

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального

государственного бюджетного учреждения

«Государственный научный центр

«Институт иммунологии»

Федерального медико-биологического агентства,

член-корр. РАН, д.м.н., проф.

М.Р. Хайтов

2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного учреждения
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства
о диссертационной работе Никольского А.А. «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»**

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

Соискатель Никольский Александр Аркадьевич, дата рождения: 31.07.1995 г., гражданство Российская Федерация, в 2019 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московская государственная академия ветеринарной

медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина Министерства сельского хозяйства Российской Федерации по специальности «биология».

Научный руководитель: доктор биологических наук Шиловский Игорь Петрович, заместитель директора по науке и инновациям ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Слушали:

1. Выступление Никольского А.А. об основных результатах диссертационной работы.
2. Выступление рецензента д.б.н. Гудимы Г.О.
3. Выступление рецензента д.м.н. Донецковой А.Д.

По результатам рассмотрения диссертации принято следующее

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Актуальность исследования

Диссертация Никольского А.А. «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» посвящена проблеме, имеющей большое научное и научно-практическое значение.

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. В отдельных регионах мира от БА страдает до 18% населения, а в целом мире диагноз БА был поставлен около 300 млн пациентов. В России общее число пациентов с диагнозом 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 БА рассматривается как гетерогенное заболевание, включающее в себя несколько фенотипов (наблюдаемых клинических проявлений) и эндотипов (молекулярных и клеточных механизмов, формирующих клинические проявления).

Накоплены экспериментальные свидетельства участия других воспалительных клеток – нейтрофилов, в патогенезе БА. Ряд авторов выделяют БА с нейтрофильной типом воспаления как самостоятельный фенотип. Зачастую пациенты с такой астмой характеризуются тяжелым течением и плохо поддаются традиционному лечению с применением глюкокортикоидов. По эпидемиологическим данным до 10% пациентов с БА проявляют резистентность к терапии глюкокортикоидами. Изучение патогенеза БА с нейтрофильной типом воспаления и поиск путей преодоления резистентности к глюкокортикоидам является актуальной задачей имmunологии.

Исследование молекулярных и клеточных механизмов патогенеза БА данного фенотипа 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. Стоит отметить, что поляризация Th2- из Th0-клеток происходит при активации IL-4/STAT6-сигнального пути, тогда как Th17-клетки формируются при активации IL-6/STAT3-сигнального пути. В свою очередь Th17-клетки секреции цитокины IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22, которые приводят к развитию проявлений БА: нейтрофильному воспалению, гиперсекреции слизи и ремоделированию респираторного тракта.

Ранее было установлено, что в процесс активации клеток вовлечено 7 факторов транскрипции семейства STAT. Об участии STAT6 в запуске Th2- опосредованного воспаления лёгких при БА опубликовано много работ, тогда как о роли STAT3 в патогенезе БА имеется значительно меньше информации. Установлено, что 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 биологическая роли STAT3 невозможно ввиду того, что этот фактор транскрипции локализуются внутри клетки.

В то же время 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 мишений. Однако использование миРНК имеет ряд недостатков, одним из которых является неэффективная доставка этих молекул в клетки из-за быстрой деградации за счёт рибонуклеаз присутствующих в организме.

Использование дендримерных пептидов для доставки миРНК в клетки может решить эту проблему. Дендримерный пептид может образовать комплекс с миРНК, обеспечивая ее стабильность и защиту от деградации. Кроме того, положительно заряженные поверхностные группы дендримерных пептидов облегчают их взаимодействие с отрицательно заряженными компонентами клеточной мембранны, что позволяет им проникать в клетку и доставлять миРНК в цитоплазму. 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 также приобретают положительный заряд в водных растворах. В итоге суммарных положительный заряд молекулы LTP может достигать +16. Таким образом, комплекс миРНК и пептида-носителя может быть потенциально использован для доставки миРНК в клетки с целью регуляции экспрессии генов.

Работа посвящена изучению роли экспрессии гена *Stat3* в нейтрофильном воспалении при бронхиальной астме.

**Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России**

Диссертационная работа Никольского А.А. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ, проводимых ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по темам:

1. Эпигенетическая регуляция STAT3 при Th17-опосредованном воспалении слизистых оболочек. Грант Российского фонда фундаментальных исследований № 16-54-53089.

2. Изучение молекулярных механизмов развития стероид-резистентной нейтрофильной бронхиальной астмы. Грант Президента Российской Федерации № МД-1578.2019.4.

3. Роль Th17-иммунного ответа в развитии резистентности нейтрофильной бронхиальной астмы к терапии глюокортикоидами. Грант Российского фонда фундаментальных исследований № 20-34-90151.

Тема диссертации утверждена на заседании секции № 2 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, протокол № 5 от 01.11.2019 г.

Основные результаты диссертационной работы и их достоверность

Была разработана модель БА у мышей с преобладающим нейтрофильным воспалением. Для этого мышей линии BALB/c иммунизировали смесью модельного аллергена овальбумина и адьюванта Фрейнда с последующей аэрозольной провокацией тем же самым аллергеном в смеси с липополисахаридом из *E. coli*. В результате у мышей развивались ключевые проявления БА с нейтрофильным типом воспаления: продукция аллерген-специфических антител класса IgE, развитие гиперреактивности бронхов, ремоделирование респираторного тракта и инфильтрация ткани

легких нейтрофилами. При этом формирование данной патологии протекало по Th17-зависимым механизмам, что соответствует наблюдаемой клинической картине. Созданная модель заболевания демонстрировала устойчивость к экспериментальной терапии кортикостероидами, т.к. лечение животных дексаметазоном не влияло на уровень аллерген-специфических IgE-антител, гиперреактивность бронхов и количество провоспалительных клеток в бронхоальвеолярном лаваже. Созданная модель БА с нейтрофильным типом воспаления была использована автором как для изучения патогенеза заболевания, так и для тестирования новых подходов к его терапии.

Автором спроектированы молекулы миРНК, специфически подавляющие экспрессию гена *Stat3* как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Первоначально было спроектировано 5 вариантов молекул миРНК, каждая из которых состоит из двух РНК-олигонуклеотидов – смыслового и антисмыслового. Эти молекулы миРНК способны независимо связываться с различными участками молекулы мРНК гена *Stat3*. В результате тестирования их специфической активности в экспериментах *in vitro* был идентифицирован наиболее активный вариант миРНК – siSTAT3-1426. Данный вариант миРНК был в последствии использован в экспериментах *in vivo*.

Известно, что молекулы миРНК не способны самопроизвольно проникать к месту действия – в цитоплазму клеток. Поэтому в работе автором был использован катионный дендримерный пептид LTP, который был ранее синтезирован в лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Этот пептид способен доставлять нуклеиновые кислоты (включая миРНК) в различные типы клеток млекопитающих.

Автором был сформирован комплекс, состоящий из молекул миРНК, подавляющих экспрессию гена *Stat3*, и пептида-носителя LTP. Определено оптимальное соотношение миРНК и пептида-носителя LTP в составе комплекса siSTAT3/LTP, которое составило 1/12,5 по массе.

В экспериментах *in vitro* была доказана способность комплекса siSTAT3/LTP подавлять экспрессию *Stat3* в клетках L929. Также была изучена

способность комплекса siSTAT3/LTP супрессировать экспрессию *Stat3* в Th17-клетках. Для этого Th0-клетки были выделены из селезенок мышей и дифференцированы в Th17-клетки в присутствии анти-CD28-антител, IL-6, TGF- β . В клетках, обработанных комплексом siSTAT3/LTP, было выявлено 2-кратное снижение уровня экспрессии мРНК *Stat3* и 15-кратное снижение уровня экспрессии мРНК *Il17a*. Учитывая, что комплекс siSTAT3/LTP способен подавлять экспрессию генов *Stat3* и *Il17a* в лимфоцитах, его использовали в последующих исследованиях *in vivo* на модели БА с нейтрофильным воспалением у мышей.

В экспериментах *in vivo* автором показано, что пятикратное ингаляционное введение комплекса siSTAT3/LTP мышам приводило к снижению уровня экспрессии гена *Stat3* в клетках бронхоальвеолярного лаважа, что, в свою очередь, оказывало влияние на проявления патологии: происходило 3-кратное уменьшение количества нейтрофилов в образцах бронхоальвеолярного лаважа; было отмечено уменьшение признаков ремоделирования бронхов и восстановление толщины стенок бронхов; так же происходило снижение экспрессии генов Th17-цитокинов (*Il17a* и *Il17f*). Однако не было отмечено влияния комплекса на гиперреактивность бронхов и концентрацию IgE и IgG1 в сыворотке крови. Это свидетельствует об отсутствии участия гена *Stat3* в формировании Th2-иммунного ответа.

Таким образом, была создана экспериментальная модель на мышах, имитирующая резистентную к кортикостероидам БА с нейтрофильным воспалением. Предлагаемый протокол позволяет индуцировать у мышей все важные признаки заболевания, включая выработку аллерген-специфического IgE, гиперреактивность бронхов, ремоделирование дыхательных путей и нейтрофильное воспаление, которые развивается при помощи Th17-зависимого пути. Также было показано, что локальное подавление экспрессии *Stat3* молекулами миРНК приводит к уменьшению Th17-зависимого нейтрофильного воспаления в модели у мышей. Описанный подход может

быть многообещающим методом терапии кортикостероид-резистентной бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления.

Результаты получены на сертифицированном, калиброванном оборудовании и воспроизведены минимум в трех независимых повторах экспериментов. Показана воспроизводимость данных в различных условиях. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны. Выводы обоснованы результатами исследований.

Научная новизна работы

В рамках настоящей работы Никольским А.А. 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 адьювантом Фрейнда и липополисахаридом *Escherichia coli*.

Автором 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 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.

В работе автором впервые изучена взаимосвязь между процессом подавления экспрессии гена *Stat3* с помощью синтетических молекул миРНК и степенью проявления признаков БА. В работе 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.

Таким образом, автором впервые экспериментально доказана возможность применения явления интерференции РНК в качестве подхода для терапии кортикостероид-резистентной БА с нейтрофильным типом воспаления.

Теоретическая 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 M2-макрофагов, и продукции ими металлопротеаз MMP2 и MMP9. Кроме того, активация STAT3 в фибробластах обеспечивает продукцию ими факторов фиброза. Соответственно, супрессия гена *Stat3* в макрофагах и фибробластах может уменьшать выраженность признаков ремоделирования бронхов, что наблюдалось автором в проведенном исследовании; а именно происходило уменьшение толщины стенки бронхов после подавления экспрессии гена *Stat3* молекулами миРНК.

В-четвертых, 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. Увеличение экспрессии STAT3 под действием IL-6 существенно увеличивает количество ICAM-1 и VCAM-1 на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к усиленному рекрутированию провоспалительных клеток в легкие. По всей видимости снижение количества нейтрофилов в образцах БАЛ, которое наблюдал автор в проведённом исследовании может быть объяснено подавлением экспрессии гена *Stat3* в эндотелиальных клетках.

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

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость данной работы заключается в том, что была создана экспериментальная модель на мышах, имитирующая резистентную к кортикостероидам нейтрофильную бронхиальную астму. Предложенный автором 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 автором предложен инновационный подход к терапии кортикоид-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 кортикоидами.

Результаты исследования указывают на возможность использования сконструированных молекул миРНК для разработки новых методов лечения заболеваний, связанных с повышенной экспрессией гена *Stat3*. Это может

привести к разработке более эффективных и безопасных методов лечения этих заболеваний, что является крайне важным для современной медицины.

Разработка комплекса, состоящего из молекул миРНК и катионного пептида-носителя LTP, имеет большую научно-практическую значимость. Этот комплекс позволяет эффективно подавлять экспрессию гена *Stat3* и транспортировать миРНК в различные типы клеток, обеспечивая при этом адресную доставку миРНК к клеткам-мишеням. Такой комплекс может быть использован в лечении различных заболеваний, связанных с нарушением экспрессии генов, в том числе онкологических заболеваний, аутоиммунных заболеваний и инфекций. Кроме того, разработка этого комплекса может помочь в создании новых методов лечения, более точно и эффективно действующих на конкретные типы клеток.

Таким образом, результаты исследования могут быть использованы для разработки новых методов терапии кортикостероид-резистентной бронхиальной астмы с нейтрофильным воспалением на основе комплекса молекул миРНК и пептида-носителя LTP, а также для дальнейших исследований в области молекулярной биологии и имmunологии.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

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»).

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., Хайтов 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., Хайтов 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., Хайтов 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., Хайтов 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., Хайтов 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.,

Маэрле А.В., Петухова О.А., Кудлай Д.А., Хайтов 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.

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., Krakow). Устный доклад «The mouse model of corticosteroid resistant neutrophilic lung inflammation».

Ученый совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана научная концепция использования интерференции РНК, для подавления экспрессии гена *Stat3*, в качестве инновационного подхода к терапии стероид-резистентной бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления;

предложена оригинальная научная гипотеза о возможности использования комплекса миРНК и пептида-носителя в качестве лекарственного средства для терапии бронхиальной астмы с нейтрофильным воспалением. Основываясь на этой гипотезе, предполагается, что данный комплекс может способствовать ингибированию экспрессии гена *Stat3* в ткани легких, что, в свою очередь, может привести к улучшению состояния пациентов с бронхиальной астмой;

доказана перспективность использования комплекса, состоящего из миРНК, подавляющей экспрессию гена *Stat3*, и катионного пептида-носителя LTP, ингаляции которым приводят к уменьшению Th17-зависимого нейтрофильного воспаления легких;

введена в экспериментальное использование оригинальная модель стероид-резистентной бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления на мышах для лабораторной оценки комплекса миРНК и пептида-носителя. Данная модель также может быть использована для тестирования новых средств терапии данной патологии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что интерференция РНК представляет собой многообещающий подход для лечения кортикостероид-резистентной бронхиальной астмы с нейтрофильным воспалением, поскольку позволяет эффективно уменьшать экспрессию генов, ответственных за воспалительный процесс, без негативных побочных эффектов, связанных с применением кортикостероидов;

применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс существующих базовых методов исследования, таких как: иммуноферментный анализ, неинвазивная плетизмография, полимеразная цепная реакция в реальном времени, гистологический анализ легких;

изложены доказательства, подтверждающие специфическую активность комплекса, которая приводит к уменьшению Th17-зависимого

нейтрофильного воспаления. Эффект достигается за счет использования в составе комплекса молекул миРНК, которые подавляют экспрессию гена *Stat3*, а также катионного пептида-носителя LTP, обладающего способностью транспортировать нуклеиновые кислоты в различные типы клеток, включая лимфоциты;

раскрыты эффекты ингибирования экспрессии гена *Stat3* при нейтрофильной БА, что имеет существенную значимость при терапии данной патологии, при этом показана его связь с Th17-иммунным ответом;

изучен фактор транскрипции STAT3, необходимый для активации Th17-зависимого нейтрофильного воспаления при бронхиальной астме, которое устойчиво к терапии кортикостероидами;

проведена модернизация процесса моделирования бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления. Были подобраны оптимальные дозы аллергена (овальбумина) и липополисахарида, а также увеличено количество ингаляций, что позволило усилить инфильтрацию дыхательных путей нейтрофилами, вызвать более выраженное утолщение стенок бронхов и увеличить долю бокаловидных клеток, секретирующих слизь, в бронхиальном эпителии мышей.

Значение полученных результатов для практики подтверждается тем, что:

разработана и внедрена модель на мышах, которая необходима для тестирования лекарственных средств, предназначенных для терапии бронхиальной астмы с нейтрофильным типом воспаления;

определены пределы и перспективы практического использования теории о применении РНК-интерференции для терапии кортикостероид-резистентной бронхиальной астмы с нейтрофильным воспалением на практике;

созданы уникальные молекулы миРНК, которые эффективно подавляют экспрессию гена *Stat3*, что приводит к ингибированию нейтрофильного воспаление легких, развивающегося по Th17-зависимому механизму;

представлены рекомендации по использованию гена *Stat3* в качестве перспективной мишени для создания новых средств терапии кортикостероид-резистентной нейтрофильной БА с применением технологии интерференции РНК, улучшающих качество жизни пациентов, страдающих этим заболеванием.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты работы получены на сертифицированном оборудовании и с использованием методов, адекватных поставленным задачам;

теория построена на известных, проверяемых фактах и согласуется с общепринятыми представлениями о клинико-патогенетических подходах к лечению бронхиальной астмы с нейтрофильным воспалением;

идея базируется на обобщении передового опыта автора и других исследователей по рассматриваемой тематике;

использованы сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике, как отечественных, так и зарубежных исследований;

установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике;

использованы современные методы сбора и обработки исходной информации; объем проведенных исследований достаточен для выработки обоснованных заключений.

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации:

личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационного исследования, проведении анализа современной литературы по теме исследования, в непосредственном личном участии в экспериментальных исследованиях, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по теме выполненной работы.

Соответствие диссертации предъявляемым требованиям и рекомендация к защите

Диссертация Никольского А.А. «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» охватывает основные вопросы поставленных научных задач и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием соответствующего методологически обоснованного плана научного исследования, непротиворечивой методологической платформы, основной идейной линии, концептуальностью и взаимосвязанностью выводов.

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. Положительная оценка диссертации вытекает из ее актуальности, достоверности полученных данных, их научной новизны, теоретической и научно-практической значимости, обоснованности выводов.

Диссертационная работа соответствует специальности «3.2.7. Аллергология и иммунология», по которой она рекомендуется к защите.

Исходя из вышеперечисленного, постановили:

Диссертационная работа Никольского А.А. «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: разработана модель кортикостероид-резистентной нейтрофильной БА у мышей, воссоздающая основные проявления патологии; доказана перспективность применения интерференции РНК для целевого воздействия на ключевые звенья патогенеза бронхиальной астмы с нейтрофильным воспалением; сконструированы молекулы миРНК, способные эффективно подавлять экспрессию гена *Stat3* в модельных системах *in vitro* и *in vivo*; разработан комплекс, состоящий из молекул миРНК, подавляющих экспрессию гена *Stat3*, и катионного пептида-носителя LTP, способного транспортировать нуклеиновые кислоты в различные типы клеток, обеспечивающий эффективную адресную доставку миРНК к клеткам-мишеням; установлена его активность *in vitro* и *in vivo*. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года с изменениями постановления Правительства Российской Федерации № 723 от 30.07.2014; № 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.) и может быть представлена к защите в специализированном диссертационном совете.

Заключение принято на расширенном заседании секции № 2 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (дата заседания: 5 июля 2022 г.). Присутствовало на заседании 11 членов секции, в том числе 7 докторов наук и 4 кандидата наук по специальности рассматриваемой диссертации. Результаты голосования: «за» – 11 человек, «против» – 0 человек, «воздержалось» – 0 человек, протокол № 3 от 5 июля 2022 года.

Председатель секции №2

Ученого совета, д.м.н., профессор



Пинегин Б.В.

Секретарь секции №2

Ученого совета



А.С.

Порошина А.С.

