Отзыв

официального оппонента Козлова Ивана Генриховича на диссертацию Никольского Александра Аркадьевича «Роль экспрессии гена *Stat3* в нейтрофильном воспалении при бронхиальной астме» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Аллергология и иммунология»

Актуальность темы диссертации

Бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных заболеваний, связанных с воспалением дыхательных путей, приводящим к ухудшению качества жизни и снижению работоспособности. Для лечения БА применяют различные медикаментозные средства (β2-агонисты, глюкокортикостероиды, антилейкотриеновые препараты и др.), а также аллерговакцины для проведения аллерген-специфической иммунотерапии. Однако применение этих средств ограничено и не всегда эффективно. В связи с этим актуальным является поиск и разработка новых подходов и препаратов для лечения БА, основанных на знании ключевых аспектов патогенеза заболевания. К таким подходам можно отнести использование интерференции РНК для регуляции экспрессии патогенетически значимых генов. Препараты на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) обладают высокой специфичностью и эффективностью, однако их применение ограничивается трудностями при доставке к месту патологическоо процесса.

Диссертационная работа Никольского А.А. посвящена изучению роли гена *Stat3* в нейтрофильном воспалении при БА (НВБА), а также разработке и исследованию комплексного препарата, включавшего миРНК, способные влиять на экспрессию гена *Stat3*, и носитель для адресной доставки. Работа актуальна и проведена на современно научно-методическом уровне.

Основные результаты диссертационной работы

В работе была использована модель БА с нейтрофильным воспалением (НВБА) у мышей линии BALB/c. Мышей иммунизировали овальбумином и

адъювантом Фрейнда, а затем проводили аэрозольную провокацию этим же аллергеном, смешанным с липополисахаридом *E. coli*.

Для терапии НВБА были спроектированы молекулы миРНК, специфически подавляющие экспрессию гена *Stat3* как *in vitro*, так и *in vivo*. Было спроектировано 5 вариантов молекул миРНК, каждая из которых состоит из двух РНК-олигонуклеотидов – смыслового и антисмыслового. После тестирования их активности был определен наиболее активный вариант миРНК – siSTAT3-1426, который использовался в экспериментах *in vivo*.

Молекулы миРНК не могут проникнуть самостоятельно в цитоплазму клеток, поэтому был применен катионный дендримерный пептид LTP, который способен доставлять нуклеиновые кислоты (включая миРНК) в различные типы клеток млекопитающих. Для доставки молекул оптимальное соотношение компонентов составило 1/12,5 по массе.

В исследованиях *in vivo* было показано, что пятикратное ингаляционное введение комплекса siSTAT3/LTP приводило к снижению уровня экспрессии гена *Stat3* в клетках бронхоальвеолярного лаважа и оказывало влияние на различные проявления патологии, включая уменьшение количества нейтрофилов, снижение ремоделирования бронхов, а также снижение экспрессии генов Th17-цитокинов *Il17a* и *Il17f*. Однако комплекс не влиял на гиперреактивность бронхов и концентрацию IgE и IgG1 в сыворотке крови, что свидетельствует об отсутствии участия гена *Stat3* в формировании Th2-иммунного ответа.

Таким образом, была создана модель, имитирующая резистентную к кортикостероидам НВБА, и показано, что локальное подавление экспрессии *Stat3* молекулами миРНК приводит к уменьшению Th17-зависимого нейтрофильного воспаления у экспериментальных животных.

Достоверность результатов

Результаты экспериментов получены на сертифицированном, калиброванном оборудовании и воспроизведены минимум в трех независимых

повторах. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны. Выводы обоснованы результатами исследований.

Научная новизна диссертационной работы

Впервые был описан способ индукции НВБА у мышей с последующей оценкой основных проявлений заболевания. В эксперименте было показано, что признаки заболевания у мышей формировались в ответ на определенную последовательность введения модельного аллергена – овальбумина, в смеси с адъювантом Фрейнда и липополисахаридом *E. coli*.

Автор впервые разработал молекулы миРНК в комплексе с пептидным носителем, эффективно подавляющие экспрессию гена *Stat3*, а также изучил биологическую активность этого комплекса *in vitro* и *in vivo*.

Впервые продемонстрировано, что ингаляционное введение созданного иммунобиологического комплекса, содержащего молекулы миРНК против гена *Stat3*, приводит к существенному подавлению проявлений НВБА у мышей.

Впервые изучена взаимосвязь между процессом подавления экспрессии гена *Stat3* с помощью синтетических молекул миРНК и степенью проявления признаков БА. Показано, что в результате пятикратного ингаляционного введения комплекса миРНК/LTP происходит восстановление толщины стенок бронхов и снижение уровня провоспалительных клеток (нейтрофилов) в бронхоальвеолярном лаваже и ткани легких экспериментальных животных.

Таким образом, впервые экспериментально доказана возможность применения интерференции РНК в качестве подхода для терапии НВБА.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Данное исследование выявило новые механизмы развития НВБА, что имеет важное значение в понимании патогенеза данного заболевания. Результаты исследования указывают на то, что устранение патологических изменений в легких может быть достигнуто различными способами.

Во-первых, это может быть достигнуто путем ингибирования экспрессии гена *Stat3* в Th17-клетках легких с помощью молекул миРНК, что приводит к уменьшению продукции цитокинов, способствующих формированию нейтрофильного воспаления. Во-вторых, ингибирование экспрессии гена *Stat3* может происходить путем ингаляционной доставки молекул миРНК в альвеолярные макрофаги и фибробласты, что снижает проявления ремоделирования бронхов. В-третьих, молекулы миРНК могут ингибировать экспрессию гена *Stat3* в эндотелиальных клетках, что снижает количество провоспалительных клеток в легких.

Полученные результаты помогут лучше понимать роль гена *Stat3* в патогенезе БА с нейтрофильным типом воспаления.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Созданная автором экспериментальная модель на мышах, которая имитирует кортикостероид-резистентную нейтрофильную БА, имеет научно-практическую значимость для углубленного исследования патогенеза заболевания. Представленный автором протокол обеспечивает возможность вызывать у мышей характерные признаки данной патологии, включая нейтрофильное воспаление, что происходит по Th17-зависимому механизму. Модель может быть использована в практических целях для проверки безопасности и эффективности новых методов лечения заболевания.

Результаты исследования важны в контексте разработки инновационных подходов к терапии кортикостероид-резистентной НВБА. В частности, на модели показано, что локальное подавление экспрессии гена *Stat3* в легочной ткани с помощью скитнических молекул миРНК существенно снижает нейтрофильное воспаление в легких.

Важным научно-практическим результатом исследования является создание комплекса миРНК/LTP, обладающего способностью адресной доставки миРНК в различные клетки и блокирования экспрессии гена *Stat3*, что делает его перспективной основой для разработки средств лечения ряда

заболеваний, связанных с изменением экспрессии генов, в том числе онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний.

Результаты исследования могут быть использованы для разработки новых методов терапии кортикостероид-резистентной НВБА, а также применены в дальнейших исследованиях молекулярных основ патогенеза иммунозависимых заболеваний.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы содержит 228 работ, в том числе 30 отечественных и 198 зарубежных. В диссертации 4 таблицы и 24 рисунка.

Во «Введении» освещено обоснование выбора темы, описана целесообразность проведения данного исследования.

«Обзор литературы» написан грамотно, изложены особенности разных фенотипов БА, роль клеток, цитокинов, молекулярных факторов, в т.ч. транскрипционного фактора STAT3, в патогенезе нейтрофильной астмы, используемые в настоящее время подходы к терапии БА. В конце главы сформулированы цель и задачи работы.

В главе «Материалы и методы» подробно охарактеризованы экспериментальные животные, представлены протоколы создания экспериментальной модели, приведены схемы экспериментов по моделированию БА, особенности проектирования миРНК и скрининга ее активности *in vitro* и *in vivo*, а также клеточные, молекулярные и функциональные методы оценки состояния экспериментальных животных. Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных методов исследования.

Результаты собственных исследований изложены подробно, последовательно и логично, проиллюстрированы достаточным количеством

таблиц и рисунков. Автором была создана экспериментальная модель, иммитирующая НВБА, спроектированы и синтезированы молекулы миРНК способные подавлять экспрессию гена *Stat3*, участвующего в патогенезе НВБА, синтезирован катионный дендримерный пептид, способный выступать в качестве проводника для молекул миРНК. С помощью созданной модели продемонстрировано, что пятикратное ингаляционное введение комплекса приводит к снижению степени проявления основных признаков заболевания: восстановлению толщины стенки бронхов, снижению количества провоспалительных клеток (нейтрофилов) в бронхоальвеолярном лаваже и ткани легких экспериментальных животных.

Анализ, проведенный в главе «Обсуждение», позволил автору всесторонне оценить перспективность применения интерференции РНК в качестве инновационного подхода к терапии кортикостероид-резистентной БА с нейтрофильным воспалением и доказать, что *Stat3* может служить перспективной биомишенью для создания новых средств терапии БА с нейтрофильным типом воспаления. В «Заключении» автор обобщает полученные результаты.

Выводы обоснованы результатами экспериментальных исследований и корректно сформулированы.

По теме диссертации опубликовано 9 работ в рецензируемых научных изданиях. Результаты диссертации были представлены в материалах 3 конгрессов и конференций. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Принципиальных замечаний по диссертации нет.

Заключение

Диссертация Никольского Александра Аркадьевича «Роль экспрессии гена *Stat3* в нейтрофильном воспалении при бронхиальной астме» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Аллергология и иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных научных задач, имеющих значение

для аллергологии и иммунологии: создана модель нейтрофильной БА у мышей, учитывающая главные патологические проявления; доказана перспективность применения интерференции РНК для целевого воздействия на ключевые элементы патогенеза БА с нейтрофильным воспалением; синтезированы молекулы миРНК, способные эффективно угнетать экспрессию гена *Stat3* как *in vitro*, так и *in vivo*; разработан комплекс, состоящий из молекул миРНК, подавляющих экспрессию гена *Stat3*, и катионного пептида-носителя LTP, обеспечивающий адресную доставку миРНК к клеткам-мишеням с высокой эффективностью как *in vitro*, так и *in vivo*.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года с изменениями постановления Правительства РФ №723 от 30.07.2014 г., №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017, №1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г., №426 от 20.03.2021 г., №1539 от 11.09.2021 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Аллергология и иммунология».

Оппонент:

доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры организации и управления
в сфере обращения лекарственных средств
Института профессионального образования
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения
высшего образования Первый Московский
государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)
Министерства здравоохранения РФ И.Г. Козлов

119991 г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)
Тел.: +7(499) 248-05-53; E-mail: rektorat@sechenov.ru

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь Е.Н. Воскресенская
«12» 05 2023 г.