На правах рукописи

**Никольский Александр Аркадьевич**

# Роль экспрессии гена *Stat3* в нейтрофильном воспалении при бронхиальной астме

3.2.7. Аллергология и иммунология

**Автореферат**
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)

**Научный руководитель:**
доктор биологических наук
**Шиловский Игорь Петрович**

**Официальные оппоненты:**
**Ненашева Наталья Михайловна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой аллергологии и иммунологии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации;

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

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____»_____ 2023 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу: 115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте:
https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/zashchity-dissertatsiy/
/
Автореферат разослан «_____» _____ 2023 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Гудима Георгий Олегович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Бронхиальная астма (БА) – это заболевание, которое обычно характеризуется хроническим воспалением дыхательных путей и сопровождается такими симптомами, как свистящие хрипы, одышка, заложенность в груди и кашель. За последние десятилетия резко возросло количество больных БА. В отдельных странах заболеваемость достигает 15-18%, а в России общее число больных БА приближается к 10 млн. человек, что составляет около 7% населения страны.

Длительное время считалось, что БА развивается исключительно по Th2-зависимому механизму, сопряженному с эозинофильным воспалением дыхательных путей и IgE-опосредованной активацией тучных клеток. Однако к настоящему времени накоплены экспериментальные свидетельства участия других воспалительных клеток – нейтрофилов, в патогенезе БА. Ряд авторов выделяют нейтрофильную БА как самостоятельный фенотип. Зачастую пациенты с такой астмой характеризуются тяжелым течением и плохо поддаются традиционному лечению с применением глюкокортикостероидов. Изучение патогенеза БА с нейтрофильным типом воспаления и поиск путей преодоления резистентности к глюкокортикостероидам является актуальной задачей иммунологии.

Исследования молекулярных и клеточных механизмов патогенеза БА установили взаимосвязь степени тяжести и нейтрофильного воспаления, которое коррелировало с активацией Th17-иммунного ответа, а также с повышенной продукцией IL-17A, IL-17F и IL-8 в мокроте. Было установлено, что фактор транскрипции STAT3 вовлечён в активацию Th17-клеток, которые способствуют инфильтрации лёгких нейтрофилами. В подавляющем большинстве опубликованных исследований роль STAT3 изучалась путем его инактивации различными ингибиторами, многие из которых представляют собой низкомолекулярные соединения с низкой специфичностью. Использование высокоспецифичных моноклональных антител для изучения роли STAT3 невозможно ввиду того, что этот фактор локализуются внутри клетки и поэтому недоступен для антител.

Появляются новые способы регуляции активности генов, например, технология интерференции РНК, которая заключается в использовании молекул малых интерферирующих РНК (миРНК), способных сиквенс-специфично деградировать мРНК целевых генов, что дает возможность исследовать

биологические свойства внутриклеточных мишеней. Однако использование миРНК имеет ряд недостатков, одним из которых является неэффективная доставка этих молекул в цитоплазму клеток.

Использование катионных дендримерных пептидов для доставки миРНК в клетки может решить эту проблему. Дендримерный пептид образует комплекс с молекулами миРНК, обеспечивая ее стабильность и защиту от деградации. Кроме того, положительно заряженные поверхностные группы дендримерных пептидов облегчают их взаимодействие с отрицательно заряженными компонентами клеточной мембраны, что позволяет им проникать в клетку и доставлять миРНК в цитоплазму.

С учетом вышесказанного данная работа посвящена изучению роли гена *Stat3* в нейтрофильном воспалении при бронхиальной астме. Роль этого гена изучается путем его сиквенс-специфического подавления молекулами миРНК, которые доставляются в клетки-мишени при помощи катионного дендримерного пептида-носителя.

**Цель исследования**

Изучить роль экспрессии гена *Stat3* в нейтрофильном воспалении при бронхиальной астме.

**Задачи исследования**

1. Создать экспериментальную модель бронхиальной астмы у мышей, сопровождающуюся нейтрофильным воспалением;

2. Изучить эффекты кортикостероидов на активацию Th17-иммунного ответа в экспериментальной модели БА с нейтрофильным типом воспаления у мышей;

3. С использованием методов биоинформатики спроектировать библиотеку молекул миРНК, направленных на подавление экспрессии гена *Stat3* мыши;

4. Изучить специфическую биологическую активность спроектированных молекул миРНК в экспериментах *in vitro* и выявить вариант, способный максимально подавлять экспрессию гена *Stat3* мыши;

5. Сконструировать комплекс, состоящий из молекул миРНК, подавляющих экспрессию гена *Stat3*, и пептида-носителя, способного транспортировать нуклеиновые кислоты в лимфоциты;

6. Изучить специфическую биологическую активность комплекса, состоящего из молекул миРНК против гена *Stat3* мыши и катионного пептида-носителя LTP в экспериментах *in vitro*;

7. С использованием модели бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления у мышей изучить влияние супрессии экспрессии гена *Stat3* молекулами миРНК на проявления этой патологии.

**Научная новизна**

Был предложен новый протокол индукции экспериментальной БА с нейтрофильным типом воспаления у мышей. В частности, 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 *Escherichia coli*. Данная модель воссоздает основные проявления этой патологии (нейтрофильное воспаление, гиперреактивность бронхов, ремоделирование респираторного тракта), а также имеет профиль иммунного ответа, схожий с наблюдаемым у пациентов в клинической практике.

Впервые спроектированы уникальные молекулы миРНК, которые в комплексе с пептидным носителем (LTP) способны эффективно подавлять экспрессию гена *Stat3* в различных типах клеток (включая Th17-клетки) в экспериментах *in vitro*, а также *in vivo* в модели нейтрофильной БА у мышей.

Впервые продемонстрировано, что ингаляционное введение созданного иммунобиологического комплекса, содержащего молекулы миРНК против гена *Stat3* и пептида-носителя LTP, приводит к уменьшению экспрессии целевого гена в ткани легких, и, как следствие, к существенному подавлению проявлений заболевания у мышей.

Впервые изучена взаимосвязь между процессом подавления экспрессии гена *Stat3* с помощью синтетических молекул миРНК и степенью проявления признаков БА. Впервые показано, что в ответ на пятикратное ингаляционное введение разработанного комплекса миРНК/пептид-носитель происходит восстановление толщины стенок бронхов и снижение уровня провоспалительных клеток (нейтрофилов) в бронхоальвеолярном лаваже и ткани легких экспериментальных животных.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в выявлении новых молекулярных и клеточных патогенетических механизмов БА с нейтрофильным типом воспаления. В частности, в данном исследовании продемонстрировано, что нивелирование патологических проявлений в легких может происходить при помощи нескольких механизмов.

Во-первых, путем подавления молекулами миРНК экспрессии гена *Stat3* в Th17-клетках легких. В результате блокировки IL-6/STAT3-сигнального пути происходит уменьшение выработки цитокинов, необходимых для развития нейтрофильного воспаления в легких.

Во-вторых, подавление экспрессии гена *Stat3* после ингаляционной доставки миРНК может также происходить в альвеолярных макрофагах и фибробластах. Известно, что STAT3 вовлечён в процессы ремоделирования при БА путем активации М2-макрофагов, и продукции ими металлопротеаз ММР2 и ММР9. Активация STAT3 в фибробластах обеспечивает продукцию ими факторов фиброза, внося вклад в ремоделирование респираторного тракта. Соответственно, супрессия гена *Stat3* в макрофагах и фибробластах может уменьшать выраженность признаков ремоделирования бронхов.

В-третьих, молекулы миРНК могут подавлять экспрессию *Stat3* в эндотелиальных клетках. Эти клетки играют важную роль в миграции провоспалительных клеток из системного кровотока в лёгкие, что происходит при участии молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1. Уменьшение экспрессии *Stat3* молекулами миРНК в эндотелиальных клетках может приводить к снижению количества нейтрофилов в респираторном тракте.

Полученные результаты вносят вклад в понимание роли гена *Stat3* в патогенезе бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления.

Научно-практическая значимость данной работы заключается в том, что была создана экспериментальная модель на мышах, имитирующая резистентную к кортикостероидам бронхиальную астму с нейтрофильным типом воспаления. Предложенный протокол позволяет индуцировать у мышей все важные признаки патологии, включая нейтрофильное воспаление, которое развивается при помощи Th17-зависимого пути. Созданная модель может быть использована в практических целях для тестирования новых средств терапии данной патологии.

Также научно-практическая значимость работы заключается в том, что предложен инновационный подход к терапии кортикостероид-резистентной БА с нейтрофильным воспалением. В частности, в модели на мышах показано, что локальное подавление экспрессии гена *Stat3* в легких синтетическими молекулами миРНК существенно уменьшает нейтрофильное воспаление в легких. При этом, нейтрофильное воспаление не уменьшается при экспериментальной терапии кортикостероидами.

Результаты исследования указывают на возможность использования сконструированных молекул миРНК для разработки новых методов лечения заболеваний, связанных с повышенной экспрессией гена *Stat3*. Это может способствовать разработке более эффективных и безопасных методов лечения этих заболеваний, что является крайне важным для современной медицины.

**Публикации по теме диссертации**

Основные результаты диссертации опубликованы в 9 статьях в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций (названия журналов: «Journal of Immunological Methods», «Иммунология», «Biochemistry (Moscow)», «Биотехнология», «Российский аллергологический журнал»).

**Апробация работы**

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на:

1. European Academy of Allergy and Clinical Immunology - 2020 Congress (6-10 июня 2020 г., Лондон). Устный доклад «Using of lipopolysaccharide to increase neutrophilic inflammation in bronchial asthma murine model».
2. Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (28-30 октября 2020 г., Москва) Устный доклад «A mouse model of neutrophilic bronchial asthma as a tool for the testing of personalized drugs».
3. European Academy of Allergy and Clinical Immunology - 2021 Congress (10-12 июня 2021 г., Краков). Устный доклад «The mouse model of corticosteroid resistant neutrophilic lung inflammation».

**Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 128 страницах текста, содержит 4 таблицы и 24 рисунка. Диссертационная работа написана в традиционном стиле и включает в себя следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы. Библиография включает 228 источников, в том числе 30 отечественных и 198 зарубежных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Лабораторные животные.** Самок мышей линии BALB/c возрастом 6–8 недель, массой 20–22 г, приобретали в питомнике «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Корм и вода предоставлялись *ad libitum*. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с принципами Директивы Европейского Союза 2010/63/ЕС «Законодательство о защите животных, используемых в научных целях» и были одобрены Этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

**Создание экспериментальной модели БА с нейтрофильным типом воспаления.** Мышей разделили на четыре группы (по 8 животных в группе). Животных первой группы (OVA) трижды (на 1, 14 и 28 сутки) иммунизировали подкожно 20 мкг овальбумина (OVA – ovalbumin). Вторую группу (OVA/FA) в 1-й день иммунизировали внутрибрюшинно 20 мкг OVA, эмульгированного в 100 мкл полного адъюванта Фрейнда (ПАФ), на 14 и 28 сутки проводились инъекции 20 мкг OVA, эмульгированного в 100 мкл неполного адъюванта Фрейнда (НАФ). Третью группу (OVA/LPS) иммунизировали аналогично группе «OVA/FA». Животных первой и второй групп подвергали провокации при помощи аэрозольного введения OVA (10 мг/мл) по 20 мин в день на 42-44-е сутки. Третьей группе (OVA/LPS) вводили смесь 10 мг/мл OVA и 0,4 мг/мл LPS *Escherichia coli*. Четвертая группа мышей (Normal) никаким манипуляциям не подвергалась.

**Гиперреактивность бронхов (ГРБ).** ГРБ определяли в ответ на аэрозольное введение метахолина в возрастающих концентрациях (6,25; 12,5; 25 мг/мл) методом неинвазивной плетизмографии с использованием FinePointe NAM (Buxco, США).

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Уровни IgE, IgG1 и IgG2a в сыворотке крови и цитокинов в образцах определяли методом ИФА с использованием

коммерческих наборов (Becton Dickinson, США), в соответствии с рекомендациями производителя.

**Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ).** Образцы БАЛ отбирали через 48 часов после последней провокации. Общее количество клеток подсчитывали с использованием камеры Горяева. Дифференциальный подсчет клеток после окрашивания азуром и эозином проводили с помощью световой микроскопии.

**Гистологический анализ легких.** Полученные препараты окрашивали гематоксилин-эозином для оценки перибронхиальной клеточной инфильтрации и альциановым синим для визуализации муцин-положительных бокаловидных клеток. Подсчитывали абсолютное количество клеток в инфильтрате и долю бокаловидных клеток в респираторном эпителии при 400-кратном увеличении. Толщину эпителия измеряли в микрометрах с использованием микрофотографий и программного обеспечения ZEN 3.0 (Carl Zeiss, Германия).

**Полимеразная цепная реакция в реальном времени.** Суммарную РНК выделяли из клеток БАЛ с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), в соответствии с протоколом производителя, а затем синтезировали кДНК (комплементарная ДНК) с использованием случайных гексамерных праймеров и коммерческого набора ОТ-1 (Синтол, Россия). кДНК амплифицировали на iCycler IQ5 (Bio-Rad, США) с использованием специфических пар праймеров и зондов для определения уровней экспрессии мРНК целевых генов.

**Проектирование и синтез миРНК.** При помощи программного обеспечения OligoWalk были спроектированы последовательности миРНК, направленные к гену *Stat3* мыши. Синтез осуществлен с использованием автоматического синтезатора Oligo Pilot 10 (Cytiva, США).

**Скрининг активности миРНК *in vitro*.** Скрининг активности миРНК *in vitro* проводился на клетках L929 (фибробласты мыши). Клетки были трансфицированы 1 мкг молекул миРНК при помощи трансфекционного агента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США), после чего оценивали уровень экспрессии целевого гена методом количественной ПЦР. На этой же культуре клеток оценили активность комплекса миРНК/пептид (siSTAT3/LTP). Дополнительно изучили активность комплекса siSTAT3/LTP на первичной культуре Th17-клеток мыши.

**Биологическая активность комплекса siSTAT3/LTP *in vivo*.** Для исследования siSTAT3/LTP *in vivo* у мышей индуцировали БА с нейтрофильным

типом воспаления. Для этого 3-кратно с интервалом в 2 недели внутрибрюшинно вводили 20 мкг аллергена овальбумина (OVA) вместе с полным (в 1-й день) и неполным (в 14-й и 28-й дни) адъювантом Фрейнда. Через 2 недели после последней иммунизации, осуществляли аэрозольную провокацию по 1 ингаляции в день в течение 5 дней смесью 1 мг/мл OVA и 1 мг/мл липополисахарида из *E. coli*. На фоне провокаций животным аэрозольно вводили комплекс siSTAT3/LTP. Концентрация комплекса составляла 1,1 мг/мл. В качестве контроля аналогичным образом вводили комплекс, содержащий неспецифические молекулы миРНК против гена *Gfp* и пептид-носитель LTP (siGFP/LTP). Через 1 сут после последней провокации оценивали гиперреактивность бронхов, а через 2 сут собирали БАЛ и извлекали легкие для гистологического исследования.

**Статистический анализ.** Для статистического анализа применялся непараметрический метод сравнения Краскела-Уоллиса или критерий Манна-Уитни, для чего в автоматическом режиме рассчитывались и сравнивались медианные значения выборок в программе Statistica 12.5. Различия считались значимыми при $p \leq 0,05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Моделирование БА с нейтрофильным типом воспаления у мышей

При моделировании БА с нейтрофильным воспалением легких мы применили несколько протоколов, описанных выше. В результате мы показали, что иммунизация мышей смесью аллергена и адъюванта Фрейнда с последующей провокацией смесью аллергена и LPS (групп OVA/LPS) обеспечивает развитие у мышей основных проявлений БА. В частности, в сыворотке крови выявляли аллерген-специфические антитела класса IgE и подклассов IgG1 и IgG2a. Развивалась ГРБ, которая была статистически значимо выше на 54% по сравнению с контрольными животными.

У этих мышей мы также выявили характерные гистологические изменения в легких. Окраска срезов легких гематоксилин-эозином выявила в 5-6 раз более высокую степень перибронхиальной инфильтрации провоспалительными клетками по сравнению с контрольными мышами. Стенки дыхательных путей были на 20-25% толще, чем у мышей группы «Normal». Окрашивание альциановым синим выявило

более высокую долю бокаловидных клеток, секретирующих слизь, в бронхиальном эпителии у мышей группы «OVA/LPS» по сравнению с контрольными мышами.

Анализ клеточного состава БАЛ выявил наибольшее количество клеток у мышей группы «OVA/LPS». Общее количество клеток в этой группе достигло 211 010 ± 25 776 клеток/мл, что в 2 раза больше, чем у мышей группы «Normal» (рис. 1А). Именно в этой группе было обнаружено максимальное количество нейтрофилов в БАЛ, которое было в 8 раз больше, чем в контрольной группе, и достигало 19 900 ± 4 421 клеток/мл, что соответствовало ~10% от общего количества клеток в БАЛ (рис. 1Г). Однако этот протокол вызывает и инфильтрацию дыхательных путей эозинофилами (рис. 1В).

Экспрессию генов *Ifnγ*, *Il4*, *Il17a* и *Il17f* в клетках БАЛ оценивали методом количественной ПЦР. Поскольку максимальная нейтрофилия в БАЛ наблюдалась у мышей, получавших смесь OVA и LPS, мы оценивали экспрессию генов в группе «OVA/LPS» в сравнении с контрольными мышами. Экспрессия мРНК гена *Il4* увеличивалась в 3 раза по сравнению с группой «Normal» (рис. 2А). При этом гены *Ifnγ*, *Il17f* и *Il17a* активировались еще сильнее в 7, 10 и 4 раза соответственно (рис. 2Б-Г). Эти данные свидетельствуют о том, что развитие нейтрофильного воспаления при БА у этих мышей происходит по Th1- и Th17-зависимым механизмам, тогда как Th2-компонент менее значим.

Все эти данные указывают на то, что именно использование аллергенов в сочетании с LPS позволяет индуцировать у мышей экспериментальную БА с преимущественным нейтрофильным воспалением легких.

Провокация иммунизированных мышей смесью OVA в концентрации 10 мг/мл и LPS в концентрации 0,4 мг/мл индуцирует около 10% нейтрофилии в БАЛ. Для усиления нейтрофильной инфильтрации дыхательных путей мы увеличили количество ингаляций с 3 до 5, при этом снизили концентрацию OVA с 10 до 1 мг/мл и повысили концентрацию LPS с 0,4 до 1 мг/мл. Такие изменения позволили вызвать более выраженную (58%) нейтрофилию в БАЛ (рис. 3В); при этом эозинофилы представляли исключительно меньшую долю (менее 10% в нашем исследовании против 20% в опубликованных работах других авторов).

В то же время мыши, получившие 3 или 5 ингаляций, демонстрировали одинаково высокий уровень ГРБ и сывороточных аллерген-специфических IgE, IgG1 и IgG2a.

Важными признаками ремоделирования дыхательных путей являются толщина бронхиальной стенки и гиперплазия бокаловидных клеток. Окрашивание гематоксилин-эозином с последующим анализом изображений выявило более выраженное (на 30%) утолщение стенок бронхов после ингаляций в течение 5 сут по сравнению с 3-дневной провокацией. Гиперплазия бокаловидных клеток оценивалась в срезах легких, окрашенных альциановым синим, и показала 1,5-кратное увеличение доли бокаловидных клеток, секретирующих слизь, в бронхиальном эпителии мышей, получивших 5 ингаляций, по сравнению с 3-дневной провокацией смесью OVA и LPS.

Таким образом, была разработана модель БА у мышей с преобладающим нейтрофильным воспалением. У мышей развивались ключевые проявления БА с нейтрофильным типом воспаления: продукция аллерген-специфических антител класса IgE, развитие ГРБ, ремоделирование респираторного тракта и инфильтрация ткани легких нейтрофилами. При этом формирование данной патологии протекало по Th17-зависимым механизмам, что соответствует наблюдаемой клинической картине.

**Нейтрофильное воспаление в легких устойчиво к кортикостероидам**

Пациенты с нейтрофильным воспалением при БА, ассоциированным с Th1- и Th17-иммунным ответом, часто устойчивы к традиционному лечению кортикостероидами. Чтобы оценить адекватность созданной нами модели у мышей клинической картине, наблюдаемой у пациентов, мы провели экспериментальную терапию мышей с индуцированной нейтрофильной БА дексаметазоном (2 мг/кг). Дексаметазон вводили внутрибрюшинно за 1 ч до аэрозольной провокации. Мы показали, что экспериментальное лечение дексаметазоном значительно нивелировало основные проявления патологии в модели эозинофильной БА у мышей. Происходило уменьшение ГРБ, уровня IgG1-антител и воспаления инфильтрации респираторного тракта провоспалительными клетками, прежде всего эозинофилами.

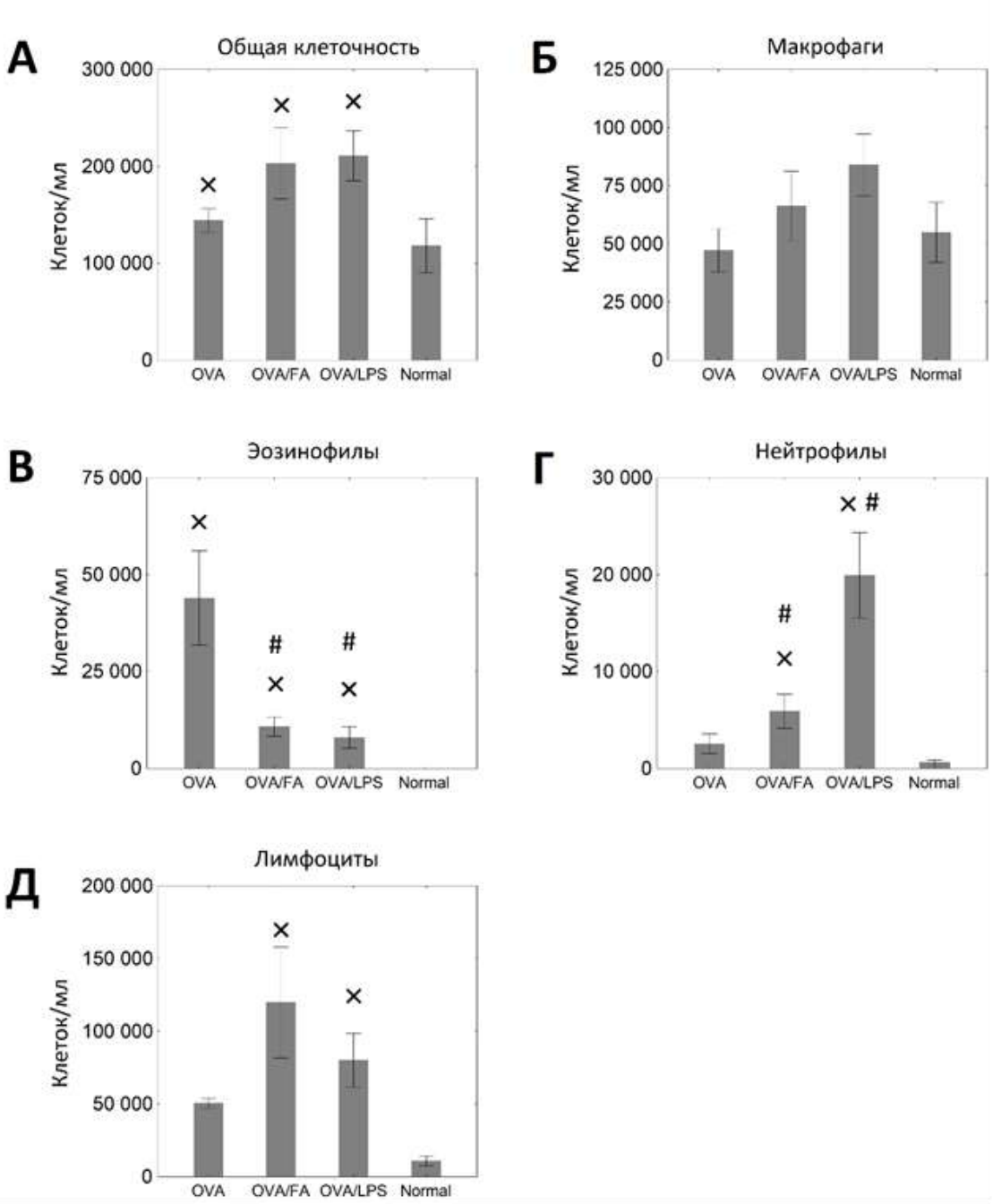


**Рисунок 1.** Клеточный состав БАЛ.

Образцы БАЛ отбирали через 48 часов после последней провокации. Общее количество клеток подсчитывали в камере Горяева (А). Дифференциальный подсчет макрофагов (Б), эозинофилов (В), нейтрофилов (Г) и лимфоцитов (Д) проводили методом световой микроскопии после окрашивания. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. N=8. × - статистически значимо отличается от мышей группы «Normal»; # - статистически значимо отличается от группы «OVA» при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

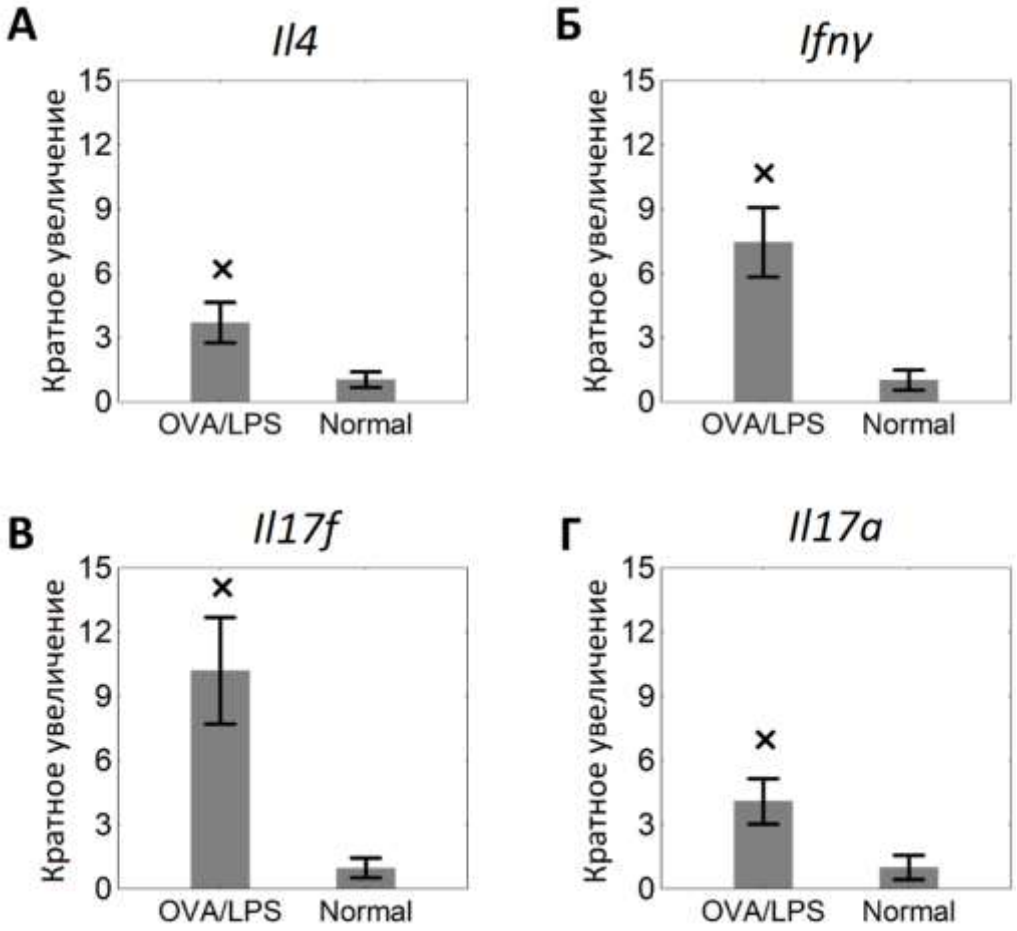


**Рисунок 2.** Экспрессия мРНК цитокинов в клетках БАЛ.
Экспрессию генов *Il4* (А), *Ifnγ* (Б), *Il17f* (В) и *Il17a* (Г) оценивали методом количественной ПЦР. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. N=8. × - статистически значимо отличается от группы «Normal» с использованием U-критерия Манна-Уитни.

В то же время экспериментальная терапия дексаметазоном мышей с нейтрофильной БА практически не оказывала благоприятного эффекта на ее показатели. Нами показано, что ГРБ не изменялась в ответ на внутрибрюшинные инъекции этого кортикостероидного препарата. Также терапия дексаметазоном не повлияла на уровень аллерген-специфического IgE. Однако лечение приводило к повышению уровня IgG2a в 1,5 раза (группа «OVA/LPS»), что лишний раз подчеркивает вклад Th1-иммунного ответа. При анализе состава БАЛ наблюдалась тенденция к 2-х кратному (p=0,18) уменьшению количества нейтрофилов (рис. 4Г), однако кортикостероид не влиял на количество макрофагов (рис. 4Б), эозинофилов (рис. 4В) и лимфоцитов (рис. 4Д), а также на общее количество клеток (рис. 4А). Также влияния кортикостероида не наблюдалось ни на уровни Th1- и Th17-цитокинов (IFN-γ и IL-17A), ни на уровни Th2-цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13) (рис. 5).

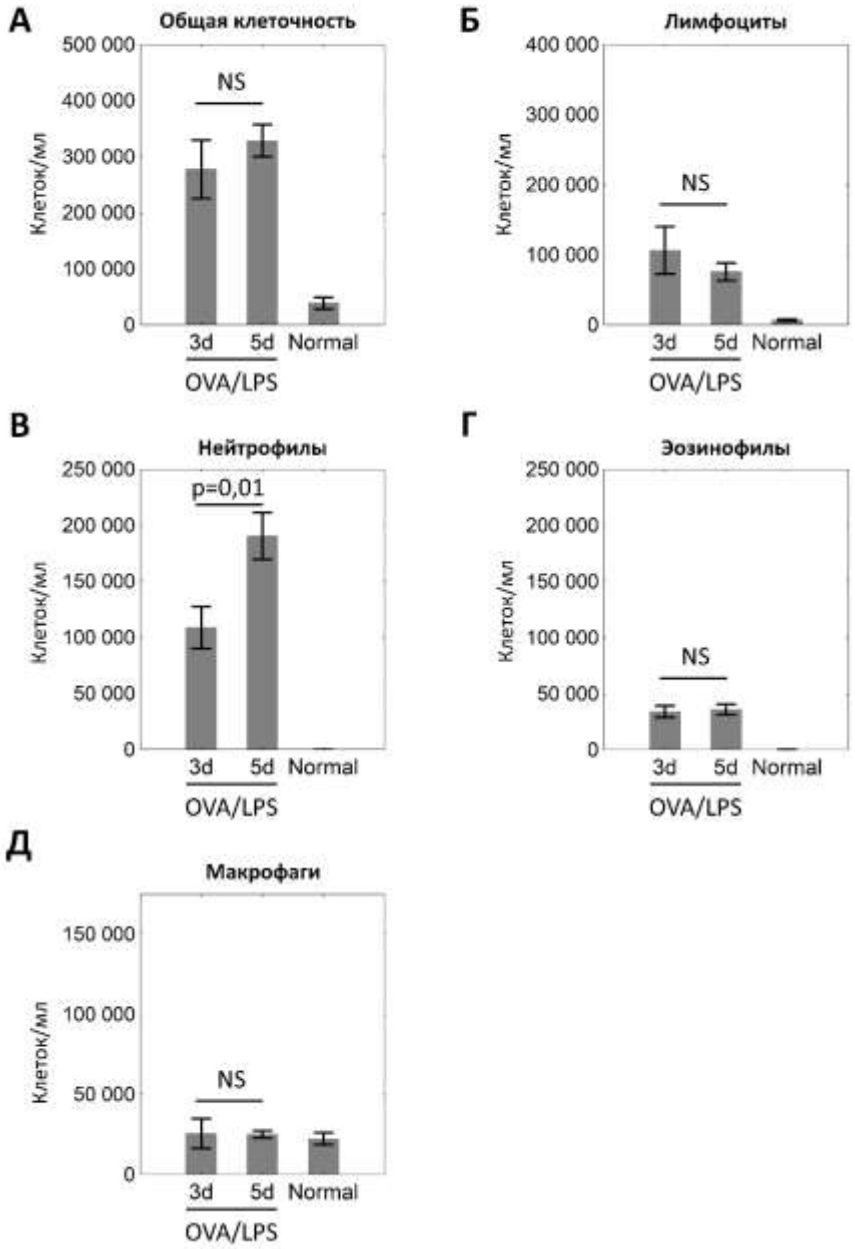


**Рисунок 3.** Клеточный состав БАЛ.
Образцы БАЛ отбирали через 48 часов после последней провокации. Общее количество клеток подсчитывали в камере Горяева (А). Дифференциальный подсчет лимфоцитов (Б), нейтрофилов (В), эозинофилов (Г) и макрофагов (Д) проводили методом световой микроскопии после окрашивания. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. N=8. NS – статистически не отличается при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

Нечувствительность к кортикостероидам у мышей с нейтрофильным типом воспаления можно объяснить тем, что лечение дексаметазоном подавляет преимущественно Th2-, а не Th17-иммунный ответ. Таким образом, можно сделать вывод, что из-за нейтрофильного воспаления, участвующего в патогенезе БА, в котором задействован в большей мере Th17-иммунный ответ, терапия дексаметазоном малоэффективно справляется со своей задачей.

**Подавление экспрессии гена *Stat3* в экспериментах *in vitro***

Методами *in silico* были спроектированы молекулы миРНК против гена *Stat3* мыши. Для этого применялось биоинформационное программное обеспечение, с помощью которого теоретически рассчитывалась предполагаемая эффективность сайленсинга (выключения) целевого гена по термодинамической эффективности связывания миРНК и мРНК. Однако данный подход не учитывает возможность стерического препятствования связыванию миРНК с мРНК со стороны белковых факторов транскрипции, находящихся в цитоплазме клетки. В связи с этим, обязательным этапом работы была верификация спроектированных миРНК в экспериментах *in vitro* на культурах клеток, продуцирующих данный транскрипционный фактор.

Для исследования *in vitro* было синтезировано 5 вариантов миРНК против *Stat3* из 200 спроектированных *in silico*. Выбор миРНК для исследований *in vitro* основывался на: 1) предсказанной эффективности миРНК; 2) неспособности миРНК взаимодействовать с другими генами-мишенями для избегания т.н. off-target-эффектов. В результате было показано, что вариант миРНК (siSTAT3-1426) осуществлял заметный сайленсинг гена *Stat3* на ~ 75% в культуре клеток L929.

Как известно, одной из ключевых проблем в применении метода РНК-интерференции является эффективная доставка молекул РНК в клетки. Для их доставки мы использовали дендримерный (разветвленный) пептид LTP, созданный ранее в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Структура LTP такова, что на концах «ветвей» находятся остатки аминокислоты – аргинина (8 остатков), которые обеспечивают положительный заряд, также в составе пептида присутствуют 7 остатков лизина и цистеин, которые приобретают положительный заряд в водных растворах. В итоге суммарный положительный заряд молекулы LTP может достигать +16.

Процесс образования комплекса молекул миРНК и LTP заключается в растворении смеси этих молекул в стерильном физиологическом растворе. В водной фазе молекулы миРНК приобретают отрицательный заряд, а LTP – положительный. В результате происходит образование комплекса за счет электростатических взаимодействий. Наиболее важным параметром при образовании комплекса является соотношение миРНК/пептид. Согласно ранее проведенным исследованиям, для эффективной доставки необходим 12,5-кратный избыток LTP.

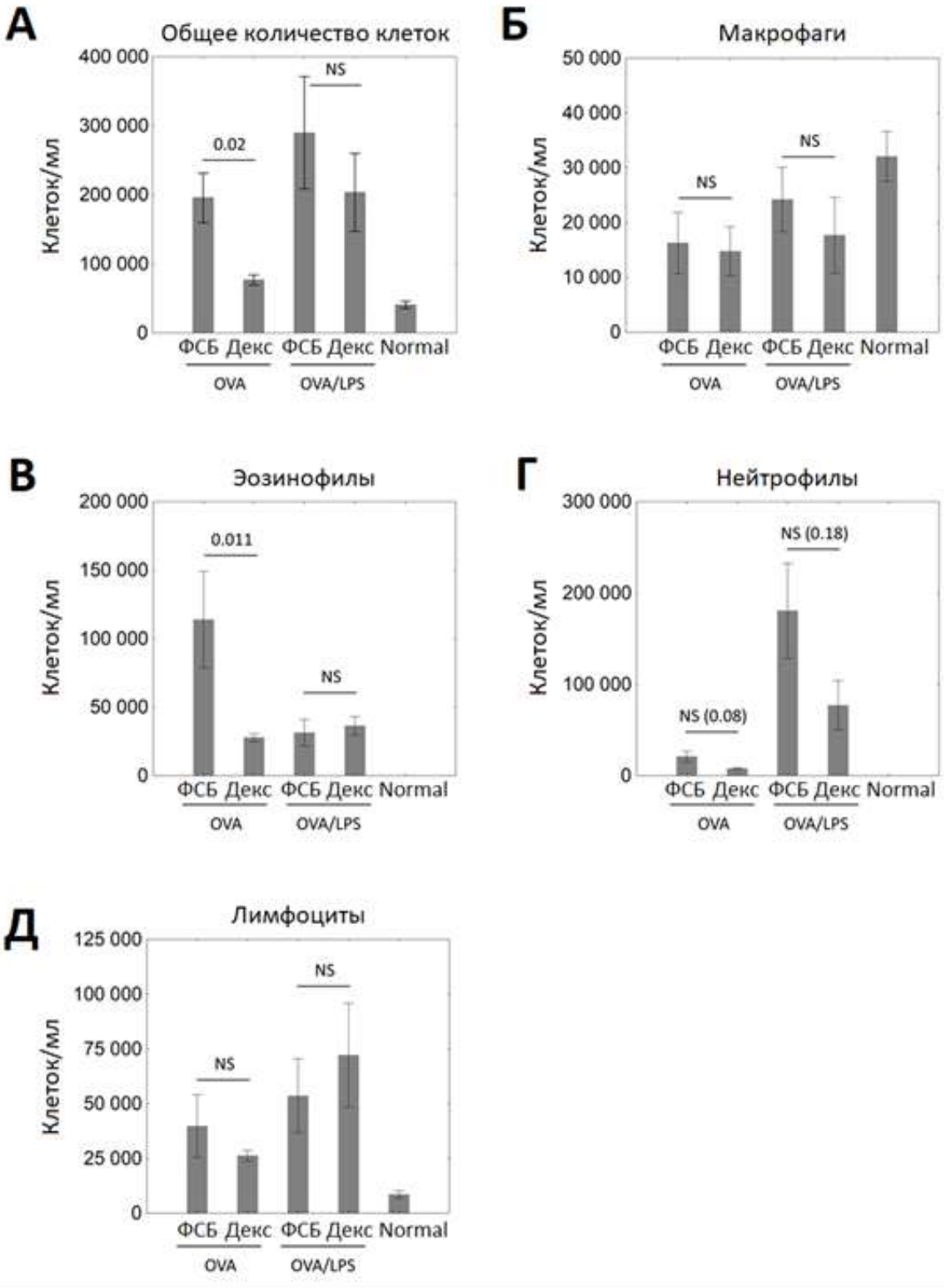


**Рисунок 4.** Клеточный состав БАЛ.
Образцы БАЛ отбирали через 48 часов после последней провокации. Общее количество клеток подсчитывали в камере Горяева (А). Дифференциальный подсчет макрофагов (Б), эозинофилов (В), нейтрофилов (Г) и лимфоцитов (Д) проводили методом световой микроскопии после окрашивания. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. N=8. NS – статистически значимо не отличается при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

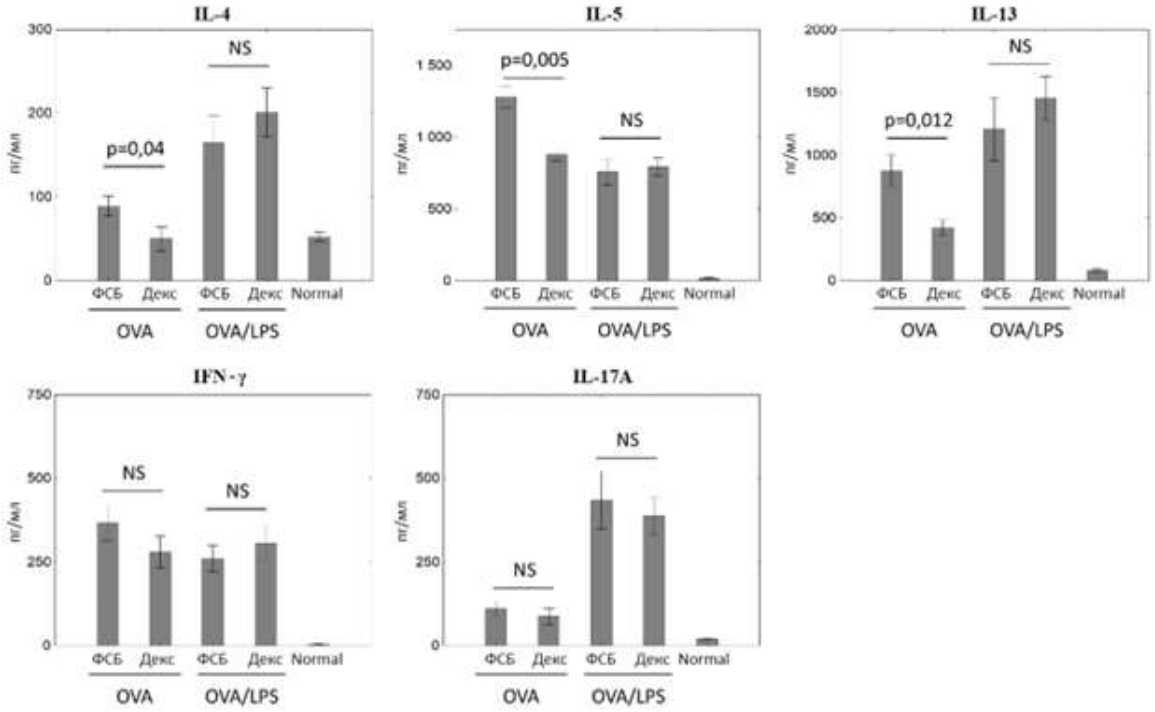


**Рисунок 5.** Цитокины, продуцируемые активированными спленоцитами.
Спленоциты активировали аллергеном в течение 3 дней с последующим количественным определением продукции цитокинов с помощью ИФА в супернатантах клеток. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. N=8. NS – статистически незначимое различие при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

В отдельных экспериментах *in vitro* была изучена способность комплекса siSTAT3/LTP подавлять экспрессию *Stat3* в клетках L929. Комплекс siSTAT3/LTP в количестве 4 мкг (по миРНК) на 100 тыс. клеток статистически значимо супрессирует экспрессию *Stat3* в 3,7 раза в сравнении с комплексом siGFP/LTP, в состав которого включены неспецифические молекулы миРНК (рис. 6А).

Также изучена способность комплекса siSTAT3/LTP супрессировать экспрессию *Stat3* в Th17-клетках. В клетках, обработанных комплексом, мы выявили 2-кратное снижение уровня экспрессии мРНК *Stat3* и 15-кратное снижение уровня экспрессии мРНК *Il17a* (рис. 6Б). Учитывая, что комплекс молекул siSTAT3-1426 и пептида LTP в массовом соотношении 1/12,5 способен подавлять экспрессию генов *Stat3* и *Il17a* в лимфоцитах, его использовали в последующих исследованиях *in vivo* на модели БА с нейтрофильным типом воспаления у мышей.

**Подавление экспрессии гена *Stat3* молекулами миРНК уменьшает выраженность проявлений нейтрофильной БА в модели у мышей**

Ингаляции комплексом, содержащим siSTAT3 и LTP, приводили к подавлению экспрессии гена *Stat3* на 50% в клетках БАЛ ($p<0,05$) по сравнению с

мышами, получавшими неспецифические молекулы siGFP (рис. 7А). Локальное подавление экспрессии этого гена молекулами миРНК уменьшало воспаление в легких и ремоделирование респираторного тракта у мышей с индуцированной нейтрофильной БА. Кроме того, супрессия экспрессии *Stat3* молекулами миРНК приводила к подавлению Th17-иммунного ответа, о чем свидетельствует значительное уменьшение экспрессии *Il17a* и *Il17f* в клетках БАЛ. При этом экспрессия гена *Ifnγ*, являющегося маркером Th1-иммунного ответа, и гена *Il4*, который является маркером Th2-иммунного ответа, не изменялись (рис. 8).

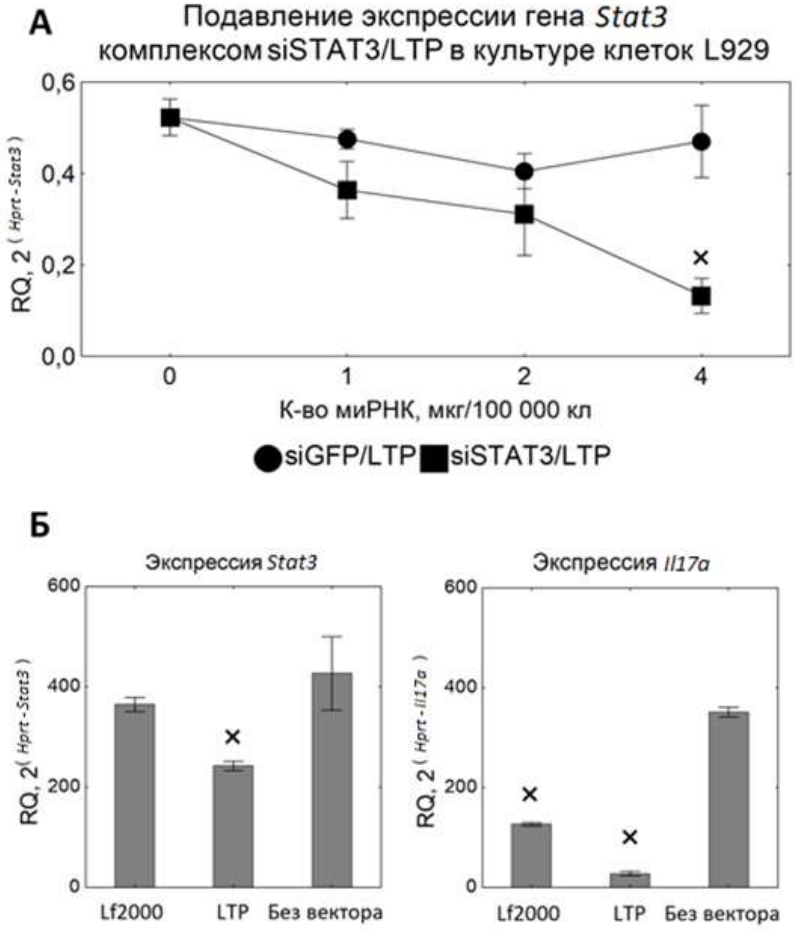


**Рисунок 6.** Подавление *Stat3* миРНК в комплексе с пептидом LTP *in vitro*.

А – подавление экспрессии гена *Stat3* комплексом siSTAT3/LTP на культуре клеток L929. Результаты нормализовали относительно экспрессии гена *Hprt* и выражали в виде RQ (relative quantity; относительное количество). Представлены средние значения ± стандартная ошибка. N=4. × – статистически значимо отличается от siGFP/LTP по U-критерию Манна–Уитни. Б – подавление экспрессии гена *Stat3* комплексом siSTAT3/LTP в Th17-клетках. Th0-клетки выделенные из селезенок мышей, были дифференцированы в Th17-клетки в течение 3 сут. В ходе дифференцировки клетки были обработаны молекулами миРНК siSTAT3-1426 в комплексе с различными трансфекционными агентами (Lipofectamine 3000 и LTP). Результаты нормализовали относительно экспрессии гена *Hprt* и выражали в виде RQ. Представлены средние значения ± стандартная ошибка. N=4. × – статистически значимо отличается от «Без вектора» при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

При индукции у мышей БА с нейтрофильным типом воспаления происходило 5-кратное увеличение общего количества клеток в образцах БАЛ по сравнению с интактными животными. Такое увеличение происходило за счет инфильтрации легких макрофагами, лимфоцитами и нейтрофилами. Примечательно, что подавление экспрессии *Stat3* приводило к уменьшению содержания нейтрофилов в БАЛ в 3 раза, в то время как содержание макрофагов и лимфоцитов не изменялось (рис. 9). Это объясняется тем, что Th17-клетки и секретируемые ими цитокины (IL-17A и IL-17F) участвуют в привлечении нейтрофилов в участок воспаления, в данном случае в легкие. В то же время уменьшение нейтрофильного воспаления легких не приводило к снижению сопротивляемости бронхов; этот показатель оставался на относительно высоком уровне (рис. 7Б). По всей видимости, нейтрофилы не вносят значимого вклада в развитие гиперактивности бронхов.

Дополнительно проведен анализ гистологических изменений в ткани легких, который показал, что супрессия экспрессии *Stat3* и уменьшение нейтрофильного воспаления частично нивелируют признаки ремоделирования бронхов. В частности, происходило восстановление толщины стенок бронхов, но при этом такие признаки ремоделирования, как метаплазия и гиперплазия бронхиального эпителия, не уменьшались. Высокий уровень метаплазии и гиперплазии эпителия объясняет повышенную ГРБ у мышей, получавших миРНК против гена *Stat3*.

Были изучены изменения уровней аллерген-специфических IgE, IgG1 и IgG2a после подавления экспрессии *Stat3* молекулами миРНК. Супрессия этого гена не приводила к изменению уровней IgE и IgG1, являющихся маркерами Th2-иммунного ответа. В то же время происходило увеличение уровня IgG2a, что свидетельствует о переключении иммунного ответа в сторону Th1-типа (рис. 7В). IgE и IgG1 у мышей важны для развития ГРБ. Учитывая, что уровни этих антител не уменьшаются после супрессии *Stat3*, это может объяснять отсутствие благоприятного эффекта молекул миРНК на этот показатель.

Таким образом, локальное подавление экспрессии гена *Stat3* молекулами миРНК уменьшает Th17-зависимое нейтрофильное воспаление легких, а также ремоделирование респираторного тракта у мышей с индуцированной нейтрофильной БА. Эти данные позволяют рассматривать *Stat3* как перспективную биомишень для создания новых средств терапии кортикостероид-резистентной бронхиальной астмы.

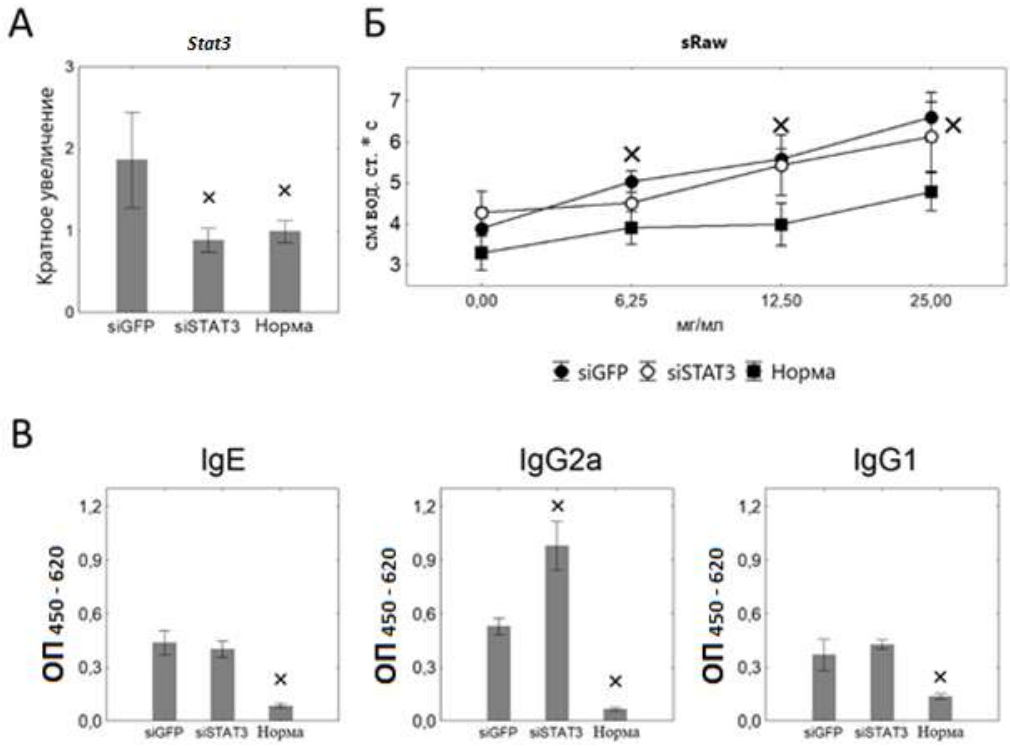


**Рисунок 7.** Действие siSTAT3/LTP на ГРБ и уровни антител.

А – уровни экспрессии гена *Stat3* в клетках БАЛ; Б – гиперреактивность бронхов, измеренная как удельное сопротивление дыхательных путей, в ответ на возрастающие концентрации метахолина; В – уровни аллерген-специфических IgE, IgG2a и IgG1 в сыворотке крови. Представлены средние значение ± стандартная ошибка. N=8. × – статистически значимо отличается от siGFP при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

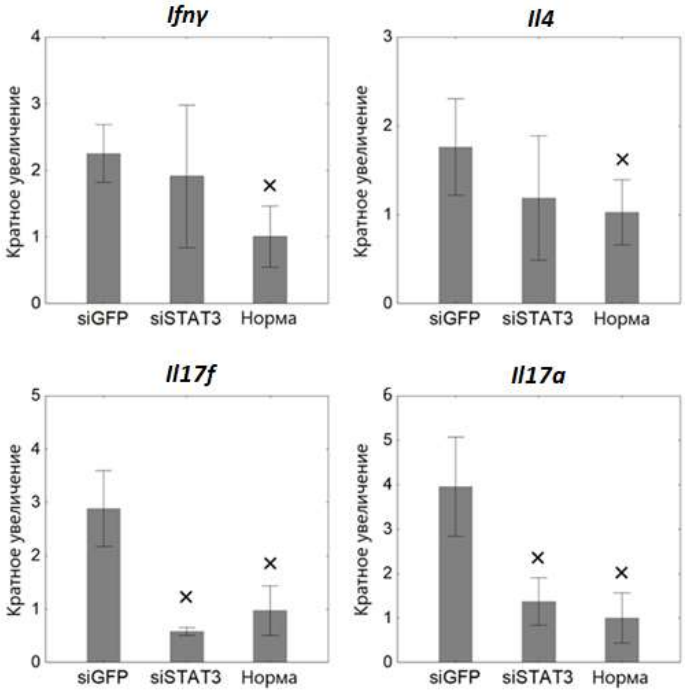


**Рисунок 8.** Изменение экспрессии цитокинов в клетках БАЛ.

Представлены средние значения относительной экспрессии генов цитокинов *Ifnγ*, *Il4*, *Il17a* и *Il17f* ± стандартная ошибка. Уровень экспрессии гена в группе «Норма» был принят за 1. N=8. × – статистически значимо отличается от siGFP при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

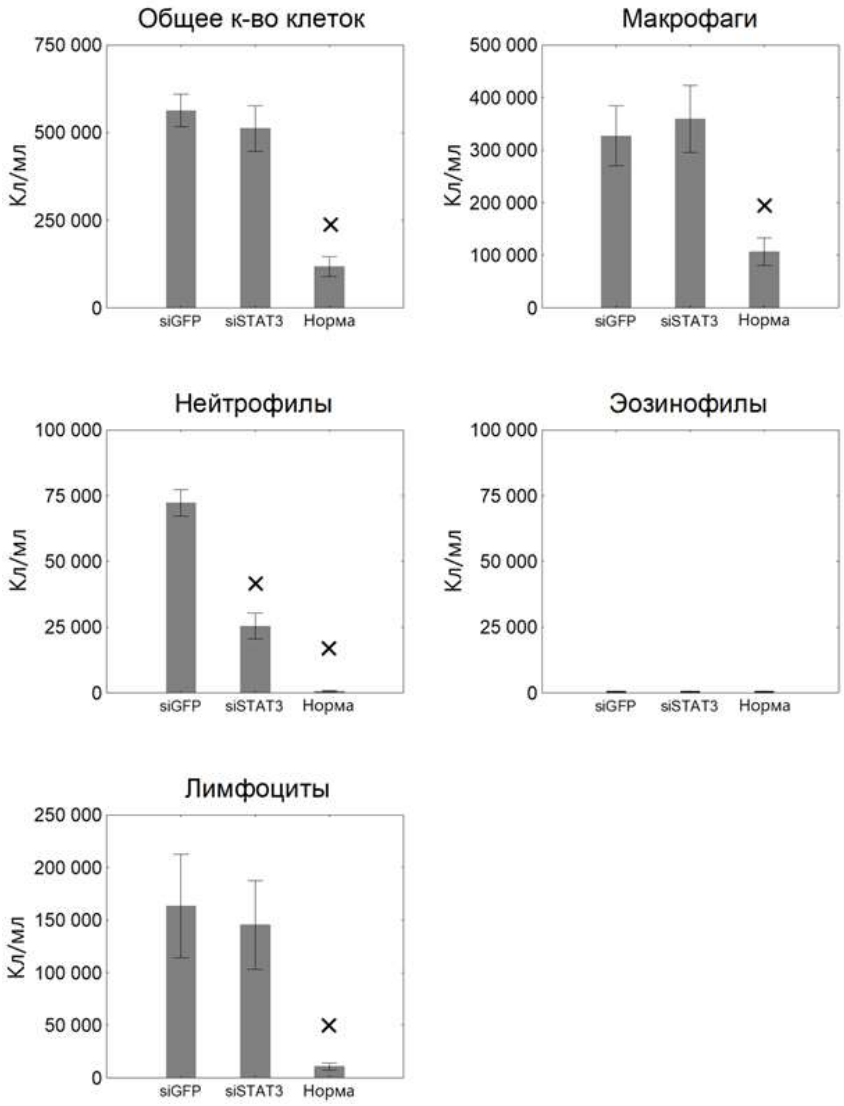


**Рисунок 9.** Клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа.

Представлены средние значения количества клеток в 1 мл БАЛ ± стандартная ошибка. N=8. × – статистически значимо отличается от siGFP при использовании непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим использованием критерия (теста) Дана.

## ВЫВОДЫ

1. Создана экспериментальная модель на мышах, имитирующая резистентную к кортикостероидам БА с нейтрофильным типом воспаления. Предлагаемый протокол индуцирует у мышей все важные признаки этой патологии, которые развиваются при помощи Th1- и Th17-иммунного ответа.

2. Продемонстрирована нечувствительность созданной модели бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления к терапии кортикостероидами; при экспериментальной терапии кортикостероидным препаратом дексаметазоном не происходило уменьшения ГРБ и воспаления легких.

3. С использованием методов биоинформатики спроектирована библиотека молекул миРНК, направленных на подавление экспрессии гена *Stat3* мыши.

4. Проведен скрининг биологической активности наиболее перспективных вариантов молекул миРНК *in vitro* на культуре клеток L929.

5. Сконструирован комплекс, состоящий из молекул миРНК, подавляющих экспрессию гена *Stat3*, и катионного пептида-носителя LTP, способного транспортировать нуклеиновые кислоты в различные типы клеток, включая лимфоциты.

6. Проведен скрининг биологической активности комплекса, состоящего из молекул миРНК, подавляющих экспрессию гена *Stat3*, и катионного пептида-носителя LTP *in vitro* на культуре клеток L929.

7. Продемонстрирована биологическая активность комплекса молекул миРНК и пептида LTP на модели бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления у мышей. Пятикратное ингаляционное введение комплекса приводило к снижению уровня экспрессии гена *Stat3*, что, в свою очередь, оказывает влияние на проявления патологии: происходит уменьшение количества нейтрофилов в образцах БАЛ, отмечается уменьшение признаков ремоделирования бронхов и восстановление толщины стенок бронхов, происходит снижение экспрессии генов Th17-цитокинов (*Il17a* и *Il17f*). Таким образом, *Stat3* можно рассматривать как перспективную биомишень для создания новых средств терапии кортикостероид-резистентной бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Никольский А.А.,** Шиловский И.П., Барвинская Е.Д., Вишнякова Л.И., Бабахин А.А., Гайсина А.Р., Хаитов М.Р. Разработка модели нейтрофильной бронхиальной астмы на мышах. Российский аллергологический журнал. 2019. Т. 16. № 1. С. 108-110.

2. **Никольский А.А.,** Шиловский И.П., Барвинская Е.Д., Вишнякова Л.И., Бабахин А.А., Гайсина А.Р., Хаитов М.Р. Создание модели нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей. Российский аллергологический журнал. 2019. Т. 16. № 1 (2). С. 110-112.

3. **Никольский А.А.,** Шиловский И.П., Барвинская Е.Д., Вишнякова Л.И., Бабахин А.А., Гайсина А.Р., Хаитов М.Р. Применение интерференции РНК для

подавления гена STAT3 как подход к терапии неаллергической бронхиальной астмы. Российский аллергологический журнал. 2019. Т. 16. № 1 (2). С. 108-110.

4. Шиловский И.П., **Никольский А.А.,** Никонова А.А., Гайсина А.Р., Вишнякова Л.И., Барвинская Е.Д., Ковчина В.И., Болотова С.И., Юмашев К.В., Брылина В.Е., Хаитов М.Р. Активация Th17-иммунного ответа при экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астме у мышей. Иммунология. 2019. Т. 40. № 6. С. 5-15.

5. **Никольский А.А.,** Шиловский И.П., Ковчина В.И., Вишнякова Л.И., Барвинская Е.Д., Болотова С.И., Юмашев К.В., Хаитов М.Р. Модель нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей как инструмент для тестирования персонализированных лекарственных средств. Биотехнология. 2020. Т. 36. № 4. С. 80-86.

6. Shilovskiy I.P., **Nikolskii A.A.,** Kurbacheva O.M., Khaitov M.R. Modern view of neutrophilic asthma molecular mechanisms and therapy. Biochemistry (Moscow). 2020. Т. 85. № 8. С. 854-868.

7. **Nikolskii A.,** Shilovskiy I., Barvinskaia E., Korneev A., Sundukova M., Khaitov M. Role of STAT3 transcription factor in pathogenesis of bronchial asthma. Biochemistry (Moscow). 2021. Т. 86. № 11. С. 1489–1501.

8. **Никольский А.А.,** Шиловский И.П., Юмашев К.В., Вишнякова Л.И., Барвинская Е.Д., Ковчина В.И., Корнеев А.В., Туренко В.Н., Каганова М.М., Брылина В.Е., Никонова А.А., Козлов И.Б., Кофиади И.А., Сергеев И.В., Маерле А.В., Петухова О.А., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Влияние локального подавления экспрессии гена Stat3 на нейтрофильное воспаление легких в экспериментальной модели на мышах. Иммунология. 2021. Т. 42. № 6. С. 600-614.

9. Shilovskiy I., **Nikolskii A.,** Kovchina V., Vishniakova L., Yumashev K., Barvinskaia E., Kaganova M., Korneev A., Turenko V., Brylina V., Petukhova O., Kudlay D., Khaitov M. Murine model of steroid-resistant neutrophilic bronchial asthma as an attempt to simulate human pathology. Journal of Immunological Methods. 2022. Т. 505. С. 1-14.