

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Лебеденко А.А.¹, Афонин А.А.¹, Семерник О.Е.¹, Логинова И.Г.¹, Гунько В.О.¹, Ларичкин А.В.¹, Аллилуев И.А.², Галкина Г.А.¹, Панова И.В.¹

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ – НОВЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

¹ФГБУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;

²ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», 344006, Ростов-на-Дону, Россия

В настоящее время бронхиальная астма (БА) является одной из самых актуальных медицинских и социальных проблем, молекулярные аспекты формирования и развития которой недостаточно изучены, а диагностика несовершенна. Проведение протеомного анализа при БА позволит не только выявить новые биомаркеры, специфичные для данного заболевания, но и приблизиться к пониманию его патогенетических механизмов.

Цель исследования: изучить протеомный профиль сыворотки крови детей с БА для выявления белков, ассоциированных с данным заболеванием.

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование детей, страдающих БА, и пациентов контрольной группы. Протеомный анализ обедненной сыворотки крови включал высокоразрешающий двухмерный электрофорез (1 направление: иммобилиновые стрипы 17 см, pH 3-10, 2-направление: денатурирующий электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле), окраску белковых пятен на гелях флуоресцентным красителем Flamingo, идентификацию белков методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии при помощи поискового алгоритма Mascot и базы данных Swiss-Prot. Сопоставление протеомного профиля сыворотки крови больных БА и пациентов контрольной группы позволило установить, что продукция ряда белков снижена при указанной патологии. Среди них были идентифицированы белки в диапазоне молекулярных масс 16-33 кДа ($p < 0,05$): глутатионпероксидаза 3, транстиретин, компоненты комплемента C4b и C3. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при БА происходят изменения в протеоме сыворотки крови детей, затрагивающие белки, которые играют важную роль в иммунных реакциях, транспорте лигандов и антиоксидантной защите. Особое внимание следует уделить идентифицированным в ходе данной работы белкам-отличиям (глутатионпероксидазе, транстиретину, C3 и C4b фрагментам системы комплемента) или их комбинациям. Изучение особенностей их экспрессии позволит расширить наши представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе хронического воспаления при данном заболевании.

Ключевые слова: протеомный анализ; бронхиальная астма; диагностика; дети; белки-маркеры; сыворотка крови.

Для цитирования: Лебеденко А.А., Афонин А.А., Семерник О.Е., Логинова И.Г., Гунько В.О., Ларичкин А.В., Аллилуев И.А., Галкина Г.А., Панова И.В. Протеомный анализ сыворотки крови – новый подход к поиску диагностических маркеров бронхиальной астмы у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 81-84. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-81-84>

Для корреспонденции: Семерник Ольга Евгеньевна, канд. мед. наук, доц. каф. детских болезней № 2; e-mail: semernick@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.04.2021

Принята к печати 23.07.2021

Опубликовано 23.02.2022

Lebedenko A.A.¹, Afonin A.A.¹, Semernik O.E.¹, Loginova I.G.¹, Gunko V.O.¹, Larichkin A.V.¹, Alliluyev I.A.², Galkina G.A.¹, Panova I.V.¹

PROTEOMIC ANALYSIS OF BLOOD SERUM – A NEW APPROACH TO THE SEARCH FOR DIAGNOSTIC MARKERS OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

¹Rostov State Medical University, 344012, Rostov-on-Don, Russia ;

²Southern State University, 344006, Rostov-on-Don, Russia

Currently, bronchial asthma (BA) is one of the most pressing medical and social problems, the molecular aspects of the formation and development of BA are insufficiently studied and the diagnosis is not perfect. Carrying out proteomic analysis of BA will not only reveal new biomarkers specific to this disease, but also bring us closer to understanding its pathogenetic mechanisms. The purpose of the study: to study the proteomic profile of blood serum of children with BA to identify proteins associated with this disease

A comprehensive clinical and laboratory examination of children suffering from BA and control group patients was performed. Proteomic analysis of depleted blood serum included high-resolution two-dimensional electrophoresis (1 direction: immobilized strips 17cm, pH 3-10, 2 direction: denaturing electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gel), protein staining on gels with fluorescent dye Flamingo, protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry using the search algorithm Mascot and the Swiss-Prot database. Comparison of the proteomic profile of BA serum and the control group patients serum allowed us to establish that the production of a number of proteins is reduced in this pathology. Among them, proteins in the molecular weight range of 16-33 kDa ($p < 0.05$) were identified: glutathione peroxidase 3, transthyretin, complement components C4b and C3. Research shows that changes in the children's serum proteome occur in BA, affecting proteins that play an important role in immune responses, ligand transport, and antioxidant protection. Special attention should be paid to the differences identified in the course of this work (glutathione peroxidase, transthyretin, C3 and C4 fragments of the complement system) or their combinations. Studying the features of their expression will expand our understanding of the molecular mechanisms underlying chronic inflammation of this disease.

Key words: proteomic analysis; bronchial asthma; diagnostics; children; protein markers; blood serum.

For citation: Lebedenko A.A., Afonin A.A., Semernik O.E., Loginova I.G., Gunko V.O., Larichkin A.V., Alliluyev I.A., Galkina G.A., Panova I.V. Proteomic analysis of blood serum – a new approach to the search for diagnostic markers of bronchial asthma in children. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 81-84 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-81-84>

Information about authors:

Lebedenko A.A.,	https://orcid.org/0000-0003-4525-1500 ;	Larichkin A.V.,	https://orcid.org/0000-0002-1207-0554 ;
Afonin A.A.,	https://orcid.org/0000-0003-1078-8391 ;	Alliluyev I.A.,	https://orcid.org/0000-0001-7654-0650 ;
Semernik O.E.,	http://www.orcid.org/0000-0002-3769-8014 ;	Galkina G.A.,	https://orcid.org/0000-0001-6809-0995 ;
Loginova I.G.,	https://orcid.org/0000-0001-7718-3528 ;	Panova I.V.,	https://orcid.org/0000-0001-5068-7136 .
Gunko V.O.,	https://orcid.org/0000-0001-8607-9052 ;		

For correspondence: Semernik Olga, PhD, associate professor of the Children's diseases № 2 Department; e-mail: semernick@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.04.2021

Accepted 23.07.2021

Published 23.02.2022

Введение. Бронхиальная астма (БА) в настоящее время является одной из самых актуальных медицинских и социальных проблем, имеющих важное практическое значение. По распространенности, тяжести течения, сложности диагностики и терапии, затратам на лечение данная нозология занимает ведущее место среди других хронических неинфекционных заболеваний. В разных странах БА болеют от 4 до 35% населения [1]. В России заболеваемость среди детей варьирует от 1 до 10% [2]. В основе этой патологии лежит хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором играют роль многие клетки и клеточные элементы, а именно: тучные клетки, эозинофилы и Т-лимфоциты [2]. Кроме того, БА включает сложные взаимодействия различных факторов на молекулярном уровне, что затрудняет понимание ее патогенеза. В отличие от моногенных заболеваний, мультифакториальные заболевания вызываются не самостоятельно функционирующими белками, а постоянно взаимодействующими белковыми сетями [3]. Сыворотка крови содержит динамическую совокупность белков, синтезируемых тканями и клетками организма, которые опосредуют гомеостаз через регуляцию межклеточной коммуникации, иммунных реакций, функций сосудистых и эндотелиальных клеток, ремоделирования тканей и т.д. Сывороточные белки и другие циркулирующие факторы могут непосредственно регулировать работу сложных сигнальных сетей, координирующих развитие и прогрессирование БА.

Среди современных методических подходов молекулярной медицины именно протеомный анализ позволяет одновременно анализировать всю совокупность белков в исследуемом образце и определять белковые профили (паттерны), характерные для того или иного заболевания [4]. В связи с этим, проведение протеомных исследований сыворотки крови у больных, страдающих БА, позволит не только выявить информативные маркеры хронического аллергического воспаления и новые терапевтические мишени, но и приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе данного заболевания у детей.

Цель исследования: изучить протеомный профиль сыворотки крови детей с БА для выявления белков, ассоциированных с данным заболеванием.

Материал и методы. Проведено проспективное обследование 8 больных с тяжелым неконтролируемым течением БА. Диагноз верифицирован на основании Национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактики» [2]. Для каждого больного был подобран в пару идентичный по полу, возрасту ребе-

нок I группы здоровья, не имеющийотягощенного личного и семейного аллергического анамнеза. Средний возраст обследованных пациентов составил 11,44±4,67 лет.

Критериями включения в данное исследование были: наличие подтвержденного диагноза БА, отсутствие сопутствующей хронической патологии со стороны других органов и систем, возраст младше 18 лет. Критерии исключения: наличие установленных хронических и острых заболеваний бронхолегочной системы (туберкулез, острый трахеобронхит, пневмония и др.), возраст пациентов старше 18 лет, отсутствие подписанного информированного согласия.

Комплексное клинико-лабораторное обследование детей, включающее сбор анамнестических данных, оценку физического состояния, определение общего и специфических IgE, а также исследование функции внешнего дыхания с применением пикфлоуметрии, спирометрии и бодиплетизмографии. Все исследования выполнены по стандартным методикам. Также всем детям проведено исследование протеомного профиля сыворотки крови, включающее высокоразрешающий электрофорез и времяпролетную масс-спектрометрию.

Взятие крови у пациентов проводили натощак из вены (4 мл) в пробирки с активатором свертывания. Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин (1600g), полученную сыворотку аликвотировали и хранили в присутствии коктейля ингибиторов протеаз («Thermo Fisher Scientific», США) при -86°C до проведения исследования. Перед использованием образцы размораживали при комнатной температуре в течение 15 мин и немедленно обрабатывали. Обеднение сыворотки (удаление альбумина и иммуноглобулина G) проводили с использованием наборов Aurum Serum Protein Mini Kit (Bio-Rad, США) согласно протоколу фирмы производителя. Затем обедненные образцы концентрировали и обессоливали на пористых фильтрах Amicon Ultra 10kDa (Millipore, США). Определение белка в образцах проводили по методу Брэдфорд [5]. Загрузка белка на 1 гель составляла 125 мкг.

Разделение белков сыворотки проводили методом двумерного электрофореза (2Д-ЭФ) [6]. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) осуществляли с использованием иммобилизованных стрипов с линейным градиентом pH (17 см, pH=3-10, Ready Strip IPG Strips, «Bio-Rad», США) на приборе Protein IEF Cell («Bio-Rad», США). Буфер для ИЭФ включал 7М мочевины, 2М тиомочевину, 1% дитиотреитол, 1% амфолиты 3-10, 4% CHAPS, 0,05% бромфеноловый синий («Bio-Rad», США). Программа ИЭФ,

после пассивной регидратации образцов течение 15 ч при 20°C, включала следующие этапы: 250 В быстро – 30 мин, до 10000 В линейно – 2 ч, до достижения общих 45000 В×ч быстро, 1000 В быстро – удержание. Вертикальный электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях проводили в камере Protean II xi Multi-Cell (Bio-Rad, США) при силе тока 40 мА на гель в течение 5 часов. В качестве стандартов молекулярных масс использовали набор белков SDS-PAGE Standard (Bio-Rad, США).

Для визуализации белковых зон (после завершения 2-го направления 2Д-ЭФ) гели окрашивали флуоресцентным красителем Flamingo (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя, а затем сканировали на приборе Chemidoc MP (Bio-Rad, США). Анализ изображений гелей, включающий сопоставление пятен на электрофореграммах, полученных от разных образцов, проводился с помощью специального программного обеспечения PDQuest, версия 8.0.1. (Bio-Rad, США).

Участки ПААГ-геля, содержащие интересующие белки, вырезали и подвергали трипсинолизу согласно методике [7] и смешивали с матрицей – 2,5-дигидроксibenзойной кислотой (Bruker, Германия). Масс-спектры триптических гидролизатов белков были получены на MALDI-TOF-масс-спектрометре Microflex LRF (Bruker, Германия). Для получения и анализа масс-спектров использовали программы FlexControl версии 3.4 и FlexAnalysis версии 3.4 (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации белков использовали программу BioTools версии 3.2 (Bruker, Германия), по масс-листу каждого белкового пятна проводили поиск соответствующих кандидатов в базе данных Swiss-Prot (2013_12) с использованием локальной версии программы Mascot Search 2.4.1 (Matrix Science, США), принимая точность определения массы ионов равной 0,01%, таксон Homo sapiens, одно пропущенное расщепление, модификации: окисление метионинов и алкилирование цистеинов ацетамидом. Достоверным считали идентификацию белка с индексом достоверности идентификации – Score > 50 и при проценте покрытия аминокислотной последовательности белка по базам данных совпадающими пептидами – Sequence Coverage > 15%.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica (версия 6.0 фирмы «StatSoft Inc.»). Степень соответствия закона распределения данных нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. При анализе частоты встречаемости белков в сыворотке пациентов двух групп использовали критерий χ^2 -критерий (для таблиц 2x2 – в точном решении Фишера). Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты. Сопоставление протеомного профиля сыворотки крови пациентов контрольной и основной групп позволило выявить четыре белка отличия с молекулярными массами в диапазоне 16-33 кДа, уровень которых снижен при БА ($p < 0,05$): глутатионпероксидаза 3 (GPX3), транстиретин (TTNY), компоненты компонента C4b и C3 (см. таблицу).

Обсуждение. Оценив основные функции выявленных белковых молекул, можно предположить к каким изменениям в патогенезе БА приведет снижение их экспрессии.

Идентифицированная нами глутатионпероксидаза 3 – основной селенозависимый антиоксидантный фермент, осуществляющий защиту эпителия трахеи, бронхов и альвеол от окислительного повреждения. Для функционирования GPX3 необходимо поддержание концентрации восстановленной формы глутатиона (GSH) – ключевого компонента редокс-буферной системы, который обеспечивает устойчивое поддержание тиол-дисульфидного равновесия и антиоксидантной защиты внутри клетки [8].

Кроме того, в исследованиях, проведенных К. Seki и соавт. [9], было показано, что FceRI-опосредованное высвобождение лейкотриенов LTC₄ из тучных клеток в основном регулируется количеством внутриклеточного GSH. Авторы сделали вывод о том, что окислительный стресс значительно повышает содержание глутатиона в клетках бронхолегочной системы, запуская тем самым не только воспалительную реакцию, но и лейкотриен-опосредованное сокращение гладкой мускулатуры бронхов.

Установленное уменьшение уровня GPX3 у пациентов основной группы, очевидно, свидетельствует об истощении резервов антиоксидантной системы на фоне избыточного накопления активных форм кислорода, что создает условия для перенапряжения системы редокс-гомеостаза и дальнейшего развития окислительного стресса – одного из ключевых звеньев патогенеза БА, а также может усиливать вторичные патологические изменения дыхательных путей и лёгочной ткани на фоне уже сформировавшегося заболевания [10].

В свою очередь, изменение баланса между восстановленной и окисленной формой глутатиона вследствие нарушения активности и/или экспрессии ферментов, вовлеченных в его метаболизм, в частности GPX3, может нарушать рецептор-индуцированную и опосредованную АФК передачу сигналов, контролирующую иммунные и воспалительные реакции в бронхолегочной системе, что, очевидно, имеет немаловажное значение в патогенезе БА [11].

Основной функцией транстиретина является транспорт тироксина и витамина А, связанного с ретинол-связывающим белком (РСБ), к периферическим тканям. Связывание с транстиретином стабилизирует комплекс ретинола с РСБ, тем самым уменьшая почечную фильтрацию последнего и обеспечивая его рециркуляцию после того, как ретинол будет доставлен в клетки [12].

Белки отличия сыворотки крови, ассоциированные с бронхиальной астмой

Название белка (ID)	№ в Swiss-Prot	Мг, кДа	pI	Score	Sequence coverage	Число пептидов, вошедших в идентификацию	Биологический процесс
Глутатионпероксидаза 3	P22352	25,8	9,1	67,3%	37,6	9	Антиоксидантная защита
Транстиретин	P02766	16	5,4	68,7%	129	8	Транспорт лигандов
Компонент компонента C4b	P0C0L5	32,6	6,4	74,1	67,2	10	Активация системы компонента
Компонент компонента C3	P01024	21,6	6,1	113	15,4	12	Активация системы компонента

Примечание. ID – аббревиатура названия белков в соответствии с базами данных; Мг – молекулярная масса белков; pI – изоэлектрическая точка белков.

Экспрессия ТТНУ подавляется под действием сигналов воспалительных цитокинов во время острой фазы воспаления [13], а также снижение уровня этого внеклеточного белка установлено при системном воспалении [14].

Сниженное содержание транстретина в сыворотке крови пациентов основной группы, по-видимому, может способствовать высвобождению переносимых им лигандов, создавая их свободные пулы, опосредуя гиперригидные и гиперретиноидные состояния. Несвязанные формы ретиноидов, избыток которых преимущественно накапливается в легочной ткани, обладают мембраноповреждающим действием, усиливают разобщенность клеток и их гибель, что в свою очередь, приводит к активации процессов пролиферации и регенерации эпителиальных тканей и, как следствие, ремоделированию бронхов при БА [15]. Физиологические дозы витамина А и его производных модулируют дифференцировку эпителиальных Т-клеток, регуляцию и созревание В-клеток, в частности, через стимуляцию цитокинов, Т-киллеров и баланс между Th-1 и Th-2 типами Т-клеток. Однако, избыток ретиноидных соединений, высвобождаемых в свободной форме, способен стимулировать киллерную активность и пролиферацию Т-лимфоцитов, изменяя субпопуляционные соотношения этих клеток в сторону преобладания Т-хелперов, играющих ключевую роль в патогенезе БА [16].

Выявленные в нашем исследовании компоненты комплемента C3 и C4b являются важным участниками каскада комплемента, обеспечивая гуморальную защиту организма от действия чужеродных агентов, т.е. реализации иммунного ответа организма человека. Экспрессия этих белков значительно изменяется в сыворотке крови при воспалении и повреждении тканей [17]. Помимо печени, клетки легких альвеолярного типа II продуцируют C4 и C3, последний также синтезируется и секретируется бронхиальными эпителиальными клетками [18]. Активация C3 – центрального фактора комплемента, который участвует как в классическом, так и альтернативном пути, – происходит под действием C3-конвертазы с образованием фрагментов C3b и C3a, обладающих свойствами анафилатоксина и хемотаксина. В результате активации компонента C4 образуется крупный опсонизирующий фрагмент C4b, непосредственно присоединяющийся к мембране клетки-мишени или антителу. Установлено, что биодоступность компонента C4b, может ограничиваться C4b-связывающим белком, который лимитирует его функцию [19].

Снижение содержания данных фракций комплемента в сыворотке крови больных БА может быть связано с их избыточным потреблением при сверхактивации системы комплемента в периоде обострения заболевания и свидетельствует об истощении защитных функций организма ребенка, страдающего БА.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при БА происходят изменения в протеоме сыворотки крови детей, затрагивающие белки, которые играют важную роль в иммунных реакциях, транспорте лигандов и антиоксидантной защите. Идентифицированные в ходе данной работы белки (глутатионпероксидаза, транстретин, C3 и C4b фрагменты системы комплемента) представляют большой научный и практический интерес. Исследование данных молекул достаточно перспективно и позволяет использовать протеомный анализ сыворотки крови для поиска новых диагностических маркеров бронхиальной астмы у детей. А изучение особенностей их экспрессии позволяет расширить наши представления о мо-

лекулярных механизмах, лежащих в основе хронического воспаления при данном заболевании.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3-9, 11-24, 26-28 см. REFERENCES)

2. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» 5-е изд., испр. и доп. М.: Атмосфера; 2017.
10. Полоников А.В., Иванов В.П., Богомазов А.Д., Солодилова М.А. Генетико-биохимические механизмы вовлеченности ферментов антиоксидантной системы в развитии бронхиальной астмы. *Биомедицинская химия*. 2015; 61(4): 427-39. DOI: 10.18097/PBMC20156104427.

REFERENCES

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2020 update). Available at: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_final_wms.pdf.
2. National program «Bronchial asthma in children. The strategy of treatment and prevention» 5th ed. [Natsional'naya programma «Bronkhal'naya astma u detey. Strategiya lecheniya i profilaktika» 5th ed.]. Moscow: Atmosfera; 2017. (in Russian)
3. Emilsson V., Ilkov M., Lamb J.R., Finkel N., Gudmundsson E.F., Pitts R. et al. Co-regulatory networks of human serum proteins link genetics to disease. *Science*. 2018; 361(6404): 769-73. DOI: 10.1126/science.aag1327.
4. Priyadharshini V.S., Teran L.M. Personalized Medicine in Respiratory Disease: Role of Proteomics. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2016; 102: 115-46. DOI: 10.1016/bs.apesb.2015.11.008.
5. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–54.
6. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996; 68: 850-8.
7. Görg A., Boguth G., Obermaier C., Posch A., Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*. 1995; 16: 1079-86.
8. Sahiner U.M., Birben E., Erzurum S., Sackesen C., Kalayci Ö. Oxidative stress in asthma: Part of the puzzle. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2018; 29(8): 789-800. DOI: 10.1111/pai.12965.
9. Seki K., Hisada T., Kawata T., Kamide Y., Dobashi K., Yamada M. et al. Oxidative stress potentially enhances FcεRI-mediated leukotriene C4 release dependent on the late-phase increase of intracellular glutathione in mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 27; 439(3): 357-62. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.081.
10. Polonikov A.V., Ivanov V. P., Bogomazov A.D., Solodilova M.A. Genetic and biochemical mechanisms of involvement of antioxidant system enzymes in the development of bronchial asthma. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015; 61(4): 427-39. DOI: 10.18097/PBMC20156104427. (in Russian)
11. Hoffman S., Nolin J., McMillan D., Wouters E., Janssen-Heininger Y., Reynaert N. Thiol redox chemistry: role of protein cysteine oxidation and altered redox homeostasis in allergic inflammation and asthma. *J. Cell Biochem.* 2015; 116(6): 884-92. DOI: 10.1002/jcb.25017.
12. Li Y., Wongsirirong N., Blaner W.S. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2014; 3(3): 126-39. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.05.04.
13. Berry D.C., Croniger C.M., Ghyselinck N.B., Noy N. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol. Cell Biol.* 2012; 32(19): 3851-9. DOI: 10.1128/MCB.00775-12.
14. Schofield J.P.R., Burg D., Nicholas B., Strazzeri F., Brandsma J., Staykova D. et al. Stratification of asthma phenotypes by airway proteomic signatures. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019; 144(1): 70-82. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.03.013.
15. Marquez H.A., Cardoso W.V. Vitamin A-retinoid signaling in pulmonary development and disease. *Mol. Cell Pediatr.* 2016; 3(1): 28. DOI: 10.1186/s40348-016-0054-6.
16. Huang Z., Liu Y., Qi G., Brand D., Zheng S.G. Role of Vitamin A in the Immune System. *J. Clin. Med.* 2018; (9)6: pii: E258. DOI: 10.3390/jcm7090258.
17. Kulkarni H.S., Liszewski M.K., Brody S.L., Atkinson J.P. The complement system in the airway epithelium: An overlooked host defense mechanism and therapeutic target? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018; 141(5): 1582-1586.e1. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.11.046.
18. Pandya P.H., Wilkes D.S. Complement system in lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2014; 51(4): 467-73. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0485TR.
19. Ermert D., Blom A.M. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol. Lett.* 2016; 169: 82-92. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.11.014.