%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа. Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	1,06%	1,06%	Механизмы подавления прогрессии э... http://niboch.nsc.ru	02 Окт 2018	Интернет Плюс	15	15	
[02]	0%	1,06%	Механизмы подавления прогрессии э... http://niboch.nsc.ru	01 Дек 2020	Интернет Плюс	0	15	
[03]	0%	0,86%	Молекулярные основы противоопух... http://genebiology.ru	11 Июл 2020	Интернет Плюс	0	12	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[04]	0%	0,74%	http://www.eimb.ru/dissovet/2016-12-2... http://eimb.ru	29 Окт 2019	Интернет Плюс	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[05]	0%	0,64%	Мохамед, Ислам Сабер Еад Молекуля... http://dlib.rsl.ru	28 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[06]	0%	0,61%	Заключение Диссертационного совета http://bionet.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[07]	0%	0,61%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[08]	0%	0,61%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[09]	0%	0,57%	Новости Сибирское отделение Росс... https://sbras.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[10]	0%	0,56%	Автореферат http://bionet.nsc.ru	23 Янв 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[11]	0%	0,56%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	0	11	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

									пересечения.
[12]	<input type="text" value="0%"/>	0,53%	Мохамед_Ислам_Сабер_Диплом	19 Мая 2022	Кольцо вузов	0	3		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	<input type="text" value="0%"/>	0,49%	Структурные изменения в опухоли и ... http://medical-diss.com	29 Окт 2017	Интернет Плюс	0	5		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	<input type="text" value="0%"/>	0,48%	https://www.tnimc.ru/upload/publicati... https://tnimc.ru	18 Мая 2022	Интернет Плюс	0	5		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[15]	<input type="text" value="0%"/>	0,42%	Бурнышева, Ксения Михайловна Мол... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	<input type="text" value="0%"/>	0,38%	Автореферат диссертации http://iimed.ru	11 Дек 2016	Интернет Плюс	0	3		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	<input type="text" value="0%"/>	0,38%	Автореферат диссертации http://iimed.ru	07 Сен 2019	Интернет Плюс	0	3		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	<input type="text" value="0%"/>	0,38%	Структурные изменения в опухоли и ... http://lib.ua-ru.net	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	3		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	<input type="text" value="0%"/>	0,37%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	11 Фев 2022	Интернет Плюс	0	3		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[20]	<input type="text" value="0%"/>	0,36%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	2		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[21]	<input type="text" value="0%"/>	0,31%	Развитие процессов адаптации карди... http://ceninauku.ru	01 Янв 2017	Парфразирования по Интернету	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	<input type="text" value="0%"/>	0,3%	Лаборатория молекулярной медици... http://niboch.nsc.ru	26 Мая 2021	Интернет Плюс	0	3		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	<input type="text" value="0%"/>	0,3%	Лаборатория молекулярной медици... http://niboch.nsc.ru	25 Мая 2021	Интернет Плюс	0	3		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	<input type="text" value="0%"/>	0,29%	Лечить рак на уровне ДНК предлага... https://vn.ru	21 Сен 2020	СМИ России и СНГ	0	2		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	<input type="text" value="0%"/>	0,25%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	17 Июн 2022	Интернет Плюс	0	2		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	<input type="text" value="0%"/>	0,25%	Щербицкая, Анастасия Дмитриевна В... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	<input type="text" value="0%"/>	0,25%	Хобракова, Валентина Бимбаевна дис... http://dlib.rsl.ru	15 Сен 2015	Сводная коллекция РГБ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	<input type="text" value="0%"/>	0,25%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	14 Июн 2022	Интернет Плюс	0	2		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	<input type="text" value="0%"/>	0,23%	Захаров, Сергей Викторович Промы... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Приказ Министерства здравоохранен... http://ivo.garant.ru	22 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Приказ Министерства здравоохранен... http://ivo.garant.ru	22 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Модели, методика и средства разраб... http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Т. 2 http://emil.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Экспертиза в российском законодате... http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Теоретические основы новых направ... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	19 вузов России получили право прис... http://ug.ru	16 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Способ получения наноразмерной с... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Способ очистки вируса осповакцины ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1		Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[39]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	Средство для нейтрализации вируса н... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	сонин диплом на антиплагиат попыт...	25 Мая 2022	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	file_595465345d1c5мжпфи290617	29 Июн 2017	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	applied-research.ru_file_5a1691d9b6b1...	23 Ноя 2017	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	NYmnik_35098. Шедько Елизавета Дм... http://umnik.fasie.ru	06 Мая 2017	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	antyhova_e_a_evolyuciya-otechestve...	20 Фев 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	NYmnik_68112. Милахина Елена Васил... http://umnik.fasie.ru	31 Окт 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	NYmnik_74803. Милахина Елена Васил... http://umnik.fasie.ru	28 Ноя 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	<input type="text" value="0%"/>	0,18%	Противоопухолевое, иммуностимули... http://elibrary.ru	20 Мар 2020	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	<input type="text" value="0%"/>	0,17%	http://www.arfpoint.ru/wp-content/upl... http://arfpoint.ru	01 Окт 2020	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Диплом без списка литературы	13 Мар 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Подавление экспрессии генов Her2, С... http://elibrary.ru	13 Дек 2011	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Генетическое разнообразие белого ... http://elibrary.ru	01 Фев 2021	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	http://www.patolog.ru/sites/default/file... http://patolog.ru	27 Июл 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Гусаченко, Олеся Николаевна диссер... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Пугач, Виктория Александровна Орех... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Шкляева, Ольга Александровна диссе... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	https://transpl.ru/files/pashkov/Dissert... https://transpl.ru	28 Июн 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Агроэкологическое обоснование воз... http://dslib.net	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Взаимодействие вируса гриппа А(Н1... http://elibrary.ru	16 Фев 2017	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Аспиранты ВГАУ впервые получили д... http://voronej.bezformata.ru	02 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	ASSA http://assa.bionet.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Разработка форконтакта и адсорбент... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	ПОЛОВОЗРАСТНЫЕ АСПЕКТЫ КОРОН... https://elibrary.ru	15 Авг 2022	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Дифференцированный подход к хиру... http://diss.natlib.uz	28 Апр 2017	Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	Cellular technologies in treatment of lu... https://journals.eco-vector.com	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	http://www.youngbio-conf.unn.ru/files/... http://youngbio-conf.unn.ru	23 Мая 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	http://www.solid.nsc.ru/education/diss... http://solid.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[67]	0%	0,08%	https://openbio.ru/openbio_tezis_2014... https://openbio.ru	10 Апр 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0%	0,08%	https://asu.edu.ru/images/File/disserta... https://asu.edu.ru	31 Янв 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0%	0,07%	Inflammatory Caspases Drive Pyroptosi... https://frontiersin.org	05 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.