

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**Намаканова Ольга Александровна**

**Роль TNF и IL-6 в патогенезе аллергического воспаления и  
фиброзе легких у мышей**

Специальность 3.2.7. Иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук  
профессор РАН  
Друцкая Марина Сергеевна

кандидат биологических наук  
Губернаторова Екатерина Олеговна

Москва – 2026

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ADAM -металлопротеиназа  
CRTH2 - рецептор простагландина D<sub>2</sub>  
CysLTs – цистеиниллейкотриены  
CysLTR1 цистеиниллейкотриеновый рецептор 1  
EGF - эпидермальный фактор роста  
FcεR - рецептор Fc-фрагмента иммуноглобулина E  
GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор  
HDM –домашний пылевой клещ  
Ig - иммуноглобулин  
IL - интерлейкин  
ILC - лимфоидные клетки врожденного иммунитета  
LPS - липополисахарид  
MUC – муцин  
OVA - овальбумин  
PGD<sub>2</sub> - простагландин D<sub>2</sub>  
R – рецептор  
reg - регуляторные  
STAT - сигнальный белок и активатор транскрипции  
TACE (ADAM17) - TNF конвертирующий фермент  
TGF- β - трансформирующий фактор роста бета  
Th - Т-хелпер  
TNF - фактор некроза опухоли  
TSLP - тимусный стромальный лимфопоэтин  
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов  
АФК - активные формы кислорода  
АПК - антигенпрезентирующая клетка  
БАЛ - бронхоальвеолярный лаваж  
Бф - базофил  
ДК - дендритная клетка  
Тк – тучная клетка

## Оглавление

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>2</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>5</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>11</b>
1.1. Механизмы патогенеза астмы .....	12
1.1.1. Астма, ассоциированная с эозинофильным воспалением .....	13
1.1.2. Астма, ассоциированная с нейтрофильным воспалением.....	18
1.2. Ремоделирование дыхательных путей.....	20
1.3. Роль TNF в патогенезе бронхиальной астмы.....	22
1.4. IL-6 как основной медиатор воспаления при астме .....	25
1.5. Антицитокиновая терапия в лечении тяжелой астмы .....	26
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	<b>33</b>
Мыши .....	33
Генотипирование .....	33
Модель HDM-индуцированной аллергической астмы .....	34
Фармакологическая блокировка цитокинов IL-6 и TNF .....	35
Модель LPS-индуцированного фиброза легких .....	35
Оценка функциональных нарушений лёгких .....	35
Выделение иммунных клеток.....	37
Получение тканевых гомогенатов .....	38
Цитофлуориметрический анализ .....	38
Мультиплексный анализ цитокинов.....	40
Выделение РНК и обратная транскрипция .....	40
Измерение экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени.....	41
Гистологический анализ срезов легких.....	42
Статистическая обработка данных .....	44
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ</b> .....	<b>45</b>
3.1. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 эффективно подавляет Th2-индуцированную эозинофилию и Th1-/Th17-опосредованное нейтрофильное воспаление дыхательных путей при HDM-индуцированной астме .....	45
3.1.1. Комбинированная блокировка IL-6 и TNF у мышей с острой HDM-индуцированной астмой приводит к снижению инфильтрации гранулоцитов и поддержанию популяции альвеолярных макрофагов в дыхательных путях .....	48
3.1.2 По сравнению с ингибированием цитокинов по отдельности, комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 снижает как Th2-, так и Th1-опосредованное воспаление в легких .....	50
3.1.3 Нейтрализация IL-6 предотвращает вызванное ингибированием TNF накопление Th17-клеток в легких.....	54
3.2. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает ремоделирование легочной ткани в экспериментальной модели тяжелой астмы .....	56

3.3. Однократное ингаляционное введение LPS приводит к появлению типичных признаков фиброза легких через 5 недель .....	59
3.4. Генетическая инактивация <i>Il6</i> , но не <i>Tnf</i> защищает от нарушения основных параметров дыхания и функциональности легких в модели LPS-индуцированного фиброза у мышей .....	64
3.5. Повышенная экспрессия IL-6 вызывает системное и локальное воспаление и способствует патологическому ремоделированию легочной ткани .....	71
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>75</b>
<b>ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>84</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>86</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>88</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ .....</b>	<b>104</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Астма представляет собой хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, которое может быть вызвано воздействием аллергенов, респираторными инфекциями и бытовыми детергентами и усугубляться наследственной предрасположенностью, ожирением и курением. В настоящее время бронхиальная астма является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, в основе которого лежат различные патологические процессы, приводящие к ремоделированию и гиперреактивности дыхательных путей. Для пациентов с астмой характерна высокая степень гетерогенности, обусловленная различиями в молекулярных механизмах патогенеза, вовлеченности ключевых цитокинов, тяжести течения и эффективности терапии. Ключевым аспектом патологии у людей, страдающих астмой, является фиброз и ремоделирование легких, которые развиваются на фоне хронического воспаления и зачастую сопровождаются тяжелым течением заболевания и резистентностью к терапии. Понимание клеточно-молекулярных механизмов астмы необходимо для установления ключевых этапов развития заболевания, а также для разработки новых эффективных методов лечения и совершенствования существующих терапевтических подходов. Так, подавляющее большинство пациентов с астмой чувствительны к классическим методам лечения, основанных на применении кортикостероидов и бронходилататоров, в то время как нейтрофильная форма астмы трудно поддается стандартной терапии. В связи с этим, актуальной задачей остается поиск и разработка новых терапевтических стратегий для лечения тяжелой кортикостероид-резистентной астмы.

Функционирование иммунной системы в значительной степени регулируется цитокинами, а терапия, основанная на фармакологической блокаде определенных цитокинов и их рецепторов показала эффективность при лечении хронических воспалительных заболеваний, таких как колит и ревматоидный артрит. Патогенез астмы включает сложную сеть цитокиновых взаимодействий, играющих ключевую роль в регуляции и поддержании воспаления в дыхательных путях. Понимание функций цитокинов привело к выявлению ключевых медиаторов воспаления в легких, используемых в качестве мишеней для лечения тяжелой астмы. Так, для лечения тяжелой астмы одобрены и активно применяются терапевтические препараты на основе моноклональных антител, блокирующих IL-5, IL-4 и IL-13. Однако применение антител к этим цитокинам эффективно при лечении пациентов с тяжелой эозинофильной астмой, но не эффективно в отношении нейтрофильного воспаления. В связи с этим возникла

потребность в поиске потенциальных мишеней для контроля тяжелой формы астмы с нейтрофильным инфильтратом.

TNF и IL-6 обладают широким спектром функций, и в контексте астмы выступают в роли медиаторов воспаления дыхательных путей. TNF представляет собой важный биомаркер при тяжелой астме, а полиморфизмы гена TNF связаны с повышенным риском развития этого заболевания. Так как TNF необходим для поддержания воспаления, привлечения лейкоцитов в легкие, функционирования гладкомышечных клеток, блокаторы TNF были протестированы в ряде клинических исследований. Однако результаты клинических испытаний оказались неутешительными: несмотря на некоторые положительные эффекты анти-TNF терапии, нейтрализация только TNF оказалась недостаточной для полного контроля заболевания. Более того, системная блокировка TNF вызывала ряд опасных побочных эффектов, в том числе, опосредованных повышенной продукцией других провоспалительных цитокинов. С другой стороны, показан существенный вклад IL-6 в воспаление легких. При этом эффективность блокировки IL-6 при тяжелой кортикостероид-резистентной астме оставалась неизученной, как и комбинированная антицитокиновая терапия с возможностью одновременной нейтрализацией TNF и IL-6. Такой подход к лечению тяжелой нейтрофильной астмы обусловлен возможностью нивелировать нежелательные эффекты, вызванные блокировкой цитокинов по отдельности. **Цель** настоящей работы заключалась в изучении вклада TNF и IL-6 в развитие HDM-индуцированной астмы и LPS-опосредованного фиброза легких у мышей *in vivo*.

В рамках этой работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить эффекты от комбинированной фармакологической блокировки TNF и IL-6 на формирование Th2-ассоциированной эозинофилии и Th1-/Th17-опосредованной нейтрофилии легких в мышинной модели острой HDM-индуцированной астмы.
2. Установить последствия совместной нейтрализации TNF и IL-6 в ремоделировании легочной ткани в мышинной модели тяжелой HDM-индуцированной астмы.
3. Оптимизировать и охарактеризовать модель фиброза легких, индуцированного у мышей путем однократного ингаляционного введения LPS.
4. Определить функциональный вклад IL-6 и TNF по отдельности в механику дыхания у мышей на фоне LPS-индуцированного фиброза.
5. Установить последствия патологически высокой системной сверхпродукции IL-6 на легкие у трансгенных мышей.

## **Научная новизна работы**

В настоящей работе впервые получены результаты, свидетельствующие об эффективности комбинированной фармакологической блокировки TNF и IL-6 как комплексного подхода в подавлении эозинофильного и нейтрофильного воспаления при острой аллергической HDM-индуцированной астме на мышинных моделях. Было установлено, что комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 предотвращает инфильтрацию как эозинофилов, так и нейтрофилов в дыхательные пути. Так, показано, что нейтрализация TNF снижает Th2-опосредованный эозинофильный ответ в легких на аллерген. Было обнаружено, что введение блокаторов IL-6, преимущественно подавляет Th17-клеточный ответ, ассоциированный с инфильтрацией нейтрофилов. Впервые установлено, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 эффективна в снижении как Th2-, так и Th1-/Th17-опосредованных ответов при астме. Было подтверждено, что ингибирование TNF способствует экспансии Th17-клеток в легких. Кроме того, в настоящей работе было впервые продемонстрировано, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 способствуют возобновлению и поддержанию тканерезидентных альвеолярных макрофагов, главных гомеостатических иммунных клеток в легких. Впервые было показано, что совместное подавление TNF и IL-6 при тяжелой астме может обеспечить преимущество в подавлении TGF- $\beta$ -зависимом ремоделировании легких по сравнению с ингибированием этих цитокинов по отдельности. Для валидации результатов использовали генетически модифицированных мышей с удалением IL-6 и TNF, в результате чего был установлен вклад каждого цитокина в развитие фиброза легких. Оказалось, в контексте LPS-индуцированного фиброза легких TNF опосредует реакции острой фазы воспаления, влияя на инфильтрацию клеток и повреждение ткани, тогда как роль IL-6 более характерна для поздней фибропролиферативной стадии заболевания. Наконец, с использованием уникальных генетически модифицированных мышей со сверхэкспрессией IL-6 человека в CD4<sup>+</sup> клетках экспериментально продемонстрировано, что избыточная продукция IL-6 является ключевым фактором необратимого ремоделирования легких и сопутствующего ухудшения функционального состояния дыхательной системы.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Представленные результаты имеют важное значение как для фундаментальной науки, так и для клинических исследований. Идея комбинированной антицитокиновой терапии представляет собой многообещающую стратегию лечения пациентов с тяжелой формой астмы, устойчивых к стандартным методам терапии. Важной составляющей этой работы является использование релевантной мышинной модели аллергической астмы, индуцированной экстрактом домашнего пылевого клеща (HDM – house dust mite) как

эталонного и наиболее часто встречаемого аллергена. В работе показан комплексный эффект комбинированной блокировки TNF и IL-6, проявляющийся как в снижении Th2-ассоциированной эозинофилии, так и Th1-/Th17-опосредованной нейтрофилии в мышинной модели аллергической астмы. Данные, полученные в модели LPS-индуцированного фиброза, а также в условиях хронической сверхэкспрессии IL-6, свидетельствуют о ключевой роли IL-6 в поддержании персистирующего воспалительного ответа и ремоделирования легочной ткани, сопровождающегося прогрессирующим ухудшением функций дыхательной системы. Полученные результаты обосновывают целесообразность комплексного таргетирования TNF/IL-6 и свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки комбинированной стратегии антицитокиновой терапии для полного контроля тяжелых форм хронических заболеваний легких и предотвращения их долгосрочных осложнений.

**Объектом исследования** были мыши в возрасте 6-12 недель дикого типа линий BALB/c и C57BL/6, мыши с полным удалением генов, кодирующих IL-6 и TNF, а также со сверхэкспрессией IL-6 (hIL-6) человека в CD4<sup>+</sup> клетках, полученные на генетической основе C57BL/6. При формировании экспериментальных групп были использованы мыши обоих полов.

#### **Методология и методы исследования**

Для изучения последствий системной фармакологической блокировки TNF и IL-6 в *in vivo* модели были использованы мыши линии BALB/c. Для моделирования заболевания была выбрана модель астмы, индуцированной экстрактом домашнего пылевого клеща (HDM). Для системной фармакологической блокировки IL-6 и TNF использовали моноклональные антитела к IL-6 (MP5-20F3) и TNF (XT3.11), а также клинически применяемый TNF-блокатор – этанерцепт. Оценка характера иммунного ответа на аллерген была проведена с помощью проточной цитофлуориметрии клеток, гистологического анализа тканей, мультипараметрического флуоресцентного и иммуноферментного анализов продукции цитокинов. Для изучения механизмов легких, лежащих в основе перехода от острого воспаления к фибротическим изменениям в легких, была задействована модель LPS-индуцированного фиброза. Оценка острого и хронического воспаления в ответ на воздействие LPS осуществлялась посредством анализа популяций клеток крови на автоматизированном анализаторе BC-60R, а также цитофлуориметрического анализа клеток, иммуноферментного анализа продукции цитокинов, и гистологического анализа легочной ткани. Для определения вклада TNF и IL-6 в ремоделирование легких, вызванного воспалением, были использованы мыши с полным удалением IL-6 и TNF на фоне LPS-индуцированного фиброза легких, а также мышей со

сверхпродукцией hIL-6 в CD4<sup>+</sup> клетках. Исследование функциональных нарушений дыхательной системы было проведено с помощью системы FlexiVent SCIREQ с использованием техники вынужденных колебаний.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 снижает Th2- и Th1-/Th17-опосредованные клеточные ответы, в том числе подавляет эозинофильное и нейтрофильное воспаление в легких у мышей в экспериментальной модели HDM-индуцированной острой аллергической астмы.
2. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 способствует подавлению ремоделирования дыхательных путей по сравнению с монотерапией блокаторами IL-6 или TNF на фоне HDM-индуцированной тяжелой астмы.
3. В экспериментальной модели LPS-индуцированного фиброза легких TNF преимущественно выступает медиатором острой фазы воспаления, тогда как вклад IL-6 важен на фибропролиферативной стадии заболевания.
4. В модели избыточной продукции IL-6 играет ключевую роль в прогрессирующих нарушениях функционального состояния дыхательной системы.

#### **Достоверность результатов**

Результаты работы были воспроизведены в двух и более независимо поставленных экспериментах. Манипуляции с лабораторными животными, экспериментальные методы и статистический анализ соответствовали общепризнанным международным стандартам.

#### **Личный вклад автора**

В настоящей работе автором были выполнены эксперименты, связанные с изучением вклада TNF и IL-6 в развитие HDM-индуцированной астмы и LPS-опосредованного фиброза легких у мышей *in vivo*. Личный вклад автора состоял в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе результатов, подготовке публикаций и текста диссертации. Мультиплексный анализ цитокинов и гистологический анализ части образцов легких были выполнены при участии сотрудников направления «Иммунобиология и биомедицина» на базе Лабораторного комплекса НТУ «Сириус».

#### **Апробация результатов и публикации**

Результаты диссертационной работы были представлены на международных и отечественных конференциях: Конференция молодых ученых Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, 21-24 октября 2025, Москва; IV Международная научная конференция "Future of Biomedicine 2025", Владивосток, 16-22 сентября, 2025; Научная школа-конференция «Молекулярные механизмы иммунитета и других физиологических процессов», Сириус, 13-15 декабря, 2024; IV Балтийский симпозиум по

иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине: «Механизмы воспаления и регенерации в норме и при патологии» с международным участием, Калининград, 14-16 мая, 2024; Конференция молодых ученых Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, 19-20 сентября 2023, Москва; Международная научная конференция «Молекулярные медиаторы иммунитета и других физиологических процессов», Сириус, 25-27 ноября, 2022; 6th European Congress of Immunology (ECI), online, 1-4 сентября, 2021; II Всемирный конгресс по астме, аллергии и ХОБЛ, Санкт-Петербург, 29 июня-2 июля, 2019.

Результаты, представленные в диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях:

1. **Namakanova O.A.**, Yakovleva A.S., Gubernatorova E.O., Pukhalskaia T.V., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. Immunometabolic properties of tissue-resident alveolar macrophages depend on *ex vivo* culturing conditions // *Biochemistry (Moscow)*. 2026. – Vol. 91. – P. 358-368. doi: [10.1134/S0006297925603867](https://doi.org/10.1134/S0006297925603867).
2. **Намаканова О.А.**, Губернаторова Е.О., Чичерина Н.Р., Зварцев Р.В., Друцкая М.С. Экспериментальная модель легочного фиброза у мышей, индуцированная посредством аэрозольной доставки LPS // *Российский иммунологический журнал*. 2024. – Т. 27, №2. – С. 145-150. EDN: TUGFGT.
3. **Namakanova O.A.**, Gorshkova E.A., Zvartsev R.V., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O. Therapeutic potential of combining IL-6 and TNF blockade in a mouse model of allergic asthma // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. – Vol. 23. – P. 3521. EDN: GUHCLL.
4. Gubernatorova E.O., **Namakanova O.A.**, Gorshkova E.A., Medvedovskaya A.D., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. Novel anti-cytokine strategies for prevention and treatment of respiratory allergic diseases // *Frontiers in Immunology*. 2021. – Vol. 12. – P. 601842. EDN: BOUVWF.
5. Gubernatorova E.O., **Namakanova O.A.**, Tumanov A.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Mouse models of severe asthma for evaluation of therapeutic cytokine targeting // *Immunology Letters*. 2019. – Vol. 207. – P. 73-83. EDN: RGRCZJ.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Астма – хроническое воспалительное заболевание дыхательной системы, характеризующееся образованием слизи, гиперреактивностью бронхов и обструкцией дыхательных путей. Несмотря на то, что рецидивирующие свистящие хрипы, кашель, одышка и стеснение в грудной клетке являются характерными чертами астмы, некоторые особенности этого заболевания варьируют, включая возраст манифестации астмы, наличие сопутствующих заболеваний, а также обратимость обструкции дыхательных путей. Ключевой патологический процесс, сопряженный с развитием астмы, заключается в ремоделировании дыхательных путей, обусловленном гипертрофией гладкомышечного слоя, отложением внеклеточного матрикса, а также формированием субэпителиального фиброза. Совокупность вышеперечисленных признаков определяет астму как гетерогенное заболевание, причины развития которого в каждом конкретном случае, а также подбор эффективной терапии зачастую затруднительны [1].

Ранняя классификация астмы заключалась в разделении пациентов на группы на основе совокупности характеристик, обусловленных сочетанием наследственных факторов и факторов окружающей среды. Долгое время было принято классифицировать астму по двум основным фенотипам - атопическому и неатопическому. Атопическая астма с ранней манифестацией наиболее распространена среди детей и подростков, в то время как неатопическая астма преобладает в старших возрастных группах. Для более точной классификации заболевания были определены дополнительные фенотипы, основанные на воздействии или отсутствии внешних факторов, таких как аллергены. Исходя из этого, было предложено идентифицировать аллергический (атопический) и неаллергический (неатопический) фенотипы астмы, что также представляется чрезмерным упрощением [2]. Однако вследствие того, что деление на фенотипы астмы, характеризующиеся клиническими и патофизиологическими проявлениями, не давало полного представления о патогенетических механизмах заболевания, был введен термин «эндотип» [3, 4]. Существует несколько эндотипов, для каждого из которых описан основной механизм патогенеза или тип воспалительного процесса [5, 6]. Так, Th2-опосредованная астма, или «Th2-high», характеризуется высокой продукцией IgE и цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13, что приводит к инфильтрации клеток, ассоциированных с Th2-иммунным ответом, таких как эозинофилы, в легочную ткань [2, 6]. Th2-независимый тип астмы, или «Th2-low», связан с нейтрофильным воспалением, резистентностью к лечению кортикостероидами, а также отсутствием маркеров Th2-иммунного ответа. Кроме того, в патогенезе астмы задействована сложная система цитокиновых взаимодействий, играющая важную роль в контроле воспаления дыхательных путей. Терапевтические подходы, направленные на

подавление активности ключевых цитокинов, могут оказаться более эффективными для пациентов с тяжелой формой астмы, не отвечающих на стандартную терапию кортикостероидами [7]. Таким образом, понимание механизмов патогенеза заболевания, а также поиск и верификация ключевых цитокинов-мишеней для лечения тяжелой астмы, является крайне актуальной задачей.

### **1.1. Механизмы патогенеза астмы**

Воспаление вносит значительный вклад в патогенез астмы и представляет собой сложный процесс взаимодействия различных типов клеток и секретируемых медиаторов воспаления, что в конечном итоге приводит к характерным патофизиологическим проявлениям заболевания. Как уже упоминалось выше, выделяют две основные формы бронхиальной астмы: аллергическую и неаллергическую, или неатопическую. Аллергическая астма является наиболее распространенной у большинства детей и примерно у 50% взрослых и совпадает с сенсibilизацией такими аллергенами, как клещ домашней пыли (лат. *Dermatophagoides*), шерсть и перхоть животных, пыльца и грибковые антигены. Развитие аллергической астмы управляется Th2-иммунным ответом, для которого характерна высокая продукция IL-4, IL-5 и IL-13, выработка аллерген-специфического IgE, накопление Th2-клеток с последующей инфильтрацией эозинофилов в дыхательные пути, а также интенсивная продукция слизи [8]. У детей развитие аллергической астмы часто сопровождается экземой и аллергическим ринитом [9]. Последовательное прогрессирование атопии от атопического дерматита до аллергического ринита и бронхиальной астмы представляет концепцию «атопического марша». Атопия определяется как наследственная предрасположенность к сенсibilизации и выработке антител IgE в ответ на факторы окружающей среды.

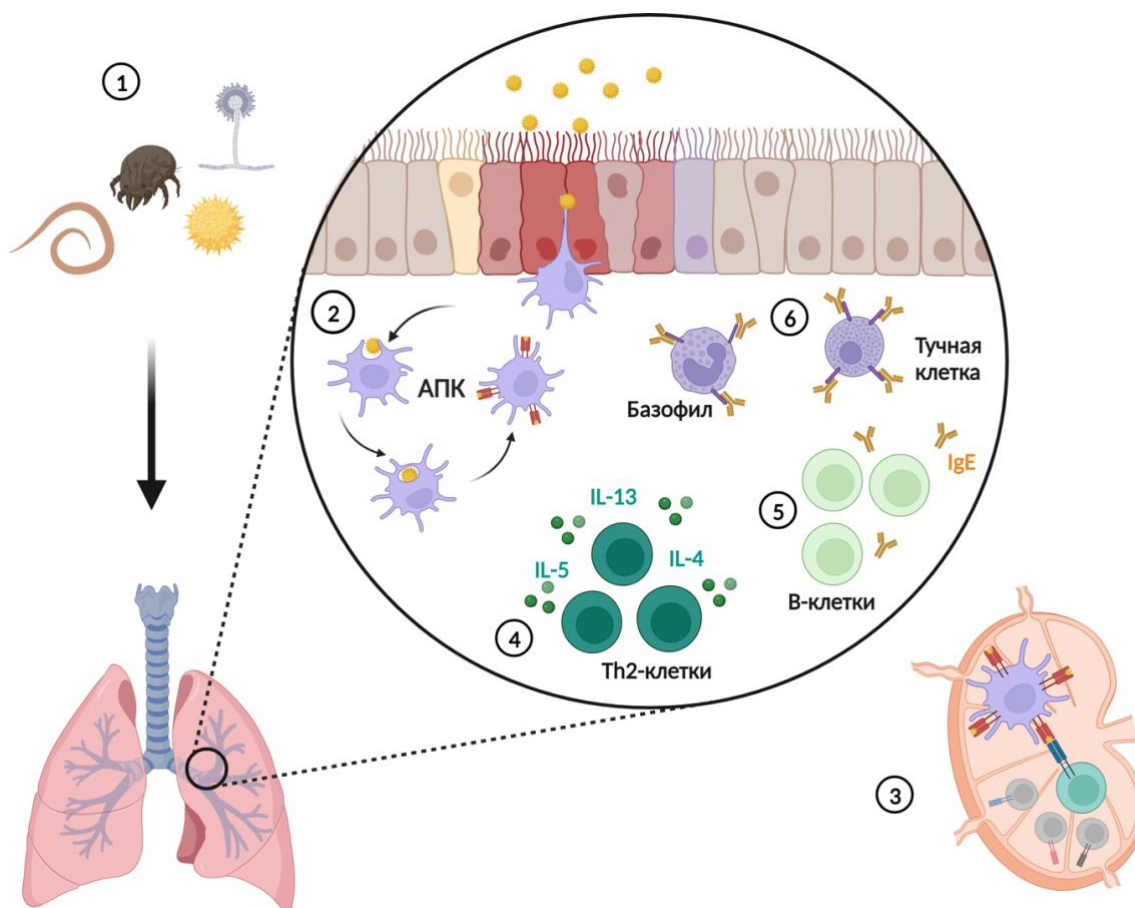
Неаллергическая (неатопическая) форма часто развивается в более позднем возрасте и встречается у 10-30% взрослых людей с астмой и связана с более тяжелыми клиническими проявлениями, которые плохо поддаются стандартным методам лечения [10, 11]. Одной из причин возникновения неаллергической астмы является сенсibilизация грибковыми антигенами [12, 13]. Кроме того, для неаллергической астмы характерна выраженная нейтрофилия легких, зачастую возникающая на фоне эозинофильной астмы при вирусных и бактериальных инфекциях, которые провоцируют обострение [14, 15]. При эозинофильной астме инфильтрация нейтрофилов не является характерным явлением, в то время как нейтрофильный эндотип, часто ассоциированный с тяжелым течением заболевания, характеризуется наличием нейтрофилии дыхательных путей выявляется даже вне обострения [16]. В отличие от аллергической астмы, ассоциированной с Th2-зависимым

ответом на аллергены, для неаллергической астмы характерен Th17-опосредованный иммунный ответ [17, 18].

### **1.1.1. Астма, ассоциированная с эозинофильным воспалением**

Аллергическая астма считается наиболее распространенным типом, который обычно индуцируется сенсibilизацией к аллергенам окружающей среды. В зависимости от природы аллергена профили сенсibilизации могут быть связаны с разными клиническими проявлениями и степенью тяжести [19]. Во время сенсibilизации происходит первичный контакт с аллергеном, приводящий к активации наивных Т-клеток и их дифференцировке в зрелые Т-хелперные клетки (Th-клетки). Кроме того, происходит переключение изотипа антител, продуцируемых В-клетками, на антитела класса IgE, которые взаимодействуют с FcεR рецепторами на поверхности тучных клеток и базофилов, что и представляет собой процесс сенсibilизации к аллергену (Рисунок 1). При повторном попадании аллергена в слизистую дыхательных путей наступает эффекторная стадия, в ходе которой ранее мигрировавшие Th-клетки продуцируют цитокины, а активация тучных клеток и базофилов за счет взаимодействия аллергена с антителами IgE, связанными с FcεR рецепторами, приводит к их дегрануляции. Индукция Т-клеток за счёт воздействия аллергена представляет собой сложный процесс, сочетающий многочисленные взаимодействия между разными типами клеток как локально в легочной ткани, так и на периферии – в лимфоузлах. Таким образом, процессы, происходящие в эффекторной фазе, приводят к возникновению симптомов аллергической астмы.

Эпителиальные клетки являются не только физическим барьером, но также управляют воспалительными реакциями в ответ на внешние стимулы. При астме межклеточные контакты эпителиального слоя нарушаются под действием протеолитически активных компонентов аллергенов, а также следовых количеств бытовых моющих средств, что приводит к увеличению проницаемости барьерной ткани [20]. Повреждение контактов эпителиальных клеток дыхательных путей характерно для всех типов астмы и может коррелировать с тяжестью заболевания [7].



**Рисунок 1. Стадия сенсibilизации при аллергической астме.** 1) Вдыхаемые аллергены достигают эпителиальный барьер дыхательных путей; 2) При проникновении аллергена в слизистую дыхательных путей активируются АПК, которые поглощают и процессируют антиген; 3) АПК мигрируют в дренирующие лимфоузлы и представляют антигенный пептид наивным Т-клеткам, запуская процесс дифференцировки в зрелые Тh-клетки; 4) Зрелые Тh-клетки начинают продуцировать цитокины, участвующие в развитии аллергических реакций; 5) Происходит переключение изотипа антител, продуцируемых В-клетками, на антитела класса IgE; 6) IgE взаимодействует с рецепторами на поверхности базофилов и тучных клеток. Рисунок выполнен с помощью BioRender.

После нарушения межклеточных контактов, аллергены способны активировать многие рецепторы врожденной иммунной системы на поверхности эпителиальных клеток. GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), TSLP (стромальный лимфопоэтин тимуса), IL-33 и IL-25 являются ключевыми цитокинами эпителиального происхождения, действующими как алармины, высвобождающиеся в ответ на активацию рецепторов врожденного иммунитета и потерю целостности эпителиального барьера [21, 22]. В иммунном ответе при астме TSLP, IL-33, IL-25 и GM-CSF выполняют ключевую роль в рекрутировании иммунных клеток в легочную ткань [23-25], усиливают гиперплазию бокаловидных клеток [26-28] и способствуют экспансии эозинофилов и тучных клеток в дыхательных путях [29].

При попадании аллергена в слизистую дыхательных путей активируются резидентные антигенпрезентирующие клетки (АПК), в основном дендритные клетки (ДК) и макрофаги легких. АПК поглощают и процессируют антиген, после чего мигрируют в дренирующие лимфоузлы для представления пептидов аллергена наивным Т-клеткам (Th0), запуская процесс дифференцировки в зрелые Th-клетки, результат которой во многом зависит от цитокинового контекста. В частности, для дифференцировки наивных Th0-клеток в зрелые Th2-клетки требуются высокие концентрации IL-4 в микроокружении [30]. Ключевым фактором транскрипции, экспрессируемым Th2-клетками, является GATA3, который управляет синтезом Th2-ассоциированных цитокинов, таких как IL-4, IL-5 и IL-13 [31, 32]. Эти медиаторы стимулируют в макрофагах, дендритных, эпителиальных и эндотелиальных клетках экспрессию хемокиновых молекул CCL1, CCL11, CCL17 и CCL22, которые, в свою очередь, привлекают другие иммунные клетки для участия в аллергическом каскаде [33]. IL-4 и IL-13 управляют переключением класса антител в сторону IgE [34, 35], а также индуцируют пролиферацию IgE-продуцирующих В-клеток и эндотелиальных клеток [36].

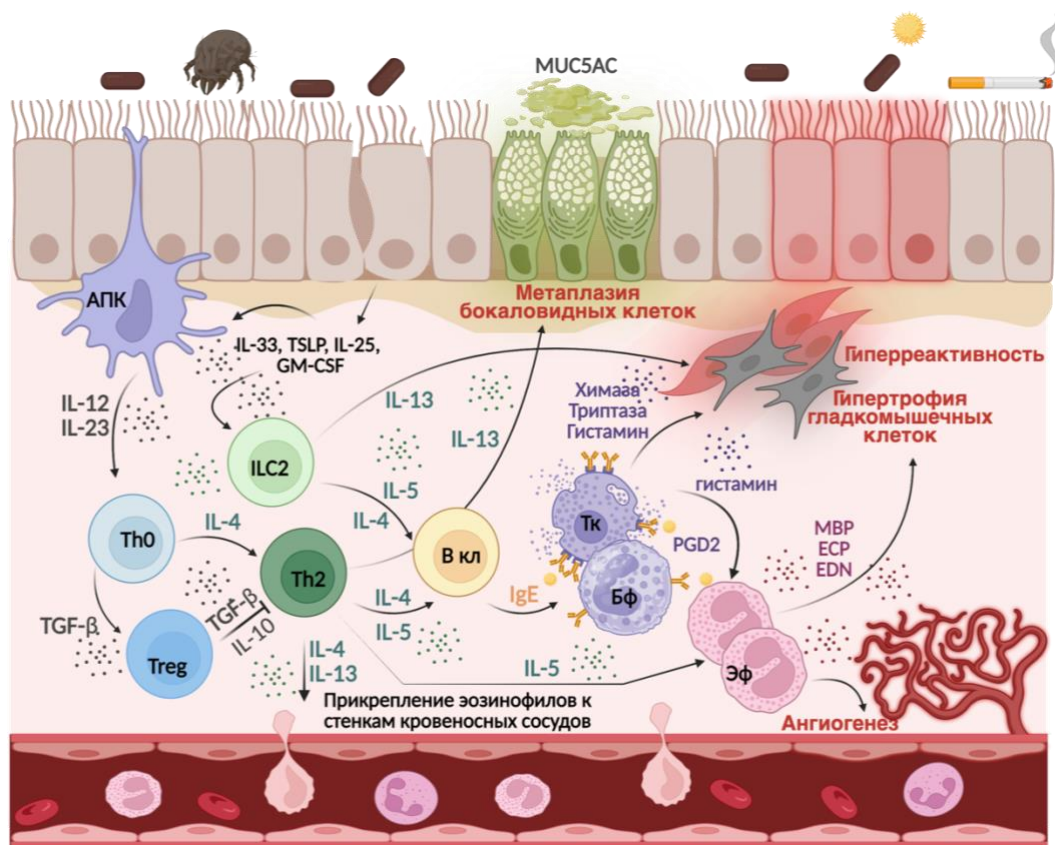
IL-5 играет ключевую роль в дифференцировке и созревании эозинофилов из миелоидных клеток-предшественников костного мозга, а также в их активации и выживании [37]. Трансэндотелиальная миграция эозинофилов в дыхательные пути стимулируется IL-4 путем взаимодействия интегринов на поверхности эозинофилов и их рецепторов на поверхности эндотелия. Несмотря на то, что IL-5 является основным фактором созревания, активации и выживания эозинофилов, существует IL-5-независимый путь, где в качестве основного медиатора выступает IL-13 [38, 39]. После инфильтрации и дегрануляции эозинофилы высвобождают цитотоксические вещества, включая эозинофильный нейротоксин, эозинофильный катионный белок, эозинофильную пероксидазу, которые в значительной степени способствуют повреждению эпителия и гиперреактивности дыхательных путей, а также гиперпродукции слизи бокаловидными клетками [40]. Кроме того, эозинофилы секретируют цистеинил-лейкотриены (cysLTs) [41], являющиеся сильными провоспалительными медиаторами и вызывающие бронхоспазм, повышение проницаемости сосудов и продукцию слизи.

Врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2) первоначально были описаны в кишечнике мышей, инфицированных гельминтами, где они способствовали тканевой эозинофилии [42], однако впоследствии их важная роль была показана и в патогенезе аллергической астмы. ILC2 развиваются из общего лимфоидного предшественника и зависят от транскрипционных факторов GATA-3 и ROR $\alpha$  [43]. Несмотря на то, что у ILC2 отсутствуют антиген-специфичные рецепторы, они способны, подобно Th2-клеткам,

реагировать на TSLP, IL-25 и IL-33, продуцируемых эпителиальными клетками легких [44, 45]. Во многих аспектах ILC2 функционально напоминают Th2-клетки. В частности, после стимуляции, вызванной аларминами, ILC2 выделяют цитокины Th2-типа – IL-5 и IL-13 [44]. Другим способом активации ILC2 в легких является взаимодействие цистеинил-лейкотриенового рецептора CysLTR1 со своим лигандом LTD4 [46], либо за счет сигнального пути простагландина D2 (PGD2) через CRTH2 рецептор [47], что указывает на раннюю активацию ILC2 в ответ на аллерген. Продукция IL-5 и IL-13 этими клетками вызывает эозинофилию и гиперреактивность легких независимо от Th2-клеток. ILC2 могут прямо или косвенно влиять на функциональность Th2-клеток. Как правило, поляризация наивных Т-клеток происходит через IL-4-опосредованный сигнальный путь. Однако в экспериментальной модели IL-4-независимого аллергического воспаления легких было показано, что ответ на вдыхаемый папаин опосредован IL-13, вырабатываемым ILC2, но не Th2-клетками [48].

Процесс взаимодействия IgE с FcεR рецепторами на поверхности тучных клеток, базофилов и эозинофилов является важной частью аллергического каскада. При перекрестном связывании аллергена с IgE на базофилах и тучных клетках происходит немедленная дегрануляция и высвобождение предварительно сформированных биологически активных медиаторов, таких как гистамин, триптаза и химаза, а также Th2-ассоциированных цитокинов для усиления Th2-опосредованного воспаления. Активация тучных клеток и базофилов отвечает за быструю фазу аллергического ответа, характеризующегося расширением сосудов, их повышенной проницаемостью, значительным сужением дыхательных путей и рекрутированием иммунных клеток в легкие. Высвобождение простагландинов D2 (PGD2), основным источником которого являются тучные клетки, запускает гиперпродукцию слизи бокаловидными клетками [49]. Кроме того, тучные клетки способны проникать в слой гладкой мускулатуры бронхов, вызывая гиперплазию гладкомышечных клеток и усиливая гиперреактивность [50]. Базофилы, помимо немедленного реагирования при повторном попадании аллергена, являются важным источником IL-4 и IL-13, хотя истощение этой клеточной популяции не устраняет симптомы астмы [51, 52]. Примечательно, что благодаря экспрессии FcεR гладкомышечными клетками [53], они способны напрямую реагировать на IgE, продуцируя цитокины и хемокины, а за счет своей пролиферации и сократительной активности способствуют гиперреактивности дыхательных путей [54]. Кроме того, за счет экспрессии FcεR рецепторов на поверхности эозинофилов происходит косвенное влияние IgE на эпителиальные клетки дыхательных путей, о чем свидетельствует апоптоз эозинофилов, вызванном применением моноклонального антитела омализумаба к IgE.

Обильное выделение слизи является одним из ярких симптомов астмы, однако в легких здорового человека слизь играет ключевую роль в поддержании барьерной функции и газообмена. Слизь выстилает проводящие дыхательные пути вплоть до терминальных бронхиол и образует важнейший компонент мукоцилиарного покрова, улавливающего вдыхаемые загрязняющие вещества, что предотвращает раздражение эпителия [55]. Основными муцинами, секретируемыми бокаловидными клетками в легких человека и мыши, являются MUC5AC и MUC5B [56]. Здоровые легкие содержат в основном MUC5B [57], а при развитии астмы происходит нарушение соотношения, при этом MUC5AC резко повышается, особенно при эозинофильной астме [58, 59]. IL-13, активируя транскрипционный фактор STAT6, является главным индуктором продукции слизи и гиперплазии бокаловидных клеток [60]. При астме характерна обильная продукция слизи с высокой вязкостью, что придает ей более липкую консистенцию вплоть до образования слизистой пробки, блокирующей дыхательные пути [61]. В слизистой пробке пациентов с астмой часто присутствуют кристаллы Шарко-Лейдена [62]. Основным компонентом кристаллов Шарко-Лейдена является галектин-10 — цитоплазматический белок эозинофилов, участвующий в биогенезе гранул. Накопление этих кристаллов ассоциировано с активацией развития Th2-опосредованного ответа, а также нейтрофилией при назальном полипозе [62, 63]. Помимо этого, кристаллы могут индуцировать продукцию слизи эпителиальными клетками, а также напрямую взаимодействовать со слизью, увеличивая ее вязкость [64]. Таким образом, неправильный фолдинг белков, вырабатываемых эозинофилами, с последующей их кристаллизацией в легочной ткани может выступать самостоятельным механизмом, провоцирующим интенсивную секрецию слизи и, как следствие, обострение бронхиальной астмы [63]. Центральная роль Th2-клеток и IL2 в развитии астмы, ассоциированной с эозинофилией, представлена на Рисунке 2.



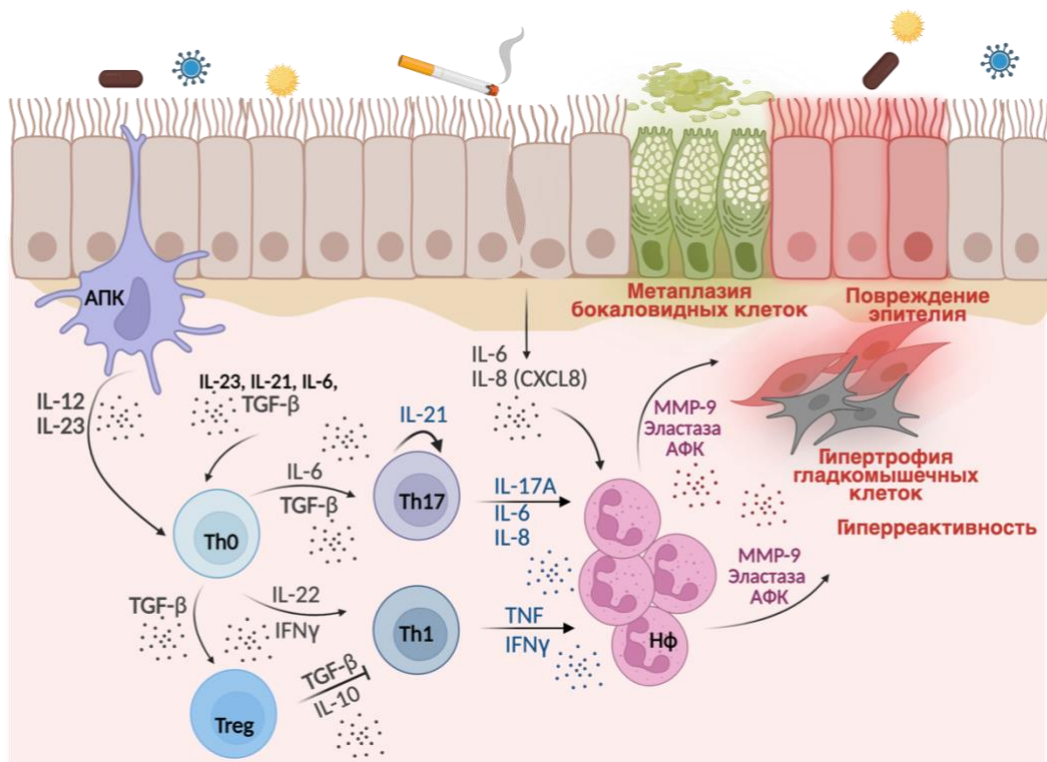
**Рисунок 2. Центральная роль Th2-клеток и ILC2 в развитии «Th2-high» эндотипа астмы.** Астма «Th2-high» эндотипа характеризуется наличием эозинофилов в дыхательных путях, гиперплазией бокаловидных клеток, высокой продукцией муцина MUC5AC и отложением коллагена миофибробластами. Th2-клетки накапливаются в легочной ткани и продуцируют Th2-ассоциированные цитокины IL-4, IL-5 и IL-13. В некоторых случаях врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2) активируются непосредственно аларминами TSLP, IL-25 и IL-33. Th2-клетки и ILC2 имеют много общих черт, таких как наличие транскрипционного фактора GATA3 и продукция IL-4, IL-5 и IL-13. IL-5 регулирует развитие эозинофилов и их привлечение в дыхательные пути. IL-13 управляет гиперплазией бокаловидных клеток и гиперреактивностью бронхов. IL-4, помимо своей роли в дифференцировке наивных Th0-клеток в сторону Th2-клеток, способствует экстравазации эозинофилов в легочную ткань посредством индукции молекул адгезии на кровеносных сосудах, а также способствует синтезу IgE. При перекрестном связывании аллергена с IgE на базофилах (Бф) и тучных клетках (Тк) происходит немедленная дегрануляция и высвобождение предварительно сформированных биологически активных медиаторов, таких как гистамин, триптаза и химаза, а также Th2-ассоциированных цитокинов для усиления Th2-опосредованного воспаления. В свою очередь, эозинофилы способствуют ангиогенезу и гиперреактивности бронхов посредством секреции основного белка (MBP), эозинофильного катионного белка (ECP) и эозинофильного нейротоксина (EDN). Рисунок выполнен с помощью BioRender.

### 1.1.2. Астма, ассоциированная с нейтрофильным воспалением

Эндотип астмы «Th2-low» типа характеризуется преимущественно нейтрофильным воспалением в легких и нередко ассоциирован с трудно контролируемым заболеванием [65]. В качестве причин развития нейтрофильной астмы могут выступать усугубленная инфекциями эозинофильная астма [66], метаболические расстройства [67], курение и

загрязнение воздуха [68], интенсивные физические нагрузки [69] или сенсibilизация к грибковым антигенам [13]. Ключевым признаком нейтрофильной астмы служит резистентность к терапии кортикостероидами, которые блокируют апоптоз нейтрофилов [70].

Начальные этапы развития нейтрофилии при астме аналогичны тем, которые наблюдаются при эозинофильном воспалении, однако связаны с активацией Th1- и Th17-клеток. Цитокины TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21 и IL-23, продуцируемые клетками микроокружения, способствуют дифференцировке наивных T-клеток в Th17- или Th1-клетки [16]. Так, установлено, что продукция IL-17A, GM-CSF и TNF повышена в крови и бронхоальвеолярной жидкости у пациентов с нейтрофильной астмой [71]. Активация Th1-клеток стимулируется IL-12 и приводит к продукции IFN $\gamma$  [72]. В экспериментальной модели тяжелой астмы было показано, что высокий уровень IFN $\gamma$  связан с резистентностью к кортикостероидам [73]. В свою очередь, Th17-клетки продуцируют IL-17A, который индуцирует секрецию эпителиальными клетками хемокинов CXCL8 (IL-8), CXCL5 и GM-CSF, привлекающих нейтрофилы [74, 75]. При этом Th17-ассоциированные цитокины вызывают гиперплазию бокаловидных клеток и увеличение массы гладкомышечных клеток [76], а также стимулируют пролиферацию фибробластов [77]. При этом нейтрофилы могут способствовать выработке провоспалительных цитокинов, рекрутированию лейкоцитов, повреждению эпителия и эндотелия, выработке слизи и пролиферации гладкомышечных клеток [16]. В гранулах нейтрофилов содержатся матриксные металлопротеиназы, нейтрофильные эластазы и активные формы кислорода, нарушающие эпителиальный барьер, что также приводит к ремоделированию. CXCL8, секретируемый эпителиальными клетками, T-клетками и макрофагами, представляет мощный хемоаттрактант в легких, и его повышенная продукция коррелирует с усиленной инфильтрацией нейтрофилов [78] (Рисунок 3).



**Рисунок 3. Th1/Th17-опосредованная нейтрофилия дыхательных путей.** Продукция IL-23, IL-21, IL-6 и TGF- $\beta$  во время активации Th-клеток сдвигает их дифференцировку в сторону Th17- или Th1-клеток. Th17- и Th1-клетки продуцируют IL-17, TNF и IFN $\gamma$ , что приводит к повышенной нейтрофилии. Кроме того, эпителиальные клетки в ответ на различные стимулы окружающей среды продуцируют CXCL8 (IL-8), мощный аттрактант нейтрофилов. Нейтрофильное воспаление плохо поддается терапии кортикостероидами в силу того, что кортикостероиды ингибируют апоптоз в нейтрофилах. Медиаторы активированных нейтрофилов, такие как матриксные металлопротеиназы (MMP-9), нейтрофильная эластаза и активные формы кислорода (АФК) вызывают повреждение эпителиального слоя клеток, гиперплазию бокаловидных клеток и гипертрофию гладкомышечных клеток. Рисунок выполнен с помощью BioRender.

Эозинофильный и нейтрофильный эндотипы не являются взаимоисключающими формами астмы. Действительно, у части пациентов с тяжелым течением астмы наблюдается накоплением эозинофилов одновременно с увеличением количества нейтрофилов в дыхательных путях [79]. Кроме того, взаимодействие между «Th2-high» и «Th2-low»-опосредованными путями в период различных фаз воспаления дыхательных путей подтверждается присутствием в крови одновременно Th2- и Th17-субпопуляций, что доказывает сосуществование различных воспалительных реакций у одного пациента, которые могут чередоваться на разных стадиях заболевания [80].

## 1.2. Ремоделирование дыхательных путей

Ремоделирование дыхательных путей проявляется в виде патологической структурной перестройки легких, приводящей к нарушениям их функциональности. В контексте астмы патоморфологические изменения в легких условно подразделяют на два

типа: изменения эпителиального и гладкомышечного слоев, свидетельствующие об обострении, а также субэпителиальный фиброз, типичный для персистирующей астмы [81].

Основная причина ремоделирования при астме не ясна, но считается, что важную роль играют хроническое воспаление и механическое повреждение от повторяющихся бронхоспазмов [82]. Клеточные и внеклеточные изменения в тканях легких начинаются с нарушения целостности эпителиального барьера, приводящего к гиперплазии бокаловидных клеток и гиперсекреции слизи. При хроническом повреждении присоединяются пролиферация гладкомышечных клеток, ангиогенез и накопление фибробластов с отложением внеклеточного матрикса [83].

Механическое воздействие, испытываемое клетками дыхательных путей при обычном дыхании минимально. Однако во время бронхоспазмов эпителиальные клетки подвергаются растяжению и трению [83], что приводит к их активации с последующей продукцией TGF- $\beta$ , GM-CSF [84], а также EGF (эпидермальный фактор роста) [85] и гиперплазией бокаловидных клеток. В целом, гиперплазия бокаловидных клеток в сочетании с избыточной продукцией слизи вызывает закупорку и последующую обструкцию дыхательных путей. В процессе ремоделирования дыхательных путей также наблюдается аномальный ангиогенез, характеризующийся пролиферацией и гипертрофией кровеносных сосудов, а также более выраженной капиллярной сетью собственной пластинки слизистой оболочки [86]. VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), выступая основным регулятором ангиогенеза, индуцирует проницаемость сосудов, что приводит к их расширению, отеку и последующему сужению просвета бронхов [87].

Ключевые особенности ремоделирования дыхательных путей обусловлены преимущественно пролиферацией и активацией гладкомышечных клеток и фибробластов. Гиперплазия и гипертрофия гладкомышечных клеток связаны с тяжестью заболевания [88], а субэпителиальная миграция этих клеток с последующим накоплением внутриклеточного матрикса усугубляет обструкцию бронхов [89]. Ремоделирование дыхательных путей заканчивается фиброзом ткани, в основе которого лежит активность профибротических факторов, дифференцировка фибробластов в миофибробласты и отложение белков внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин) с последующим утолщением базальной мембраны [90, 91]. Интенсивность субэпителиального фиброза также ассоциирована с тяжестью заболевания [92]. Так, содержание коллагена в легких повышается у пациентов с умеренно-тяжелой астмой по сравнению с легкой формой. Активация TGF- $\beta$ -опосредованного каскада приводит к усиленной экспрессии профибротических генов, кодирующих маркер дифференцировки фибробластов -  $\alpha$ -SMA, а также различных изоформ коллагена, что приводит к накоплению внеклеточного матрикса [93, 94]. Изначально,

процесс трансдифференцировки фибробластов в миофибробласты рассматривался как ключевой механизм заживления ран, при котором миофибробласты стимулируют рубцевание через повышенную продукцию коллагена, а затем подвергаются апоптозу после заживления [95]. Однако длительное воспаление создает локальное микроокружение, при котором миофибробласты могут находиться в активированном состоянии и продолжать пролиферировать, что приводит к чрезмерному отложению внеклеточного матрикса, уплотнению ткани и, в конечном итоге, фиброзным поражениям [96]. Помимо TGF- $\beta$ , IL-10, IL-13 и IL-4 также вносят значительный вклад в развитие легочного фиброза. Полное удаление IL-10 у мышей предотвращало блеомицин-индуцированный фиброз [97], тогда как у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом отмечался локальный повышенный уровень продукции IL-10 [98]. В свою очередь IL-4 вносит вклад в ремоделирование дыхательных путей через активацию Th2-клеток и привлечение эозинофилов, тогда как IL-13 напрямую способствует структурным изменениям за счет усиления продукции слизи и гиперреактивности легких, а также выработки коллагена и  $\alpha$ -SMA в фибробластах [99].

Таким образом, по мере прогрессирования процессов чрезмерного разрушения и ремоделирования ткани характер астмы изменяется от эпизодического состояния к хронически персистирующему и устойчивому к лечению заболеванию. Для поиска новых биомаркеров и потенциальных мишеней терапии астмы требуются дальнейшие исследования патофизиологических механизмов фиброза легких.

### **1.3. Роль TNF в патогенезе бронхиальной астмы**

TNF представляет собой многофункциональный цитокин, участвующий в регуляции воспаления, органогенезе вторичных лимфоидных органов, а также выполняющий защитную роль при некоторых инфекциях [100]. К клеткам, продуцирующим TNF, относятся клетки миелоидного ряда, в первую очередь, моноциты и макрофаги, клетки стромы, в том числе фибробласты и эндотелиальные клетки, а также NK-клетки [101], T- и B-лимфоциты [102]. При этом, клетками, продуцирующими TNF и играющими ключевую роль в патогенезе астмы, могут являться также Th1-клетки [103], гранулоциты [104], и тучные клетки [105]. TNF продуцируется в виде трансмембранного гомотримерного белка (tmTNF), который подвергается протеолитическому расщеплению благодаря ферментативной активности металлопротеазы ADAM17 (или TACE) в результате чего происходит образование растворимой формы TNF (sTNF), опосредующей многочисленные системные эффекты [106]. Передача сигнала TNF осуществляется через два высокоаффинных рецептора. TNFR1 (p55) экспрессируется на всех типах клеток, в то время как экспрессия TNFR2 (p75) ограничена и присутствует на моноцитах, регуляторных T-клетках, нейронах и миелоидных супрессорных клетках [107-109]. Оба рецептора могут

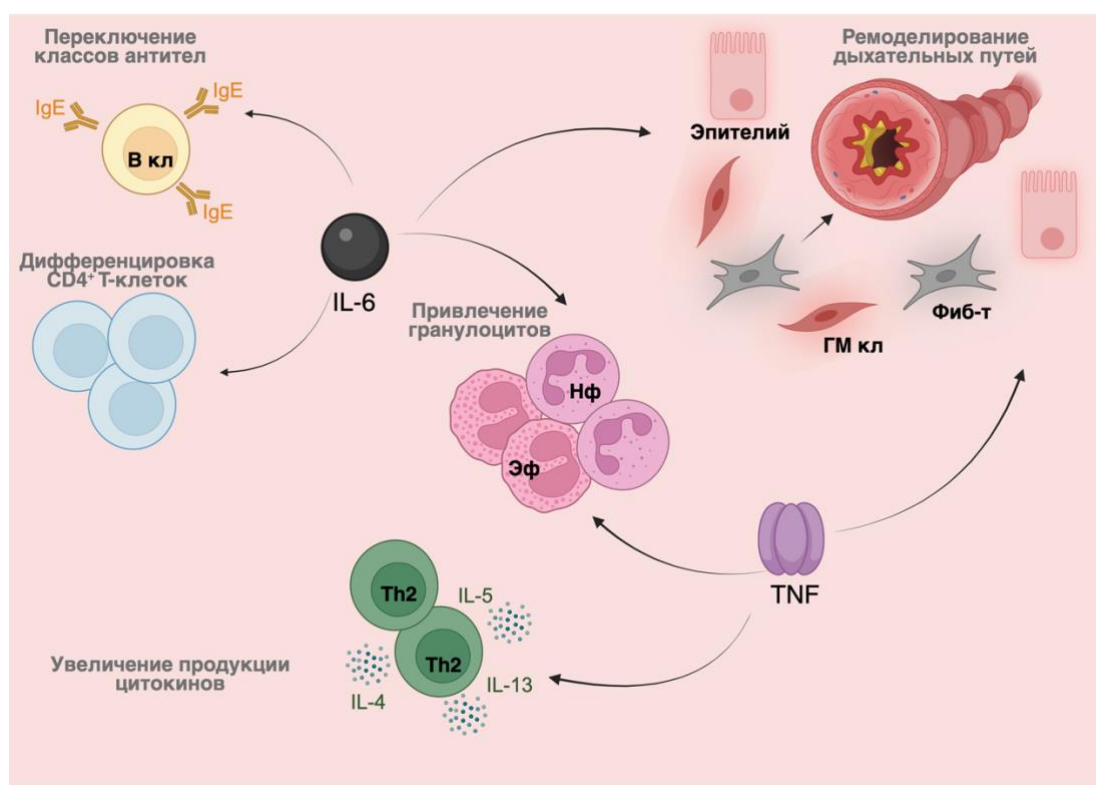
существовать как в мембранно-связанной, так и растворимой формах (sTNFR1 и sTNFR2). TNFR1 может активироваться при связывании с мембранно-связанной и растворимой формами TNF, тогда как TNFR2 взаимодействует преимущественно с мембранно-связанным TNF [110]. Сигнальный путь, опосредованный рецептором TNFR1, содержащим внутриклеточный домен смерти, активирует экспрессию провоспалительных генов, а также индуцирует два механизма программируемой клеточной гибели [111]. TNFR2-опосредованная передача сигнала связана с пролиферацией и выживанием клеток [112]. При этом взаимодействие трансмембранной формы TNF с рецепторами может индуцировать «обратную» передачу сигнала через активацию MAPK/ERK-, Nrf2-, а также канонического NF-κB-опосредованных путей [113-115].

Известно, что TNF играет критическую роль в развитии хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как бактериальные инфекции, астма и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). Так, при инфекции наблюдается повышение системного уровня TNF, что может спровоцировать развитие септического шока. Однако мыши с делецией TNF или TNFR1 резистентны к септическому шоку, но уязвимы к бактериальным инфекциям [116], поскольку TNF/TNFR1-опосредованный путь регулирует образование гранул при инфекции *M. Tuberculosis*. Секретируемый нейтрофилами и макрофагами TNF контролирует бактериальную нагрузку на ранней стадии заболевания, в отличие от T-клеточного TNF, необходимого для эффективного ограничения инфекции *M. Tuberculosis* [117, 118]. TNF играет важную роль и в патогенезе астмы. Так, проявление аллергических реакций, индуцированных овальбумином (OVA), подавлялось у мышей с генетической инактивацией *Tnf*, а также на фоне фармакологической блокировки цитокина [119-121]. Метаанализ показал существенную корреляцию между полиморфизмами TNF и повышенным риском развития астмы [122]. Так, сывороточный TNF представляет собой важный биомаркер тяжелой астмы [123]. Недавнее исследование показало, что при нейтрофильной астме наблюдается повышенная продукция как TNF, так и его рецепторов в мокроте, что говорит о нарушении регуляции TNF-опосредованной передачи сигнала при плохо контролируемой астме [124].

TNF индуцирует выработку Th2-ассоциированных цитокинов с последующей активацией эозинофилов, базофилов и тучных клеток [125, 126]. При астме TNF, синергически взаимодействуя с IL-17A, способствует инфильтрации нейтрофилов [17]. В контексте аллергических заболеваний сигнальная ось TNF-TNFR1 задействована в привлечении гранулоцитов и лимфоцитов в дыхательные пути [127]. В свою очередь, нарушение TNF-TNFR2-опосредованного сигнала способствует дифференцировке Th2-или Th17-клеток и усугубляет воспаление дыхательных путей [128]. Так, у мышей с делецией

TNFR2 наблюдалось значительное усиление эозинофилии, тогда как мыши с полным удалением TNFR1 демонстрировали сниженное эозинофильное воспаление [127]. TNF обладает рядом функциональных характеристик, способствующих развитию тяжелой рефрактерной астмы, включая индукцию резистентности к глюкокортикоидам [129], активацию трансдифференцировки фибробластов в миофибробласты путем индукции TGF- $\beta$  [130], а также развитие гиперреактивности дыхательных путей за счет прямого воздействия TNF на гладкомышечные клетки [131].

В недавнем исследовании была показана роль TNF в формировании «тренированного» иммунитета макрофагов, что обеспечивает быстрый Th2-опосредованный ответ при астме [130]. Известно, что аллергены, распознаваемые во время сенсibilизации, могут определять преобладающий тип иммунного ответа и тяжесть развития астмы. Так, костномозговые макрофаги TLR4-зависимым путем приобретают отчетливый иммунометаболический профиль, который характеризуется увеличением продукции TNF и повышением гликолиза и дыхания при *in vitro* сенсibilизации HDM [132]. Таким образом, TNF, выполняя разнообразные функции в аллергическом воспалении дыхательных путей, осуществляет сложную дисрегуляцию иммунного ответа. Основные функции TNF в патогенезе астмы представлены на Рисунке 4.



**Рисунок 4. Комплексная роль TNF и IL-6 в патогенезе астмы.** Провоспалительные цитокины TNF и IL-6 представляют собой ключевые медиаторы в развитии астмы. TNF и IL-6 участвуют в привлечение гранулоцитов, ремоделировании ткани посредством стимуляции фибробластов (Фиб-т), эпителиальных и гладкомышечных клеток (ГМ кл). Пroliferация и трансдифференцировка фибробластов также зависят от экспрессии TGF-

$\beta$ , индуцированной TNF и IL-6. TNF индуцирует выработку Th2-ассоциированных цитокинов с последующей активацией эозинофилов, базофилов и тучных клеток. В свою очередь, IL-6 направляет дифференцировку, регулирует функции и выживание CD4<sup>+</sup> T-клеток, а также участвует в переключении классов антител. Рисунок выполнен с помощью BioRender.

#### 1.4. IL-6 как основной медиатор воспаления при астме

IL-6 – цитокин с множеством функций, включая индукцию воспаления и защиту от различных инфекций, а также гомеостаз иммунной системы, регулирующий пролиферацию и дифференцировку клеток [133]. IL-6 продуцируется макрофагами, T- и B-клетками, дендритными клетками, моноцитами, фибробластами, эпителиальными, гладкомышечными клетками и многими другими типами клеток [134, 135]. В условиях контролируемого воспалительного процесса IL-6 обеспечивает поддержание гомеостаза тканей и способствует их регенерации. Тем не менее, при постоянной продукции IL-6 нарушается гомеостаз, что приводит к повреждению тканей и развитию различных заболеваний [136].

Плейотропность IL-6 связана не только с широким спектром клеточных источников, но и со сложностью его рецепторной системы. IL-6-опосредованная передача сигнала требует взаимодействия двух субъединиц IL-6Ra и gp130, которые могут существовать как в мембранно-связанной, так и в растворимой формах [137]. Существует три способа передачи сигнала от IL-6. Классический путь передачи сигнала включает связывание IL-6 с мембранно-связанным рецептором IL-6Ra, после чего образованный комплекс IL-6/IL-6Ra взаимодействует с субъединицей gp130, которая ответственна за внутриклеточную передачу сигнала. IL-6R присутствует в растворимой форме, которая образуется в результате альтернативного сплайсинга или протеолиза с участием ферментов ADAM17/ADAM10 [138], а субъединица gp130 экспрессируется практически на всех типах клеток. Таким образом, клетки, не экспрессирующие на своей поверхности IL-6Ra, благодаря наличию gp130 и его связыванию с растворимым комплексом IL-6/sIL-6R, могут принимать сигнал и отвечать на IL-6. Этот тип передачи сигнала получил название транс-сигналинг [139]. Именно с транс-сигналингом связывают патогенетические эффекты при тяжелой форме астмы [140]. Наконец, при кластерной передаче сигнала, или транс-презентации, сформированный комплекс IL-6/IL-6Ra презентуется клеткой-донором клетке-реципиенту, экспрессирующей субъединицу gp130 на своей поверхности [141]. Существование транс-презентации было впервые описано для дендритных клеток и их роли в образовании популяции Th17-клеток в экспериментальной модели рассеянного склероза [142]. В зависимости от конкретного типа передачи сигнала, механизм и эффективность фармакологической блокировки IL-6 существенно варьирует. Моноклональные антитела к

IL-6 ингибируют как классическую передачу сигнала, так и транс-сигнализацию, однако не воздействуют на транс-презентацию. Растворимая форма gp130 нейтрализует растворимые комплексы IL-6R $\alpha$ /IL-6, блокируя исключительно транс-сигналинг [141, 143, 144].

Повышенная продукция IL-6, наблюдаемая при различных заболеваниях легких указывает на его ключевую роль в патологическом воспалении [145]. Повышенная продукция IL-6 детектируется в сыворотке, мокроте и бронхоальвеолярной жидкости у пациентов с астмой и коррелирует с тяжестью заболевания [67]. Кроме того, данные по эффектам ингибирования IL-6R указывают на ключевую роль передачи сигнала IL-6 в накоплении регуляторных T-клеток и снижении количества эффекторных Th-клеток [146], что подтверждает роль IL-6 в определении направления дифференцировки и выживании CD4<sup>+</sup> T-клеток [147-149]. Способствуя развитию CD4<sup>+</sup> T-клеток в Th17-клетки, IL-6 вместе с TGF- $\beta$  подавляет дифференцировку регуляторных T-клеток [150]. Помимо этого, созревание B-клеток в плазматические клетки и переключение классов антител также происходит с участием IL-6 [151]. Наряду с провоспалительными эффектами, IL-6 посредством транс-сигналинга в эпителиальных клетках стимулирует структурное ремоделирование дыхательных путей, способствуя прогрессированию хронического воспаления [150, 152, 153] (Рисунок 4).

Функции IL-6 в патогенезе различных заболеваний могут существенно отличаться в зависимости от клеточных источников [154]. Было показано, что IL-6 может направлять дифференцировку макрофагов в сторону альтернативно активированных макрофагов (M2), играющих ключевую роль HDM-индуцированном эозинофильном воспалении у мышей [155]. У мышей с дефицитом IL-6 в макрофагах наблюдалось значительное уменьшение эозинофилии и продукции Th2-ассоциированных цитокинов, в то время как дефицит IL-6 в дендритных клетках способствовал снижению Th17-зависимого ответа в экспериментальной модели HDM-индуцированной астмы [156]. Эти результаты свидетельствуют о том, что IL-6, продуцируемый дендритными клетками приводит к развитию нейтрофильной астмы. Таким образом, являясь многофункциональным цитокином, IL-6 существенно влияет на прогрессирование и тяжесть астмы.

### **1.5. Антицитокиновая терапия в лечении тяжелой астмы**

Необратимые изменения дыхательных путей у пациентов с тяжелой астмой вызывают снижение функций дыхания, что может привести к опасным для жизни последствиям. Применение кортикостероидов в качестве лечения тяжелой нейтрофильной астмы остается неэффективным, более того, они могут предотвращать апоптоз нейтрофилов и стимулировать продукцию внеклеточного матрикса, тем самым провоцируя нежелательное ремоделирование дыхательных путей [74]. Ранее было одобрено

использование омализумаба, моноклонального антитела к IgE, для лечения тяжелых случаев атопической бронхиальной астмы [157]. Препарат представляет собой гуманизированное антитело, которое связывается с IgE и ингибирует взаимодействие с Fcγ-рецепторами на поверхности тучных клеток и базофилов, тем самым предотвращая выделение биологически активных медиаторов. Омализумаб эффективен только против тяжелой атопической астмы, характеризующейся повышенной эозинофилией в легких. При этом прием омализумаба может вызывать местные побочные эффекты [158]. Поэтому, по мере изучения молекулярных механизмов патогенеза астмы, в том числе ассоциированных тяжело контролируемым течением, провоспалительные цитокины и их рецепторы стали рассматривать как более релевантные мишени для терапии.

Эпителиальные алармины составляют первую волну сигнальных молекул, высвобождаемых эпителиальными клетками в ответ на воздействие аллергена, вследствие чего идея их использования в качестве потенциальных мишеней при антицитокиновой терапии кажется весьма многообещающей. Так, нейтрализация TSLP моноклональными антителами в мышинной модели аллергической астмы снижала продукцию Th2-ассоциированных цитокинов и предотвращала структурные изменения дыхательных путей [159, 160]. Применение человеческого моноклонального антитела AMG157 в рамках двойного слепого плацебо-контролируемого исследования способствовало уменьшению бронхоспазмов [161]. Наконец, в 3 фазе клинического исследования применение тезепелумаба улучшало функции легких, а также значительно снижало уровни биомаркеров Th2-иммунного ответа у пациентов с тяжелой аллергической астмой [162]. Применение фрагмента моноклонального антитела эклералимаб в клинических испытаниях сопровождалось достоверным снижением эозинофилии в мокроте и уменьшением степени бронхоконстрикции [163].

Введение антител против IL-25, относящегося к цитокинам семейства IL-17, значительно снижало Th2-опосредованные реакции и ослабляло гиперреактивность дыхательных путей у мышей с астмой, индуцированной овалбумином (OVA) и HDM [164, 165]. Введение рекомбинантного гуманизированного моноклонального антитела к IL-25 (XKN001) приводило к достоверному снижению концентрации IgE в сыворотке крови здоровых добровольцев [166]. Однако клинические испытания эффективности анти-IL-25 терапии астмы еще не проводили.

В свою очередь, в рандомизированном контролируемом исследовании эффективности этокимаба, блокатор IL-33 продемонстрировал его способность снижать побочные эффекты, связанные с атопией у пациентов с аллергией на арахис [167]. В рамках клинических испытаний применение гуманизированного моноклонального антитела

итепекимаба показало эффективность в снижении частоты обострений и уменьшении количества эозинофилов в крови у пациентов с ХОБЛ [168] и аллергической астмой [169]. Другое гуманизированное моноклональное антитело астеголимаб против рецептора IL-33, молекулы ST2, у пациентов с астмой эффективно снижало частоту обострений [170], в отличие от пациентов с ХОБЛ, у которых наблюдалось лишь уменьшение эозинофилии в крови и мокроте [171].

В экспериментальной модели HDM-индуцированной смешанной астмы блокировка IL-33 предотвращала ремоделирование дыхательных путей [172]. В другом исследовании при введении антител к IL-33 и ST2 мышам с OVA-индуцированной астмой наблюдалось снижение инфильтрации эозинофилов, продукции IgE и Th2-ассоциированных цитокинов [173]. Однако несмотря на существенную роль IL-33 в регуляции Th2-опосредованного ответа, мыши с дефицитом ST2 оказались восприимчивы к аллергической астме, что позволяет предположить, что ингибирования только сигнала IL-33 может быть недостаточным для предотвращения развития заболевания [174]. Интересно, что анти-IL-33, но не анти-TSLP блокировка, уменьшала продукцию IL-5 и IL-13, в то время как гиперреактивность дыхательных путей снижалась только у мышей, которые в качестве терапии получали блокаторы TSLP [175]. Однако при одновременной нейтрализации IL-25 и TSLP наблюдалось снижение воспаления, а ремоделирование легочной ткани проявлялось слабее [176]. Таким образом, с учетом данных о преимуществах анти-TSLP терапии, ожидается, что подход с применением комбинированной блокировки IL-33 и TSLP может быть терапевтически обоснованной. В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что одновременное воздействие на несколько аларминов может обеспечить синергетический эффект при лечении астмы.

После начального этапа аллергической реакции в развитие дальнейшего иммунного ответа включаются эффекторный цитокины IL-4, IL-5 и IL-13. На сегодняшний день для терапии тяжелой астмы, связанной с повышенным содержанием эозинофилов, одобрены три антитела, блокирующие IL-5 и его рецептор, которые являются гуманизированными моноклональными антителами, нацеленными на IL-5 [177, 178], позволяющие уменьшить потребность в использовании системных кортикостероидов, а также снизить частоту обострений и эозинофилию легких и крови. Бенрализумаб - гуманизированное моноклональное антитело против  $\alpha$ -цепи рецептора IL-5 (IL-5R $\alpha$ ) ингибирует гетеродимеризацию субъединиц IL-5R и, соответственно, блокирует передачу сигнала через рецептор. Клинические испытания бенрализумаба продемонстрировали его эффективность при эозинофильном эндотипе астмы вне зависимости от степени тяжести заболевания [179]. В совокупности, анти-IL-5 терапия представляет собой эффективный

подход лечения пациентов только с эозинофильным воспалением, но не с нейтрофилией легких.

Другими потенциальными мишенями являются IL-4 и IL-13, выполняющие множество общих и часть не перекрывающихся функций. Так, IL-4 вносит вклад в ремоделирование дыхательных путей через активацию Th2-клеток и привлечение эозинофилов, тогда как IL-13 напрямую способствует структурным изменениям за счет усиленной продукции слизи и гиперреактивности легких [180]. Клинические испытания трафокиумаба [181] и лебрикизумаба [182], блокирующих только IL-13, а также IL-4 блокаторов альтракинцепта [183] и пасколизумаба [184], не показали положительного эффекта в устранении воспаления дыхательных путей. Однако нейтрализация IL-4 и IL-13 моноклональным антителом дупилумабом, нацеленным на их общий рецепторный комплекс IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1, представляет собой наиболее впечатляющий пример комбинированной блокировки двух цитокинов при астме. Известно, что IL-4 и IL-13 кодируются близлежащими генами, расположенными на 5 хромосоме у человека и 11 хромосоме у мыши. Гены этих цитокинов имеют общий регуляторный элемент GATA3 и могут передавать сигналы через общий рецепторный комплекс IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1. Изначально разработанный для лечения атопического дерматита, дупилумаб показал свою эффективность для лечения пациентов с тяжелой эозинофильной астмой [185-187]. Таким образом, применение антител к вышеперечисленным цитокинам в формате комбинированной блокировки эффективно при лечении пациентов с тяжелой астмой, характеризующейся повышенной эозинофилией, но не влияет на нейтрофильное воспаление легких. В связи с этим сохраняется потребность в поиске релевантных мишеней для контроля тяжелой формы астмы с нейтрофильным инфильтратом.

В качестве потенциальных молекулярных мишеней для лечения тяжелой нейтрофильной астмы стали рассматривать основные медиаторы нейтрофильного воспаления, такие как IL-17A, IL-6 и TNF. Единственным препаратом, предназначенным для лечения различных Th17-опосредованных воспалительных заболеваний, являлось гуманизированное моноклональное антитело бродалумаб, блокирующее IL-17A. Эффекты бродалумаба, изначально предназначенного для лечения псориаза, рассматривались многообещающими для лечения стероид-резистентной нейтрофильной астмы, но клинические исследования не показали положительных результатов [188].

Провоспалительные функции TNF делают его одним из ключевых медиаторов тяжелой астмы, и его блокаторы в качестве терапевтических средств были протестированы в ряде клинических исследований. Так, человеческое моноклональное антитело голимумаб, связывающее как растворимую, так и трансмембранную формы TNF, не снижал симптомы

у пациентов с тяжелой астмой, но вызывал серьезные побочные эффекты, в частности, повышение восприимчивости к инфекциям и увеличение риска развития новообразований [189-191]. С другой стороны, этанерцепт, рекомбинантный белок на основе растворимого TNFR2, слитого с Fc-частью IgG человека, был предложен в качестве альтернативного средства для терапии рефрактерной астмы. Более ранние исследования показали, что этанерцепт улучшает функцию легких у пациентов с высоким содержанием TNF в мокроте [192]. В соответствии с этим инфликсимаб, химерное моноклональное антитело, значительно снижал частоту обострений у пациентов с астмой, резистентной к кортикостероидам [193]. В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что ингибиторы TNF остаются многообещающими терапевтическими агентами при терапии астмы с тяжелым течением заболевания, однако блокировка только TNF может быть недостаточной для полного контроля над развитием заболевания, а способна вызывать серьезные побочные эффекты, которые опосредованы гиперэкспрессией других провоспалительных цитокинов [194], что может приводить к восприимчивости к инфекциям [190] и увеличению риска развития новообразований [191] (Таблица 1).

Известно, что избирательная блокировка путей передачи сигнала от IL-6 имеет разные последствия [144, 195]. Как антитела к IL-6, олокизумаб, сирукумаб и силтуксимаб, так и блокаторы IL-6R, тоцилизумаб и сарилумаб, способны блокировать классический и транс-сигнальный пути [196, 197]. Клинические испытания (NCT02794519) сирукумаба, человеческого моноклонального антитела против IL-6, при астме было прекращено после того, как применение этого блокатора не получило одобрения для лечения ревматоидного артрита из-за увеличения числа смертей и злокачественных новообразований [198]. Напротив, яркий пример эффективности антицитокиновой терапии связан с применением тоцилизумаба, гуманизированного моноклонального антитела против IL-6R, для лечения ревматоидного и системного ювенильного идиопатического артрита [199, 200]. Клинические испытания, посвященные изучению эффективности тоцилизумаба при лечении тяжелой астмы, не продемонстрировали доказательств того, что тоцилизумаб способен предотвращать бронхоконстрикцию, вызванную воздействием аллергена [201]. Однако, другое независимое клиническое исследование показало, что в течение 10-месячной терапии моноклональными антителами к IL-6R у пациентов отмечалось подавление Th2- и Th17-опосредованных ответов, тогда как уровень периферической эозинофилии оставался без значимых изменений (Таблица 1) [202].

Тем не менее, высокая эффективность антицитокиновой терапии в тех случаях, когда применение стандартных методов лечения не является оптимальным, подталкивает к разработке и оптимизации блокаторов ключевых цитокинов для лечения хронических

воспалительных заболеваний [203]. Комбинированная блокировка нескольких провоспалительных цитокинов может оказаться более эффективной, с одной стороны, за счет снижения дозы отдельных блокаторов, а с другой – за счет нивелирования побочных эффектов при блокировке индивидуальных цитокинов наряду с воздействием на множественные каскады патогенеза заболевания.

**Таблица 1. Клинические исследования блокаторов TNF и IL-6 для лечения бронхиальной астмы**

Название препарата	Тип ингибитора	Мишень	Тип астмы	Фаза	Результат	Статус исследования	ID
Голимумаб	Человеческое моноклональное антитело	TNF	Тяжелая астма	II	Отсутствие терапевтического эффекта, появление инфекций и злокачественных новообразований	Завершено	NCT00207740
Этанерцепт	Растворимый рецептор p75 (TNFRII) человека, слитый с Fc-частью IgG1 человека	TNF	Средняя и тяжелая астма	II	Улучшение функции легких у пациентов с высоким уровнем TNF в мокроте	Завершено	NCT00141791
			Рефрактерная астма		Отсутствие терапевтического эффекта	Завершено	NCT00276029
Инфликсимаб	Химерное моноклональное антитело	TNF	Тяжелая кортикостероид-резистентная астма	II	Снижение частоты обострения заболевания	Завершено	NCT00278083
Сирукумаб	Человеческое моноклональное антитело	IL-6	Тяжелая астма	IIa	Участники были исключены из исследования до начала набора	Отменено	NCT02794519
Тоцилизумаб	Гуманизированное моноклональное антитело	IL-6R	Тяжелая персистирующая астма		Снижение Th2- и Th17-опосредованных ответов, эозинофилия на периферии без изменений		[202]

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Мыши

В экспериментах использовались мыши дикого типа линий BALB/c и C57BL/6, а также мыши с C57BL/6 бэкграунде с делецией гена IL-6 (IL-6 KO) [204], с полным удалением TNF (TNF KO) [205], а также мыши со сверхэкспрессией IL-6 человека (hIL-6) в CD4<sup>+</sup> клетках (hIL-6 tg CD4-Cre). Группы мышей линии BALB/c получали в питомнике для лабораторных животных SPF-категории (specific pathogen free) «Пушино», ФИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Содержание и экспериментальные манипуляции проводили на базе Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН (модульный виварий ИМБ РАН). Все манипуляции с мышами были выполнены согласно правилам работы с лабораторными животными, установленным в Федерации Европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA) и согласованы с комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол № 3 от 27.10.2022, Протокол №1 от 04.03.2024, Протокол №1 от 05.03.2025, Протокол №2 от 22.07.2025).

### Генотипирование

Генетический материал получали из образцов биопсии ушей или хвоста мышей с помощью лизирующего буфера, содержащего 10X Gittschier buffer, 5% Тритон X-100 и 0.25 мг/мл протеиназы К, и инкубации на термошейкере при 55°C в течение ночи. Остановка реакции происходила при 95°C. Далее лизированные пробы разводили в 11 раз. ПЦР проводили в реакционной смеси, содержавшей буфер 10X DreamTaq Green Buffer, 0.2 mM dNTP, 1 мкл смеси прямого и обратного праймеров и 5 Ед/мкл DreamTaq DNA Polymerase (Таблица 2).

**Таблица 2. Список праймеров и протоколов ПЦР, использованных для генотипирования мышей**

Реакция	Последовательность праймера		Программа амплификации	Продукты амплификации, kb
	Прямая	Обратная		
<i>Il6</i> fl/del	CCCACCAAGAACGAT AGTCA	GGTATCCTCTGTGAAGTCT CC	94°C 2 мин, 35x (94°C 15 сек, 60°C 15 сек, 72°C 20 сек), 72°C 3 мин	дикий тип - 0.32 <i>Il6</i> fl - 0.42 <i>Il6</i> del - 0.25
<i>Tnf</i> wt/del	TGAGTCTGTCTTAACT AACC	CTCTTAAGACCCACTTGCT C	94°C 3 мин, 35x (94°C 30 сек, 60°C 30 сек, 72°C 30 сек), 72°C 5 мин	<i>Tnf</i> del - 0.45
	GTCTACTTTGGAGTCA TTGC	GACATTCGAGGCTCCAGT		дикий тип - 0.3
<i>hIl6</i> tg	AACAACCTGAACCTTCA CA	GCTTGTTCCCTCACTACTCT C	95°C 5 мин,	<i>hIl6</i> tg – 0.157

			35x (95°C 30 сек, 60°C 30 сек, 72°C 30 сек), 72°C 5 мин	
<i>Cd4</i> wt/Cre	ATCAAGGTCCTGAGG AAGAG	CTAGGAGTTGTGCTGCACA G; ACCTCATCACTCGTTGCAT C	94°C 3 мин, 35x (94°C 40 сек, 60°C 45 сек, 72°C 60 сек), 72°C 5 мин	дикий тип - 0.33 <i>cd4</i> Cre – 0.24

### Модель HDM-индуцированной аллергической астмы

Индукцию аллергической астмы проводили на самках 6-8 недель линии BALB/c. Выбор линии был обусловлен высокой чувствительностью BALB/c к развитию аллергического воспаления дыхательных путей, которое проявляется более выраженной инфильтрацией эозинофилов и нейтрофилов в легкие [206, 207]. В качестве модельного аллергена использовали экстракт домашнего пылевого клеща (HDM - house dust mite) из *Dermatophagoides pteronyssinus* - лот XP B70D3A25 (Greer Labs, США) и лот 15G10 (Citeq biologics, Нидерланды). Индукцию экспериментальной аллергической астмы проводили по ранее опубликованному протоколу двухэтапного введения аллергена с небольшими изменениями [208].

*Протокол индукции острой аллергической астмы.* Перед каждым введением аллергена мышей подвергали ингаляционной анестезии с использованием системы анестезии SomnoSuite (Kent Scientific Corporation). В качестве ингаляционного анестетика использовали 3% изофлуран при параллельном потоке концентрированного кислорода, который подавали в индукционную камеру с животным. Индукцию астмы осуществляли путем интраназального введения (и.н.) 20 мкг экстракта HDM (лот XP B70D3A25, Greer Labs) в течение 6 дней с сенсibiliзирующим введением 5 мкг HDM за неделю до основного курса. Через 48 часов после последнего введения аллергена мышей подвергали эвтаназии путем передозировки инъекционными анестетиками – смесью Золотила100 и Ксилазина, введенными внутривентриально. Данный метод гуманной эвтаназии применяли для сохранения целостности трахеи и легочной ткани.

*Протокол индукции тяжелой астмы, ассоциированной с ремоделированием.* Индукцию тяжелой астмы осуществляли посредством внутритрахеального введения (в.т.) 100 мкг/100 мкл экстракта HDM (лот 15G10, Citeq biologics) в 0 и 4 дни сенсibiliзации. На 14-17 сутки мышам ежедневно внутритрахеально (в.т.) вводили 100 мкг/100 мкл HDM. Все манипуляции по введению аллергена осуществлялись под инъекционной анестезией смесью анестетиков Золетила100 (5%) и Ксилазина (15%) в физрастворе (80%) из расчета 100 мкл/20 г веса мыши. Через 48 часов после последнего введения аллергена мышей подвергали эвтаназии с последующим анализом.

### **Фармакологическая блокировка цитокинов IL-6 и TNF**

Для фармакологической блокировки IL-6 и TNF *in vivo* применяли моноклональное антитело MP5-20F3 против IL-6 (5 мкг/г веса мыши) (BioXCell, США), моноклональное антитело XT3.11 против TNF (10 мкг/г веса мыши) (BioXCell, США), а также клинически применяемый TNF-блокатор этанерцепт (10 мкг/г веса мыши) (Pfizer, Великобритания), состоящий из двух субъединиц растворимого рецептора TNF (p75) человека, слитых с Fc-частью человеческого IgG1. Блокирующие антитела разводили стерильным физраствором и перед каждой иммунизацией вводили внутрибрюшинно (в.б.) каждые 48 часов, начиная с этапа сенсibilизации. Каждый эксперимент проводили с участием четырех групп мышей (n=3-6): мыши на фоне блокировки IL-6; мыши, которые получали блокаторы TNF, мыши с комбинированной блокировкой IL-6 и TNF и контрольная группа, получавшая физраствор.

### **Модель LPS-индуцированного фиброза легких**

Воспаление легких у мышей индуцировали посредством ингаляционного введения LPS по раннее опубликованному протоколу с небольшими изменениями [209]. Мышей 6-9 недель линии C57BL/6 подвергали воздействию LPS с использованием пассивной ингаляционной установки с камерой (Aeroneb Lab Nebulizer, Kent Scientific Corporation). Воспаление дыхательных путей индуцировали однократным ингаляционным введением группе мышей 5 мл LPS в концентрации 2 мг/мл (LPS из *E. coli* O111: B4, Sigma-Aldrich), а также 5 мл физраствора в качестве контроля до полного распыления. В отработки экспериментальной модели легочного фиброза участвовали следующие группы мышей: группа мышей для определения кратковременных эффектов (через 24 ч после введения LPS); мыши для оценки развития фиброза (через 5 недель после введения LPS); а также контрольная группа (через 24 ч после введения физраствора). Для изучения роли цитокинов в модели избыточной продукции IL-6 были использованы мыши со сверхэкспрессией hIL-6 в CD4<sup>+</sup> клетках (hIL-6 tg CD4-Cre) в возрасте 4 месяцев, а в модели LPS-индуцированного развития фиброза легких использовали мышей 6-9 недель линии с полным удалением IL-6 и TNF.

### **Оценка функциональных нарушений легких**

Оценка нарушений в функциональности дыхательной системы на фоне LPS-индуцированного фиброза легких была осуществлялась с помощью техники вынужденных колебаний (SCIREQ FlexiVent, Канада). На анестезированном животном проводили трахеостомию между первыми двумя ближайшими к гортани кольцами хряща, после чего вставляли предварительно откалиброванную канюлю и продвигали ее внутрь трахеи на длину примерно пяти колец. Канюлю закрепляли хлопчатобумажной нитью. Далее животное подключали к прибору, в котором осуществлялась передача тестового сигнала в легкие с последующим измерением ответа. В качестве вынужденных колебаний использовались: 1) одночастотные колебания (SNAPSHOT) для измерения общего сопротивления (Rrs) и

эластичности (Ers) и общей податливости (Crs) всей дыхательной системы; 2) многочастотные колебания (QUICK PRIME) для оценки сопротивления крупных проводящих дыхательных путей (Rn) и легких (G), а также эластичности легочной ткани (H) (Таблица 3). Набор контролируемых автоматизированных измерений выполнялся в исходных условиях (*Baseline*) и во время использования последовательно увеличивающихся доз провокационного вещества - метахолина в концентрациях 3,125 мг/мл, 6,25 мг/мл и 12,5 мг/мл.

**Таблица 3. Используемые параметры для оценки функциональности легких**

<b>Параметр</b>	<b>Описание</b>	<b>Физиологическая значимость</b>
<b>Rrs</b> (Resistance of the respiratory system)	Общее сопротивление дыхательной системы	Общее сужение дыхательной системы, означающее препятствие, которое преодолевает воздушный поток во время дыхания
<b>Ers</b> (Elastance of the respiratory system)	Общая эластичность дыхательной системы	Способность растягиваться дыхательной системы при вдохе, расправляться и возвращаться в исходное состояние
<b>Rn</b> (Newtonian Resistance) resistance of the airways	Сопротивление крупных проводящих дыхательных путей	Сужение крупных проводящих дыхательных путей, означающее препятствие, которое преодолевает воздушный поток во время дыхания
<b>Crs</b> (Compliance of the respiratory system)	Общая податливость дыхательной системы	Способность дыхательной системы возвращаться в исходное состояние после растяжения
<b>G</b> (Tissue Damping=related to tissue resistance)	Сопротивление легочной ткани	Сужение легочной ткани
<b>H</b> (Tissue Elastance)	Эластичность легочной ткани	Способность растягиваться легочной ткани при вдохе, расправляться и возвращаться в исходное состояние

### **Анализ популяций клеток крови с помощью гематологического анализатора**

Забор крови производили двумя способами: из лицевой вены прижизненно, а также из камер сердца посмертно. Оценку популяций клеток крови объемом 30 мкл проводили с помощью автоматизированного гематологического анализатора BC-60R Vet (Mindray, Китай) согласно инструкции производителя. Для получения сыворотки кровь собирали в специализированные

пробирки с активатором свертывания и разделяющим гелем с последующим центрифугированием образцов при комнатной температуре, 3500 g в течение 25 минут.

#### **Выделение иммунных клеток**

Выделение бронхоальвеолярной жидкости (БАЛ) производили методом бронхоальвеолярного лаважа. Для этого в канюлированное отверстие трахеи дважды вводили и отбирали по 800 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS) с 2 mM ЭДТА. Образцы осаждали центрифугированием при 300 g, 4°C в течение 7 минут. Надклеточный супернатант собирали для последующего анализа на содержание IgE и цитокинов. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS).

Лимфоузлы, а также селезенку перетирали и пропускали через фильтр размером пор 70 мкм. Образцы осаждали центрифугированием в течение 7 минут при 300 g, 4°C. Образцы с клетками селезенки инкубировали в буфере ACK Lysis buffer 1X (1.5 M NH<sub>4</sub>Cl, 100 mM KHCO<sub>3</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA) для лизиса эритроцитов, после чего промывали PBS/2%FBS, и осаждали центрифугированием. Полученные осадки клеток лимфоузлов и селезенки ресуспендировали в PBS/2%FBS.

Перед выделением клеток, инфильтрирующих легочную ткань, мышам проводили транскардиальную перфузию физраствором, далее каждое легкое выделяли и измельчали стерильными ножницами. Для получения клеточной суспензии измельченную ткань легкого помещали в буфер с ферментами (100 мг/мл Коллагеназы D и 2000U/мл ДНКазы I (Sigma) в 10 mM HEPES в PBS). Для механического гомогенизирования ткани использовали прибор Octo Dissociator gentleMACS (Miltenyi Biotec) с помощью программы с установленными настройками: 36 секунд при 65 оборотов в минуту. Далее колонки с диссоциированной тканью инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 25 минут. По окончании инкубации образцы повторно гомогенизировали с помощью программы с настройками: 37 секунд при 2079 оборотов в минуту. Полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием при 300 g, 4°C в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в 10 mM HEPES буфере и пропускали через фильтр с размером пор 70 мкм с последующим осаждением центрифугированием при 300 g, 4°C в течение 7 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в большом объеме PBS/2%FBS и повторно осаждали центрифугированием для полной остановки энзиматической реакции. Далее клетки легких сепарировали центрифугированием на градиенте плотности. Для этого к осадку с клетками добавляли изотонический раствор 80% перколла (Percoll, GE Healthcare). Получившуюся суспензию подслаивали под 40% раствор перколла с последующим центрифугированием при 330 g, 4°C в течение 25 минут без ускорения и торможения центрифуги. Лейкоциты аккуратно отбирали на границе двух фаз, растворяли в PBS/2%FBS, осаждали центрифугированием при

стандартных настройках и ресуспендировали в PBS/2%FBS. Подсчет клеток в суспензии проводили с помощью прибора Countess Automated Cell Counter (ThermoFisher, США).

#### **Получение тканевых гомогенатов**

Для получения гомогенатов легких был использован RIPA лизис-буфер (50 mM Tris HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% дезоксихолата натрия; 0,1% SDS) с добавлением ингибиторов протеаз (cOmplete™ ULTRA Tablets, Protease Inhibitor Cocktail, «Sigma») и фосфатаз (PhosStop, «Sigma»). На каждый мг ткани добавляли 10 мкл RIPA лизис-буфера. Гомогенизацию проводили 2-мя циклами длительностью по 45 секунд каждый и скоростью 3500 rpm при помощи роторного гомогенизатора PowerLyser 24 (Qiagen, США).

#### **Цитофлуориметрический анализ**

Суспензию клеток, полученных из бронхоальвеолярной жидкости и изолированных тканей, анализировали с помощью проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences). Для окрашивания клетки рассаживали в 96-луночный планшет и осаждали центрифугированием при 300 g, 4°C в течение 7 минут. Для предотвращения неспецифического связывания клетки обрабатывали антителами к Fcγ-рецепторам с помощью anti-mouse CD16/CD32 антител в течение 20 минут при 4°C, далее отмывали от FcγR-блокирующих антител и осаждали клетки центрифугированием при 300 g, 4°C в течение 7 минут. После удаления надосадочной жидкости в лунки с клетками добавляли смесь антител к поверхностным маркерам вместе с Fixable ViabilityDye (для детекции мертвых клеток) в растворе PBS/2%FBS и инкубировали в течение 20 минут при 4°C. После окрашивания на поверхностные маркеры, клетки отмывали, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 100 мкл PBS/2% FBS.

Для внутриклеточного окрашивания клетки рассаживали в 96-луночный планшет и активировали 50 нг/мл фоболмиристатацетатом (PMA) (Sigma) в присутствии 500 нг/мл иономицина (Thermo Fisher Scientific) в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS и брэфельдина А в концентрации 3 мкг/мл и инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, после чего отмывали PBS/2%FBS. При окрашивании регуляторных Т-клеток (Treg) предварительную активацию не проводили. После блокировки Fcγ-рецепторов клетки окрашивали на поверхностные маркеры по вышеописанному протоколу. Для внутриклеточного окрашивания цитокинов и транскрипционных факторов клетки фиксировали и одновременно пермеабелизировали в пермеабелизирующем буфере (Fixation/Permeabilization Concentrate, Invitrogen) в течение 1 часа при 4°C. Последующие процедуры, включая отмывку и окрашивания на внутриклеточные маркеры, проводили в присутствии буфера для пермеабелизации (1X Permeabilization Buffer, Thermo Fisher Scientific). После фиксации клетки отмывали в 1X буфере для пермеабелизации, осаждали центрифугированием при 400 g, 4°C, в течение 5 минут. Осадок клеток ресуспендировали в 1X буфере для пермеабелизации с антителами к внутриклеточным

маркерам и оставляли на ночь при 4°C. На следующий день клетки отмывали дважды, осаждали центрифугированием при 400 g, 4°C, в течение 5 минут и ресуспендировали в PBS/2% FBS. Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto II и программного обеспечения FlowJo v10. Полный список флуоресцентно-меченных антител представлен в Таблице 4.

**Таблица 4. Антитела, использованные для определения различных популяций иммунных клеток**

<b>Маркер</b>	<b>Клон</b>	<b>Производитель</b>
Fixable Viability Dye	eFluor-780	Invitrogen
CD45	30-F11	eBioscience
SiglecF	E50-2440	BD Biosciences
CD11c	N418	eBioscience
CD11b	M1/70	Biolegend
Ly6G	1A8	Biolegend
F4/80	BM8	eBioscience
TCR $\beta$	H57-597	eBioscience
CD4	RM4-5	Biolegend
IL-17A	eBio17B7	Invitrogen
RoR $\gamma$ t	B2D	Invitrogen
IFN $\gamma$	XMG1.2	Biolegend
TNF	MP6-XT22	eBioscience
IL-13	eBio13A	eBioscience
FoxP3	FJK-16s	Invitrogen
HELIOS	22F6	Biolegend

#### **Измерение продукции цитокинов и IgE с помощью иммуноферментного анализа (ИФА)**

Продукцию цитокинов и IgE в бронхоальвеолярной жидкости анализировали с использованием коммерческих наборов «Mouse IgE uncoated ELISA Kit» (Invitrogen, США), «Mouse TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 ELISA Ready-SET-Go» и «Human IL-6 Uncoated ELISA Kit» (ThermoFisher, США) по протоколу производителя с небольшими изменениями. Вкратце, высокоаффинный 96-луночный планшет с иммобилизирующими антителами (1:250), разведенных в буфере Coating Buffer, инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день проводили трехкратную отмывку с помощью PBS с 0,05% Tween-20. Для блокировки неспецифического

связывания планшет инкубировали в буфере для образцов при комнатной температуре в течение часа. Далее наносили образцы, а также серию стандартов для построения калибровочной кривой. Планшет инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре с последующей отмывкой. После этого планшет инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с биотином (1:250) в течение часа при комнатной температуре. После отмывки планшет инкубировали с ферментом HRP, конъюгированным с авидином (1:250) в течение 30 минут при комнатной температуре. После шестикратной отмывки проявляли реакцию с помощью субстрата (тетраметилбензидин гидрохлорида), инкубировали до проявления синей окраски, после чего останавливали реакцию добавлением 1M раствора  $H_3PO_4$ . Оптическую плотность измеряли при вычитании длин волн 450 нм и 570 нм с помощью спектрофотометра Multiscan Go (Thermo Fisher Scientific, США).

### **Мультиплексный анализ цитокинов**

Для определения уровня продукции цитокинов в сыворотке крови и бронхоальвеолярной жидкости была использована система мультиплексного анализа Luminex xMAP (Merck, США) на наборе MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (#MCYTMAP-70K-PX32, Merck, США) по протоколу производителя. Вкратце, в 96-луночные планшеты наносили образцы сыворотки крови и бронхоальвеолярной жидкости, а также стандарты с известными концентрациями с последующим добавлением буфера для разведения и смесь магнитных микросфер, конъюгированных с антителами к одному виду аналита. Планшеты ставили на ночную инкубацию при 4°C. На следующий день микросферы отмывали два раза с помощью буфера на магнитной подложке. Далее наносили вторичные антитела, конъюгированные с биотином, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После чего добавляли стрептавидин, конъюгированный с фикоэритрином, и ставили на инкубацию на 30 минут при комнатной температуре с последующей отмывкой на магнитной подложке. Анализ проводили с помощью прибора MAGPIX (Luminex). Концентрацию аналитов определяли по средней интенсивности флуоресценции фикоэритрина на каждой микросфере.

### **Выделение РНК и обратная транскрипция**

Используя диспергатор Ultra Turrax IKA T10, легкие гомогенизировали в TRK буфере для лизиса (OMEGA biotek, США). Выделение РНК проводили с использованием коммерческого набора E.Z.N.A. Total RNA Kit I (OMEGA biotek) по протоколу производителя. Этапы осаждения центрифугированием осуществляли при комнатной температуре. Гомогенизированные образцы осаждали центрифугированием при максимальной скорости (>12000 g) в течение 5 минут. Аккуратно отбирали 350 мкл супернатанта, не задевая клеточный дебрис, и смешивали с 350 мкл 70% этанола. Тщательно пипетировали и наносили на колонки HiBind® RNA Mini Column с последующим центрифугированием в течение 1 минуты при 10000 g. Далее колонки со связанной

РНК промывали первым буфером для промывки (RNA Wash Buffer I) и производили центрифугирование в течение 30 секунд при 10000 g. После удаления фильтрата на колонки наносили второй буфер для промывки (RNA Wash Buffer II) и откручивали на центрифуге в течение 1 минуты при 10000 g. Данную процедуру проводили дважды. С целью удаления остатков буфера для промывки колонки переносили в новые стерильные пробирки и подвергали центрифугированию в течение 2 минут при максимальной скорости. На завершающем этапе РНК элюировали с колонок водой, очищенной от нуклеаз. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer N50.

Синтез кДНК осуществляли с помощью коммерческого набора для обратной транскрипции RevertAid RT kit (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя. Для удаления геномной ДНК 1 мкг полученной РНК обрабатывали ДНКазой I, растворенной в 10X реакционном буфере с  $MgCl_2$ . Реакционную смесь инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Далее останавливали реакцию с помощью добавления 1 мкл 50 мМ ЭДТА и инкубировали в течение 10 минут при 65°C. После этого добавляли 5 мкМ праймера Oligo (dT)<sub>18</sub> и ставили на инкубацию на 5 минут при 65°C. Далее в реакционную смесь вносили 4 мкл 5ч реакционного буфера, 1 мкл ингибитора РНКаз (20 U/мкл), 2 мкл 10 мМ смеси дезоксинуклеотидов dNTP и 1 мкл обратной транскриптазы RevertAid RT. Образцы инкубировали при 42°C в течение 1 часа, после чего реакцию терминировали за счет нагревания при 70°C 5 минут.

#### **Измерение экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени**

Измерение экспрессии генов проводили на приборах 7500 Real Time PCR System Amplificator и QuantStudio 6 Pro. Реакцию ставили в 20 мкл с использованием 4 мкл матрицы кДНК, 4 мкл qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген), 1 мкл 10 мкМ смеси прямого и обратного праймеров и 11 мкл воды, очищенной от нуклеаз. В качестве отрицательного контроля использовали воду, а положительным контролем являлось измерения уровня экспрессии референсного гена домашнего хозяйства  $\beta$ -актина с последующим нормированием на него экспрессии целевых генов. Каждую реакцию проводили в двух технических повторах. Использовали оптимизированный протокол для всех праймеров: предварительная денатурация - 95°C 10 минут, далее 40 циклов – денатурация при 95°C в течение 15 секунд, отжиг праймеров при 62°C 30 секунд и элонгация при 72°C в течение 20 секунд. Для определения относительной экспрессии генов применяли сравнительный метод  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [210]. Список праймеров, специфичных к целевым генам, представлен в Таблице 5.

**Таблица 5. Последовательности праймеров, использованных для количественной ПЦР в реальном времени**

Ген	Прямая последовательность (5'-3')	Обратная последовательность (5'-3')
<i>Actb</i>	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>Tgfb1</i>	CAACAATTCCTGGCGTTACCT	GGCTGATCCCGTTGATTTCC
<i>Il17a</i>	GGACTCTCCACCGCAATGA	GGCACTGAGCTTCCCAGATC
<i>Ifng</i>	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
<i>Il5</i>	AGCACAGTGGTGAAGAGACCTT	TCCAATGCATAGCTGGTGATTT
<i>Il4</i>	GGTCTCAACCCCGAGTAGT	GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
<i>Il13</i>	CCTGGCTCTTGCTTGCCCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
<i>Il33</i>	TGCTCAATGTGTCAACAGACG	TCCTTGCTTGGCAGTATCCA
<i>Il10</i>	CCAGTTTTACCTGGTAGAAGTGATG	TGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA
<i>Muc5ac</i>	AGAATATCTTTTCAGGACCCCTGCT	ACACCAGTGCTGAGCATACTTTT
<i>Muc5b</i>	TCCTGCTCTGGAATATCCAAG	GCCTCGGGGAGCTTGCCTGCC
<i>Acta2</i>	GGCACCCTCTTTCTATAACGAG	GCACAATACCAGTTGTACGTCC
<i>Colla1</i>	ACGCCATCAAGGTCTACTG	GTAICTCGAACGGGAATCCA

### **Гистологический анализ срезов легких**

После транскардиальной перфузии физраствором легкие фиксировали в 4% формальдегиде для дальнейшего гистологического анализа легочной ткани. После фиксации материал промывали в PBS для полного удаления фиксатора. Обезвоживание легочной ткани проводили путем проведения через спирты двух смен 70% и 96% этанола в течение 2 часов, после чего переносили в изопропанол (2 смены по 30 минут и 1 смена 1,5 часа). Далее ткань переносили в ксилол (2 смены по 1 часу) с последующей постепенной пропиткой ткани парафином в 2 смены по 2-3 часа. Приготовление парафиновых блоков осуществляли на аппарате EG 1150 Leica Biosystems. Пропитанные парафином образцы тканей легких помещали в кассеты и заливали расплавленным парафином. Из готовых парафиновых блоков получали срезы толщиной 5 мкм с помощью микротомы SLEE CUT 4055, срезы переносили в каплю воды на предметное стекло.

Перед окрашиванием проводили этап депарафинирования, который заключался в инкубации срезов в 2 сменах ксилола по 3 минуты, постепенной проводки в этаноле убывающей концентрации по 2 минуты (96%, 80%, 70%) и переносе в дистиллированную воду на 2 минуты.

*Окрашивание по методу Шиффа (PAS - Periodic Acid-Schiff).* Срезы окрашивали гематоксилином и по методу Шиффа (Sigma) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, стекла со срезами погружали в раствор периодической кислоты на 5 минут при

комнатной температуре, после чего промывали в нескольких сменах дистиллированной воды. Далее наносили реактив Шиффа по каплям на срезы и инкубировали 15 минут при комнатной температуре с последующей промывкой проточной водой в течение 5 минут. Стекла со срезами переносили в раствор гематоксилина примерно на 1,5 минуты и промывали под проточной водой 5 минут. После окрашивания проводили этап дегидратации препаратов, последовательно помещая их в 96% этанол, на 30 секунд в изопропанол и далее в две порции ксилола по 3 минуты. Готовые препараты заключали с помощью монтирующей среды Витрогель на основе акриловых смол, и оценивали признаки воспаления по ранее опубликованной схеме [211]. Определение инфильтрации воспалительных клеток проводили по следующей шкале: 0 - отсутствие клеток; 1 - присутствие единичных воспалительных клеток; 2 - кольцо воспалительных клеток толщиной в один клеточный слой; 3 - кольцо воспалительных клеток толщиной в 2-4 клеточной слой; 4 - кольцо воспалительных клеток толщиной более 4 клеток слоя. Оценку интенсивности продукции слизи (PAS - положительные бокаловидные клетки) проводили по шкале: 0 - <0,5%; 1 - <25%; 2 - 25-50%; 3 - 50-75%; 4 - >75%. На срезе рассматривали по восемь полей и рассчитывали среднее значение оценки инфильтрации воспалительных клеток и интенсивности продукции слизи.

*Окрашивание по Массону с анилиновым синим.* Окрашивание проводили по протоколу производителя (Biovitrum, Россия). Срезы выдерживали в железном гематоксилине Вейгерта в течение 10 минут, после чего срезы просушивали с помощью фильтровальной бумаги. Далее на образцы наносили пикриновую кислоту и инкубировали в течение 4 минут и промывали в двух порциях дистиллированной воды. На срезы наносили раствор кислого пунцового фуксина на 4 минуты. Далее промывали в двух порциях дистиллированной воды и максимально убрали остатки воды со срезов, после чего наносили раствор фосфорномолибденовой кислоты на 10 минут и просушивали срезы с помощью фильтровальной бумаги. Образцы окрашивали раствором анилинового синего в течение 5 минут и промывали в двух порциях дистиллированной воды. После окрашивания срезы помещали в 96% этанол, изопропанол и ксилол с последующим заключением в монтирующую среду. Анализ срезов проводили на микроскопе Leica DM4000 B LED и в программе ImageJ. Площадь коллагеновых волокон оценивалась в ImageJ Fiji с использованием The Colour Deconvolution 2 ImageJ plugin [212].

*Окрашивание гематоксилин-эозином.* Срезы окрашивали с помощью гематоксилина (Biovitrum, Россия) в течение 5 минут. После чего срезы промывали под проточной водой 5 минут и в нескольких сменах дистиллированной воды. Срезы окрашивали эозином в течение 30 секунд и последовательно помещали в две порции 96% этанола, изопропанол и далее в две порции ксилола на 3 минуты. Готовые препараты заключали с помощью монтирующей среды Витрогель. Анализ срезов проводили на микроскопе Leica DM4000 B LED и в программе ImageJ.

### **Статистическая обработка данных**

Для статистической обработки данных была использована программа GraphPad Prism 8. Соответствие выборки нормальному распределению проверяли по критерию Шапиро-Уилка. При нормальном распределении статистическую значимость определяли с помощью тестов t-критерий Стьюдента, 1-way ANOVA и 2-way ANOVA. В противном случае использовали непараметрические тесты Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитокины, помимо своих гомеостатических функций, играют важную роль в индукции и развитии ряда патологических состояний, ассоциированных с острым или хроническим воспалением, в частности, аллергической астмы и фиброза легких. Результаты опубликованных исследований свидетельствуют о том, что провоспалительные цитокины и их рецепторы могут представлять собой перспективные мишени терапии, основанной на применении моноклональных блокирующих антител. Патогенетические механизмы обычно включают несколько цитокинов с частично перекрывающимися функциями. В то же время, избирательное ингибирование отдельных цитокинов может быть неэффективным в лечении ряда заболеваний, как например нейтрофильная астма, и приводить к системным побочным эффектам. Поэтому стратегия комбинированной антицитокиновой терапии представляет особый интерес для лечения тяжелых форм бронхиальной астмы, устойчивой к стандартным протоколам лечения. Провоспалительные цитокины IL-6 и TNF относятся к ключевым медиаторам, обеспечивающих развитие воспаления дыхательной системы, однако их роль в развитии астмы до конца не изучена. Например, до сих пор актуален вопрос об эффективности блокировки IL-6 при тяжелой резистентной к кортикостероидам астме. Кроме того, не изучены эффекты комбинированной блокировки TNF и IL-6 при формировании воспаления дыхательных путей, которое поддерживается постоянным воздействием аллергена. Имеются примеры, когда комбинированная антицитокиновая терапия демонстрировала выраженный терапевтический эффект даже в отсутствие ответа на монотерапию, направленную против тех же мишеней. Настоящая работа посвящена определению вклада провоспалительных цитокинов, TNF и IL-6, в развитие HDM-индуцированной астмы и LPS-зависимого фиброза легких у мышей.

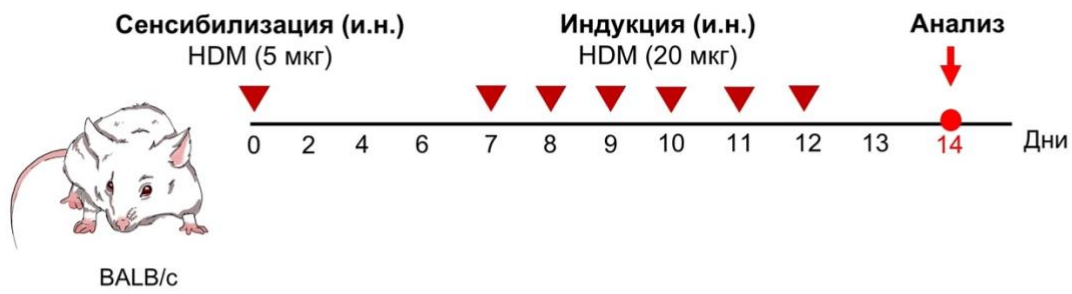
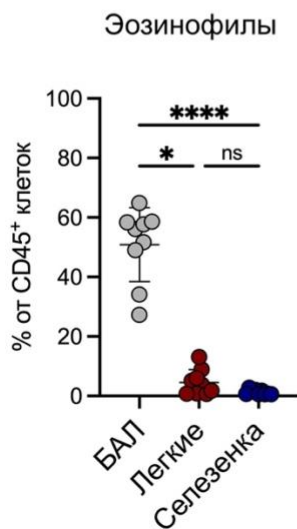
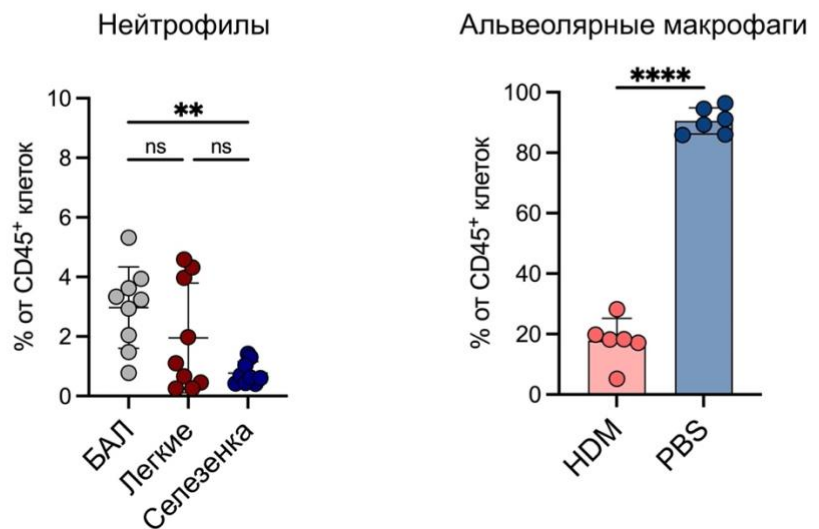
### **3.1. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 эффективно подавляет Th2-индуцированную эозинофилию и Th1-/Th17-опосредованное нейтрофильное воспаление дыхательных путей при HDM-индуцированной астме**

Астма с преимущественно эозинофильным воспалением дыхательных путей и практически полным отсутствием нейтрофилов, успешно контролируется кортикостероидами. Однако пациенты с тяжелой неконтролируемой астмой, при которой наблюдается повышенная нейтрофилия либо смешанный гранулоцитарный инфильтрат, не поддаются стандартным методам лечения. Разработка новых терапевтических стратегий при астме требует глубокого понимания ключевых иммунных процессов и роли цитокинов в патогенезе заболевания. В этом контексте антицитокиновая терапия представляет особый интерес как подход, направленный на преодоление множественных патогенных эффектов провоспалительных цитокинов [185]. Так, ингибирование TNF зачастую связано с системными побочными эффектами, проявляющимися в восприимчивости к инфекциям и повышенном риске развития новообразований [192]. Нами была

выдвинута гипотеза об эффективности комбинированной фармакологической блокировки IL-6 и TNF по сравнению с нейтрализацией этих цитокинов по отдельности в контексте HDM-индуцированной астмы. В настоящей работе была использована наиболее релевантная модель аллергической астмы с использованием одного из самых распространенных аллергенов - экстракта домашнего пылевого клеща, HDM [208]. Основное преимущество использования экстракта домашнего пылевого клеща заключается в индукции астмы без введения дополнительных адъювантов за счет многокомпонентного состава, включающего лиганды многих паттерн-распознающих рецепторов [213]. Для изучения последствий системной нейтрализации цитокинов был модифицирован стандартный протокол [208] с увеличением дозы аллергена, вносимого при сенсibilизации и индукции для развития смешанного типа ответа, характеризующегося как присутствием эозинофилов, так и нейтрофилов в БАЛ. Так, для индукции острой аллергической астмы мышам линии BALB/c ежедневно интраназально вводили 20 мкг HDM в течение шести дней с сенсibilизирующим интраназальным введением 5 мкг HDM за неделю до основного курса (Рисунок 5А).

Традиционно важнейшим биомаркером для выявления астмы является эозинофилия в периферической крови и мокроте. В настоящей работе эозинофилия также была оценена как параметр развития заболевания. Через 48 ч после последнего введения HDM мышей подвергали эвтаназии, после чего извлекали БАЛ, легкие и селезенку. С помощью проточной цитометрии оценивали накопление эозинофилов по маркерам SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> и их распределение в вышеперечисленных тканях. Стратегия выделения популяций гранулоцитов с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рисунке 1 в Приложении. Значительное повышение эозинофилов при индукции астмы наблюдали в БАЛ, но не в легких (Рисунок 5Б). В то же время повышенное содержание нейтрофилов (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) детектировали в БАЛ по сравнению с легкими и селезенкой (Рисунок 5Б).

Альвеолярные макрофаги известны как основная тканерезидентная популяция иммунных клеток в здоровых легких, характеризующаяся высокой экспрессией SiglecF и CD11c [214] и отсутствием экспрессии CD11b [215, 216]. Помимо своей роли в регуляции количества сурфактанта, продуцируемого эпителием и участвующего в снижении поверхностного натяжения в альвеолах для эффективного расширения легких, альвеолярные макрофаги обеспечивают поддержание целостности эпителия, а также действуют как первая линия защиты от вдыхаемых патогенов [217]. Острое воспаление дыхательных путей приводит к потере большинства резидентных альвеолярных макрофагов, которые заменяются провоспалительными макрофагами, функционально отличимыми и происходящими из моноцитов костного мозга [217].

**A****Б****В**

**Рисунок 5. HDM-индуцированная астма приводит к значительному повышению содержания гранулоцитов в БАЛ по сравнению с легочной тканью. (А) Схема эксперимента по индукции острой аллергической астмы. На этапе сенсибилизации мышам линии BALB/c вводили 5 мкг HDM (день 0). На седьмой день начинали этап индукции, продолжающийся шесть дней, в ходе которого мышам вводили 20 мкг HDM (красные стрелки). Через 48 часов после последнего введения аллергена проводили последующий анализ. Доля (Б) эозинофилов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>), нейтрофилов (Lyb6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) и (В) альвеолярных макрофагов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) от CD45<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток в БАЛ, легких и селезенке мышей на фоне HDM-индуцированной астмы. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу n=5-9 и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница). HDM – house dust mite, PBS – Phosphate-buffered saline, БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж, и.н. – интраназальное введение.**

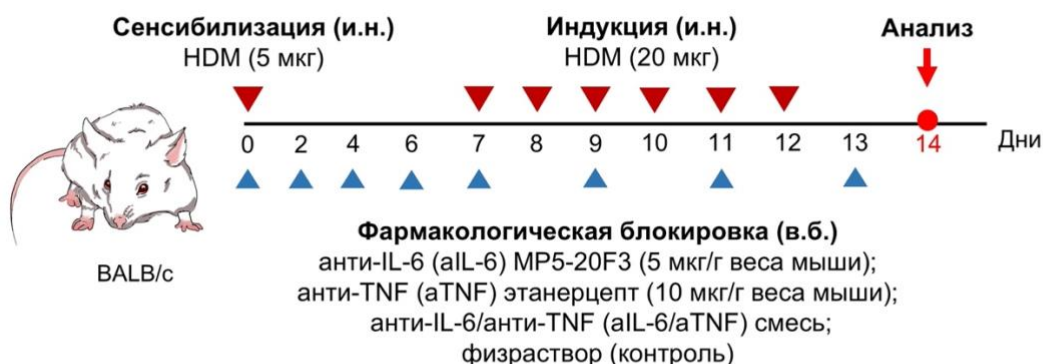
Этот процесс происходит параллельно с накоплением других воспалительных клеток и нарушением целостности эпителиального барьера. Действительно, у мышей с HDM-индуцированной астмой наблюдается резкое снижение процентного содержания альвеолярных макрофагов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) в БАЛ по сравнению с контрольной группой мышей, которым вместо аллергена вводили PBS (Рисунок 5В). Таким образом, содержание клеток миелоидного

ряда в БАЛ было выбрано для дальнейшей оценки развития заболевания и исследования последствий фармакологической блокировки IL-6 и TNF.

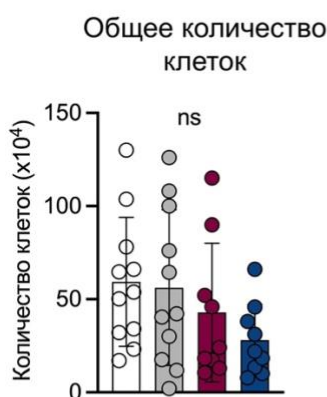
### **3.1.1. Комбинированная блокировка IL-6 и TNF у мышей с острой HDM-индуцированной астмой приводит к снижению инфильтрации гранулоцитов и поддержанию популяции альвеолярных макрофагов в дыхательных путях**

Для изучения последствий системной нейтрализации TNF и IL-6 мышей линии BALB/c иммунизировали HDM по вышеописанному протоколу (Рисунок 5А). Для системной фармакологической блокировки IL-6 и TNF было проведено внутрибрюшинное введение моноклонального антитела к IL-6 (MP5-20F3) в дозировке 5 мкг/г веса мыши, а также клинически доступного TNF-блокатора этанерцепт из расчета 10 мкг/г веса мыши каждые 48 ч в течение 13 дней (Рисунок 6А). Через 48 часов после последнего введения HDM у мышей собирали кровь на сыворотку для иммуноферментного анализа. Далее мышей подвергали эвтаназии с извлечением БАЛ, легких и селезенки. Цитофлуориметрический анализ показал, что общее количество клеток в БАЛ у мышей на фоне блокировки TNF и IL-6 не отличалось от такового у контрольной группы мышей, получавших вместо блокаторов физраствор (Рисунок 6Б). В то же время, комбинированная блокировка TNF и IL-6 приводила к значительному снижению инфильтрации гранулоцитов в БАЛ (Рисунок 6В, Г). Примечательно, что у мышей, получавших антитела к IL-6, было снижено содержание нейтрофилов, но не эозинофилов, тогда как блокировка TNF преимущественно подавляла накопление эозинофилов (Рисунок 6В, Г). В группе мышей на фоне комбинированной блокировки цитокинов происходило снижение как числа эозинофилов, так и числа нейтрофилов в БАЛ (Рисунок 6В, Г).

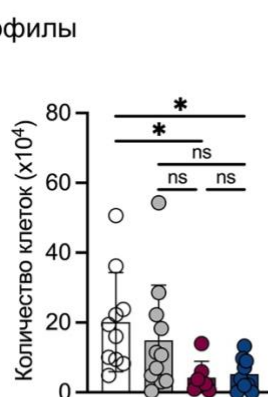
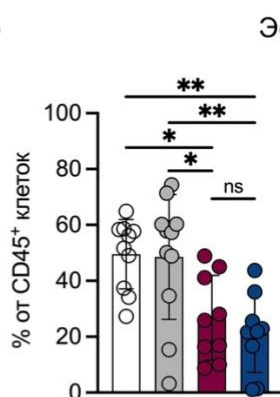
**A**



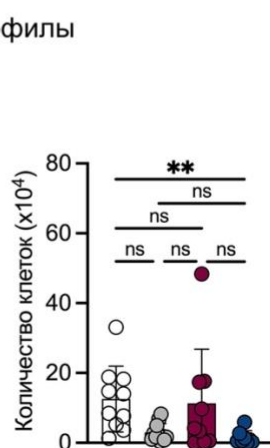
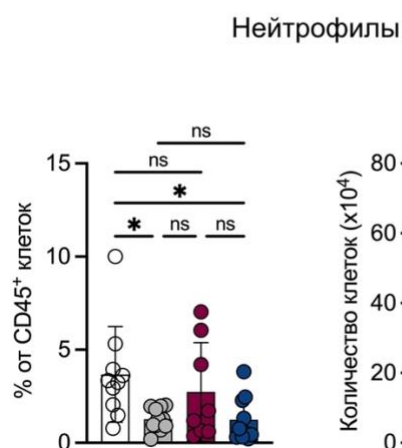
**Б**



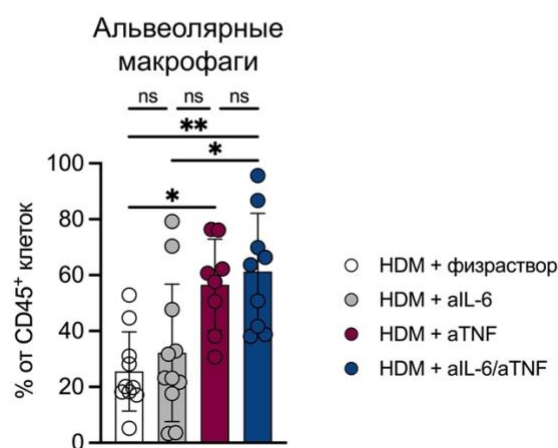
**В**



**Г**



**Д**



**Рисунок 6. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 у мышей с острой HDM-индуцированной астмой приводит к снижению содержания гранулоцитов и поддержанию популяции альвеолярных макрофагов в БАЛ. (А) Схема эксперимента по блокировке TNF и IL-6 на фоне острой аллергической астмы. В качестве модели астмы использовали протокол двухэтапной индукции аллергической астмы. Блокирующее моноклональное антитело MP5-20F3 к IL-6 (5 мкг/г веса мыши), блокатор TNF этанерцепт (10 мкг/г), а также физиологический раствор в качестве контроля, вводили перед иммунизацией каждые два дня на фоне сенсибилизации и индукции астмы (синие стрелки). Через 48 часов после последнего введения аллергена проводили последующий анализ. Эксперимент включал четыре группы мышей: контрольная группа с**

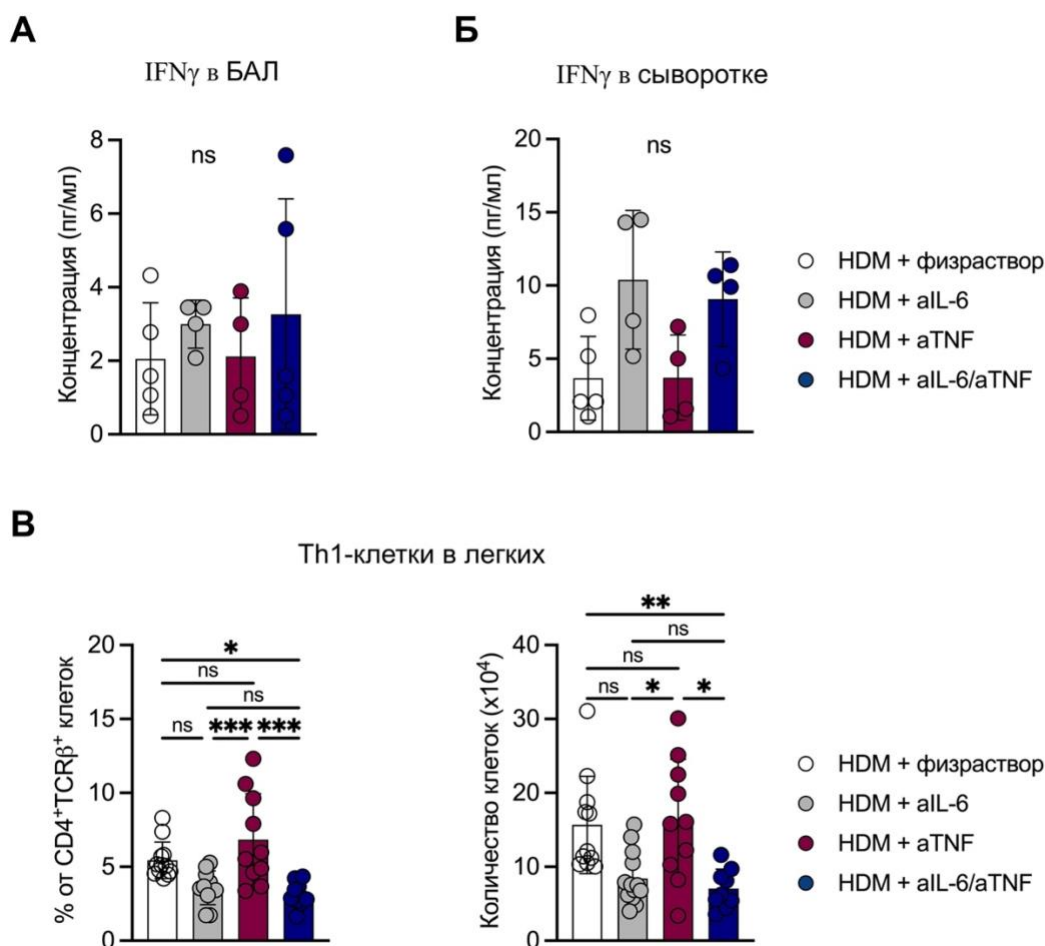
введением 0,9% раствора хлорида натрия; группа мышей на фоне анти-IL-6 блокировки; группа мышей с нейтрализацией TNF; и мыши с комбинированной анти-IL-6 и анти-TNF блокировкой. (Б) Общее количество клеток в БАЛ. Доля и количество (В) эозинофилов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>), (Г) нейтрофилов (LybG<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) и (Д) альвеолярных макрофагов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) от CD45<sup>+</sup>VD-клеток в БАЛ. Результаты представлены как среднее значение ±SD с количеством мышей на группу n=7-11 и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns, non-significant (недостоверная разница). и.н. – интраназальное введение, в.б. – внутривентриальное введение.

При заживлении повреждений, вызванных острым или хроническим воспалением дыхательных путей, остаточные резидентные альвеолярные макрофаги могут самообновляться за счет пролиферации, либо восполняться из макрофагов моноцитарного происхождения под влиянием микроокружения легких [218, 219]. Для установления вклада нейтрализации TNF и IL-6 в восполнение пула резидентных альвеолярных макрофагов, оценивали содержание этой популяции иммунных клеток при острой аллергической астме на фоне блокировки TNF и IL-6. Стратегия выделения популяции альвеолярных макрофагов с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рисунке 1 в Приложении. Оказалось, что нейтрализация TNF наряду с комбинированной блокировкой TNF и IL-6 способствуют возобновлению и поддержанию популяции альвеолярных макрофагов в отличие от мышей с блокировкой IL-6 или введением физраствора (Рисунок 6Д). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о более высокой эффективности комбинированной блокировки TNF и IL-6 при HDM-индуцированной астме за счет подавления эозинофилии и нейтрофилии в дыхательных путях, а также поддержания популяции резидентных альвеолярных макрофагов.

### **3.1.2 По сравнению с ингибированием цитокинов по отдельности, комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 снижает как Th2-, так и Th1-опосредованное воспаление в легких**

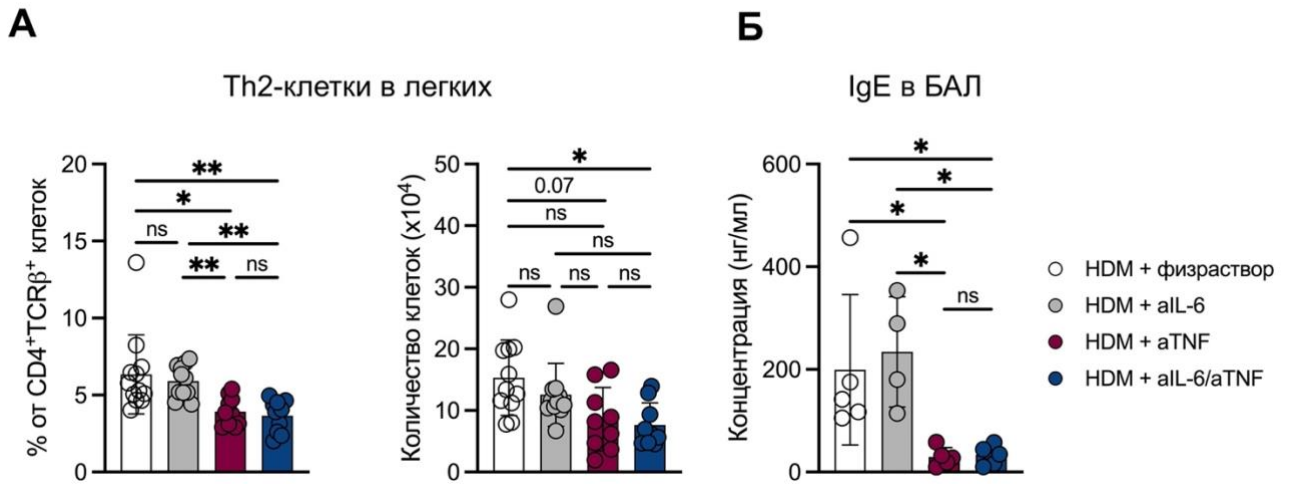
Многочисленные исследования показали, что преобладающий тип Т-клеточного ответа играет центральную роль в определении оптимальной стратегии для лечения астмы [220]. Так, активация Th2-клеток характерна для развития легкой эозинофильной формы астмы, в то время как нейтрофильная тяжелая астма связана с преобладанием Th17- и Th1-клеток. Нами было исследовано содержание различных субпопуляций Т-клеток, таких как Th2-, Th1-, Th17- и Treg-клеток в легких и на периферии при фармакологической блокировке TNF и IL-6. Стратегия выделения субпопуляций Т-клеток представлена на Рисунке 2 в Приложении.

Было показано, что введение антител к IL-6 мышам с HDM-индуцированной астмой не приводило к снижению секреции IFN $\gamma$  в БАЛ и сыворотке (Рисунок 7А, Б), а также не способствовало уменьшению Th1-клеток (TNF<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) и Th2-клеток (IL-13<sup>+</sup>) в легких (Рисунок 7В, 8А).



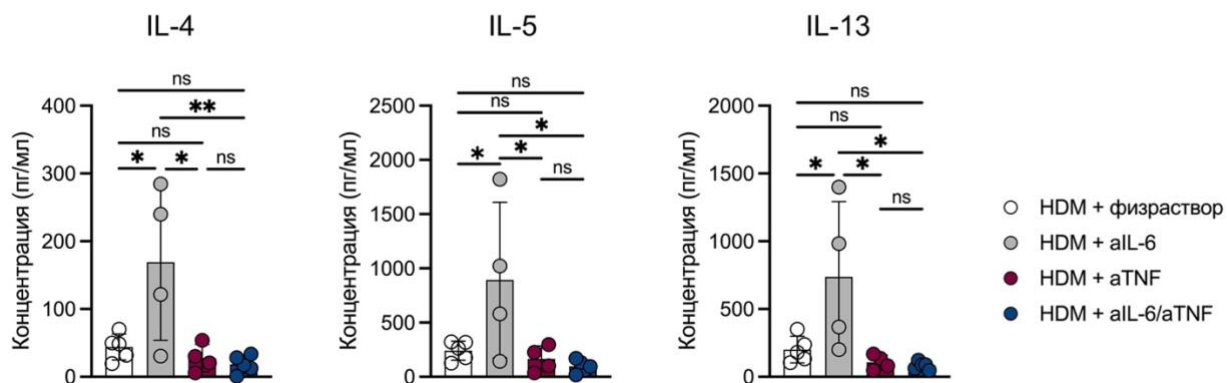
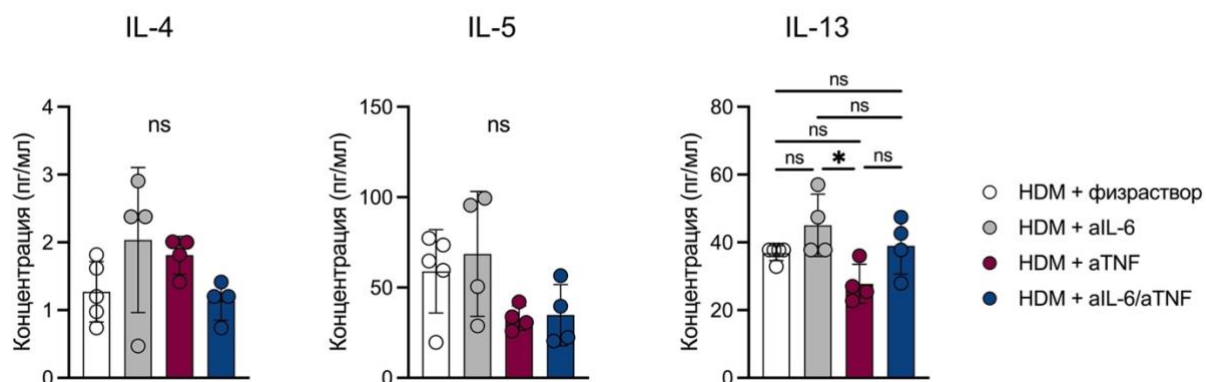
**Рисунок 7. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает накопление Th1-клеток в легких.** Концентрация IFN $\gamma$  (пг/мл) в (А) БАЛ и (Б) сыворотке мышей через 48 часов после последнего введения HDM, измеренная с помощью мультипараметрического флуоресцентного анализа продукции цитокинов. (В) Доля и количество Th1-клеток (TNF<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) от TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток в легких. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу n=4-11 и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; ns, non-significant (недостовверная разница).

Кроме того, ингибирование IL-6 при воспалении дыхательных путей было связано с локальным увеличением продукции IL-4, IL-5 и IL-13, которые играют решающую роль в Th2-опосредованном эозинофильном воспалении (Рисунок 9А). При этом продукция IL-4, IL-5 и IL-13 в сыворотке между экспериментальными группами не отличалась (Рисунок 9Б). На фоне блокировки TNF, напротив, происходило подавление Th2-клеток в легких, что согласуется со снижением эозинофилии (Рисунок 8А).



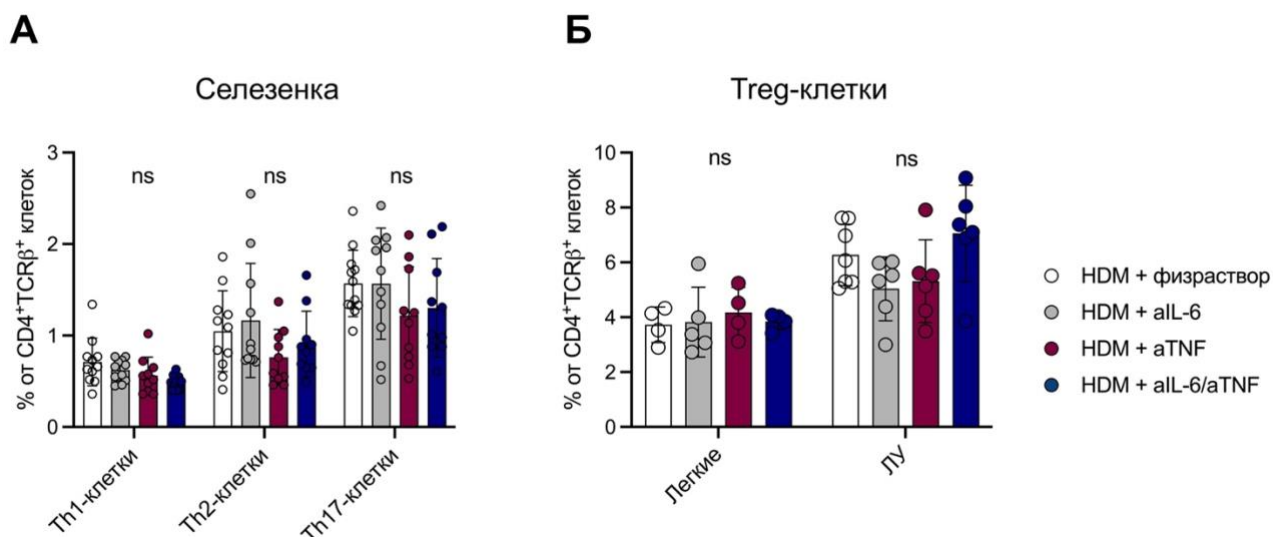
**Рисунок 8.** Нейтрализация TNF наряду с комбинированной блокировкой TNF и IL-6 способствует уменьшению Th2-опосредованного клеточного ответа при HDM-индуцированной астме. (А) Доля и количество Th2-клеток (IL-13<sup>+</sup>) от TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток в легких. (Б) Концентрация IgE (нг/мл) в БАЛ, измеренная методом ИФА через 48 часов после последнего введения HDM. Результаты представлены как среднее значение ±SD с количеством мышей на группу n=4-11 и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

Известно, что IgE является важнейшим клиническим биомаркером аллергических реакций, в частности, Th2-опосредованной атопии [221]. Было установлено, что у мышей на фоне комбинированной фармакологической блокировки наблюдается резкое снижение продукции IgE в БАЛ (Рисунок 8Б). Интересно, что нейтрализация TNF приводила к такому же эффекту, в отличие от блокировки только IL-6 (Рисунок 8Б), что указывает на эксклюзивный эффект блокировки TNF на снижение IgE.

**A****Б**

**Рисунок 9. Ингибирование IL-6 при воспалении дыхательных путей связано с локальным увеличением продукции Th2-ассоциированных цитокинов.** Концентрация IL-4, IL-5 и IL-13 (пг/мл) в (А) БАЛ и (Б) сыворотке у мышей через 48 часов после последнего введения HDM, измеренная с помощью мультипараметрического флуоресцентного анализа продукции цитокинов. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=4-5$  и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

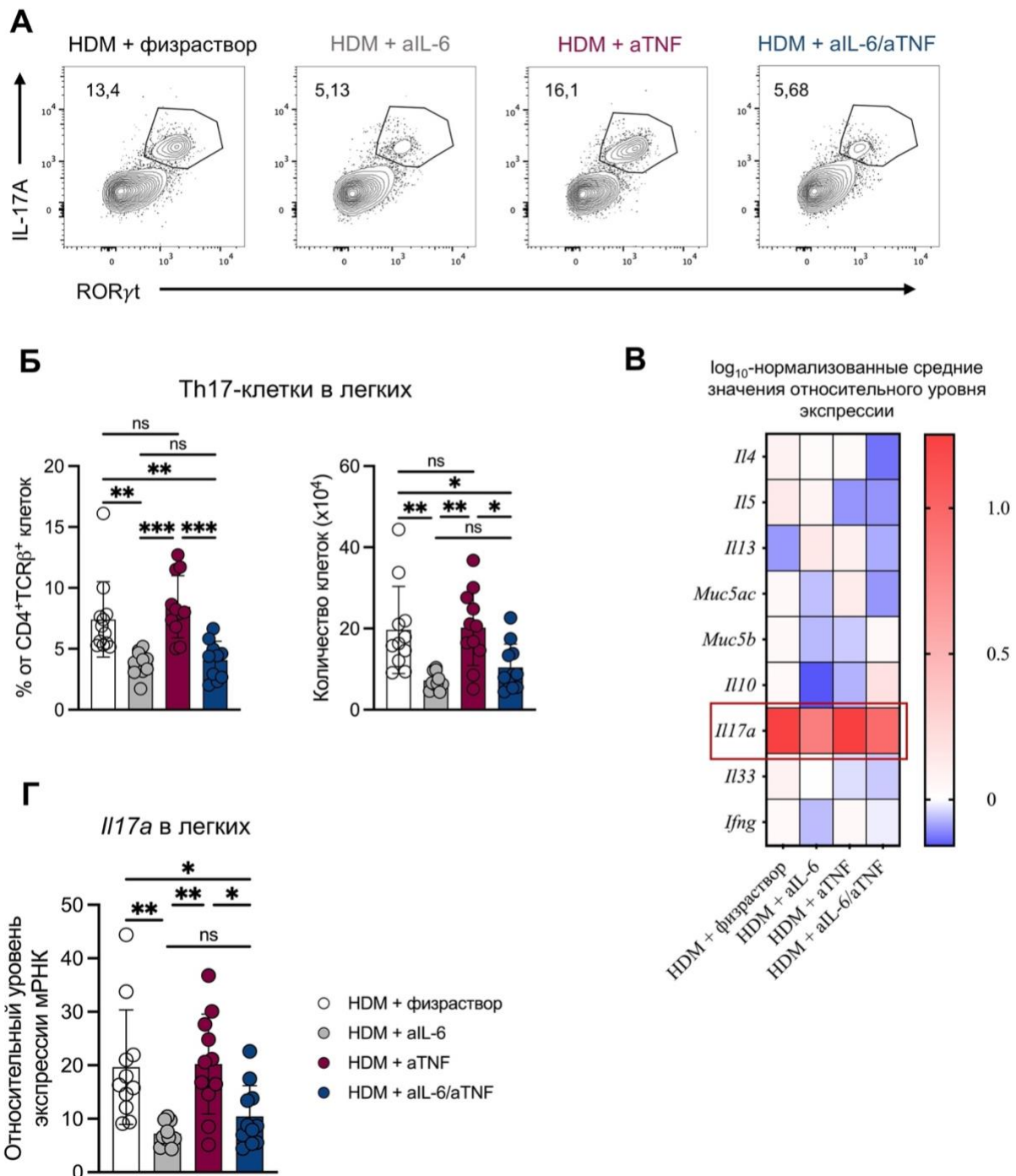
Следующим этапом исследования было изучение влияния блокировки TNF и IL-6 на накопление Т-клеток на периферии. Для этого с помощью проточной цитометрии было оценено содержание Т-клеток в селезенке у мышей с HDM-индуцированной астмой на фоне терапии антителами. Несмотря на системное введение блокаторов, состав Th-клеток существенно не отличался в селезенке мышей с комбинированной блокировкой TNF и IL-6 по сравнению с другими группами мышей (Рисунок 10А). В то же время было установлено, что комбинированная блокировка не влияет на содержание субпопуляции Treg-клеток и, предположительно, не способствует созданию иммуносупрессорного микроокружения ни локально в легочной ткани, ни на периферии (Рисунок 10Б). Тем не менее, полученные данные позволяют утверждать, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 более эффективно снижает интенсивность воспалительного ответа в легких по сравнению с ингибированием цитокинов по отдельности у мышей с острой HDM-индуцированной астмой.



**Рисунок 10. Блокировка TNF и IL-6 не влияет на содержание различных субпопуляций Т-клеток на периферии.** Доля (А) Th1-клеток ( $TNF^{+}IFN\gamma^{+}$ ), Th2-клеток ( $IL-13^{+}$ ), Th17-клеток ( $IL-17A^{+}ROR\gamma^{+}$ ) от  $TCR\beta^{+}CD4^{+}VD^{-}$  клеток в селезенке и (Б) Трег-клеток ( $FoxP3^{+}HELIOS^{+}$ )  $TCR\beta^{+}CD4^{+}VD^{-}$  клеток в легких и лимфоузлах у мышей с HDM-индуцированной астмой на фоне фармакологической блокировки TNF и IL-6. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=4-11$  и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

### 3.1.3 Нейтрализация IL-6 предотвращает вызванное ингибированием TNF накопление Th17-клеток в легких

Известно, что тяжелая форма нейтрофильной астмы связана с активацией не только Th1-, но и Th17-опосредованного ответа [16, 222]. С целью подтвердить положительный эффект комбинированной блокировки TNF и IL-6 в подавлении Th17-опосредованного воспаления в легких методом проточной цитометрии оценивали накопление субпопуляции Th17-клеток по маркерам  $IL-17A^{+}ROR\gamma^{+}$  у мышей с острой аллергической астмой на фоне системной блокировки TNF и IL-6 (Рисунок 11А). Как ожидалось, комбинированная блокировка TNF и IL-6 значительно снижала процентное содержание и количество Th17-клеток в легких по сравнению с контрольной группой (Рисунок 11А, Б). Интересно, что субпопуляция Th17-клеток резко увеличивалась у группы мышей с ингибированием TNF (Рисунок 11А, Б). При этом в ответ на введение антител к IL-6 наблюдалось значительное снижение Th17-клеток в легких (Рисунок 11А, Б), что коррелировало со снижением количества нейтрофилов в БАЛ на фоне блокировки IL-6 (Рисунок 6Г). В целом, полученные данные указывают на то, что введение анти-IL-6 антител, в первую очередь, приводит к подавлению Th17-клеточного ответа, в то время как нейтрализация TNF, по-видимому, способствует накоплению Th17-клеток в дыхательных путях.



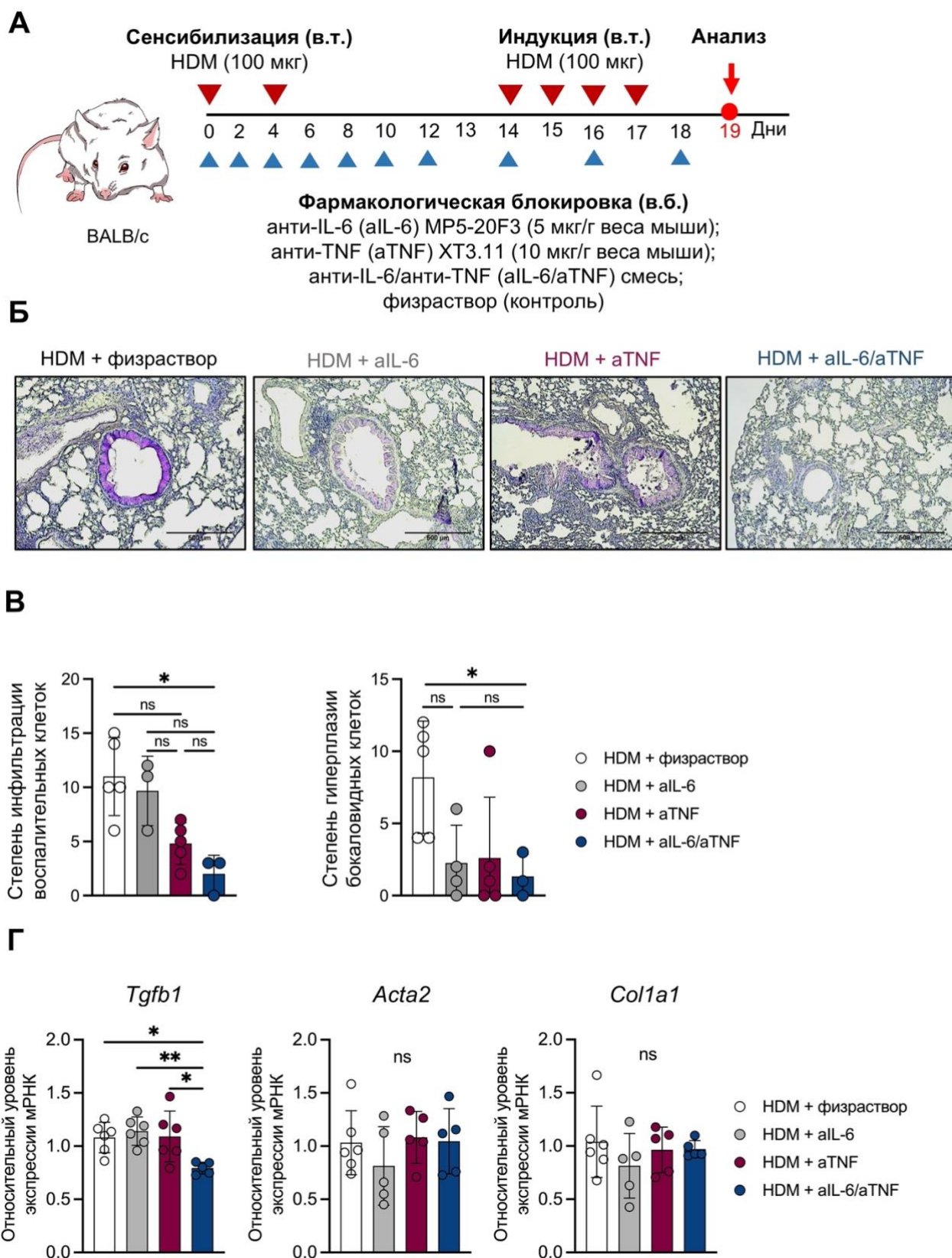
**Рисунок 11. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает накопление Th17-клеток, ассоциированное с анти-TNF монотерапией. (А)** Распределение субпопуляции Th17-клеток (IL-17A<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) от TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток в легких у мышей с нейтрализацией цитокинов на фоне острой аллергической астмы. **(Б)** Доля и количество Th17-клеток (IL-17A<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) от TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток в легких. **(В)** Тепловая карта, изображающая log<sub>10</sub>-нормализованные средние значения относительной экспрессии генов *Il4*, *Il5*, *Il13*, *Muc5ac*, *Muc5b*, *Il10*, *Il17a*, *Il33* и *Ifng* относительно *Actb*, определенные методом RT-PCR в образцах легких. **(Г)** Экспрессия гена *Il17a* относительно *Actb*, определенная методом RT-PCR в тканях легких через 48 часов после последнего введения HDM. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу n=7-11 и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

При этом, комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращала активацию патогенетического *Il17a*, играющего, как известно, важную роль в формировании нейтрофильного воспаления при астме. В то время как фармакологическая нейтрализация TNF поддерживала высокий уровень экспрессии *Il17a* (Рисунок 11Г), снижение уровня экспрессии других генов, ассоциированных с астмой, не было статистически значимым во всех экспериментальных группах (Рисунок 11В). Таким образом, полученные результаты демонстрируют преимущество комбинированной фармакологической блокировки IL-6 и TNF в подавлении Th17-опосредованного воспаления при острой аллергической астме.

### **3.2. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает ремоделирование легочной ткани в экспериментальной модели тяжелой астмы**

Важным клиническим признаком развития гиперреактивности легких является ремоделирование дыхательных путей, которое связано с длительными изменениями структуры ткани, вносящими существенный вклад в снижение функции легких. Ремоделирование дыхательных путей включает утолщение слоя гладкомышечных клеток, повышенное отложение внеклеточного матрикса, гиперплазию бокаловидных клеток и гиперсекрецию слизи [223, 224]. Современные методы лечения астмы в основном направлены на уменьшение воспаления, но не на снижение ремоделирования дыхательных путей.

Для исследования эффектов комбинированной блокировки цитокинов в ремоделировании дыхательных путей были использованы более высокие дозы HDM для развития более выраженного воспалительного ответа и ремоделирования легочной ткани [225]. Индукцию тяжелой астмы у мышей линии BALB/c осуществляли путем внутритрахеального введения (в.т.) 100 мкг экстракта HDM на 0 и 4 дни сенсибилизации. Кроме того, мышам ежедневно проводили внутритрахеальное введение 100 мкг HDM на 14-17 сутки эксперимента. Введение блокаторов IL-6 (MP5-20F3) (5 мкг/г массы тела) и TNF (XT3.11) (10 мкг/г массы тела) или их смеси, а также физиологического раствора в качестве контроля производили внутрибрюшинно (в.б.) перед иммунизацией каждые 48 часов в течение 18 дней (Рисунок 12А). Через 48 часов после последнего введения аллергена мышей подвергали эвтаназии с последующим извлечением легких. После транскардиальной перфузии физраствором легкие фиксировали в 4% формальдегиде (PFA) для дальнейшего гистологического анализа легочной ткани.



**Рисунок 12. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает ремоделирование ткани легких у мышей при тяжелой HDM-индуцированной астме. (А)** Схема эксперимента по индукции тяжелой астмы. Мышей линии BALB/c сенсибилизировали путем внутритрахеального введения (в.т.) 100 мкг экстракта HDM (лот 15G10, Citeq biologics) в 0 и 4 дни (красные стрелки). На 14-17 сутки мышам ежедневно внутритрахеально (в.т.) вводили 100 мкг HDM. Антитела к IL-6 (MP5-20F3) (5 мкг/г массы тела) и к TNF (XT3.11) (10 мкг/г массы тела) или смесь ингибиторов, а также физиологический раствор в качестве контроля вводили

внутрибрюшинно (в.б.) перед каждой иммунизацией каждые 48 часов в течение 18 дней (синие стрелки). Через 48 часов после последнего введения аллергена проводили анализ. Эксперимент включал четыре группы мышей: контрольная группа с введением 0,9% раствора хлорида натрия; группа мышей на фоне анти-IL-6 блокировки; группа мышей с нейтрализацией TNF; и мыши с комбинированной анти-IL-6 и анти-TNF блокировкой. **(Б)** Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания гематоксилином и PAS (реакция Шифф-йодной кислотой) срезов легких мышей. Области интенсивного фиолетового окрашивания демонстрируют толщину слоя муцинов и гликопротеинов в легочной ткани. Размер масштабной линейки - 500 мкм. **(В)** Интенсивность инфильтрации воспалительных клеток и гиперплазии бокаловидных клеток (по шкале от 0 до 4), оцененные на гистологических срезах. **(Г)** Уровень экспрессии генов *Tgfb1*, *Acta2* и *Colla1* относительно *Actb* в легких мышей на фоне блокировки цитокинов при индукции тяжелой астмы. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=3-6$  и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns, non-significant (недостоверная разница). в.т. – внутритрахеальное введение, в.б. – внутрибрюшинное введение.

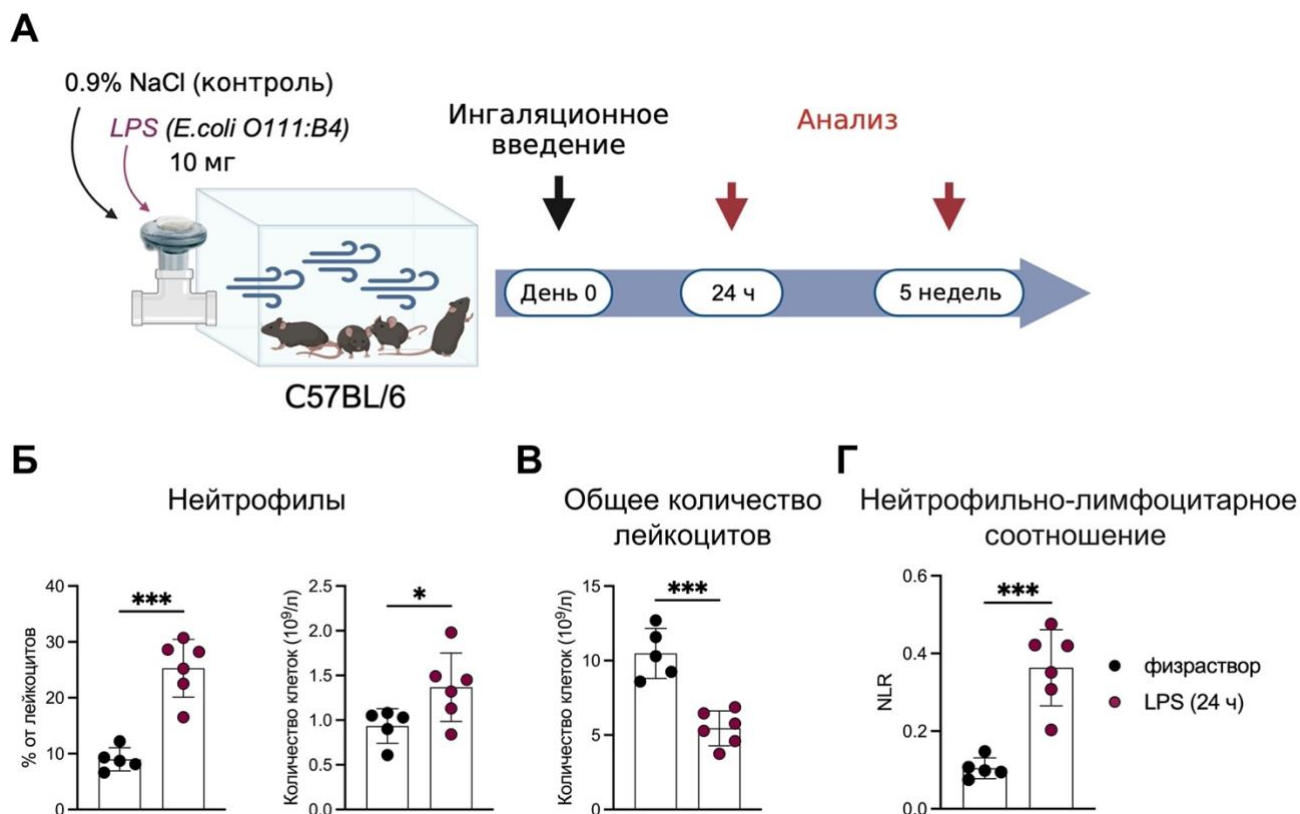
Окрашивание гематоксилином и методом Шиффа (PAS-реакция или реакция Шифф-йодной кислотой) выявило снижение инфильтрации воспалительных клеток и популяции бокаловидных клеток у мышей на фоне комбинированной блокировки TNF и IL-6 по сравнению с другими экспериментальными группами (Рисунок 12Б). Полуколичественная оценка воспалительного клеточного инфильтрата и PAS-положительных бокаловидных клеток (интенсивность продукции слизи) показала, что у мышей с комбинированной фармакологической блокировкой TNF и IL-6 как инфильтрация воспалительных клеток, так и гиперплазия бокаловидных клеток в легких значительно уменьшались по сравнению с мышами с инактивацией одного из двух цитокинов (Рисунок 12В).

TGF- $\beta$  известен способностью индуцировать выработку коллагена в легочной ткани, что может приводить к фиброзу. Действительно, продукция TGF- $\beta$  была повышена как в животных моделях фиброза, так и в легких пациентов с фиброзом. Кроме того, пролиферация и трансдифференцировка фибробластов в миофибробласты зависят от TNF- и IL-6-индуцированной продукции TGF- $\beta$  [130, 226]. Было установлено, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 снижает экспрессию *Tgfb1*, чего не наблюдается у мышей с ингибированием этих цитокинов по отдельности (Рисунок 12Г). При этом экспрессия других маркеров, связанных с ремоделированием, в частности, генов *Acta2* и *Colla1*, не отличались во всех экспериментальных группах (Рисунок 12Г). Суммируя вышеописанные результаты, было показано, что именно комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 в контексте тяжелой HDM-индуцированной астмы может обеспечить преимущество в подавлении ремоделирования легких по сравнению с ингибированием этих цитокинов по отдельности.

### **3.3. Однократное ингаляционное введение LPS приводит к появлению типичных признаков фиброза легких через 5 недель**

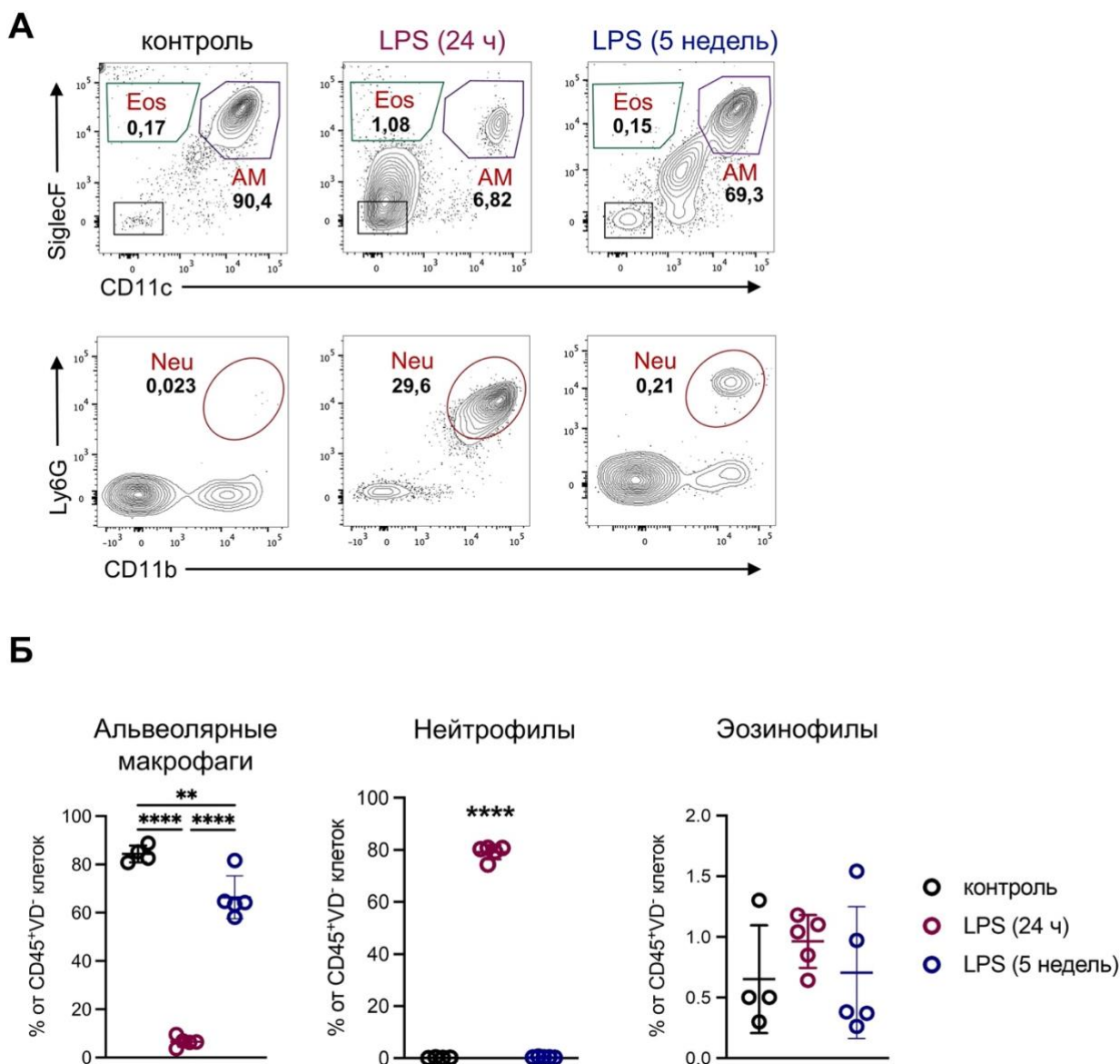
Одной из разновидностей ремоделирования легочной ткани у людей, страдающих астмой, является избыточная пролиферация гладкомышечных клеток, приводящая к отложению внеклеточного матрикса и усиленной обструкции дыхательных путей и, в некоторых случаях, к необратимым структурным изменениям в дыхательных путях и легочной ткани [227]. Фиброз легких можно рассматривать как следствие длительного не разрешившегося воспаления, возникшего после острого повреждения. Накопление фиброзной ткани в легких сопровождается тяжелым течением заболевания и резистентностью к проводимой терапии. Основное ограничение существующих экспериментальных моделей астмы при изучении патогенеза фиброза заключается в их остром и кратковременном характере, что препятствует воспроизведению ключевых аспектов хронического течения болезни у человека [228]. Следовательно, поиск мышинной модели для понимания механизмов, лежащих в основе перехода от острого воспалительного процесса к фибротическим изменениям легких, остается актуальной задачей.

Модель LPS-индуцированного острого повреждения легких широко используется для изучения молекулярных и клеточных механизмов патогенеза заболеваний дыхательных путей. При этом большинство исследований сосредоточено на изучении повреждений легких во время острой фазы воспаления, тогда как долговременные изменения в легочной ткани недостаточно изучены. В настоящей работе была использована ранее опубликованная модель воспаления легких [209] с модификациями [229]. Для индукции воспаления легких проводили однократное ингаляционное введение LPS (10 мг), и наблюдали за животными в течение 5 недель, что позволяет оценить как изменения, происходящие при острой фазе воспаления, так и долгосрочные последствия, присущие фибропролиферативной фазе с развитием хронического воспаления и фиброза (Рисунок 13А).



**Рисунок 13. Оценка эффективности доставки LPS с помощью аэрозольного введения. (А)** Схема эксперимента LPS-индуцированного воспаления легких. Мышей линии C57BL/6 подвергали ингаляционному воздействию 5 мл LPS в концентрации 2 мг/мл до полного распыления раствора, в качестве контроля использовали физиологический раствор. Через 24 часа, а также через 5 недель после последнего введения LPS проводили анализ. Эксперимент включал три группы мышей: контрольная группа (через 24 ч после введения физраствора); группа мышей для оценки кратковременных эффектов (через 24 ч после введения LPS); а также группа мышей для исследования долгосрочных эффектов (через 5 недель после введения LPS). Доля и количество нейтрофилов (**Б**), а также общее количество лейкоцитов (**В**) в крови мышей через 24 ч после ингаляционного введения LPS и физраствора. (**Г**) Нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение в крови у мышей спустя 24 ч после однократного аэрозольного введения LPS. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=5-6$  и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница). WBC (white blood cells) – лейкоциты.

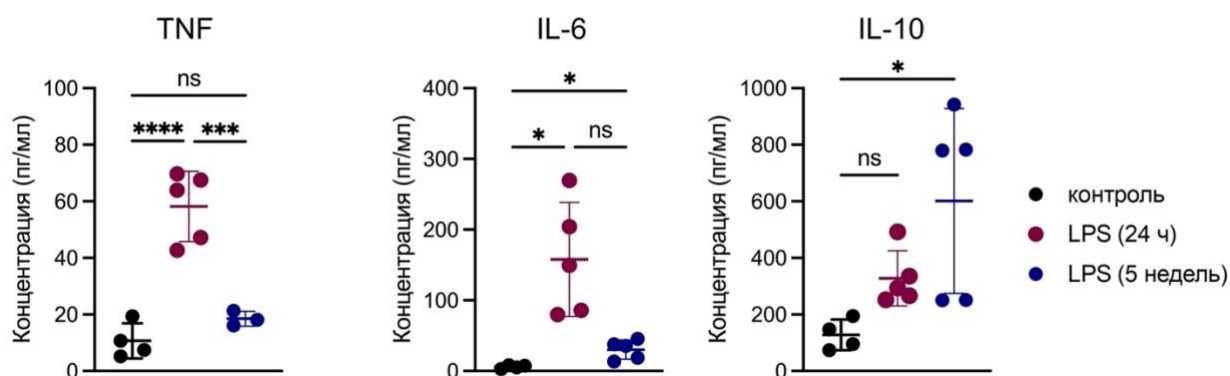
Так, однократное воздействие LPS на дыхательные пути спустя сутки вызывало системное воспаление, характеризующееся увеличением содержания нейтрофилов в крови (Рисунок 13Б-Г). Кроме того, введение LPS в виде аэрозоля спустя сутки приводило к выраженной локальной инфильтрации нейтрофилов в БАЛ, тогда как на 5-й неделе содержание нейтрофилов снижалось до значений, сопоставимых с наивным уровнем (Рисунок 14А, Б).



**Рисунок 14.** Однократное аэрозольное введение LPS приводит к снижению пула альвеолярных макрофагов в БАЛ в течение 5 недель. (А) Репрезентативные поточечные диаграммы миелоидных клеток в БАЛ, выделенных от CD45<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток. (Б) Доля альвеолярных макрофагов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), нейтрофилов (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) и эозинофилов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) от CD45<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток в БАЛ мышей после воздействия аэрозольного LPS. Результаты представлены как среднее значение ±SD с количеством мышей на группу n=4-5 и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница). Eos – эозинофилы, Neu – нейтрофилы, AM – альвеолярные макрофаги.

Как было указано ранее, при остром воспалении дыхательных путей наблюдается деплеция резидентных SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> альвеолярных макрофагов [217], что подтверждается полученными нами данными (Рисунок 14А, Б). К 5-й неделе после введения LPS у мышей отмечалось более высокое содержание альвеолярных макрофагов по сравнению с группой, исследованной через 24 ч (Рисунок 14Б), однако полного восстановления пула до уровня контрольной группы не наблюдалось, что может свидетельствовать о сохраняющемся воспалении дыхательных путей

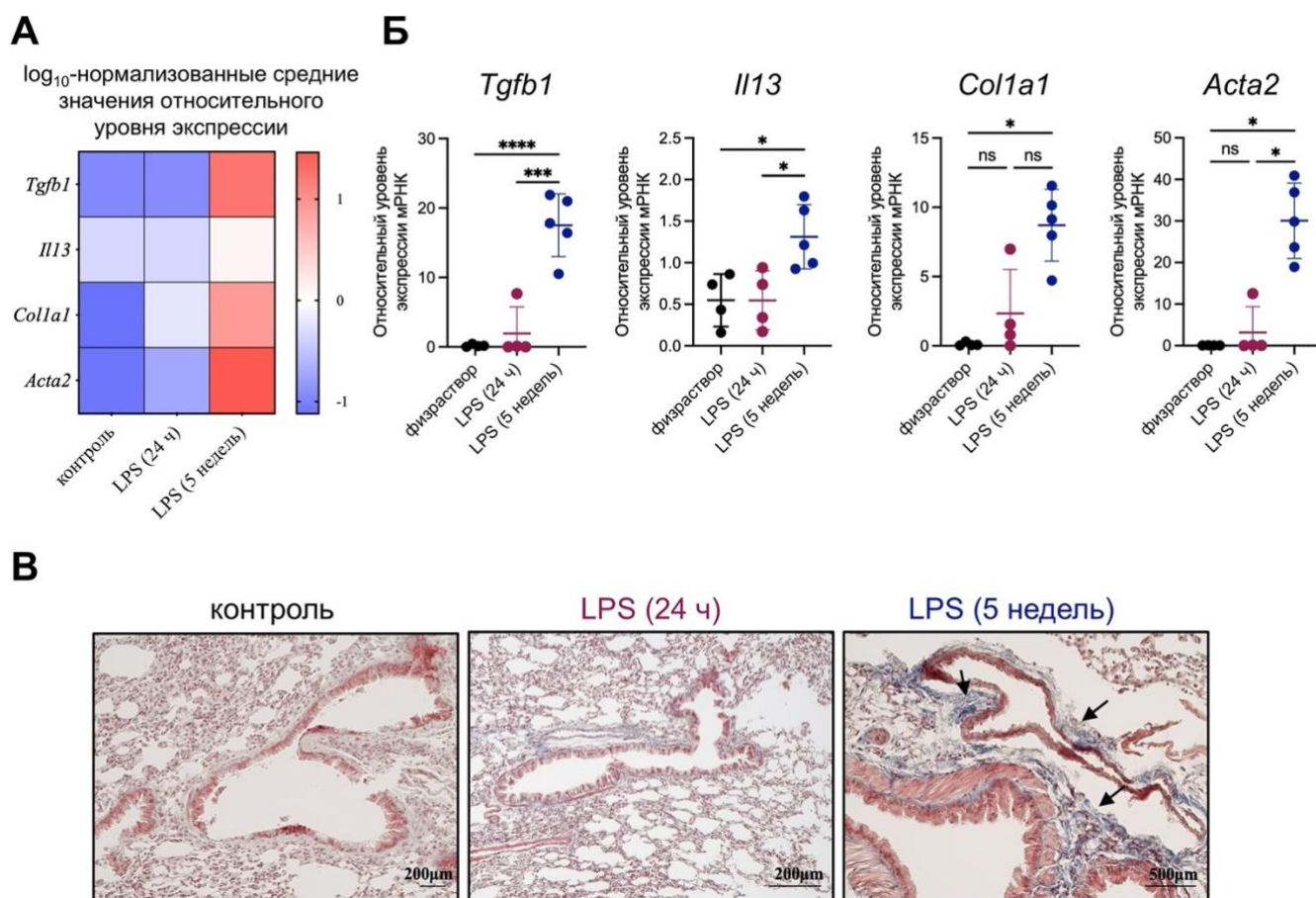
(Рисунок 14Б). Кроме того, через 5 недель после ингаляционного воздействия LPS сохранялась повышенная локальная продукция IL-6, но не TNF в БАЛ (Рисунок 15). При этом повышение продукции как TNF, так и IL-6 на фоне острого воспаления (через 24 часа) было статистически достоверным (Рисунок 15). Таким образом, спустя 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS выявлялась повышенная локальная продукция IL-6 и нарушение восстановления пула альвеолярных макрофагов, что может указывать на формирование хронического воспаления легких.



**Рисунок 15. Введение LPS в виде аэрозоля через 5 недель способствует повышенной продукции IL-6 и IL-10, но не TNF, в БАЛ.** Уровень продукции TNF, IL-6 и IL-10 (пг/мл) в БАЛ после аэрозольного введения LPS. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=4-5$  и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

Известно, что IL-10, являясь каноническим противовоспалительным цитокином, ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов, тем самым подавляя развитие воспалительной реакции. При этом имеются данные о его значимом вкладе в развитие и прогрессирование фиброза легких: так, мыши с полной делецией IL-10 демонстрировали резистентность к развитию блеомицин-индуцированного фиброза, тогда как у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом отмечался повышенный уровень продукции IL-10 [97]. Было установлено, что однократное введение LPS в виде аэрозоля приводит к повышению продукции IL-10 в БАЛ через 5 недель, но не через 24 ч (Рисунок 15).

TGF- $\beta$ , усиливающий выработку коллагена в легочной ткани и инициирующий дифференцировку фибробластов, представляет собой один из ключевых медиаторов фиброза легких [230]. В настоящей модели LPS-индуцированного воспаления было показано, что однократное воздействие LPS значительно увеличивало экспрессию *Tgfb1* и *Coll1* в легких у мышей через 5 недель по сравнению с контрольной группой и мышами на фоне острого воспаления (Рисунок 16А, Б).



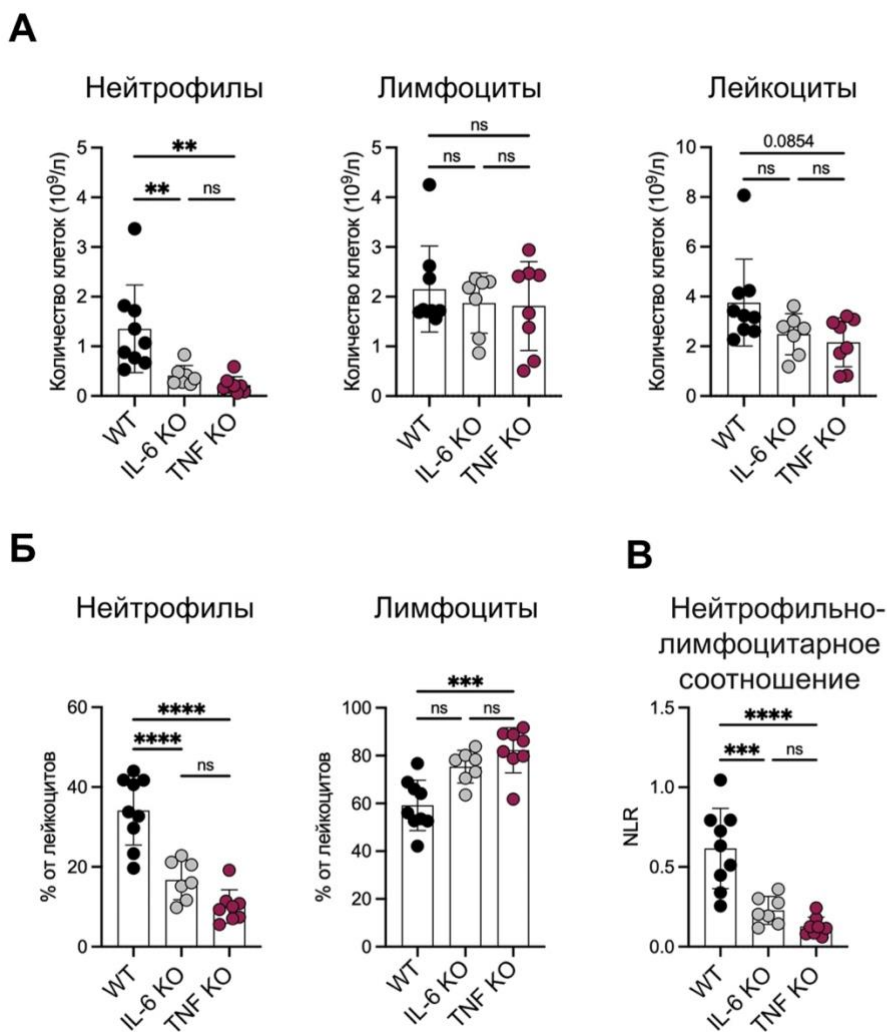
**Рисунок 16. Ингаляционное введение LPS через 5 недель приводит к увеличению экспрессии генов ключевых медиаторов, ассоциированных с фиброзом, и характерным изменениям ткани. (А)** Тепловая карта, изображающая log<sub>10</sub>-нормализованные средние значения относительной экспрессии генов *Tgfb1*, *Il13*, *Colla1* и *Acta2* в легких мышей через 24 ч и 5 недель после аэрозольного введения LPS. **(Б)** Экспрессия генов, ассоциированных с фиброзом, относительно *Actb*, в тканях легких. **(В)** Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания методом Массона срезов легких мышей после воздействия LPS, а также физраствора в качестве контроля. Стрелки указывают на области интенсивного синего окрашивания и демонстрируют наличие коллагена в легочной ткани. Размер масштабной линейки – 200 и 500 мкм. Результаты представлены как среднее значение ±SD с количеством мышей на группу n=4-5 и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

В то же время, TGF-β может индуцировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты за счет индукции экспрессии α-SMA (гладкомышечного актина α), кодируемого геном *Acta2*, тогда как IL-13 непосредственно регулирует выработку коллагена и α-SMA в фибробластах [99]. В соответствии с указанными данными, в легких мышей через 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS регистрировалось повышение экспрессии *Il13* и *Acta2* (Рисунок 16А, Б). Наряду с этим, окрашивание образцов легочной ткани по Массону выявило значительное отложение коллагена в тканях легких спустя 5 недель после аэрозольного введения LPS, что коррелировало с высоким уровнем экспрессии *Colla1* (Рисунок 16Б, В). Таким образом, было

установлено, что через 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS у мышей развивается хроническое воспаление, а также появляются типичные признаки фиброза легких: отложение коллагена и повышенная экспрессия профибротических генов. Представленная в настоящей работе ингаляционная форма доставки LPS воспроизводит наиболее физиологичный путь развития воспаления легких и позволяет исследовать механизмы фиброза на поздних стадиях острого повреждения легких, что необходимо для оптимизации существующих или разработки новых терапевтических подходов.

#### **3.4. Генетическая инактивация *Il6*, но не *Tnf* защищает от нарушения основных параметров дыхания и функциональности легких в модели LPS-индуцированного фиброза у мышей**

Для определения роли IL-6 и TNF в развитии ремоделирования легких, вызванного воспалением, работу проводили на мышах с полной генетической инактивацией IL-6 (IL-6 KO) или TNF (TNF KO) на фоне LPS-индуцированного фиброза легких. Следует отметить, что в используемой модели фиброза на 5 неделе наблюдалось накопление коллагена, отображающее только начальную стадию фибротических изменений (Рисунок 16B), поэтому мышей подвергали ингаляционному воздействию LPS с последующим анализом через 7 недель после введения. Гематологический анализ выявил снижение воспалительного ответа у IL-6 KO и TNF KO мышей по сравнению с мышами дикого типа, в частности, снижение абсолютного и относительного числа нейтрофилов в крови (Рисунок 17A, Б). Примечательно, что подсчет нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения также показал уменьшение системного воспаления у IL-6 KO и TNF KO мышей (Рисунок 17B). При этом между группами мышей с дефицитом IL-6 и TNF отсутствовали статистически значимые отличия в абсолютном и относительном содержании лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в крови (Рисунок 17A-В). Таким образом, оба цитокина играют определяющую роль в поддержании персистирующего системного воспаления в LPS-индуцированном фиброзе легких.



**Рисунок 17.** У мышей с дефицитом IL-6 и TNF снижено системное воспаление через 7 недель после однократного ингаляционного введения LPS. Количество (А) и доля (Б) нейтрофилов и лимфоцитов, а также (В) нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение в крови у мышей на фоне LPS-индуцированного фиброза на 7 неделе эксперимента. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=7-9$  и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ .  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ;  $****P < 0,0001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

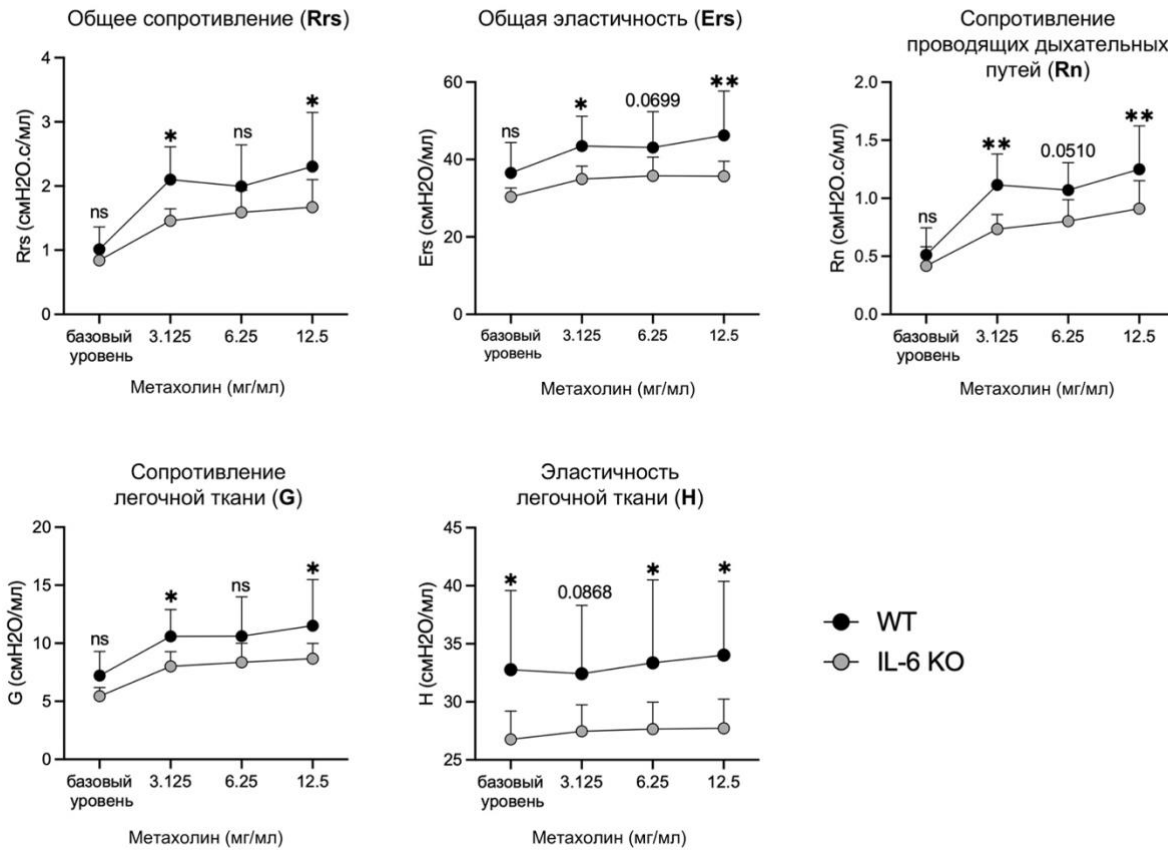
Исследование функциональности легких с помощью системы FlexiVent SCIREQ считается золотым стандартом в доклинических моделях и позволяет детально оценить механику дыхания, включая эластичность, сопротивление и податливость не только всей дыхательной системы, но и отдельных ее компонентов – крупных проводящих дыхательных путей и легочной ткани. Для анализа функциональных нарушений легких на фоне фиброза у IL-6 KO, TNF KO и контрольных мышей дикого типа была проведена оценка механики дыхания с использованием техники вынужденных колебаний в провокационном тесте с метахолином нарастающей концентрации (3.125 мг/мл, 6.25 мг/мл, 12.5 мг/мл) [231]. Было установлено, что спустя 7 недель после однократного ингаляционного введения LPS у мышей с полным удалением IL-6

наблюдалось снижение сопротивления дыхательной системы ( $Rrs$ ,  $Rn$  и  $G$ ) в ответ на провокационную пробу метахолина по сравнению с мышами дикого типа (Рисунок 18).

**А**



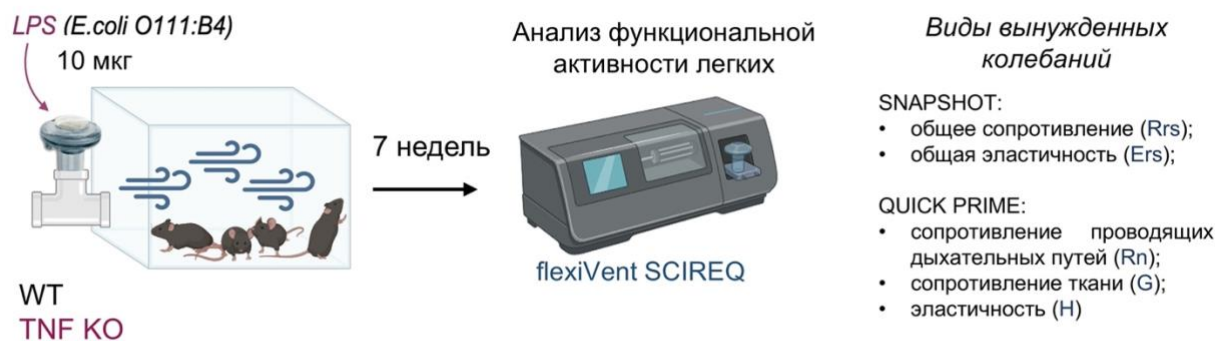
**Б**



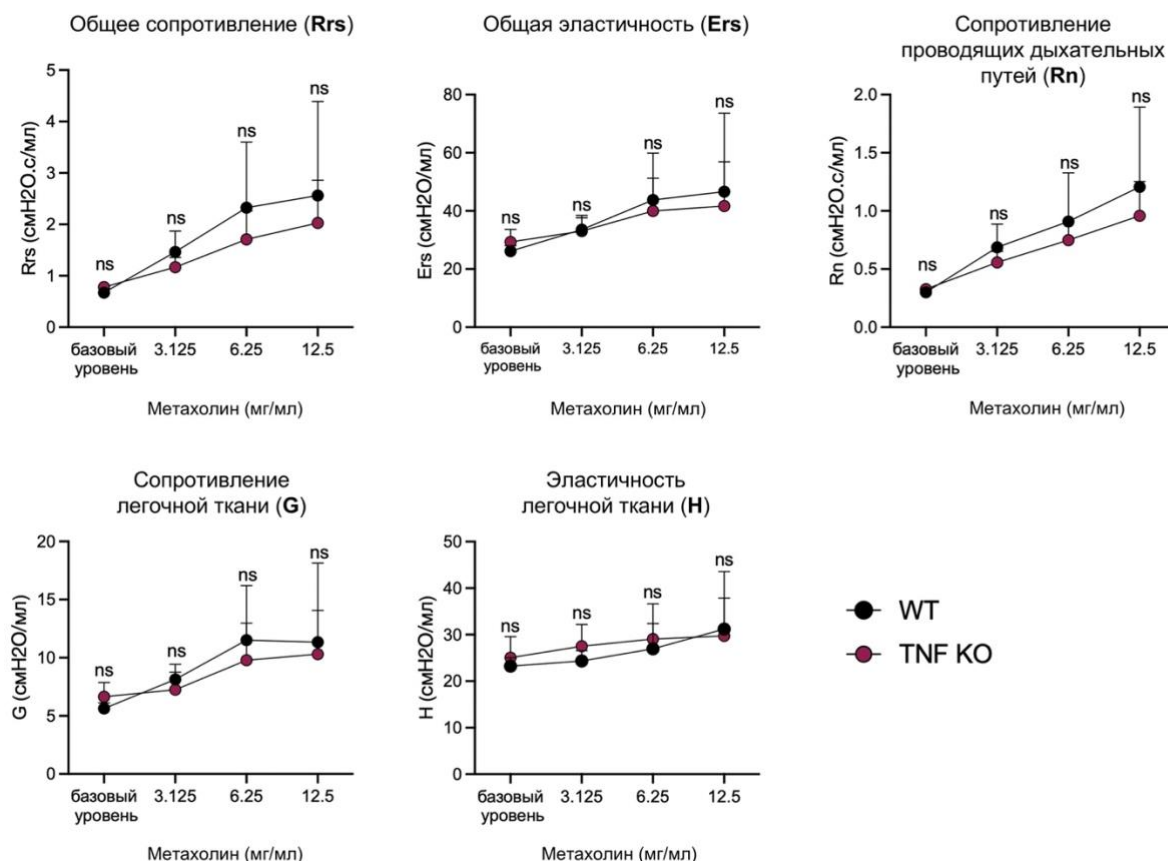
**Рисунок 18. У мышей с дефицитом IL-6 изменяются параметры дыхания при LPS-индуцированном фиброзе. (А) Схема эксперимента LPS-индуцированного воспаления легких. Мышей дикого типа и с делецией IL-6 подвергали ингаляционному воздействию 5 мл LPS в концентрации 2 мг/мл до полного распыления раствора. Через 7 недель после последнего введения LPS проводили анализ. (Б) Измерение параметров механики дыхания с помощью прибора FlexiVent SCIREQ в провокационном тесте с метахолином. На анестезированном животном проводили трахеостомию между первыми двумя ближайшими к гортани кольцами хряща, после чего вставляли предварительно откалиброванную канюлю и продвигали ее внутрь трахеи на длину примерно пяти колец. Далее животное подключали к прибору и проводили технику вынужденных колебаний: 1) для измерения общего сопротивления ( $Rrs$ ), общей эластичности ( $Ers$ ) дыхательной системы использовали одночастотные колебания (SNAPSHOT);**

2) сопротивления крупных проводящих дыхательных путей ( $R_n$ ) и ткани ( $G$ ), а также эластичности легочной ткани ( $H$ ) оценивали с помощью многочастотных колебаний (QUICK PRIME). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=9-11$  и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 2-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

**А**



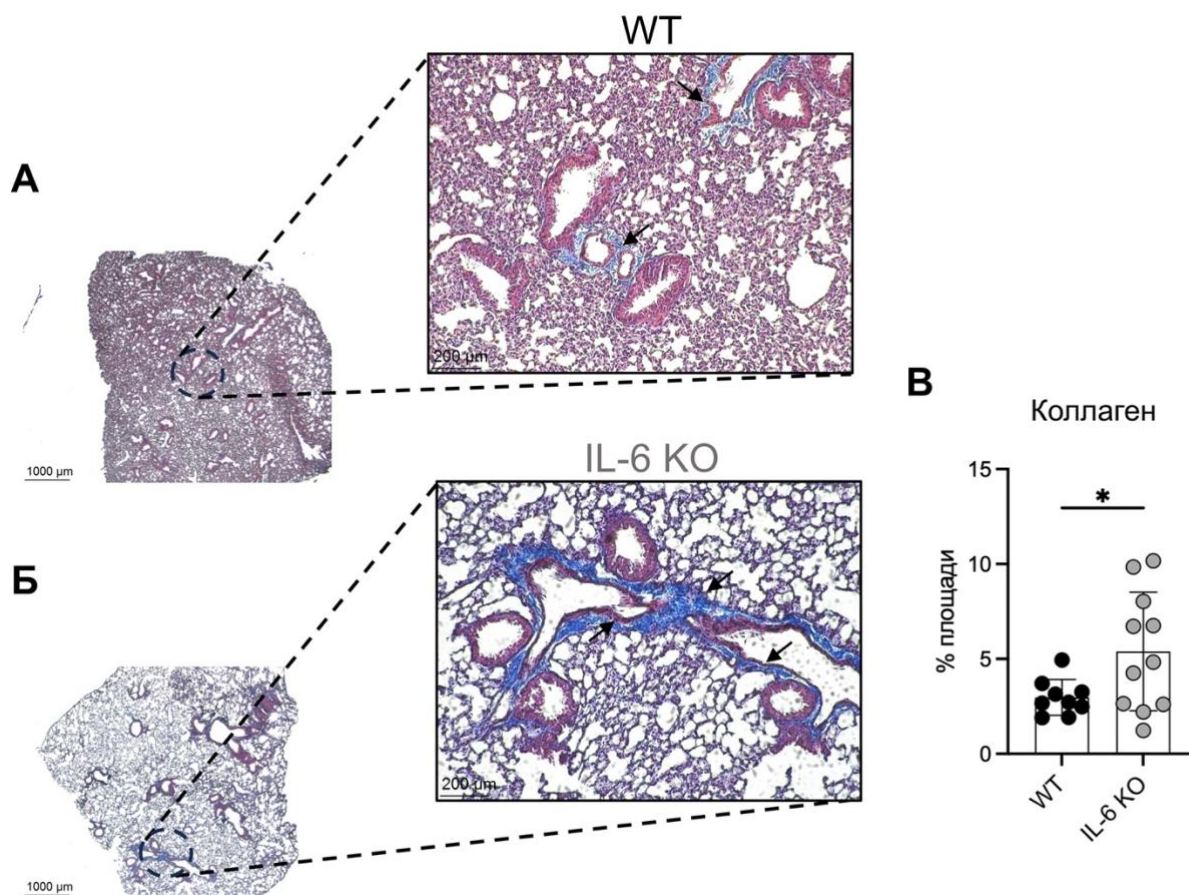
**Б**



**Рисунок 19. Генетическая инактивация *Tnf* у мышей на фоне LPS-индуцированного фиброза не влияет на функциональность легких. (А) Схема эксперимента LPS-индуцированного воспаления легких. Мышей дикого типа и с делецией TNF подвергали ингаляционному воздействию 5 мл LPS в концентрации 2 мг/мл до полного распыления раствора. Через 7 недель после последнего введения LPS проводили анализ. (Б) Измерение параметров механики дыхания с помощью прибора FlexiVent SCIREQ в провокационном тесте с метахолином. На анестезированном животном проводили трахеостомию между первыми двумя ближайшими к гортани кольцами хряща, после чего вставляли предварительно откалиброванную**

канюлю и продвигали ее внутрь трахеи на длину примерно пяти колец. Далее животное подключали к прибору и проводили технику вынужденных колебаний: 1) для измерения общего сопротивления ( $Rrs$ ), общей эластичности ( $Ers$ ) дыхательной системы использовали одночастотные колебания (SNAPSHOT); 2) сопротивления крупных проводящих дыхательных путей ( $Rn$ ) и ткани ( $G$ ), а также эластичности легочной ткани ( $H$ ) оценивали с помощью многочастотных колебаний (QUICK PRIME). Результаты представлены как среднее значение  $\pm SD$  с количеством мышей на группу  $n=9-11$  и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 2-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

Напротив, у TNF KO мышей не наблюдалось статистически значимых отличий ни в сопротивлении ( $Rrs$  и  $Rn$ ) и эластичности ( $Ers$ ) дыхательных путей, ни в сопротивлении ( $G$ ) или эластичности ( $H$ ) легочной ткани (Рисунок 19А, Б). Учитывая отсутствие различий в функционировании легких между мышами дикого типа и мышами с дефицитом TNF, можно сделать вывод, что в модели LPS-индуцированного фиброза TNF важен во время острой фазы воспаления, но не в фибропролиферативной фазе, что коррелирует с отсутствием повышенной локальной продукции TNF в БАЛ спустя 5 недель после индукции фиброза, когда высокий уровень IL-6 сохраняется (Рисунок 15). Интересно, что у мышей с полным удалением IL-6, несмотря на сниженное сопротивление дыхательной системы ( $Rrs$  и  $Rn$ ) и легочной ткани ( $G$ ), также наблюдалось снижение эластичности (Рисунок 18Б). Наряду с этим, окрашивание образцов легочной ткани по Массону выявило значительное отложение коллагена у мышей с полным удалением IL-6 по сравнению с мышами дикого типа спустя 7 недель после аэрозольного введения LPS (Рисунок 20), что коррелировало со снижением общей эластичности дыхательных путей ( $Ers$ ) и самой легочной ткани ( $H$ ) (Рисунок 18Б). Учитывая отсутствие различий в функции легких между наивными мышами дикого типа и мышами с нокаутом гена IL-6 (Рисунок 21А, Б), можно сделать вывод, что IL-6 оказывает свое патогенное действие именно при хронических воспалительных процессах в легких. Таким образом, инактивация IL-6 на фоне LPS-индуцированного фиброза легких способствовала улучшению функционального состояния дыхательной системы, проявляющегося в снижении сопротивления дыхательных путей и ткани, однако ассоциировалось с выраженным накоплением коллагена, что приводило к потере эластичности.



**Рисунок 20.** На фоне LPS-индуцированного фиброза у мышей с дефицитом IL-6 накапливается коллаген. Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания методом Массона срезов легких мышей дикого типа (А) и мышей с полным удалением IL-6 (Б) через 7 недель после воздействия LPS. Стрелки, указывающие на области интенсивного синего окрашивания, демонстрируют наличие коллагена в легочной ткани. Размер масштабной линейки – 200 и 1000 мкм. (В) Процентная площадь коллагеновых структур в легких, оцененная на гистологических срезах. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=9-11$  и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью теста t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

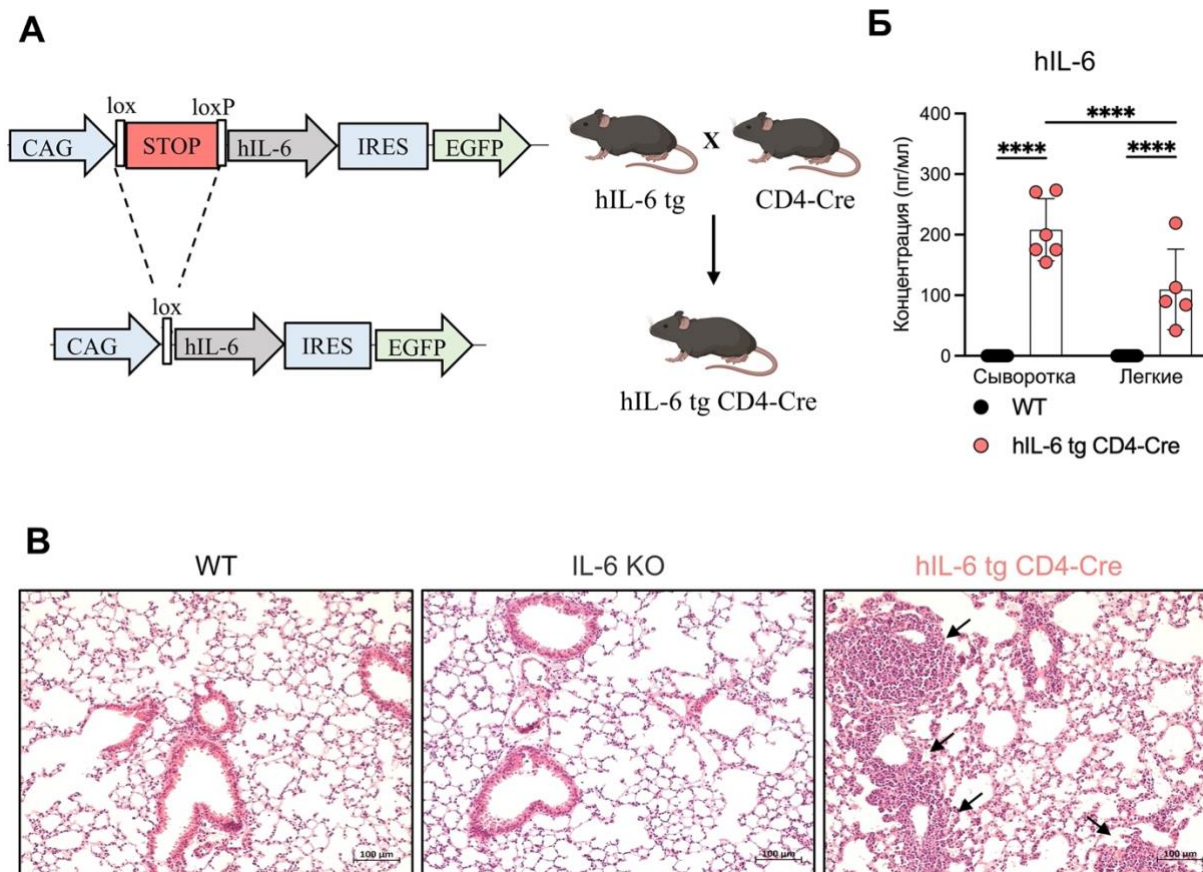


Статистический анализ был проведен с помощью 2-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

### **3.5. Повышенная экспрессия IL-6 вызывает системное и локальное воспаление и способствует патологическому ремоделированию легочной ткани**

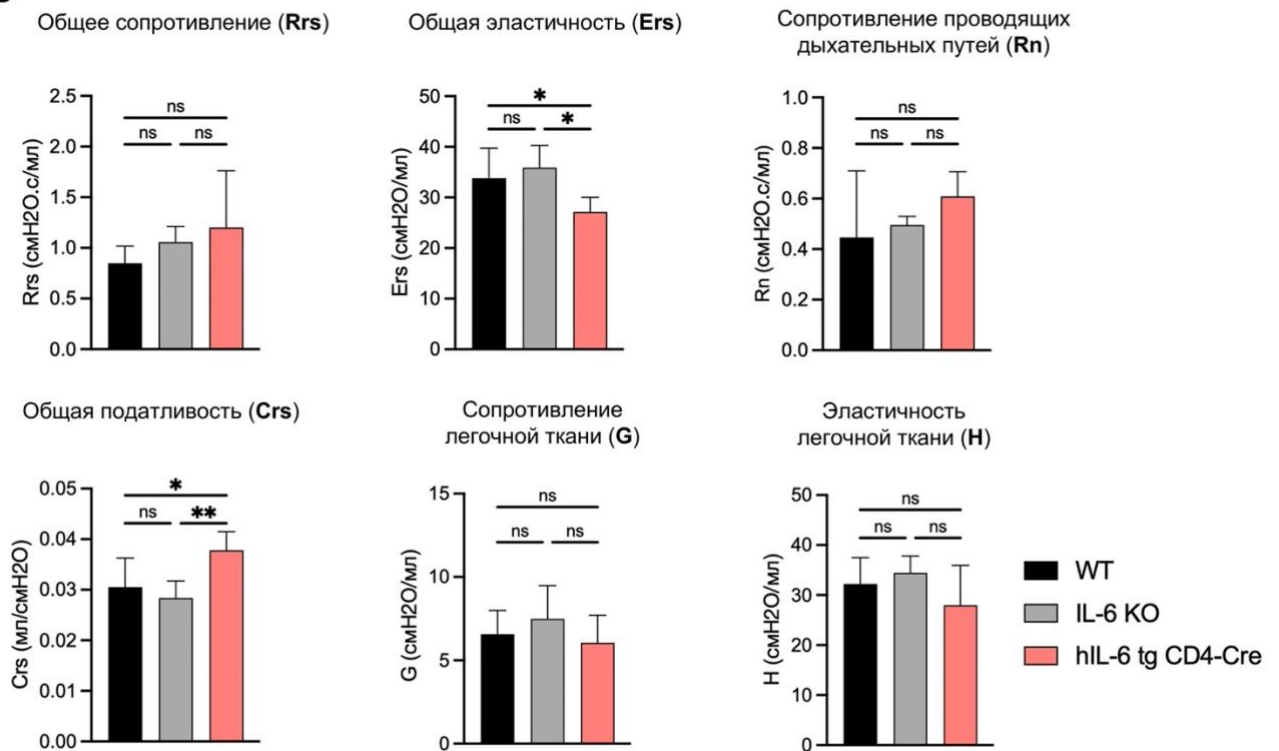
Повышенная продукция IL-6 при сепсисе, а также во время цитокинового шторма, связанного с COVID-19, сопровождается патологическими последствиями, что подтверждено в мышинных моделях сверхэкспрессии IL-6 [232, 233]. При этом воздействие сверхэкспрессии IL-6 на легочную ткань не исследовалось. Ранее в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ РАН была получена линия трансгенных мышей со сверхэкспрессией IL-6 человека (hIL-6) в лизоцимположительных миелоидных клетках (hIL6 tg LysM-Cre), характеризующихся сниженной жизнеспособностью (до 4 недель) в связи со значительным системным воспалением [234, 235]. Из-за ограниченной жизнеспособности hIL6 tg LysM-Cre мышей и их неспособности достичь репродуктивного возраста для изучения патологий легких, опосредованных IL-6, в настоящей работе была использована мышинная модель со сверхэкспрессией hIL-6 в CD4<sup>+</sup> клетках (hIL-6 tg CD4-Cre), характеризующаяся более низкой системной продукцией hIL-6 и нормальной жизнеспособностью (Рисунок 22А). Для получения уникальной линии мышей со сверхэкспрессией hIL-6 в CD4<sup>+</sup> клетках проводили скрещивание двух линий: трансгенной линии (hIL-6 tg) с мышами, несущими Cre-рекомбиназу под контролем CD4-промотора (CD4-Cre). В результате скрещивания часть потомства обладала генотипом hIL-6 tg CD4-Cre, обеспечивавшим тканеспецифичную экспрессию IL-6 человека в Т-лимфоцитах. В отличие от других линий с тканеспецифичной экспрессией hIL-6 [234], преимуществом hIL-6 tg CD4-Cre мышей была рождаемость с ожидаемым расщеплением по генотипу, что указывает на отсутствие эмбриональной летальности.

Ключевой особенностью полученной линии мышей hIL-6 tg CD4-Cre является развитие системного воспаления у hIL-6 tg CD4-Cre мышей на фоне хронически повышенной продукции hIL-6 Т-лимфоцитами в сыворотке крови (Рисунок 22Б). Помимо этого, у трансгенных мышей наблюдалась и локальная продукция hIL-6 в легких (Рисунок 22Б). Гистологический анализ образцов легких показал, что у hIL-6 tg CD4-Cre мышей по сравнению с мышами дикого типа и с полным удалением IL-6 в наивном состоянии развивались структурные изменения легочной ткани, с инфильтрацией воспалительных клеток вблизи крупных дыхательных путей (Рисунок 22Б).



**Рисунок 22.** У hIL-6 tg CD4-Cre мышей развивается выраженное воспаление легких. (А) Для получения мышей, экспрессирующих IL-6 человека (hIL-6) в CD4<sup>+</sup> клетках, было проведено скрещивание между мышами трансгенной линии и мышами вспомогательной линии, несущими ген рекомбиназы Cre в локусе гена *Cd4* (CD4-Cre). (Б) Продукция hIL-6 (пг/мл) в сыворотке и в гомогенате легких hIL-6 tg CD4-Cre и мышей дикого типа. (В) Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания гематоксилин-эозином срезов легких мышей дикого типа, hIL-6 tg CD4-Cre и мышей с дефицитом IL-6. Стрелки указывают на области инфильтрации воспалительных клеток вблизи крупных дыхательных путей, напоминающих индуцируемую бронхоассOCIированную лимфоидную ткань (БАЛТ). Размер масштабной линейки – 100 мкл. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу n=5-6 и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью теста t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Предположительно, формирование таких многоклеточных структур в легких может соответствовать индуцируемой бронхоассOCIированной лимфоидной ткани (БАЛТ) [236]. Полученные данные свидетельствуют о том, что продукция hIL-6 вызывает системное воспаление, приводящее к ремоделированию легочной ткани. Для оценки влияния выявленных структурных изменений и высокой локальной продукции hIL-6 на функцию легких были проанализированы механические параметры дыхания. Мыши с повышенной системной и локальной экспрессией hIL-6 развили гипоплазию трахеи, и не были пригодны для функциональной оценки легких с использованием провокационного теста с метахолином, поэтому оценка параметров дыхания была проведена на базовом уровне (Рисунок 23А).

**A****Б**

**Рисунок 23. Избыточная продукция hIL-6 приводит к нарушению функциональных параметров дыхательной системы.** (А) Схема эксперимента по исследованию механики дыхания с помощью прибора FlexiVent SCIREQ у мышей дикого типа, с полным удалением IL-6 и мышей со сверхэкспрессией hIL-6. (Б) Измерение параметров механики дыхания с помощью прибора FlexiVent SCIREQ в исходных условиях. На анестезированном животном проводили трахеостомию между первыми двумя ближайшими к гортани кольцами хряща, после чего вставляли предварительно откалиброванную канюлю и продвигали ее внутрь трахеи на длину примерно пяти колец. Далее животное подключали к прибору и проводили технику вынужденных колебаний: 1) для измерения общего сопротивления (Rrs), общей эластичности (Ers) дыхательной системы и общей податливости (Crs) использовали одночастотные колебания (SNAPSHOT); 2) сопротивления крупных проводящих дыхательных путей (Rn) и ткани (G), а также эластичности легочной ткани (H) оценивали с помощью многочастотных колебаний (QUICK PRIME). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$ SD с количеством мышей на группу  $n=8-9$  и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns, non-significant (недостоверная разница).

Так, у мышей с дефицитом IL-6 в наивном состоянии функциональность легких не отличалась от таковой у дикого типа (Рисунок 23Б). В то же время, мыши с повышенной продукцией hIL-6 демонстрировали значительное снижение общей эластичности (Ers) дыхательных путей (Рисунок 23Б). При этом существенных изменений в параметрах сопротивления дыхательных путей (Rrs и Rn), и также сопротивлению (G) или эластичности (H) легочной ткани не наблюдали у мышей линии hIL-6 tg CD4-Cre. Интересно, что у hIL-6 tg CD4-Cre заметно повышалась податливость дыхательной системы (Crs) по сравнению с мышами дикого типа (Рисунок 23Б), что может объясняться потерей эластических волокон в стенках альвеол. Так, снижение эластичности непосредственно приводит к потере способности ткани возвращаться в исходное состояние после растяжения. Вследствие этого легкие становятся более растяжимыми, легко расширяясь при вдохе, но плохо сокращаясь при выдохе, что затрудняет выведение воздуха из легких и вызывая его задержку в альвеолах. Таким образом, повышенная продукция hIL-6 приводит к системному воспалению и ремоделированию легочной ткани, что проявляется в образовании скоплений лимфоидных клеток, структурных изменениях и, как следствие, в значительном снижении общей эластичности дыхательной системы, увеличении её растяжимости и затруднении выдоха, что согласуется с концепцией обструктивного характера дыхательной недостаточности. Отсутствие различий в функциях легких между мышами дикого типа и мышами с нокаутом гена IL-6 в наивном состоянии указывает на патогенетическое действие IL-6 только в контексте воспалительных заболеваний легких. Результаты, полученные на моделях с избыточной продукцией IL-6 и LPS-индуцированного фиброза легких, определяют IL-6, как ключевой фактор необратимого ремоделирования легких и прогрессирующего нарушения функционального состояния дыхательной системы, представляя IL-6 центральным звеном.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Понимание иммунных процессов, вовлеченных в патогенез астмы, и роли перекрестного взаимодействия цитокинов важно при разработке новых терапевтических стратегий, нацеленных на ключевые медиаторы заболевания. Гетерогенность бронхиальной астмы существенно затрудняет выявление первопричины воспалительного процесса в каждом конкретном случае и подбор эффективного метода лечения. Тяжелая нейтрофильная или смешанная форма астмы, характеризующаяся частыми обострениями, снижением функций легких и резистентностью к кортикостероидам, плохо поддается стандартным методам лечения. Антицитокиновая терапия, направленная на ключевые молекулы-индукторы воспаления, высокоэффективна в некоторых случаях тяжелой астмы. В частности, для лечения тяжелой эозинофильной астмы одобрены два антитела к IL-5, меполизумаб и реслизумаб, а также антитело к рецептору IL-5 [177-179]. Кроме того, тезепелумаб, блокирующий TSLP, алармин и фактор ремоделирования дыхательных путей, значительно уменьшал частоту обострений и улучшал функцию легких пациентов с неконтролируемой астмой [237]. Тем не менее, применение вышеперечисленных препаратов эффективно при лечении пациентов с преобладанием Th2-опосредованного эозинофильного воспаления, но не влияет на нейтрофильный инфильтрат. Это обстоятельство подчеркивает актуальность поиска новых терапевтических мишеней для контроля тяжелой нейтрофильной астмы.

Сывороточный TNF является биомаркером тяжелой астмы [123]. Было показано, что при тяжелой нейтрофильной астме наблюдается повышенная продукция как TNF, так и его рецепторов в мокроте, что говорит о нарушении регуляции TNF-опосредованной передачи сигнала при плохо контролируемой астме [124]. Поэтому, препараты, блокирующие TNF, рассматриваются в качестве антицитокиновой терапии астмы (Таблица 1) [131]. Например, этанерцепт и инфликсимаб значительно улучшали функцию легких у пациентов с астмой, резистентной к кортикостероидам [193]. В нескольких исследованиях введение ингибиторов TNF также продемонстрировало обнадеживающие результаты в экспериментальных моделях астмы [78]. Тем не менее, необходимо отметить, что продолжительная анти-TNF терапия ассоциируется с повышенным риском реактивации хронических инфекций и развитием новообразований. Так, системная анти-TNF терапия может влиять на целостность гранулем, ограничивающих распространение *Mycobacterium tuberculosis* в легких [189]. В частности, применение голимумаба, человеческого моноклонального антитела против TNF, не только не продемонстрировало терапевтического эффекта при неконтролируемой астме, но и вызывало серьезные побочные эффекты, в том числе провоцировало угрожающие жизни инфекции [238]. В настоящей работе было показано, что нейтрализация TNF у мышей с HDM-индуцированной астмой подавляет Th2-опосредованную эозинофилию (Рисунок 6B, 8A), в то время как

накопление Th1- и Th17-клеток с последующей инфильтрацией нейтрофилов достоверно не снижалось (Рисунок 6Г, 7В, 11Б). Следовательно, нейтрализации одного лишь TNF может быть недостаточной для полного контроля над прогрессированием астмы. Поскольку в патогенезе заболевания зачастую участвует несколько цитокинов с частично перекрывающимися функциями, нашей задачей стал поиск других мишеней, ингибирование которых могло бы способствовать подавлению нейтрофильного воспаления в легких.

IL-6 известен своей способностью индуцировать и поддерживать хроническое воспаление в дыхательных путях [239]. IL-6 является важным регулятором адаптивного иммунного ответа, определяя направление дифференцировки эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Так, активируя дифференцировку Th2-клеток, IL-6 может подавлять экспансию Th1-клеток. С другой стороны, IL-6 подавляет развитие Т-клеток в сторону регуляторных Т-клеток и инициирует дифференцировку Th17-клеток [240-242]. Кроме того, важно учитывать, что эффекты IL-6 могут существенно различаться в зависимости от клеточного источника. В экспериментальной модели HDM-индуцированной астмы у мышей с дефицитом IL-6 в макрофагах наблюдалось снижение Th2-ассоциированного эозинофильного воспаления, в то время как дефицит IL-6 из дендритных клеток подавлял Th17-опосредованную инфильтрацию нейтрофилов в легкие [156]. Наконец, установлена роль IL-6 в структурных изменениях легких [243]. В недавнем исследовании оценивали ответ на гуманизированное моноклональное антитело к IL-6R, тоцилизумаб, у пациентов с тяжелой персистирующей астмой [202]. Введение тоцилизумаба приводило к уменьшению воспаления, вызванного Th2- и Th17-клеточными ответами, но не оказывало никакого эффекта на периферическую эозинофилию. Вместе с тем, параллельное клиническое исследование не подтвердило способность тоцилизумаба предотвращать бронхоконстрикцию [201]. Таким образом, многообразие и клеточно-специфичность эффектов IL-6, а также ограниченная клиническая эффективность его изолированной блокировки при астме, указывают на целесообразность рассматривать IL-6 как компонент более широкой цитокиновой сети и обосновывают переход к стратегии комбинированного таргетирования медиаторов воспаления.

Концепция комбинированной антицитокиновой терапии, позволяющей одновременно таргетировать несколько цитокинов, остается привлекательной стратегией для преодоления функциональной избыточности воспалительных цитокинов. В частности, блокировка общего рецепторного комплекса IL-4 и IL-13 с помощью человеческого биспецифичного моноклонального антитела, дупилумаба, продемонстрировала терапевтический эффект при лечении пациентов с тяжелой эозинофильной астмой [185]. В условиях воспаления IL-6 и TNF могут проявлять функциональную избыточность и параллельно инициировать различные, частично не совпадающие по механизмам, воспалительные реакции, вовлеченные в патогенез астмы. Поэтому была выдвинута гипотеза, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 будет

более эффективной и позволит снизить риск возникновения нежелательных эффектов, наблюдаемых при монотерапии. Установлено, что комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 значительно снижает инфильтрацию гранулоцитов в дыхательные пути (Рисунок 6В, Г). Примечательно, что у мышей после введения антител к IL-6 наблюдалось снижение содержания нейтрофилов, но не эозинофилов, тогда как ингибирование TNF эксклюзивно подавляло накопление эозинофилов в БАЛ (Рисунок 6В, Г). Эти данные указывают на комплементарные эффекты ингибирования TNF и IL-6 и обосновывают целесообразность их одновременной блокировки [244] для более полного контроля воспаления при астме. Далее мы сосредоточились на роли альвеолярных макрофагов как ключевой тканерезидентной популяции легких, потенциально вовлечённой в регуляцию воспалительного ответа в легких и гранулоцитарной инфильтрации.

Альвеолярные макрофаги известны как основная тканерезидентная популяция иммунных клеток в здоровых легких, участвующая в регуляции сурфактанта, поддержании целостности эпителия и выступающая как первая линия защиты от вдыхаемых патогенов [217]. При этом, онтогенез альвеолярных макрофагов и микроокружение в легких в значительной степени определяют их свойства и функции, что принципиально отличает их от макрофагов моноцитарного происхождения [245]. При заживлении повреждений, вызванных острым или хроническим воспалением, остаточные резидентные альвеолярные макрофаги могут самообновляться за счет пролиферации, либо восполняться за счет дифференцировки макрофагов моноцитарного происхождения под влиянием микроокружения дыхательных путей [218, 219, 246]. Эта способность к восполнению популяции альвеолярных макрофагов является ключевой для поддержания гомеостаза легких. В ходе настоящей работы было установлено, что нейтрализация TNF наряду с комбинированной блокировкой TNF и IL-6 способствуют возобновлению и поддержанию альвеолярных макрофагов в отличие от блокировки только IL-6 (Рисунок 6Д). Таким образом, полученные данные указывают на регуляторную роль TNF в восстановлении и поддержании резидентных альвеолярных макрофагов при воспалении, что может иметь значение при разработке подходов к коррекции ремоделирования и нарушений гомеостаза легких.

До недавнего времени астму рассматривали исключительно как IgE-опосредованное заболевание адаптивной иммунной системы. Однако прогрессирование астмы происходит при взаимодействии адаптивного и врожденного звена иммунного ответа [247]. При этом доминирующая субпопуляция Th-клеток, дифференцированная из наивных T-клеток, индуцирует реакции врожденного иммунитета, в том числе активацию тучных клеток и инфильтрацию гранулоцитов. Долгое время астма рассматривалась как Th2-опосредованное воспалительное заболевание, для которого характерны продукция IL-4, IL-5, IL-13 и

эозинофилия дыхательных путей. Однако впоследствии было установлено, что нарушение соотношения других субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-клеток также связано с патогенезом астмы [247], более того, преобладающий тип Т-клеточного ответа предопределяет тяжесть заболевания. Так, астма средней тяжести характеризуется активацией Th2-клеток, в то время как тяжелая астма обычно зависит от Th1- или Th17-опосредованного ответа с инфильтрацией нейтрофилов [248]. В связи с этим таргетирование ключевых цитокинов, определяющих полярность Т-клеточного ответа, является перспективной стратегией в терапии астмы.

Известно, что TNF индуцирует не только Th1-клеточный ответ, но также опосредует эпигенетическое перепрограммирование макрофагов, что обеспечивает их обучение Th2-опосредованному ответу после повторного воздействия аллергена [249]. С другой стороны, IL-6 управляет дифференцировкой Th17-клеток и может усиливать нейтрофильное воспаление в дыхательных путях [222, 250]. В настоящей работе было показано, что комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 предотвращает накопление как Th2-клеток, так и Th1- и Th17-клеток в легких (Рисунок 7В, 8А, 11Б). Введение блокатора IL-6 на фоне индукции HDM-индуцированной астмы повышало продукцию IL-4, IL-5 и IL-13 в БАЛ (Рисунок 9А). Эти цитокины являются регуляторами Th2-ассоциированной эозинофилии, следовательно, блокировка IL-6 приводит к усилению иммунного ответа 2 типа при астме. Примечательно, что эффект нейтрализации IL-6 на Th2-ассоциированные цитокины в сыворотке отсутствовал (Рисунок 9Б), что позволяет предположить, что действие системной блокировки IL-6 ограничивается сайтом воспаления. Несмотря на то, что введение антител к IL-6 не влияет на изменение Th2-опосредованного ответа (Рисунок 8А), оно приводит к значительному снижению Th1- и Th17-клеток в легких (Рисунок 7В, 11Б). С другой стороны, ингибирование TNF не приводило к снижению ни количества Th1- и Th17-клеток, ни к снижению экспрессии *Il17a* в легких (Рисунок 7В, 11Б, Г). Эти результаты согласуются с литературными данными пациентов с астмой и подтверждают, что системная анти-TNF терапия может усиливать продукцию IL-17А и накопление патогенетических Th17-клеток [251]. В совокупности, полученные результаты указывают на то, что IL-6 является критическим регулятором Th17-компонента воспаления, усиливающегося на фоне анти-TNF терапии, следовательно, одновременная блокада TNF и IL-6 представляется принципиально важной для предотвращения IL-17А/Th17-опосредованного нейтрофильного воспаления и достижения более полного контроля патологического процесса.

Патогенез бронхиальной астмы сопровождается повреждением и деструкцией легочной ткани. Ремоделирование дыхательных путей является характерной чертой заболевания и определяется координированным взаимодействием различных клеточных популяций, приводящим к нарушению целостности эпителиального барьера, избыточному отложению компонентов внеклеточного матрикса, пролиферации гладкомышечных клеток, активации

фибробластов и гиперплазии бокаловидных клеток. В совокупности, эти изменения лежат в основе клинических проявлений астмы и ассоциированы с прогрессирующим снижением функции легких. Для оценки функционального значения комбинированной блокировки цитокинов в процессах ремоделирования дыхательных путей был использован протокол индукции астмы, основанный на внутритрахеальном введении высоких доз HDM, что обеспечивала более выраженный воспалительный ответ и приобретение признаков ремоделирования легочной ткани (Рисунок 12А). Гистологический анализ показал, что у мышей на фоне одновременной блокировки TNF и IL-6 наблюдается снижение инфильтрации иммунных клеток в легочную ткань, а также уменьшение гиперплазии бокаловидных клеток (Рисунок 12Б, В). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 не только ограничивает воспаление, но и способствует ослаблению ключевых морфологически детектируемых проявлений ремоделирования дыхательных путей при HDM-индуцированной астме.

Основными медиаторами ремоделирования дыхательных путей являются TGF- $\beta$ , IL-17, IL-13 и VEGF [252]. TGF- $\beta$  участвует в инициации и регуляции фиброза при астме, а уровень его экспрессии коррелирует с тяжестью заболевания [253]. Помимо своего участия в повреждении эпителиального барьера, TGF- $\beta$  способен стимулировать экспрессию IL-6, что усиливает пролиферацию гладкомышечных клеток и продукцию муцинов бокаловидными клетками [152, 254]. Важно отметить, что при легочном фиброзе у человека и животных наблюдается повышенная экспрессия TGF- $\beta$ , поскольку этот цитокин способен индуцировать активацию и дифференцировку фибробластов (в том числе в миофибробласты), тем самым способствуя развитию фибротических изменений [230]. При этом процессе именно TNF и IL-6 индуцируют экспрессию TGF- $\beta$  [226]. В настоящей работе было показано, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращала увеличение экспрессии *Tgfb1*, чего не наблюдалось при нейтрализации TNF и IL-6 по отдельности (Рисунок 12Г). Важно также отметить, что при лечении кортикостероидами экспрессия TGF- $\beta$  не снижалась [255]. Таким образом, мы предполагаем, что комбинированная анти-IL-6/анти-TNF терапия может выступать в качестве нового подхода в предотвращении TGF- $\beta$ -индуцированного ремоделирования дыхательных путей.

Традиционная антицитокиновая терапия имеет недостатки, включая системные побочные эффекты, варьирующиеся от препарата к препарату и зависящие от дозы вводимого лекарственного средства. В силу избыточности и перекрытия функций цитокинов, введение препарата против одного цитокина в высоких дозах в течение длительного времени ассоциировано с высоким риском осложнений. Как показано в настоящей работе, комбинированная антицитокиновая терапия может представлять более эффективный

комплексный метод лечения тяжелой астмы по сравнению с монотерапией, позволяющий в перспективе снизить дозу системных блокаторов, при одновременном уменьшении частоты обострений. Кроме того, перспективным направлением представляется антицитокиновая терапия, предполагающая избирательную нейтрализацию цитокина, продуцируемого конкретным типом клеток, что потенциально позволит снизить риск побочных эффектов [256]. В настоящей работе показано, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 оказывает выраженный положительный эффект, снижая как Th2-опосредованную эозинофилию, так и Th17/Th1-опосредованное нейтрофильное воспаление в легких при HDM-индуцированной астме.

Известно, что фибротические изменения в легких, характеризующиеся пролиферацией фибробластов, избыточным накоплением компонентов внеклеточного матрикса наряду с локальным воспалительным повреждением ткани [95, 257], могут формироваться как терминальная стадия патологического процесса при широком спектре респираторных заболеваниях, включая бронхиальную астму. Существенным ограничением большинства современных экспериментальных мышиных моделей астмы является их острый, ограниченный по длительности характер, который не воспроизводит ключевые особенности хронического течения заболевания у человека [228]. В связи с этим подбор адекватной мышиной модели для изучения механизмов перехода от острой фазы воспаления к фиброзу легких остается актуальной задачей.

В настоящее время одной из наиболее распространенных моделей экспериментально индуцированного фиброза легких является введение противоопухолевого препарата блеомицина [258, 259], вызывающего выраженный фибротический ответ, наблюдаемый у пациентов с фиброзирующими заболеваниями легких [260]. Однако несмотря на ряд преимуществ, блеомициновая модель имеет существенные ограничения. Так, для индукции фиброза используют внутритрахеальное введение препарата, что ограничивает физиологичность модели. Кроме того, через 3-4 недели после введения блеомицина фиброз спонтанно разрешается, то есть имеет обратимый характер течения заболевания [261, 262]. Следовательно, поиск более релевантной мышиной модели, воспроизводящей устойчивые и типичные признаки фиброза легких, остается актуальной задачей.

В рамках настоящей работы для определения вклада IL-6 и TNF в формирование фиброза была использована модель LPS-индуцированного воспаления легких при ингаляционном введении [229]. Во-первых, данная модель более точно имитирует естественный путь аэрозольного поступления агента в легкие с равномерным осаждением частиц LPS на поверхности дыхательных путей. Во-вторых, она позволяет оценивать как кратковременные изменения, характерные для острой фазы воспаления (Рисунок 14, 15), так и отсроченные последствия, ассоциированные с хроническим воспалением и фиброзом (Рисунок 15, 16). Так,

через 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS наблюдаются типичные признаки фиброза, включая повышенную локальную продукцию IL-6 и IL-10 (Рисунок 15), а также индукцию экспрессии генов, ассоциированных с фиброзом (Рисунок 16А, Б), и отложение коллагена в ткани легких (Рисунок 16В).

По нашим данным комбинирования блокировка TNF и IL-6 приводила к снижению экспрессии *Tgfb1*, ключевого регулятора активации и дифференцировки фибробластов [230] в модели тяжелой HDM-индуцированной бронхиальной астмы. В связи с этим следующей задачей стала оценка вклада TNF и IL-6 в патогенез легочного фиброза. В качестве экспериментальной платформы была использована валидированная в рамках диссертационного исследования модель фиброза легких, основанная на однократном ингаляционном введении LPS (Рисунок 18А, 19А). Выявленное на 7-й неделе после введения LPS снижение системного воспаления (Рисунок 17) у мышей с полным удалением как TNF, так и IL-6, указывает на определяющую роль этих цитокинов не только в острой фазе воспаления, но и в поддержании персистирующего системного воспалительного ответа. Параллельно, при анализе функционального состояния дыхательной системы на фоне LPS-индуцированного фиброза у мышей с делецией TNF не было выявлено достоверных изменений ни по одному из анализируемых параметров механики дыхания, включая сопротивление и эластичность (Рисунок 19Б). Полученный результат согласуется с отсутствием продукции TNF в БАЛ спустя 5 недель после индукции фиброза, тогда как высокий уровень IL-6 сохраняется (Рисунок 15). Несмотря на имеющиеся данные о роли TNF в активации трансдифференцировки фибробластов [130] и развитии гиперреактивности дыхательных путей за счет прямого воздействия на гладкомышечные клетки [131], в нашей модели TNF, по-видимому, преимущественно выступает медиатором острой фазы воспаления, влияя главным образом на клеточную инфильтрацию и повреждение ткани, тогда как вклад IL-6 может быть более важен на фибропролиферативной стадии. Действительно, у мышей с полной делецией IL-6 было зарегистрировано снижение сопротивления дыхательных путей и легочной ткани в ответ на провокационную пробу метахолином по сравнению с мышами дикого типа (Рисунок 18Б). Примечательно, что наряду со снижением сопротивления полное удаление IL-6 сопровождалось снижением эластичности дыхательной системы (Рисунок 18Б) и усиленным накоплением коллагена (Рисунок 20Б, В). Наблюдаемая разнонаправленность показателей механики дыхания может отражать комплексное и тканеспецифичное влияние IL-6 на воспалительные каскады, репаративные процессы и функциональные характеристики дыхательной системы. Так, с одной стороны, у мышей с делецией IL-6 с блеомицин-индуцированным фиброзом легочные фибротические изменения наряду с локальным воспалением были существенно ниже по сравнению с мышами дикого типа [263, 264], что указывает на роль IL-6 в переходе от острого воспаления к патологическому ремоделированию ткани, и

поддерживает представление о нем как о ключевом медиаторе патогенеза фиброза легких. С другой стороны, согласно ранее полученным данным, в модели острого респираторного дистресс-синдрома у мышей с инактивацией *Il6* наряду с увеличением сопротивления дыхательных путей наблюдалось снижение эластичности легочной ткани [265], что указывает на защитную роль IL-6 в поддержании структурно-функциональной целостности легочной ткани. Вероятно, в контексте LPS-индуцированного фиброза, снижение сопротивления и накопление коллагена не являются взаимоисключающими процессами, поскольку могут отражать поражение различных анатомических компартментов дыхательной системы. Дефицит IL-6, с одной стороны, ограничивает воспаление и отек легочной ткани (Рисунок 20Б), способствуя сохранению просвета и снижению сопротивления дыхательных путей (Рисунок 18Б). С другой стороны, коллаген может накапливаться в интерстиции легких (Рисунок 18Б, В), что в меньшей степени влияет на сопротивление, но существенно меняет эластические свойства ткани. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о комплексной роли IL-6 не только как провоспалительного медиатора, но и как фактора, участвующего в регуляции ремоделирования легочной ткани и синтеза внеклеточного матрикса. При этом следует учитывать, что эффекты IL-6 носят контекст-зависимый характер и определяются тканевым микроокружением, фазой повреждения и особенностями передачи сигнала [264].

В ряде работ были рассмотрены последствия острой избыточной продукции IL-6 [232, 233], однако влияние хронической повышенной экспрессии IL-6 на респираторную систему оставалось неизученным. В представленном исследовании были изучены мыши с повышенной продукцией hIL-6 в CD4<sup>+</sup> клетках. Было установлено, что у мышей с хронически повышенной продукцией IL-6 наблюдается выраженное системное и локальное воспаление в легких (Рисунок 22Б), что вызывает ремоделирование легочной ткани (Рисунок 22В) и достоверное снижение функциональных показателей дыхательной системы (Рисунок 23Б). Полученные результаты согласуются с клиническими данными о длительных последствиях COVID-19 на легкие [233, 266] и подтверждают роль IL-6, как важного медиатора нарушения легочной функции. Кроме того, было показано, что хронически высокая продукция IL-6 у мышей усугубляет острое воспаление во время коронавирусной инфекции и вызывает необратимое ремоделирование легких, при этом эффективность применения олокизумаба в снижении смертности в экспериментальной модели SARS-CoV-2 подчеркивает необходимость ранней блокировки IL-6 для предотвращения необратимой иммунопатологии (Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Namakanova O.A., et al, неопубликованные данные). В настоящей работе отсутствие достоверных различий в параметрах механики легких между мышами с делецией IL-6 и мышами дикого типа в наивном состоянии (Рисунок 21Б) указывает на патогенное действие IL-6 только в контексте воспалительных заболеваний дыхательной системы. Результаты, полученные в моделях

избыточной продукции ИЛ-6 и LPS-индуцированного фиброза легких, позволяют заключить, что ИЛ-6 является ключевым медиатором необратимого ремоделирования легких и последующего прогрессирующего ухудшения функционального состояния дыхательной системы, выступая центральным звеном перехода от острого воспаления к персистирующим функциональным нарушениям легких.

В совокупности, представленные данные подчёркивают, что патогенез бронхиальной астмы и ассоциированных с ней структурно-функциональных нарушений определяется не отдельными медиаторами, а сетью перекрёстно регулируемых цитокиновых осей, обладающих функциональной избыточностью. Полученные результаты подтверждают ограниченность подходов, основанных на монотерапии, в том числе блокировку TNF и ИЛ-6 по отдельности, и демонстрируют, что одновременное ингибирование TNF и ИЛ-6 позволяет подавлять как Th2-ассоциированную эозинофилию, так и Th1/Th17-опосредованное нейтрофильное воспаление, а также ослаблять признаки ремоделирования дыхательных путей, включая снижение экспрессии *Tgfb1*. Кроме того, результаты, полученные в модели LPS-индуцированного фиброза и при хронической сверхэкспрессии ИЛ-6, указывают на ключевую роль ИЛ-6 в поддержании персистирующего воспалительного ответа и в формировании ремоделирования лёгочной ткани, сопровождающегося прогрессирующим ухудшением функции дыхательной системы. Таким образом, одновременное таргетирование TNF и ИЛ-6 и дальнейшая разработка комбинированных, в том числе тканеспецифичных, стратегий антицитокиновой терапии представляются перспективным направлением для достижения более полного контроля хронических заболеваний легких и предотвращения долгосрочных структурных осложнений.

## ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе настоящей работы результаты вносят вклад в фундаментальные представления об иммунопатологии легких, а также являются актуальными в контексте поиска новых подходов терапии хронических респираторных заболеваний. Основным итогом работы является экспериментальное обоснование перспективности комбинированной антицитокиновой терапии, направленной на одновременную блокировку TNF и IL-6. В рамках релевантной мышинной модели аллергической астмы, индуцированной HDM, впервые был продемонстрирован комплексный эффект комбинированной блокировки, а именно подавление как Th2-ассоциированного эозинофильного воспаления, так и Th1-/Th17-опосредованной нейтрофилии. Такой подход представляется особенно актуальным для терапии пациентов с тяжелыми, трудно контролируемыми формами астмы, у которых часто наблюдается смешанный тип воспаления, устойчивый к стандартным методам лечения. Кроме того, результаты настоящей работы позволили углубить существующее представление о роли TNF и IL-6 в поддержании воспаления и ремоделирования легких. Результаты, полученные с использованием модели LPS-индуцированного фиброза легких, свидетельствуют о ключевой роли TNF на острой, но не хронической фазе воспаления, тогда как вклад IL-6 оказался важен для поддержания хронического воспалительного ответа и инициации ремоделирования легочной ткани. Выявленная взаимосвязь между избыточной продукцией IL-6 и прогрессирующим ухудшением функции дыхательной системы доказывает, что IL-6 является не просто маркером воспаления, но и активным фактором ремоделирования.

По результатам работы были сделаны следующие **выводы**:

1. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 при HDM-индуцированной астме эффективно подавляет Th2- и Th1-/Th17-опосредованные ответы, в том числе, снижает инфильтрацию гранулоцитов в легкие. Введение блокатора IL-6 преимущественно подавляет Th17-клеточный ответ и снижает нейтрофильный инфильтрат в легких, в то время как нейтрализация TNF способствует экспансии Th17-клеток и подавляет эозинофильное воспаление.
2. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 обеспечивает более эффективное подавление ремоделирования дыхательных путей по сравнению с монотерапией блокаторами этих цитокинов.
3. Однократное ингаляционное введение LPS приводит к повышенной экспрессии IL-6 в БАЛ и появлению фибротических изменений в легких у мышей.
4. Дефицит TNF не влияет на функциональное состояние легких при LPS-индуцированном фиброзе. У мышей с генетической инактивацией IL-6 наблюдается снижение сопротивления дыхательных путей и легочной ткани, а также потеря эластичности

легких в сравнении с диким типом, что свидетельствует о значимом вкладе IL-6 в регуляцию механики дыхания на фоне воспаления.

5. У мышей с избыточной системной продукцией hIL-6 наблюдается системное воспаление и ремоделирование легочной ткани, что проявляется в структурных изменениях в легких и в значительном снижении эластичности дыхательных путей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своим научным руководителям – Марине Сергеевне Друцкой и Екатерине Олеговне Губернаторовой – за помощь в организации работы, планировании и проведении экспериментов, а также за плодотворное обсуждение результатов, ценные замечания и предложения, неоценимые жизненные советы и поддержку на протяжении всей работы. Отдельная благодарность Екатерине Олеговне за ту искру, с которой начался мой интерес к изучению иммунитета слизистой легких, и за мастерство, переданное через множество экспериментальных методик. Выражаю огромную благодарность Сергею Артуровичу Недоспасову за бесценный опыт работы в лаборатории, доверие, которое позволило участвовать в проекте, справедливую критику и всестороннюю поддержку на всех этапах работы.

Бесконечную благодарность выражаю Екатерине Александровне Горшковой за колоссальный вклад в работу, поддержку без границ, за дружбу и те философские диалоги, которые делали мой путь осмысленнее.

Искренне признательна лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ РАН: работа в этом коллективе подарила мне возможность обрести не только замечательных коллег, но и близких друзей. Благодарю нынешних и бывших сотрудников лаборатории: Александра Воронцова, Анастасию Яковлеву, Федора Сысонова, Александру Евдокимову, Константина Меньшикова, Артемия Гелетканича, Софию Казымову, Анну Литвинову, Светлану Пуртову, Тимура Бойко, Анну Шейнову, Дениса Анисова, Тьи Нгуен, Таисию Юракову, Альмину Полинову, Арину Дыгай, Александру Медведовскую, Камар-Сулу Атретханы, Максима Носенко, Сюне Амбарян и Тихона Маркина за помощь в работе, создание дружественной рабочей атмосферы и поддержку. Отдельно благодарю Анну Литвинову, Альмину Полинову и Александру Медведовскую за помощь в выполнении некоторых экспериментов.

Благодарю Виолетту Гоголеву за мотивацию, моральную поддержку, заразительный смех, позитивный настрой и дружбу, проверенную не только временем, но и расстоянием. Спасибо Анне Литвиновой – той, с кого начались просто рабочие отношения, а вылились в искреннюю дружбу. Благодарю ее за готовность всегда прийти на помощь.

Отдельно хочу поблагодарить Рафаела Шаэновича Казаряна за решение любых организационных вопросов, хорошее настроение и дискуссии за чашечкой кофе. Благодарю Руслана Зварцева за отзывчивость, содержательные беседы и создание дружественной обстановки.

Благодарю Алексея Валерьевича Туманова за предоставление экстракта домашнего пылевого клеща и Андрея Алексеевича Круглова за предоставление моноклональных антител к IL-6. Выражаю огромную благодарность питомнику для лабораторных животных «Пушино», ФИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова за предоставление лабораторных мышей,

а также модульному виварию ИМБ РАН за возможность проведения экспериментальных манипуляций.

Выражаю благодарность сотрудникам направления «Иммунобиология и биомедицина» на базе Лабораторного комплекса НТУ «Сириус» Ирине Астраханцевой и Неле Чичериной за помощь в проведении мультиплексного анализа цитокинов и гистологического анализа.

Отдельно хочу поблагодарить всех сотрудников и преподавателей кафедры иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за ценные знания, переданные в ходе обучения, и всестороннюю организационную поддержку.

Наконец, благодарю свою семью за безграничную веру, которая придавала мне сил, за поддержку и мотивацию, которые всегда вели вперед. Отдельную благодарность выражаю своему супругу Евгению - за то, что был и остается для меня источником сил и поддержки, за его терпение, за то, что всегда подставлял плечо и утешал в минуты отчаяния, оставаясь рядом в самые трудные моменты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chung K. F. Diagnosis and Management of Severe Asthma // *Semin Respir Crit Care Med.* – 2018. – Т. 39, № 1. – С. 91-99.
2. Kuruvilla M. E., Lee F. E., Lee G. B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2019. – Т. 56, № 2. – С. 219-233.
3. Gans M. D., Gavrilova T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes // *Paediatr Respir Rev.* – 2020. – Т. 36. – С. 118-127.
4. Holgate S. T., Wenzel S., Postma D. S., Weiss S. T., Renz H., Sly P. D. Asthma // *Nat Rev Dis Primers.* – 2015. – Т. 1, № 1. – С. 15025.
5. Anderson G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease // *Lancet.* – 2008. – Т. 372, № 9643. – С. 1107-19.
6. Peters M. C., Ringel L., Dyjack N., Herrin R., Woodruff P. G., Rios C., O'Connor B., Fahy J. V., Seibold M. A. A Transcriptomic Method to Determine Airway Immune Dysfunction in T2-High and T2-Low Asthma // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2019. – Т. 199, № 4. – С. 465-477.
7. Papi A., Brightling C., Pedersen S. E., Reddel H. K. Asthma // *Lancet.* – 2018. – Т. 391, № 10122. – С. 783-800.
8. Lambrecht B. N., Hammad H. The immunology of asthma // *Nat Immunol.* – 2015. – Т. 16, № 1. – С. 45-56.
9. Bantz S. K., Zhu Z., Zheng T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma // *J Clin Cell Immunol.* – 2014. – Т. 5, № 2.
10. Peters S. P. Asthma phenotypes: nonallergic (intrinsic) asthma // *J Allergy Clin Immunol Pract.* – 2014. – Т. 2, № 6. – С. 650-2.
11. Baos S., Calzada D., Cremades-Jimeno L., Sastre J., Picado C., Quirarte J., Florido F., Lahoz C., Cardaba B. Nonallergic Asthma and Its Severity: Biomarkers for Its Discrimination in Peripheral Samples // *Front Immunol.* – 2018. – Т. 9. – С. 1416.
12. Denning D. W., Pashley C., Hartl D., Wardlaw A., Godet C., Del Giacco S., Delhaes L., Sergejeva S. Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs // *Clin Transl Allergy.* – 2014. – Т. 4. – С. 14.
13. Zhang Z., Biagini Myers J. M., Brandt E. B., Ryan P. H., Lindsey M., Mintz-Cole R. A., Reponen T., Vesper S. J., Forde F., Ruff B., Bass S. A., LeMasters G. K., Bernstein D. I., Lockey J., Budelsky A. L., Khurana Hershey G. K. beta-Glucan exacerbates allergic asthma independent of fungal sensitization and promotes steroid-resistant T(H)2/T(H)17 responses // *J Allergy Clin Immunol.* – 2017. – Т. 139, № 1. – С. 54-65 e8.
14. Darveaux J. I., Lemanske R. F., Jr. Infection-related asthma // *J Allergy Clin Immunol Pract.* – 2014. – Т. 2, № 6. – С. 658-63.
15. Jartti T., Bonnelykke K., Elenius V., Feleszko W. Role of viruses in asthma // *Semin Immunopathol.* – 2020. – Т. 42, № 1. – С. 61-74.
16. Ray A., Kolls J. K. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity // *Trends Immunol.* – 2017. – Т. 38, № 12. – С. 942-954.
17. Manni M. L., Trudeau J. B., Scheller E. V., Mandalapu S., Elloso M. M., Kolls J. K., Wenzel S. E., Alcorn J. F. The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma // *Mucosal Immunol.* – 2014. – Т. 7, № 5. – С. 1186-98.
18. Zhao J., Lloyd C. M., Noble A. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling // *Mucosal Immunol.* – 2013. – Т. 6, № 2. – С. 335-46.
19. Valero A., Quirce S., Davila I., Delgado J., Dominguez-Ortega J. Allergic respiratory disease: Different allergens, different symptoms // *Allergy.* – 2017. – Т. 72, № 9. – С. 1306-1316.
20. Akdis C. A. The epithelial barrier hypothesis proposes a comprehensive understanding of the origins of allergic and other chronic noncommunicable diseases // *J Allergy Clin Immunol.* – 2022. – Т. 149, № 1. – С. 41-44.

21. Hammad H., Lambrecht B. N. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity // *Immunity*. – 2015. – T. 43, № 1. – C. 29-40.
22. Roan F., Obata-Ninomiya K., Ziegler S. F. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm // *J Clin Invest*. – 2019. – T. 129, № 4. – C. 1441-1451.
23. Hammad H., Chieppa M., Perros F., Willart M. A., Germain R. N., Lambrecht B. N. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells // *Nat Med*. – 2009. – T. 15, № 4. – C. 410-6.
24. Hong H., Liao S., Chen F., Yang Q., Wang D. Y. Role of IL-25, IL-33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation // *Allergy*. – 2020. – T. 75, № 11. – C. 2794-2804.
25. Su Z., Lin J., Lu F., Zhang X., Zhang L., Gandhi N. B., de Paiva C. S., Pflugfelder S. C., Li D. Q. Potential autocrine regulation of interleukin-33/ST2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation // *Mucosal Immunol*. – 2013. – T. 6, № 5. – C. 921-30.
26. Stanbery A. G., Shuchi S., Jakob von M., Tait Wojno E. D., Ziegler S. F. TSLP, IL-33, and IL-25: Not just for allergy and helminth infection // *J Allergy Clin Immunol*. – 2022. – T. 150, № 6. – C. 1302-1313.
27. Duchesne M., Okoye I., Lacy P. Epithelial cell alarmin cytokines: Frontline mediators of the asthma inflammatory response // *Front Immunol*. – 2022. – T. 13. – C. 975914.
28. Tamachi T., Maezawa Y., Ikeda K., Kagami S., Hatano M., Seto Y., Suto A., Suzuki K., Watanabe N., Saito Y., Tokuhisa T., Iwamoto I., Nakajima H. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice // *J Allergy Clin Immunol*. – 2006. – T. 118, № 3. – C. 606-14.
29. Gauvreau G. M., Bergeron C., Boulet L. P., Cockcroft D. W., Cote A., Davis B. E., Leigh R., Myers I., O'Byrne P. M., Sehmi R. Sounding the alarmins-The role of alarmin cytokines in asthma // *Allergy*. – 2023. – T. 78, № 2. – C. 402-417.
30. Russkamp D., Aguilar-Pimentel A., Alessandrini F., Gailus-Durner V., Fuchs H., Ohnmacht C., Chaker A., de Angelis M. H., Ollert M., Schmidt-Weber C. B., Blank S. IL-4 receptor alpha blockade prevents sensitization and alters acute and long-lasting effects of allergen-specific immunotherapy of murine allergic asthma // *Allergy*. – 2019. – T. 74, № 8. – C. 1549-1560.
31. Zhu J., Yamane H., Cote-Sierra J., Guo L., Paul W. E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors // *Cell Res*. – 2006. – T. 16, № 1. – C. 3-10.
32. Kumagai T., Iwata A., Furuya H., Kato K., Okabe A., Toda Y., Kanai M., Fujimura L., Sakamoto A., Kageyama T., Tanaka S., Suto A., Hatano M., Kaneda A., Nakajima H. A distal enhancer of GATA3 regulates Th2 differentiation and allergic inflammation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2024. – T. 121, № 27. – C. e2320727121.
33. Medoff B. D., Thomas S. Y., Luster A. D. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs // *Annu Rev Immunol*. – 2008. – T. 26. – C. 205-32.
34. Cernescu L. D., Haidar L., Panaitescu C. Dendritic cell-CD4(+) T cell interaction: The differential role of IL-4/IL-13 in serum IgE levels in house dust mite allergic patients // *Exp Ther Med*. – 2021. – T. 21, № 1. – C. 95.
35. Barnes P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *J Clin Invest*. – 2008. – T. 118, № 11. – C. 3546-56.
36. Mitamura Y., Nunomura S., Nanri Y., Ogawa M., Yoshihara T., Masuoka M., Tsuji G., Nakahara T., Hashimoto-Hachiya A., Conway S. J., Furue M., Izuhara K. The IL-13/periostin/IL-24 pathway causes epidermal barrier dysfunction in allergic skin inflammation // *Allergy*. – 2018. – T. 73, № 9. – C. 1881-1891.
37. Fulkerson P. C., Rothenberg M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond // *Nat Rev Drug Discov*. – 2013. – T. 12, № 2. – C. 117-29.
38. Esnault S., Kelly E. A. Essential Mechanisms of Differential Activation of Eosinophils by IL-3 Compared to GM-CSF and IL-5 // *Crit Rev Immunol*. – 2016. – T. 36, № 5. – C. 429-444.

39. Van Hulst G., Jorssen J., Jacobs N., Henket M., Louis R., Schleich F., Bureau F., Desmet C. J. Anti-IL5 mepolizumab minimally influences residual blood eosinophils in severe asthma // *Eur Respir J.* – 2022. – T. 59, № 3.
40. Nakagome K., Nagata M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation // *Front Immunol.* – 2018. – T. 9. – C. 2220.
41. Thompson-Souza G. A., Gropillo I., Neves J. S. Cysteinyl Leukotrienes in Eosinophil Biology: Functional Roles and Therapeutic Perspectives in Eosinophilic Disorders // *Front Med (Lausanne).* – 2017. – T. 4. – C. 106.
42. Moro K., Yamada T., Tanabe M., Takeuchi T., Ikawa T., Kawamoto H., Furusawa J., Ohtani M., Fujii H., Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells // *Nature.* – 2010. – T. 463, № 7280. – C. 540-4.
43. Yu S., Kim H. Y., Chang Y. J., DeKruyff R. H., Umetsu D. T. Innate lymphoid cells and asthma // *J Allergy Clin Immunol.* – 2014. – T. 133, № 4. – C. 943-50; quiz 51.
44. McKenzie A. N. J., Spits H., Eberl G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity // *Immunity.* – 2014. – T. 41, № 3. – C. 366-374.
45. Walker J. A., Barlow J. L., McKenzie A. N. Innate lymphoid cells--how did we miss them? // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – T. 13, № 2. – C. 75-87.
46. Doherty T. A., Khorram N., Lund S., Mehta A. K., Croft M., Broide D. H. Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. – T. 132, № 1. – C. 205-13.
47. Xue L., Salimi M., Panse I., Mjosberg J. M., McKenzie A. N., Spits H., Klenerman P., Ogg G. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells // *J Allergy Clin Immunol.* – 2014. – T. 133, № 4. – C. 1184-94.
48. Halim T. Y., Steer C. A., Matha L., Gold M. J., Martinez-Gonzalez I., McNagny K. M., McKenzie A. N., Takei F. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation // *Immunity.* – 2014. – T. 40, № 3. – C. 425-35.
49. Carter R. J., Bradding P. The role of mast cells in the structural alterations of the airways as a potential mechanism in the pathogenesis of severe asthma // *Curr Pharm Des.* – 2011. – T. 17, № 7. – C. 685-98.
50. Elieh Ali Komi D., Bjermer L. Mast Cell-Mediated Orchestration of the Immune Responses in Human Allergic Asthma: Current Insights // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2019. – T. 56, № 2. – C. 234-247.
51. Motomura Y., Morita H., Moro K., Nakae S., Artis D., Endo T. A., Kuroki Y., Ohara O., Koyasu S., Kubo M. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation // *Immunity.* – 2014. – T. 40, № 5. – C. 758-71.
52. Ohnmacht C., Schwartz C., Panzer M., Schiedewitz I., Naumann R., Voehringer D. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths // *Immunity.* – 2010. – T. 33, № 3. – C. 364-74.
53. Boonpiyathad T., Sozener Z. C., Satitsuksanoa P., Akdis C. A. Immunologic mechanisms in asthma // *Semin Immunol.* – 2019. – T. 46. – C. 101333.
54. Domingo C., Busse W. W., Hanania N. A., Ertugrul M., Millette L. A., Maio-Twofoot T., Jaumont X., Palomares O. The Direct and Indirect Role of IgE on Airway Epithelium in Asthma // *Allergy.* – 2025. – T. 80, № 4. – C. 919-931.
55. Johnson D. C. Airway mucus function and dysfunction // *N Engl J Med.* – 2011. – T. 364, № 10. – C. 978; author reply 978.
56. Kesimer M. Mucins MUC5AC and MUC5B in the Airways: MUCing around Together // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2022. – T. 206, № 9. – C. 1055-1057.
57. Costain G., Liu Z., Mennella V., Radicioni G., Goczi A. N., Albuлесcu A., Walker S., Ngan B., Manson D., Vali R., Khan M., Palaniyar N., Hill D. B., Hall D. A., Marshall C. R., Knowles M., Zariwala M. A., Kesimer M., Dell S. D. Hereditary Mucin Deficiency Caused by Biallelic Loss of Function of MUC5B // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2022. – T. 205, № 7. – C. 761-768.

58. Bonser L. R., Zlock L., Finkbeiner W., Erle D. J. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma // *J Clin Invest.* – 2016. – T. 126, № 6. – C. 2367-71.
59. Evans C. M., Raclawska D. S., Ttofali F., Liptzin D. R., Fletcher A. A., Harper D. N., McGing M. A., McElwee M. M., Williams O. W., Sanchez E., Roy M. G., Kindrachuk K. N., Wynn T. A., Eltzschig H. K., Blackburn M. R., Tuvim M. J., Janssen W. J., Schwartz D. A., Dickey B. F. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity // *Nat Commun.* – 2015. – T. 6. – C. 6281.
60. Wang X., Li Y., Luo D., Wang X., Zhang Y., Liu Z., Zhong N., Wu M., Li G. Lyn regulates mucus secretion and MUC5AC via the STAT6 signaling pathway during allergic airway inflammation // *Sci Rep.* – 2017. – T. 7. – C. 42675.
61. Patarin J., Ghiringhelli E., Darsy G., Obamba M., Bochu P., Camara B., Quetant S., Cracowski J. L., Cracowski C., Robert de Saint Vincent M. Rheological analysis of sputum from patients with chronic bronchial diseases // *Sci Rep.* – 2020. – T. 10, № 1. – C. 15685.
62. Aegerter H., Smole U., Heyndrickx I., Verstraete K., Savvides S. N., Hammad H., Lambrecht B. N. Charcot-Leyden crystals and other protein crystals driving type 2 immunity and allergy // *Curr Opin Immunol.* – 2021. – T. 72. – C. 72-78.
63. Gevaert E., Delemarre T., De Volder J., Zhang N., Holtappels G., De Ruyck N., Persson E., Heyndrickx I., Verstraete K., Aegerter H., Nauwynck H., Savvides S. N., Lambrecht B. N., Bachert C. Charcot-Leyden crystals promote neutrophilic inflammation in patients with nasal polyposis // *J Allergy Clin Immunol.* – 2020. – T. 145, № 1. – C. 427-430 e4.
64. Persson E. K., Verstraete K., Heyndrickx I., Gevaert E., Aegerter H., Percier J. M., Deswarte K., Verschueren K. H. G., Dansercoer A., Gras D., Chanez P., Bachert C., Goncalves A., Van Gorp H., De Haard H., Blanchetot C., Saunders M., Hammad H., Savvides S. N., Lambrecht B. N. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment // *Science.* – 2019. – T. 364, № 6442.
65. Fitzpatrick A. M., Chipps B. E., Holguin F., Woodruff P. G. T2-"Low" Asthma: Overview and Management Strategies // *J Allergy Clin Immunol Pract.* – 2020. – T. 8, № 2. – C. 452-463.
66. Wang F., He X. Y., Baines K. J., Gunawardhana L. P., Simpson J. L., Li F., Gibson P. G. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma // *Eur Respir J.* – 2011. – T. 38, № 3. – C. 567-74.
67. Peters M. C., McGrath K. W., Hawkins G. A., Hastie A. T., Levy B. D., Israel E., Phillips B. R., Mauger D. T., Comhair S. A., Erzurum S. C., Johansson M. W., Jarjour N. N., Coverstone A. M., Castro M., Holguin F., Wenzel S. E., Woodruff P. G., Bleecker E. R., Fahy J. V., National Heart L., Blood Institute Severe Asthma Research P. Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction, and asthma severity: a cross-sectional analysis of two cohorts // *Lancet Respir Med.* – 2016. – T. 4, № 7. – C. 574-584.
68. Guarnieri M., Balmes J. R. Outdoor air pollution and asthma // *Lancet.* – 2014. – T. 383, № 9928. – C. 1581-92.
69. Seys S. F., Daenen M., Dilissen E., Van Thienen R., Bullens D. M., Hespel P., Dupont L. J. Effects of high altitude and cold air exposure on airway inflammation in patients with asthma // *Thorax.* – 2013. – T. 68, № 10. – C. 906-13.
70. Saffar A. S., Ashdown H., Gounni A. S. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival // *Curr Drug Targets.* – 2011. – T. 12, № 4. – C. 556-62.
71. Panettieri R. A., Jr. The Role of Neutrophils in Asthma // *Immunol Allergy Clin North Am.* – 2018. – T. 38, № 4. – C. 629-638.
72. Newcomb D. C., Peebles R. S., Jr. Th17-mediated inflammation in asthma // *Curr Opin Immunol.* – 2013. – T. 25, № 6. – C. 755-60.
73. Raundhal M., Morse C., Khare A., Oriss T. B., Milosevic J., Trudeau J., Huff R., Pilewski J., Holguin F., Kolls J., Wenzel S., Ray P., Ray A. High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans // *J Clin Invest.* – 2015. – T. 125, № 8. – C. 3037-50.
74. Wang M., Gao P., Wu X., Chen Y., Feng Y., Yang Q., Xu Y., Zhao J., Xie J. Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma // *Respir Res.* – 2016. – T. 17, № 1. – C. 153.

75. Bruijnzeel P. L., Uddin M., Koenderman L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? // *J Leukoc Biol.* – 2015. – T. 98, № 4. – C. 549-56.
76. Chang Y., Al-Alwan L., Risse P. A., Halayko A. J., Martin J. G., Baglolle C. J., Eidelman D. H., Hamid Q. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation // *FASEB J.* – 2012. – T. 26, № 12. – C. 5152-60.
77. Al-Ramli W., Prefontaine D., Chouiali F., Martin J. G., Olivenstein R., Lemiere C., Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma // *J Allergy Clin Immunol.* – 2009. – T. 123, № 5. – C. 1185-7.
78. Kim N. D., Luster A. D. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment // *Trends Immunol.* – 2015. – T. 36, № 9. – C. 547-55.
79. Fahy J. V. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies // *Proc Am Thorac Soc.* – 2009. – T. 6, № 3. – C. 256-9.
80. Cosmi L., Maggi L., Santarlasci V., Capone M., Cardilicchia E., Frosali F., Querci V., Angeli R., Matucci A., Fambrini M., Liotta F., Parronchi P., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4 // *J Allergy Clin Immunol.* – 2010. – T. 125, № 1. – C. 222-30 e1-4.
81. Trejo Bittar H. E., Yousem S. A., Wenzel S. E. Pathobiology of severe asthma // *Annu Rev Pathol.* – 2015. – T. 10. – C. 511-45.
82. Grainge C. L., Lau L. C., Ward J. A., Dulay V., Lahiff G., Wilson S., Holgate S., Davies D. E., Howarth P. H. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma // *N Engl J Med.* – 2011. – T. 364, № 21. – C. 2006-15.
83. 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 (Lausanne).* – 2020. – T. 7. – C. 191.
84. Grainge C., Dennison P., Lau L., Davies D., Howarth P. Asthmatic and normal respiratory epithelial cells respond differently to mechanical apical stress // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2014. – T. 190, № 4. – C. 477-80.
85. Tschumperlin D. J., Dai G., Maly I. V., Kikuchi T., Laiho L. H., McVittie A. K., Haley K. J., Lilly C. M., So P. T., Lauffenburger D. A., Kamm R. D., Drazen J. M. Mechanotransduction through growth-factor shedding into the extracellular space // *Nature.* – 2004. – T. 429, № 6987. – C. 83-6.
86. Harkness L. M., Ashton A. W., Burgess J. K. Asthma is not only an airway disease, but also a vascular disease // *Pharmacol Ther.* – 2015. – T. 148. – C. 17-33.
87. Bajbouj K., Ramakrishnan R. K., Hamid Q. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Its Implications in Asthma // *J Immunol Res.* – 2021. – T. 2021. – C. 6645072.
88. Varricchi G., Brightling C. E., Grainge C., Lambrecht B. N., Chanez P. Airway remodelling in asthma and the epithelium: on the edge of a new era // *Eur Respir J.* – 2024. – T. 63, № 4.
89. Jones R. L., Noble P. B., Elliot J. G., Mitchell H. W., McFawn P. K., Hogg J. C., James A. L. Airflow obstruction is associated with increased smooth muscle extracellular matrix // *Eur Respir J.* – 2016. – T. 47, № 6. – C. 1855-7.
90. Bergeron C., Tulic M. K., Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice // *Can Respir J.* – 2010. – T. 17, № 4. – C. e85-93.
91. Mostaco-Guidolin L. B., Osei E. T., Ullah J., Hajimohammadi S., Fouadi M., Li X., Li V., Shaheen F., Yang C. X., Chu F., Cole D. J., Brandsma C. A., Heijink I. H., Maksym G. N., Walker D., Hackett T. L. Defective Fibrillar Collagen Organization by Fibroblasts Contributes to Airway Remodeling in Asthma // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2019. – T. 200, № 4. – C. 431-443.
92. Liu G., Philp A. M., Corte T., Travis M. A., Schilter H., Hansbro N. G., Burns C. J., Eapen M. S., Sohal S. S., Burgess J. K., Hansbro P. M. Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis // *Pharmacol Ther.* – 2021. – T. 225. – C. 107839.
93. Meng X. M., Nikolic-Paterson D. J., Lan H. Y. TGF-beta: the master regulator of fibrosis // *Nat Rev Nephrol.* – 2016. – T. 12, № 6. – C. 325-38.

94. Epstein Shochet G., Brook E., Bardenstein-Wald B., Shitrit D. TGF-beta pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) fibroblast derived soluble factors is mediated by IL-6 trans-signaling // *Respir Res.* – 2020. – T. 21, № 1. – C. 56.
95. Distler J. H. W., Gyorfi A. H., Ramanujam M., Whitfield M. L., Konigshoff M., Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis // *Nat Rev Rheumatol.* – 2019. – T. 15, № 12. – C. 705-730.
96. Michalik M., Wojcik-Pszczola K., Paw M., Wnuk D., Koczurkiewicz P., Sanak M., Pekala E., Madeja Z. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma // *Cell Mol Life Sci.* – 2018. – T. 75, № 21. – C. 3943-3961.
97. Nakagome K., Dohi M., Okunishi K., Tanaka R., Miyazaki J., Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung // *Thorax.* – 2006. – T. 61, № 10. – C. 886-94.
98. Byrne A. J., Maher T. M., Lloyd C. M. Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease? // *Trends Mol Med.* – 2016. – T. 22, № 4. – C. 303-316.
99. Kolahian S., Fernandez I. E., Eickelberg O., Hartl D. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2016. – T. 55, № 3. – C. 309-22.
100. Kalliolias G. D., Ivashkiv L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies // *Nat Rev Rheumatol.* – 2016. – T. 12, № 1. – C. 49-62.
101. Wang R., Jaw J. J., Stutzman N. C., Zou Z., Sun P. D. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1 // *J Leukoc Biol.* – 2012. – T. 91, № 2. – C. 299-309.
102. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2003. – T. 14, № 3-4. – C. 185-91.
103. Britt R. D., Jr., Thompson M. A., Sasse S., Pabelick C. M., Gerber A. N., Prakash Y. S. Th1 cytokines TNF-alpha and IFN-gamma promote corticosteroid resistance in developing human airway smooth muscle // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2019. – T. 316, № 1. – C. L71-L81.
104. Tavares L. P., Peh H. Y., Tan W. S. D., Pahima H., Maffia P., Tiligada E., Levi-Schaffer F. Granulocyte-targeted therapies for airway diseases // *Pharmacol Res.* – 2020. – T. 157. – C. 104881.
105. Brightling C. E., Bradding P., Symon F. A., Holgate S. T., Wardlaw A. J., Pavord I. D. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma // *N Engl J Med.* – 2002. – T. 346, № 22. – C. 1699-705.
106. Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2010. – T. 45, № 2. – C. 146-69.
107. Polz J., Remke A., Weber S., Schmidt D., Weber-Steffens D., Pietryga-Krieger A., Muller N., Ritter U., Mostböck S., Mannel D. N. Myeloid suppressor cells require membrane TNFR2 expression for suppressive activity // *Immun Inflamm Dis.* – 2014. – T. 2, № 2. – C. 121-30.
108. Gao H., Danzi M. C., Choi C. S., Taherian M., Dalby-Hansen C., Ellman D. G., Madsen P. M., Bixby J. L., Lemmon V. P., Lambertsen K. L., Brambilla R. Opposing Functions of Microglial and Macrophagic TNFR2 in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis // *Cell Rep.* – 2017. – T. 18, № 1. – C. 198-212.
109. Chen X., Baumel M., Mannel D. N., Howard O. M., Oppenheim J. J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells // *J Immunol.* – 2007. – T. 179, № 1. – C. 154-61.
110. Sedger L. M., McDermott M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2014. – T. 25, № 4. – C. 453-72.
111. Varfolomeev E., Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease // *Cytokine.* – 2018. – T. 101. – C. 26-32.
112. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling // *Cell Death Differ.* – 2003. – T. 10, № 1. – C. 45-65.
113. Zhang H., Yan D., Shi X., Liang H., Pang Y., Qin N., Chen H., Wang J., Yin B., Jiang X., Feng W., Zhang W., Zhou M., Li Z. Transmembrane TNF-alpha mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells // *J Leukoc Biol.* – 2008. – T. 84, № 3. – C. 789-97.

114. Qu Y., Zhao G., Li H. Forward and Reverse Signaling Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor-Alpha and TNF Receptor 2: Potential Roles in an Immunosuppressive Tumor Microenvironment // *Front Immunol.* – 2017. – T. 8. – C. 1675.
115. Kirchner S., Boldt S., Kolch W., Haffner S., Kazak S., Janosch P., Holler E., Andreesen R., Eissner G. LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway // *J Leukoc Biol.* – 2004. – T. 75, № 2. – C. 324-31.
116. Bean A. G., Roach D. R., Briscoe H., France M. P., Korner H., Sedgwick J. D., Britton W. J. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin // *J Immunol.* – 1999. – T. 162, № 6. – C. 3504-11.
117. Allie N., Grivennikov S. I., Keeton R., Hsu N. J., Bourigault M. L., Court N., Fremond C., Yeremeev V., Shebzukhov Y., Ryffel B., Nedospasov S. A., Quesniaux V. F., Jacobs M. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of Mycobacterium tuberculosis infection // *Sci Rep.* – 2013. – T. 3. – C. 1809.
118. Fremond C., Allie N., Dambuza I., Grivennikov S. I., Yeremeev V., Quesniaux V. F., Jacobs M., Ryffel B. Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection // *Respir Res.* – 2005. – T. 6, № 1. – C. 136.
119. Iwasaki M., Saito K., Takemura M., Sekikawa K., Fujii H., Yamada Y., Wada H., Mizuta K., Seishima M., Ito Y. TNF-alpha contributes to the development of allergic rhinitis in mice // *J Allergy Clin Immunol.* – 2003. – T. 112, № 1. – C. 134-40.
120. Mo J. H., Kang E. K., Quan S. H., Rhee C. S., Lee C. H., Kim D. Y. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment reduces allergic responses in an allergic rhinitis mouse model // *Allergy.* – 2011. – T. 66, № 2. – C. 279-86.
121. Lee H. S., Park H. W., Song W. J., Jeon E. Y., Bang B., Shim E. J., Moon H. G., Kim Y. K., Kang H. R., Min K. U., Cho S. H. TNF-alpha enhance Th2 and Th17 immune responses regulating by IL23 during sensitization in asthma model // *Cytokine.* – 2016. – T. 79. – C. 23-30.
122. Huang H., Nie W., Qian J., Zang Y., Chen J., Lai G., Ye T., Xiu Q. Effects of TNF-alpha polymorphisms on asthma risk: a systematic review and meta-analysis // *J Investig Allergol Clin Immunol.* – 2014. – T. 24, № 6. – C. 406-17.
123. Russo C., Polosa R. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis // *Clin Sci (Lond).* – 2005. – T. 109, № 2. – C. 135-42.
124. Niessen N. M., Gibson P. G., Baines K. J., Barker D., Yang I. A., Upham J. W., Reynolds P. N., Hodge S., James A. L., Jenkins C., Peters M. J., Marks G. B., Baraket M., Simpson J. L., Fricker M. Sputum TNF markers are increased in neutrophilic and severe asthma and are reduced by azithromycin treatment // *Allergy.* – 2021. – T. 76, № 7. – C. 2090-2101.
125. Choi J. P., Kim Y. S., Kim O. Y., Kim Y. M., Jeon S. G., Roh T. Y., Park J. S., Gho Y. S., Kim Y. K. TNF-alpha is a key mediator in the development of Th2 cell response to inhaled allergens induced by a viral PAMP double-stranded RNA // *Allergy.* – 2012. – T. 67, № 9. – C. 1138-48.
126. Paul W. E., Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – T. 10, № 4. – C. 225-35.
127. Whitehead G. S., Thomas S. Y., Shalaby K. H., Nakano K., Moran T. P., Ward J. M., Flake G. P., Nakano H., Cook D. N. TNF is required for TLR ligand-mediated but not protease-mediated allergic airway inflammation // *J Clin Invest.* – 2017. – T. 127, № 9. – C. 3313-3326.
128. Li X. M., Chen X., Gu W., Guo Y. J., Cheng Y., Peng J., Guo X. J. Impaired TNF/TNFR2 signaling enhances Th2 and Th17 polarization and aggravates allergic airway inflammation // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2017. – T. 313, № 3. – C. L592-L601.
129. Dendoncker K., Timmermans S., Vandewalle J., Eggermont M., Lempiainen J., Paakinaho V., Van Hamme E., Dewaele S., Vandevyver S., Ballegeer M., Souffriau J., Van Wyngene L., Van Looveren K., Vanderhaeghen T., Beyaert R., De Bosscher K., Palvimo J. J., Van Montagu M., Libert C. TNF-alpha inhibits glucocorticoid receptor-induced gene expression by reshaping the GR nuclear cofactor profile // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2019. – T. 116, № 26. – C. 12942-12951.

130. Sullivan D. E., Ferris M., Pociask D., Brody A. R. Tumor necrosis factor-alpha induces transforming growth factor-beta1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal-regulated kinase pathway // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2005. – T. 32, № 4. – C. 342-9.
131. Amrani Y., Chen H., Panettieri R. A., Jr. Activation of tumor necrosis factor receptor 1 in airway smooth muscle: a potential pathway that modulates bronchial hyper-responsiveness in asthma? // *Respir Res.* – 2000. – T. 1, № 1. – C. 49-53.
132. Yurakova T. R., Gubernatorova E. O., Gorshkova E. A., Nosenko M. A., Nedospasov S. A., Drutskaya M. S. HDM induces distinct immunometabolic phenotype in macrophages in TLR4-dependent manner // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2022. – T. 1868, № 12. – C. 166531.
133. Murakami M., Kamimura D., Hirano T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines // *Immunity.* – 2019. – T. 50, № 4. – C. 812-831.
134. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2014. – T. 6, № 10. – C. a016295.
135. Korn T., Hiltensperger M. Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets // *Cytokine.* – 2021. – T. 146. – C. 155654.
136. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer // *Int Immunol.* – 2021. – T. 33, № 3. – C. 127-148.
137. Rose-John S., Heinrich P. C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function // *Biochem J.* – 1994. – T. 300 ( Pt 2), № Pt 2. – C. 281-90.
138. Schumacher N., Meyer D., Mauermann A., von der Heyde J., Wolf J., Schwarz J., Knittler K., Murphy G., Michalek M., Garbers C., Bartsch J. W., Guo S., Schacher B., Eickholz P., Chalaris A., Rose-John S., Rabe B. Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles // *J Biol Chem.* – 2015. – T. 290, № 43. – C. 26059-71.
139. Rose-John S. The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced Therapeutic Options in Inflammation // *Clin Pharmacol Ther.* – 2017. – T. 102, № 4. – C. 591-598.
140. Jevnikar Z., Ostling J., Ax E., Calven J., Thorn K., Israelsson E., Oberg L., Singhanian A., Lau L. C. K., Wilson S. J., Ward J. A., Chauhan A., Sousa A. R., De Meulder B., Loza M. J., Baribaud F., Sterk P. J., Chung K. F., Sun K., Guo Y., Adcock I. M., Payne D., Dahlen B., Chanez P., Shaw D. E., Krug N., Hohlfeld J. M., Sandstrom T., Djukanovic R., James A., Hinks T. S. C., Howarth P. H., Vaarala O., van Geest M., Olsson H., Unbiased Biomarkers in Prediction of Respiratory Disease Outcomes study g. Epithelial IL-6 trans-signaling defines a new asthma phenotype with increased airway inflammation // *J Allergy Clin Immunol.* – 2019. – T. 143, № 2. – C. 577-590.
141. Lamertz L., Rummel F., Polz R., Baran P., Hansen S., Waetzig G. H., Moll J. M., Floss D. M., Scheller J. Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses // *Sci Signal.* – 2018. – T. 11, № 550.
142. Heink S., Yogev N., Garbers C., Herwerth M., Aly L., Gasperi C., Husterer V., Croxford A. L., Moller-Hackbarth K., Bartsch H. S., Sotlar K., Krebs S., Regen T., Blum H., Hemmer B., Misgeld T., Wunderlich T. F., Hidalgo J., Oukka M., Rose-John S., Schmidt-Supprian M., Waisman A., Korn T. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T(H)17 cells // *Nat Immunol.* – 2017. – T. 18, № 1. – C. 74-85.
143. Jostock T., Mullberg J., Ozbek S., Atreya R., Blinn G., Voltz N., Fischer M., Neurath M. F., Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses // *Eur J Biochem.* – 2001. – T. 268, № 1. – C. 160-7.
144. Garbers C., Heink S., Korn T., Rose-John S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine // *Nat Rev Drug Discov.* – 2018. – T. 17, № 6. – C. 395-412.
145. Rincon M., Irvin C. G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases // *Int J Biol Sci.* – 2012. – T. 8, № 9. – C. 1281-90.
146. Doganci A., Eigenbrod T., Krug N., De Sanctis G. T., Hausding M., Erpenbeck V. J., Haddad el B., Lehr H. A., Schmitt E., Bopp T., Kallen K. J., Herz U., Schmitt S., Luft C., Hecht O., Hohlfeld J. M., Ito H., Nishimoto N., Yoshizaki K., Kishimoto T., Rose-John S., Renz H., Neurath M. F., Galle P.

- R., Finotto S. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo // *J Clin Invest.* – 2005. – T. 115, № 2. – C. 313-25.
147. Dienz O., Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses // *Clin Immunol.* – 2009. – T. 130, № 1. – C. 27-33.
148. Jones B. E., Maerz M. D., Buckner J. H. IL-6: a cytokine at the crossroads of autoimmunity // *Curr Opin Immunol.* – 2018. – T. 55. – C. 9-14.
149. Sahoo A., Wali S., Nurieva R. T helper 2 and T follicular helper cells: Regulation and function of interleukin-4 // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2016. – T. 30. – C. 29-37.
150. Basso A. S., Cheroutre H., Mucida D. More stories on Th17 cells // *Cell Res.* – 2009. – T. 19, № 4. – C. 399-411.
151. Dienz O., Eaton S. M., Bond J. P., Neveu W., Moquin D., Noubade R., Briso E. M., Charland C., Leonard W. J., Ciliberto G., Teuscher C., Haynes L., Rincon M. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells // *J Exp Med.* – 2009. – T. 206, № 1. – C. 69-78.
152. Ammit A. J., Moir L. M., Oliver B. G., Hughes J. M., Alkhouri H., Ge Q., Burgess J. K., Black J. L., Roth M. Effect of IL-6 trans-signaling on the pro-remodeling phenotype of airway smooth muscle // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2007. – T. 292, № 1. – C. L199-206.
153. Farahi N., Paige E., Balla J., Prudence E., Ferreira R. C., Southwood M., Appleby S. L., Bakke P., Gulsvik A., Litonjua A. A., Sparrow D., Silverman E. K., Cho M. H., Danesh J., Paul D. S., Freitag D. F., Chilvers E. R. Neutrophil-mediated IL-6 receptor trans-signaling and the risk of chronic obstructive pulmonary disease and asthma // *Hum Mol Genet.* – 2017. – T. 26, № 8. – C. 1584-1596.
154. Drutskaya M. S., Nosenko M. A., Atretkhany K. S., Efimov G. A., Nedospasov S. A. [Interleukin-6 From molecular mechanisms of signal transduction to physiological properties and therapeutic targeting] // *Mol Biol (Mosk).* – 2015. – T. 49, № 6. – C. 937-43.
155. Draijer C., Robbe P., Boorsma C. E., Hylkema M. N., Melgert B. N. Dual role of YM1+ M2 macrophages in allergic lung inflammation // *Sci Rep.* – 2018. – T. 8, № 1. – C. 5105.
156. Gubernatorova E. O., Gorshkova E. A., Namakanova O. A., Zvartsev R. V., Hidalgo J., Drutskaya M. S., Tumanov A. V., Nedospasov S. A. Non-redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation // *Front Immunol.* – 2018. – T. 9. – C. 2718.
157. Samitas K., Delimpoura V., Zervas E., Gaga M. Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives // *Eur Respir Rev.* – 2015. – T. 24, № 138. – C. 594-601.
158. Balbino B., Herviou P., Godon O., Stackowicz J., Goff O. R., Iannascoli B., Sterlin D., Brule S., Millot G. A., Harris F. M., Voronina V. A., Nadeau K. C., Macdonald L. E., Murphy A. J., Bruhns P., Reber L. L. The anti-IgE mAb omalizumab induces adverse reactions by engaging Fcγ receptors // *J Clin Invest.* – 2020. – T. 130, № 3. – C. 1330-1335.
159. Chen Z. G., Zhang T. T., Li H. T., Chen F. H., Zou X. L., Ji J. Z., Chen H. Neutralization of TSLP inhibits airway remodeling in a murine model of allergic asthma induced by chronic exposure to house dust mite // *PLoS One.* – 2013. – T. 8, № 1. – C. e51268.
160. Lin S. C., Chou H. C., Chen C. M., Chiang B. L. Anti-thymic stromal lymphopoietin antibody suppresses airway remodeling in asthma through reduction of MMP and CTGF // *Pediatr Res.* – 2019. – T. 86, № 2. – C. 181-187.
161. Gauvreau G. M., O'Byrne P. M., Boulet L. P., Wang Y., Cockcroft D., Bigler J., FitzGerald J. M., Boedigheimer M., Davis B. E., Dias C., Gorski K. S., Smith L., Bautista E., Comeau M. R., Leigh R., Parnes J. R. Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses // *N Engl J Med.* – 2014. – T. 370, № 22. – C. 2102-10.
162. Corren J., Ambrose C. S., Griffiths J. M., Hellqvist A., Lindsley A. W., Llanos J. P., Colice G., Menzies-Gow A. Efficacy of tezepelumab in patients with evidence of severe allergic asthma: Results from the phase 3 NAVIGATOR study // *Clin Exp Allergy.* – 2023. – T. 53, № 4. – C. 417-428.
163. Gauvreau G. M., Hohlfeld J. M., FitzGerald J. M., Boulet L. P., Cockcroft D. W., Davis B. E., Korn S., Kornmann O., Leigh R., Mayers I., Watz H., Grant S. S., Jain M., Cabanski M., Pertel P. E., Jones

- I., Lecot J. R., Cao H., O'Byrne P. M. Inhaled anti-TSLP antibody fragment, eclelralimab, blocks responses to allergen in mild asthma // *Eur Respir J.* – 2023. – T. 61, № 3.
164. Ballantyne S. J., Barlow J. L., Jolin H. E., Nath P., Williams A. S., Chung K. F., Sturton G., Wong S. H., McKenzie A. N. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma // *J Allergy Clin Immunol.* – 2007. – T. 120, № 6. – C. 1324-31.
165. Gregory L. G., Jones C. P., Walker S. A., Sawant D., Gowers K. H., Campbell G. A., McKenzie A. N., Lloyd C. M. IL-25 drives remodelling in allergic airways disease induced by house dust mite // *Thorax.* – 2013. – T. 68, № 1. – C. 82-90.
166. Zhang H., Zheng W., Peng R., Wu D., Hu Y., Sun T., Gao L., Liu Y., Guo L., Ding Y., Liu L. First-in-human study on tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single and multiple escalating doses of XKH001, a recombinant humanized monoclonal antibody against IL-25 in healthy Chinese volunteers // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2025. – T. 34, № 1-2. – C. 81-87.
167. Chinthrajah S., Cao S., Liu C., Lyu S. C., Sindher S. B., Long A., Sampath V., Petroni D., Londei M., Nadeau K. C. Phase 2a randomized, placebo-controlled study of anti-IL-33 in peanut allergy // *JCI Insight.* – 2019. – T. 4, № 22.
168. Rabe K. F., Celli B. R., Wechsler M. E., Abdulai R. M., Luo X., Boomsma M. M., Staudinger H., Horowitz J. E., Baras A., Ferreira M. A., Ruddy M. K., Nivens M. C., Amin N., Weinreich D. M., Yancopoulos G. D., Goulaouic H. Safety and efficacy of itepekimab in patients with moderate-to-severe COPD: a genetic association study and randomised, double-blind, phase 2a trial // *Lancet Respir Med.* – 2021. – T. 9, № 11. – C. 1288-1298.
169. Wechsler M. E., Ruddy M. K., Pavord I. D., Israel E., Rabe K. F., Ford L. B., Maspero J. F., Abdulai R. M., Hu C. C., Martincova R., Jessel A., Nivens M. C., Amin N., Weinreich D. M., Yancopoulos G. D., Goulaouic H. Efficacy and Safety of Itepekimab in Patients with Moderate-to-Severe Asthma // *N Engl J Med.* – 2021. – T. 385, № 18. – C. 1656-1668.
170. Kelsen S. G., Agache I. O., Soong W., Israel E., Chupp G. L., Cheung D. S., Theess W., Yang X., Staton T. L., Choy D. F., Fong A., Dash A., Dolton M., Pappu R., Brightling C. E. Astegolimab (anti-ST2) efficacy and safety in adults with severe asthma: A randomized clinical trial // *J Allergy Clin Immunol.* – 2021. – T. 148, № 3. – C. 790-798.
171. Yousuf A. J., Mohammed S., Carr L., Yavari Ramsheh M., Micieli C., Mistry V., Haldar K., Wright A., Novotny P., Parker S., Glover S., Finch J., Quann N., Brookes C. L., Hobson R., Ibrahim W., Russell R. J., John C., Grimbaldeston M. A., Choy D. F., Cheung D., Steiner M., Greening N. J., Brightling C. E. Astegolimab, an anti-ST2, in chronic obstructive pulmonary disease (COPD-ST2OP): a phase 2a, placebo-controlled trial // *Lancet Respir Med.* – 2022. – T. 10, № 5. – C. 469-477.
172. Allinne J., Scott G., Lim W. K., Birchard D., Erjefalt J. S., Sanden C., Ben L. H., Agrawal A., Kaur N., Kim J. H., Kamat V., Fury W., Huang T., Stahl N., Yancopoulos G. D., Murphy A. J., Sleeman M. A., Orenge J. M. IL-33 blockade affects mediators of persistence and exacerbation in a model of chronic airway inflammation // *J Allergy Clin Immunol.* – 2019. – T. 144, № 6. – C. 1624-1637 e10.
173. Lee H. Y., Rhee C. K., Kang J. Y., Byun J. H., Choi J. Y., Kim S. J., Kim Y. K., Kwon S. S., Lee S. Y. Blockade of IL-33/ST2 ameliorates airway inflammation in a murine model of allergic asthma // *Exp Lung Res.* – 2014. – T. 40, № 2. – C. 66-76.
174. Zoltowska A. M., Lei Y., Fuchs B., Rask C., Adner M., Nilsson G. P. The interleukin-33 receptor ST2 is important for the development of peripheral airway hyperresponsiveness and inflammation in a house dust mite mouse model of asthma // *Clin Exp Allergy.* – 2016. – T. 46, № 3. – C. 479-90.
175. Choi Y., Kim Y. M., Lee H. R., Mun J., Sim S., Lee D. H., Pham D. L., Kim S. H., Shin Y. S., Lee S. W., Park H. S. Eosinophil extracellular traps activate type 2 innate lymphoid cells through stimulating airway epithelium in severe asthma // *Allergy.* – 2020. – T. 75, № 1. – C. 95-103.
176. An G., Wang W., Zhang X., Huang Q., Li Q., Chen S., Du X., Corrigan C. J., Huang K., Wang W., Chen Y., Ying S. Combined blockade of IL-25, IL-33 and TSLP mediates amplified inhibition of airway inflammation and remodelling in a murine model of asthma // *Respirology.* – 2020. – T. 25, № 6. – C. 603-612.

177. Albers F. C., Papi A., Taille C., Bratton D. J., Bradford E. S., Yancey S. W., Kwon N. Mepolizumab reduces exacerbations in patients with severe eosinophilic asthma, irrespective of body weight/body mass index: meta-analysis of MENSA and MUSCA // *Respir Res.* – 2019. – T. 20, № 1. – C. 169.
178. Bjermer L., Lemiere C., Maspero J., Weiss S., Zangrilli J., Germinaro M. Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma With Elevated Blood Eosinophil Levels: A Randomized Phase 3 Study // *Chest.* – 2016. – T. 150, № 4. – C. 789-798.
179. Chipps B. E., Hirsch I., Trudo F., Alacqua M., Zangrilli J. G. Benralizumab efficacy for patients with fixed airflow obstruction and severe, uncontrolled eosinophilic asthma // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2020. – T. 124, № 1. – C. 79-86.
180. Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X., Schofield B., Neben T. Y., Karp C. L., Donaldson D. D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma // *Science.* – 1998. – T. 282, № 5397. – C. 2258-61.
181. Panettieri R. A., Jr., Sjobring U., Peterffy A., Wessman P., Bowen K., Piper E., Colice G., Brightling C. E. Tralokinumab for severe, uncontrolled asthma (STRATOS 1 and STRATOS 2): two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 clinical trials // *Lancet Respir Med.* – 2018. – T. 6, № 7. – C. 511-525.
182. Hanania N. A., Korenblat P., Chapman K. R., Bateman E. D., Kopecky P., Paggiaro P., Yokoyama A., Olsson J., Gray S., Holweg C. T., Eisner M., Asare C., Fischer S. K., Peng K., Putnam W. S., Matthews J. G. Efficacy and safety of lebrikizumab in patients with uncontrolled asthma (LAVOLTA I and LAVOLTA II): replicate, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trials // *Lancet Respir Med.* – 2016. – T. 4, № 10. – C. 781-796.
183. Steinke J. W. Anti-interleukin-4 therapy // *Immunol Allergy Clin North Am.* – 2004. – T. 24, № 4. – C. 599-614, vi.
184. Walker B. L., Leigh R. Use of biologicals as immunotherapy in asthma and related diseases // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2008. – T. 4, № 6. – C. 743-56.
185. Busse W. W., Maspero J. F., Rabe K. F., Papi A., Wenzel S. E., Ford L. B., Pavord I. D., Zhang B., Staudinger H., Pirozzi G., Amin N., Akinlade B., Eckert L., Chao J., Graham N. M. H., Teper A. Liberty Asthma QUEST: Phase 3 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study to Evaluate Dupilumab Efficacy/Safety in Patients with Uncontrolled, Moderate-to-Severe Asthma // *Adv Ther.* – 2018. – T. 35, № 5. – C. 737-748.
186. Jonstam K., Swanson B. N., Mannent L. P., Cardell L. O., Tian N., Wang Y., Zhang D., Fan C., Holtappels G., Hamilton J. D., Grabher A., Graham N. M. H., Pirozzi G., Bachert C. Dupilumab reduces local type 2 pro-inflammatory biomarkers in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis // *Allergy.* – 2019. – T. 74, № 4. – C. 743-752.
187. Wenzel S., Ford L., Pearlman D., Spector S., Sher L., Skobieranda F., Wang L., Kirkesseli S., Rocklin R., Bock B., Hamilton J., Ming J. E., Radin A., Stahl N., Yancopoulos G. D., Graham N., Pirozzi G. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels // *N Engl J Med.* – 2013. – T. 368, № 26. – C. 2455-66.
188. Busse W. W., Holgate S., Kerwin E., Chon Y., Feng J., Lin J., Lin S. L. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2013. – T. 188, № 11. – C. 1294-302.
189. Flynn J. L., Goldstein M. M., Chan J., Triebold K. J., Pfeffer K., Lowenstein C. J., Schreiber R., Mak T. W., Bloom B. R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice // *Immunity.* – 1995. – T. 2, № 6. – C. 561-72.
190. Keane J., Gershon S., Wise R. P., Mirabile-Levens E., Kasznica J., Schwieterman W. D., Siegel J. N., Braun M. M. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent // *N Engl J Med.* – 2001. – T. 345, № 15. – C. 1098-104.
191. Wolfe F., Michaud K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients // *Arthritis Rheum.* – 2004. – T. 50, № 6. – C. 1740-51.
192. Berry M. A., Hargadon B., Shelley M., Parker D., Shaw D. E., Green R. H., Bradding P., Brightling C. E., Wardlaw A. J., Pavord I. D. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma // *N Engl J Med.* – 2006. – T. 354, № 7. – C. 697-708.

193. Taille C., Poulet C., Marchand-Adam S., Borie R., Dombret M. C., Crestani B., Aubier M. Monoclonal Anti-TNF-alpha Antibodies for Severe Steroid-Dependent Asthma: A Case Series // *Open Respir Med J.* – 2013. – T. 7. – C. 21-5.
194. Ahmad S., Mohd Noor N., Engku Nur Syafirah E. A. R., Irekeola A. A., Shueb R. H., Chan Y. Y., Barnes P. J., Mohamud R. Anti-Tumor Necrosis Factor for Supplementary Management in Severe Asthma: A Systematic Review and Meta-analysis // *J Interferon Cytokine Res.* – 2023. – T. 43, № 2. – C. 77-85.
195. Kang S., Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic // *Immunity.* – 2019. – T. 50, № 4. – C. 1007-1023.
196. Smolen J. S., Feist E., Fatenejad S., Grishin S. A., Korneva E. V., Nasonov E. L., Samsonov M. Y., Fleischmann R. M., Group C. Olokizumab versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis // *N Engl J Med.* – 2022. – T. 387, № 8. – C. 715-726.
197. Rose-John S., Jenkins B. J., Garbers C., Moll J. M., Scheller J. Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects // *Nat Rev Immunol.* – 2023. – T. 23, № 10. – C. 666-681.
198. Avci A. B., Feist E., Burmester G. R. Targeting IL-6 or IL-6 Receptor in Rheumatoid Arthritis: What's the Difference? // *BioDrugs.* – 2018. – T. 32, № 6. – C. 531-546.
199. Kang S., Tanaka T., Kishimoto T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody // *Int Immunol.* – 2015. – T. 27, № 1. – C. 21-9.
200. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2012. – T. 52. – C. 199-219.
201. Revez J. A., Bain L. M., Watson R. M., Towers M., Collins T., Killian K. J., O'Byrne P. M., Gauvreau G. M., Upham J. W., Ferreira M. A. Effects of interleukin-6 receptor blockade on allergen-induced airway responses in mild asthmatics // *Clin Transl Immunology.* – 2019. – T. 8, № 6. – C. e1044.
202. Esty B., Harb H., Bartnikas L. M., Charbonnier L. M., Massoud A. H., Leon-Astudillo C., Visner G., Subramaniam M., Phipatanakul W., Chatila T. A. Treatment of severe persistent asthma with IL-6 receptor blockade // *J Allergy Clin Immunol Pract.* – 2019. – T. 7, № 5. – C. 1639-1642 e4.
203. Gubernatorova E. O., Namakanova O. A., Gorshkova E. A., Medvedovskaya A. D., Nedospasov S. A., Drutskaya M. S. Novel Anti-Cytokine Strategies for Prevention and Treatment of Respiratory Allergic Diseases // *Front Immunol.* – 2021. – T. 12. – C. 601842.
204. Quintana A., Erta M., Ferrer B., Comes G., Giralt M., Hidalgo J. Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior // *Brain Behav Immun.* – 2013. – T. 27, № 1. – C. 162-73.
205. Kuprash D. V., Tumanov A. V., Liepinsh D. J., Koroleva E. P., Drutskaya M. S., Kruglov A. A., Shakhov A. N., Southon E., Murphy W. J., Tessarollo L., Grivennikov S. I., Nedospasov S. A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches // *Eur J Immunol.* – 2005. – T. 35, № 5. – C. 1592-600.
206. Gueders M. M., Paulissen G., Crahay C., Quesada-Calvo F., Hacha J., Van Hove C., Tournoy K., Louis R., Foidart J. M., Noel A., Cataldo D. D. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production // *Inflamm Res.* – 2009. – T. 58, № 12. – C. 845-54.
207. Nials A. T., Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge // *Dis Model Mech.* – 2008. – T. 1, № 4-5. – C. 213-20.
208. Haspeslagh E., Debeuf N., Hammad H., Lambrecht B. N. Murine Models of Allergic Asthma // *Methods Mol Biol.* – 2017. – T. 1559. – C. 121-136.
209. de Souza Xavier Costa N., Ribeiro Junior G., Dos Santos Alemany A. A., Belotti L., Zati D. H., Frota Cavalcante M., Matera Veras M., Ribeiro S., Kallas E. G., Nascimento Saldiva P. H., Dolhnikoff M., Ferraz da Silva L. F. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model // *PLoS One.* – 2017. – T. 12, № 9. – C. e0185474.
210. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nat Protoc.* – 2008. – T. 3, № 6. – C. 1101-8.

211. Park S. C., Kim H., Bak Y., Shim D., Kwon K. W., Kim C. H., Yoon J. H., Shin S. J. An Alternative Dendritic Cell-Induced Murine Model of Asthma Exhibiting a Robust Th2/Th17-Skewed Response // *Allergy Asthma Immunol Res.* – 2020. – Т. 12, № 3. – С. 537-555.
212. Ruifrok A. C., Johnston D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution // *Anal Quant Cytol Histol.* – 2001. – Т. 23, № 4. – С. 291-9.
213. Post S., Nawijn M. C., Hackett T. L., Baranowska M., Gras R., van Oosterhout A. J., Heijink I. H. The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitisation // *Thorax.* – 2012. – Т. 67, № 6. – С. 488-95.
214. Кондратьева Т. К. К. Е. В., Апт А. С. . Ранние фазы туберкулезной инфекции: иммунный ответ и генетический контроль хозяина // *Инфекция и иммунитет.* – 2025. – Т. 15. – С. 431-445.
215. Bharat A., Bhorade S. M., Morales-Nebreda L., McQuattie-Pimentel A. C., Soberanes S., Ridge K., DeCamp M. M., Mestan K. K., Perlman H., Budinger G. R., Misharin A. V. Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2016. – Т. 54, № 1. – С. 147-9.
216. Gautier E. L., Shay T., Miller J., Greter M., Jakubzick C., Ivanov S., Helft J., Chow A., Elpek K. G., Gordonov S., Mazloom A. R., Ma'ayan A., Chua W. J., Hansen T. H., Turley S. J., Merad M., Randolph G. J., Immunological Genome C. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages // *Nat Immunol.* – 2012. – Т. 13, № 11. – С. 1118-28.
217. Bain C. C., MacDonald A. S. The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity // *Mucosal Immunol.* – 2022. – Т. 15, № 2. – С. 223-234.
218. Aegerter H., Kulikauskaite J., Crotta S., Patel H., Kelly G., Hessel E. M., Mack M., Beinke S., Wack A. Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection // *Nat Immunol.* – 2020. – Т. 21, № 2. – С. 145-157.
219. Misharin A. V., Morales-Nebreda L., Reyfman P. A., Cuda C. M., Walter J. M., McQuattie-Pimentel A. C., Chen C. I., Anekalla K. R., Joshi N., Williams K. J. N., Abdala-Valencia H., Yacoub T. J., Chi M., Chiu S., Gonzalez-Gonzalez F. J., Gates K., Lam A. P., Nicholson T. T., Homan P. J., Soberanes S., Dominguez S., Morgan V. K., Saber R., Shaffer A., Hinchcliff M., Marshall S. A., Bharat A., Berdnikovs S., Bhorade S. M., Bartom E. T., Morimoto R. I., Balch W. E., Sznajder J. I., Chandel N. S., Mutlu G. M., Jain M., Gottardi C. J., Singer B. D., Ridge K. M., Bagheri N., Shilatifard A., Budinger G. R. S., Perlman H. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span // *J Exp Med.* – 2017. – Т. 214, № 8. – С. 2387-2404.
220. Ozdemir C., Kucuksezer U. C., Akdis M., Akdis C. A. The concepts of asthma endotypes and phenotypes to guide current and novel treatment strategies // *Expert Rev Respir Med.* – 2018. – Т. 12, № 9. – С. 733-743.
221. Patel T. R., Sur S. IgE and eosinophils as therapeutic targets in asthma // *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 42-49.
222. Halwani R., Sultana A., Vazquez-Tello A., Jamhawi A., Al-Masri A. A., Al-Muhsen S. Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma // *J Asthma.* – 2017. – Т. 54, № 9. – С. 893-904.
223. Al-Muhsen S., Johnson J. R., Hamid Q. Remodeling in asthma // *J Allergy Clin Immunol.* – 2011. – Т. 128, № 3. – С. 451-62; quiz 463-4.
224. James A. L., Elliot J. G., Jones R. L., Carroll M. L., Mauad T., Bai T. R., Abramson M. J., McKay K. O., Green F. H. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2012. – Т. 185, № 10. – С. 1058-64.
225. Tan H. T., Hagner S., Ruchti F., Radzikowska U., Tan G., Altunbulakli C., Eljaszewicz A., Moniuszko M., Akdis M., Akdis C. A., Garn H., Sokolowska M. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice // *Allergy.* – 2019. – Т. 74, № 2. – С. 294-307.

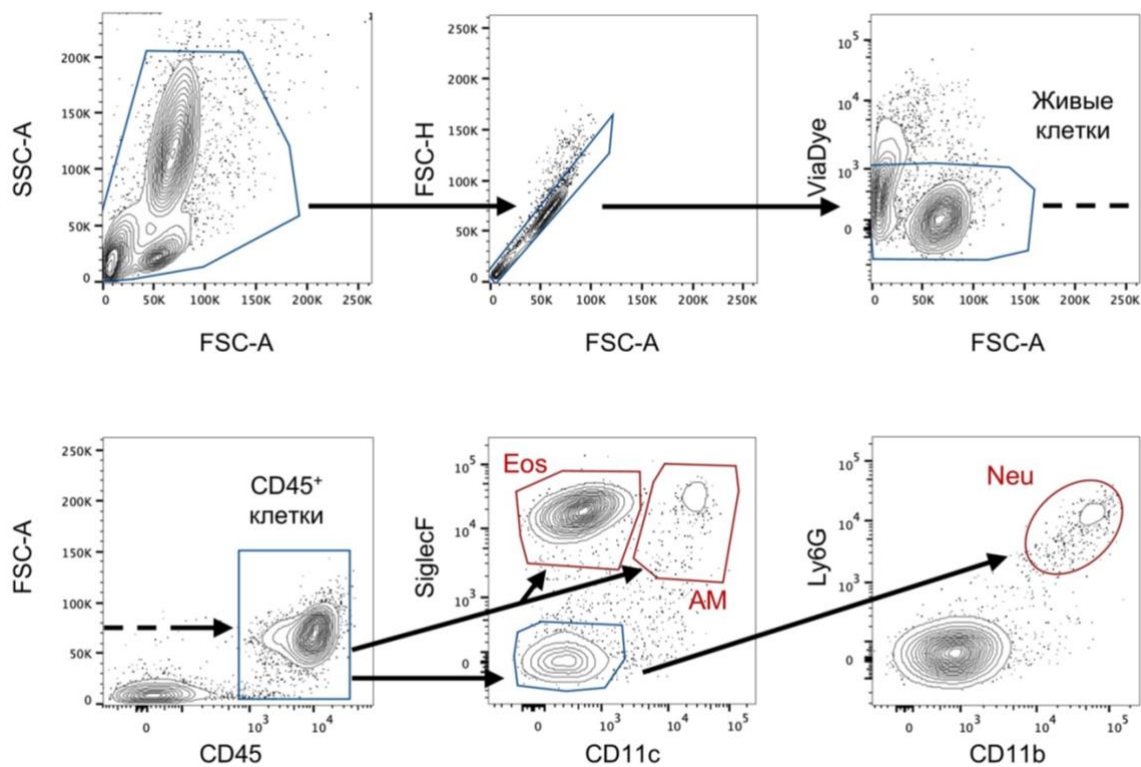
226. Zheng M., Li H., Sun L., Brigstock D. R., Gao R. Interleukin-6 participates in human pancreatic stellate cell activation and collagen I production via TGF-beta1/Smad pathway // *Cytokine*. – 2021. – Т. 143. – С. 155536.
227. Moretti L., Stalfort J., Barker T. H., Abebayehu D. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation // *J Biol Chem*. – 2022. – Т. 298, № 2. – С. 101530.
228. Wegmann M. Animal models of chronic experimental asthma - strategies for the identification of new therapeutic targets // *J Occup Med Toxicol*. – 2008. – Т. 3 Suppl 1, № Suppl 1. – С. S4.
229. Намаканова О.А. Г. Е. О., Чичерина Н.Р., Зварцев Р.В., Друцкая М.С. Экспериментальная модель легочного фиброза у мышей, индуцированная посредством аэрозольной доставки LPS // *оссийский иммунологический журнал*. – 2024. – Т. 27, № 2. – С. 145-150.
230. Frangogiannis N. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis // *J Exp Med*. – 2020. – Т. 217, № 3. – С. e20190103.
231. McGovern T. K., Robichaud A., Fereydoonzad L., Schuessler T. F., Martin J. G. Evaluation of respiratory system mechanics in mice using the forced oscillation technique // *J Vis Exp*. – 2013.10.3791/50172 № 75. – С. e50172.
232. Mufazalov I. A., Andruszewski D., Schelmbauer C., Heink S., Blanfeld M., Masri J., Tang Y., Schuler R., Eich C., Wunderlich F. T., Karbach S. H., Bluestone J. A., Korn T., Waisman A. Cutting Edge: IL-6-Driven Immune Dysregulation Is Strictly Dependent on IL-6R alpha-Chain Expression // *J Immunol*. – 2020. – Т. 204, № 4. – С. 747-751.
233. Knopp T., Jung R., Wild J., Bochenek M. L., Efentakis P., Lehmann A., Bieler T., Garlapati V., Richter C., Molitor M., Perius K., Finger S., Lagrange J., Ghasemi I., Zifkos K., Kommos K. S., Masri J., Reissig S., Randriamboavonjy V., Wunderlich T., Hovelmeyer N., Weber A. N. R., Mufazalov I. A., Bosmann M., Bechmann I., Fleming I., Oelze M., Daiber A., Munzel T., Schafer K., Wenzel P., Waisman A., Karbach S. Myeloid cell-derived interleukin-6 induces vascular dysfunction and vascular and systemic inflammation // *Eur Heart J Open*. – 2024. – Т. 4, № 4. – С. ocae046.
234. Р.В. Зварцев Д. С. К., Е.А. Горшкова, М.А. Носенко, К.В. Корнеев, О.Г. Максименко, И.В. Коробко, Д.В. Купраш, М.С. Друцкая, С.А. Недоспасов, А.В. Дейкин. Неонатальная смертность и воспалительный фенотип у новых трансгенных мышей со сверхэкспрессией интерлейкин-6 человека в миелоидных клетках // *Доклады академии наук*. – 2018. – Т. 483, № 4.
235. Горшкова Е.А. Зварцев Р. В., Друцкая М.С., Губернаторова Е.О. Гуманизированные мыши со сверхэкспрессией генов человека как инструмент изучения функций провоспалительных цитокинов // *Молекулярная биология*. – 2019. – Т. 53, № 5.
236. Wasbotten R. K., Dahler A. A., Mackel J. J., Morffy Smith C., Rosen D. A. Murine Respiratory Tract Infection with Classical *Klebsiella pneumoniae* Induces Bronchus-Associated Lymphoid Tissue // *Infect Immun*. – 2022. – Т. 90, № 4. – С. e0059621.
237. Menzies-Gow A., Corren J., Bourdin A., Chupp G., Israel E., Wechsler M. E., Brightling C. E., Griffiths J. M., Hellqvist A., Bowen K., Kaur P., Almqvist G., Ponnarambil S., Colice G. Tezepelumab in Adults and Adolescents with Severe, Uncontrolled Asthma // *N Engl J Med*. – 2021. – Т. 384, № 19. – С. 1800-1809.
238. Wenzel S. E., Barnes P. J., Bleecker E. R., Bousquet J., Busse W., Dahlen S. E., Holgate S. T., Meyers D. A., Rabe K. F., Antczak A., Baker J., Horvath I., Mark Z., Bernstein D., Kerwin E., Schlenker-Herceg R., Lo K. H., Watt R., Barnathan E. S., Chanez P., Investigators T. A. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of tumor necrosis factor-alpha blockade in severe persistent asthma // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2009. – Т. 179, № 7. – С. 549-58.
239. Губернаторова Е. О., Горшкова Е. А., Полинова А. И., Друцкая М. С. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2 // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2020. – Т. 53. – С. 13-24.
240. Kimura A., Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance // *Eur J Immunol*. – 2010. – Т. 40, № 7. – С. 1830-5.
241. Palmer D. C., Restifo N. P. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function // *Trends Immunol*. – 2009. – Т. 30, № 12. – С. 592-602.

242. Yang Y., Ochando J., Yopp A., Bromberg J. S., Ding Y. IL-6 plays a unique role in initiating c-Maf expression during early stage of CD4 T cell activation // *J Immunol.* – 2005. – Т. 174, № 5. – С. 2720-9.
243. Robinson M. B., Deshpande D. A., Chou J., Cui W., Smith S., Langefeld C., Hastie A. T., Bleecker E. R., Hawkins G. A. IL-6 trans-signaling increases expression of airways disease genes in airway smooth muscle // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2015. – Т. 309, № 2. – С. L129-38.
244. Namakanova O. A., Gorshkova E. A., Zvartsev R. V., Nedospasov S. A., Drutskaya M. S., Gubernatorova E. O. Therapeutic Potential of Combining IL-6 and TNF Blockade in a Mouse Model of Allergic Asthma // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Т. 23, № 7.
245. Namakanova O.A., Yakovleva A.S., Gubernatorova E.O., Pukhalskaia T.V., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. Immunometabolic properties of tissue-resident alveolar macrophages depend on ex vivo culturing conditions // *Biochemistry (Moscow).* – 2026. – Vol. – P. 358-368.
246. Топтыгина А. П. Тканерезидентные клетки иммунитета в гомеостазе и репарации тканей // *Медицинская иммунология.* – 2025. – Т. 27, № 3. – С. 475-484.
247. Lloyd C. M., Hessel E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Т. 10, № 12. – С. 838-48.
248. Choy D. F., Hart K. M., Borthwick L. A., Shikotra A., Nagarkar D. R., Siddiqui S., Jia G., Ohri C. M., Doran E., Vannella K. M., Butler C. A., Hargadon B., Sciurba J. C., Gieseck R. L., Thompson R. W., White S., Abbas A. R., Jackman J., Wu L. C., Egen J. G., Heaney L. G., Ramalingam T. R., Arron J. R., Wynn T. A., Bradding P. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma // *Sci Transl Med.* – 2015. – Т. 7, № 301. – С. 301ra129.
249. Lechner A., Henkel F. D. R., Hartung F., Bohnacker S., Alessandrini F., Gubernatorova E. O., Drutskaya M. S., Angioni C., Schreiber Y., Haimerl P., Ge Y., Thomas D., Kabat A. M., Pearce E. J., Ohnmacht C., Nedospasov S. A., Murray P. J., Chaker A. M., Schmidt-Weber C. B., Esser-von Bieren J. Macrophages acquire a TNF-dependent inflammatory memory in allergic asthma // *J Allergy Clin Immunol.* – 2022. – Т. 149, № 6. – С. 2078-2090.
250. Xue Y., Zhou Y., Bao W., Fu Q., Hao H., Han L., Zhang X., Tian X., Zhang M. STAT3 and IL-6 Contribute to Corticosteroid Resistance in an OVA and Ozone-induced Asthma Model with Neutrophil Infiltration // *Front Mol Biosci.* – 2021. – Т. 8. – С. 717962.
251. Urbano P. C. M., Aguirre-Gamboa R., Ashikov A., van Heeswijk B., Krippner-Heidenreich A., Tijssen H., Li Y., Azevedo V. F., Smits L. J. T., Hoentjen F., Joosten I., Koenen H. TNF-alpha-induced protein 3 (TNFAIP3)/A20 acts as a master switch in TNF-alpha blockade-driven IL-17A expression // *J Allergy Clin Immunol.* – 2018. – Т. 142, № 2. – С. 517-529.
252. Doherty T., Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma // *Curr Opin Immunol.* – 2007. – Т. 19, № 6. – С. 676-80.
253. 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. – Т. 134, № 3. – С. 663-670 e1.
254. McMillan S. J., Xanthou G., Lloyd C. M. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway // *J Immunol.* – 2005. – Т. 174, № 9. – С. 5774-80.
255. Chakir J., Shannon J., Molet S., Fukakusa M., Elias J., Laviolette M., Boulet L. P., Hamid Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression // *J Allergy Clin Immunol.* – 2003. – Т. 111, № 6. – С. 1293-8.
256. Drutskaya M. S., Nosenko M. A., Gorshkova E. A., Mokhonov V. V., Zvartsev R. V., Polinova A. I., Kruglov A. A., Nedospasov S. A. Effects of myeloid cell-restricted TNF inhibitors in vitro and in vivo // *J Leukoc Biol.* – 2020. – Т. 107, № 6. – С. 933-939.
257. Weiskirchen R., Weiskirchen S., Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications // *Mol Aspects Med.* – 2019. – Т. 65. – С. 2-15.
258. B B. M., Lawson W. E., Oury T. D., Sisson T. H., Raghavendran K., Hogaboam C. M. Animal models of fibrotic lung disease // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2013. – Т. 49, № 2. – С. 167-79.

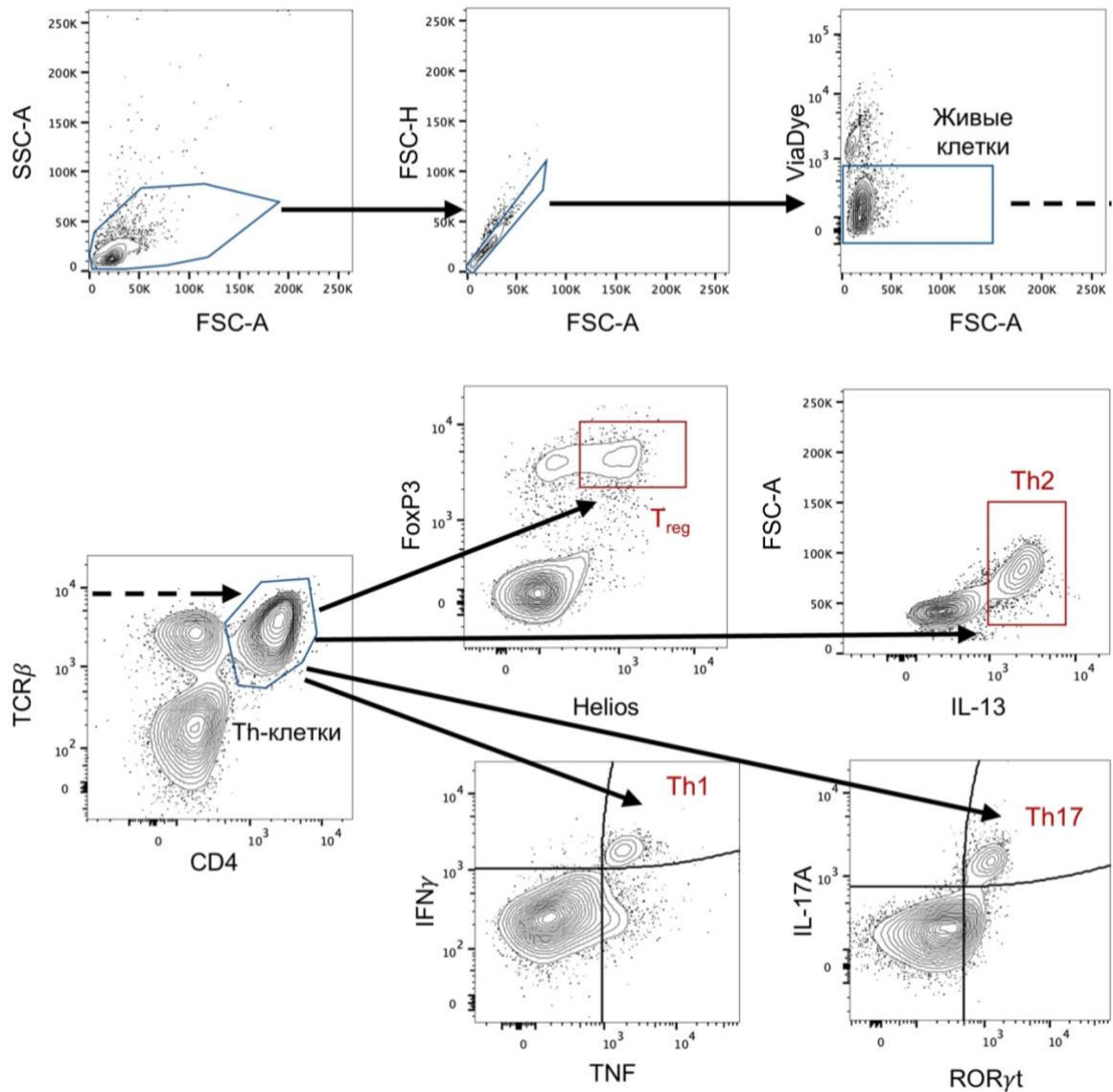
259. Jenkins R. G., Moore B. B., Chambers R. C., Eickelberg O., Konigshoff M., Kolb M., Laurent G. J., Nanthakumar C. B., Olman M. A., Pardo A., Selman M., Sheppard D., Sime P. J., Tager A. M., Tatler A. L., Thannickal V. J., White E. S., Cell A. T. S. A. o. R., Molecular B. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2017. – T. 56, № 5. – C. 667-679.
260. Degryse A. L., Tanjore H., Xu X. C., Polosukhin V. V., Jones B. R., McMahon F. B., Gleaves L. A., Blackwell T. S., Lawson W. E. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2010. – T. 299, № 4. – C. L442-52.
261. Miles T., Hoyne G. F., Knight D. A., Fear M. W., Mutsaers S. E., Prele C. M. The contribution of animal models to understanding the role of the immune system in human idiopathic pulmonary fibrosis // *Clin Transl Immunology.* – 2020. – T. 9, № 7. – C. e1153.
262. Kolb P., Upagupta C., Vierhout M., Ayaub E., Bellaye P. S., Gauldie J., Shimbori C., Inman M., Ask K., Kolb M. R. J. The importance of interventional timing in the bleomycin model of pulmonary fibrosis // *Eur Respir J.* – 2020. – T. 55, № 6.
263. Saito F., Tasaka S., Inoue K., Miyamoto K., Nakano Y., Ogawa Y., Yamada W., Shiraishi Y., Hasegawa N., Fujishima S., Takano H., Ishizaka A. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2008. – T. 38, № 5. – C. 566-71.
264. Kobayashi T., Tanaka K., Fujita T., Umezawa H., Amano H., Yoshioka K., Naito Y., Hatano M., Kimura S., Tatsumi K., Kasuya Y. Bidirectional role of IL-6 signal in pathogenesis of lung fibrosis // *Respir Res.* – 2015. – T. 16, № 1. – C. 99.
265. Voiriot G., Razazi K., Amsellem V., Tran Van Nhieu J., Abid S., Adnot S., Mekontso Dessap A., Maitre B. Interleukin-6 displays lung anti-inflammatory properties and exerts protective hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury // *Respir Res.* – 2017. – T. 18, № 1. – C. 64.
266. Lokau J., Garbers Y., Vicente M. M., Dittrich A., Meltendorf S., Lingel H., Munster-Kuhnel A. K., Brunner-Weinzierl M., Garbers C. Long-term increase in soluble interleukin-6 receptor levels in convalescents after mild COVID-19 infection // *Front Immunol.* – 2024. – T. 15. – C. 1488745.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Стратегия выделения различных популяций иммунных клеток с помощью проточной цитометрии



**Рисунок 1. Стратегия выделения популяций гранулоцитов с помощью цитофлуориметрического анализа.** Клетки бронхоальвеолярной жидкости, легких и селезенки окрашивали антителами к CD45, SiglecF, CD11c, Ly6G и CD11b. Для выделения живых клеток использовали краситель ViabilityDye. Эозинофилы определяли как VD<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>, нейтрофилы VD<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, альвеолярные макрофаги VD<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения FlowJo Software. Eos – эозинофилы, Neu – нейтрофилы, AM – альвеолярные макрофаги.



**Рисунок 2. Стратегия выделения субпопуляций Th-клеток в легких, селезенке и лимфоузлах с помощью цитофлуориметрического анализа. Для выделения живых клеток использовали краситель ViabilityDye. Treg-клетки определяли как  $VD^-TCR\beta^+CD4^+FoxP3^+HELIOS^+$ , Th17-клетки  $VD^-TCR\beta^+CD4^+IL-17A^+ROR\gamma t^+$ , Th1-клетки  $VD^-TCR\beta^+CD4^+TNF^+IFN\gamma^+$  и Th2-клетки  $VD^-TCR\beta^+CD4^+IL-13^+$ . Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения FlowJo Software.**