

На правах рукописи

САВИН ИННОКЕНТИЙ АНДРЕЕВИЧ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ
РАЗВИТИЕ ОСТРЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ
И ИХ ПЕРЕХОД В ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ**

1.5.4. – Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Сенькова Александра Васильевна

Научный консультант:

доктор биологических наук

Зенкова Марина Аркадьевна

чл.-корр. РАН, профессор

Официальные оппоненты:

Колосова Наталия Гориславовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Шпагина Любовь Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии и медицинской реабилитации, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» г. Новосибирск.

Защита диссертации состоится «__» _____ 202_ г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.242.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте <https://frcftm.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 202_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

к.б.н.

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

В настоящее время острые и хронические заболевания легких являются третьей по частоте причиной смертности, занимая это место после сердечно-сосудистых заболеваний и онкопатологий [Soriano и др., 2020]. Несмотря на то, что острые воспалительные заболевания легких, такие как бактериальные и вирусные пневмонии, успешно поддаются этиотропной, патогенетической и симптоматической терапии, в ряде случаев происходит тяжелое и обширное повреждение легочной ткани [Jia и др., 2022; Meyer, Gattinoni, Calfee, 2021].

Острое повреждение легких (ОПЛ) – это специфическая форма поражения легких, характеризующаяся диффузным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным нейтрофил-ассоциированным воспалением [Chen и др., 2020; Mowery, Terzian, Nelson, 2020]. В течение последних лет заболеваемость и смертность от ОПЛ значительно возросла в результате пандемии новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-2019) [Jamal и др., 2021; Ramasamy, Subbian, 2021].

Гистологически ОПЛ представлено паттерном диффузных альвеолярных повреждений, характеризующих экссудативную фазу, которая сопровождается отеком и формированием гиалиновых мембран, а затем переходит в пролиферативную фазу с развитием фибропластических изменений и гиперплазией альвеолоцитов II типа [Spinelli и др., 2020]. Потенциальной третьей фазой ОПЛ может стать фиброз легких.

Одной из самых распространенных хронических воспалительных патологий легких, сопровождающейся фибротическими изменениями, является бронхиальная астма (БА) – гетерогенное заболевание, главными отличительными признаками которого являются персистирующее воспаление дыхательных путей, а также их гиперреактивность и обратимое нарушение проходимости [Perez-Garcia и др., 2020; Vasconcelos и др., 2021]. Структурные изменения дыхательных путей, ассоциированные с прогрессией и хронизацией астмы, объединены под широким термином «ремоделирование дыхательных путей» [Hough и др., 2020; Mostaço-Guidolin и др., 2019], который включает в себя клеточные и внеклеточные изменения в больших и малых дыхательных путях: отложение компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) [Ito и др., 2019], нарушение функции эпителия [Bazan-Socha и др., 2021], гиперплазию бокаловидных клеток [Chakraborty и др., 2022], пролиферацию гладкомышечных клеток и фибробластов/миофибробластов [Cheng и др., 2021; Nassoun и др., 2022; Wnuk и др., 2020].

Таким образом, самый распространенный исход острого воспаления – это его своевременное разрешение с восстановлением поврежденных тканей. Однако, при невозможности элиминации воспалительного фактора, острое воспаление переходит в хроническое, которое в некоторых случаях может привести к развитию фиброза. В основе развития фиброза лежит

нерегулируемый процесс восстановления повреждений (wound healing), а основной эффекторной клеткой данного процесса являются фибробласты и миофибробласты. Также показано, что одним из долговременных эффектов легочного воспаления является гиперплазия альвеолоцитов 2 типа и сквамозная метаплазия бронхиального эпителия, которые могут быть предопухолевыми состояниями. Поэтому быстрое и ранее прогнозирование тяжелого течения, возможных осложнений и отдаленных последствий ОПЛ с помощью специфических биомаркеров могло бы улучшить прогноз пациентов с воспалительными заболеваниями легких, что делает поиск таких биомаркеров актуальной задачей.

Цель исследования

Идентификация узловых генов, вовлеченных в развитие легочного воспаления различной этиологии, а также потенциальных молекулярных маркеров перехода от острых воспалительных изменений в легких к легочному фиброзу.

Задачи исследования

1. Поиск ключевых генов, участвующих в регуляции острого повреждения легких (ОПЛ) различной этиологии.

2. Валидация идентифицированных генов на *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ без лечения и после его коррекции противовоспалительными соединениями.

3. Исследование функциональной взаимосвязи между идентифицированными узловыми элементами ОПЛ-ассоциированной регуляторной сети и генами, изменение экспрессии которых связано с развитием/прогрессированием COVID-19 и опухолевых заболеваний легких.

4. Поиск ключевых генов, ассоциированных с развитием острого астматического воспаления, а также их связи с фиброзом легких.

5. Валидация идентифицированных астма-ассоциированных генов на модели овальбумин-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза.

6. Исследование функциональной взаимосвязи между идентифицированными фиброз-ассоциированными генами и генами, изменение экспрессии которых связано с развитием/прогрессированием хронических заболеваний легких человека.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что гены *Il-6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, *Ptx3*, *Socs3* являются ключевыми участниками острых воспалительных изменений в легких при ОПЛ различной этиологии. Показано, что при развитии липополисахарид (ЛПС)-индуцированного ОПЛ происходит активация данных генов, в то время как противовоспалительная терапия приводит к подавлению их экспрессии. Впервые показано, что некоторые ОПЛ-ассоциированные гены (*Saal*, *Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4*, *Mmp8*) связаны с развитием COVID-19, а на модели ЛПС-индуцированного ОПЛ показано изменение их экспрессии как при развитии острого воспаления, так и при проведении противовоспалительной терапии. Впервые показана взаимосвязь между

уровнями экспрессии ряда ОПЛ-ассоциированных генов (*PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR*) и неблагоприятным прогнозом у пациентов с злокачественными новообразованиями легких.

Впервые на модели овальбумин (ОВА)-индуцированной астмы показано, что морфологические признаки ремоделирования дыхательных путей и легочного фиброза формируются уже на стадии подострого астма-ассоциированного воспаления. Впервые идентифицированы гены, регулирующие как острое астматическое воспаление, так и развитие пост-астматического фиброза (*Timp1*, *Ccl2*, *Igf1*, *Muc5ac*, *Muc5b*, *C3*, *Fn1*, *Cat*, *Cyp2e1*). Впервые показано, что уровни экспрессии ряда генов, ассоциированных с легочным фиброзом не-астматической этиологии (*Colla1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs1*, *Tyropb*), повышались в тканях легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом. Впервые показано, что профиль экспрессии генов при пост-астматическом фиброзе у мышей обладает наибольшим сходством с профилем экспрессии генов при идиопатическом легочном фиброзе у человека.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты позволяют расширить современные представления о механизмах, лежащих в основе развития ОПЛ различной этиологии, а также перехода острого воспаления в легочный фиброз. Идентифицирован ряд генов, которые могут быть рассмотрены в качестве потенциальных молекулярных маркеров и терапевтических мишеней воспалительных и фибротических изменений в легких, в том числе вызванных SARS-CoV-2 и опухолевыми заболеваниями легких.

Полученные результаты могут использоваться в качестве теоретической базы при разработке новых подходов стратификации риска развития осложнений, тяжелого течения и отдаленных последствий острых воспалительных процессов в легких, а также для разработки методов терапии острых и хронических воспалительных заболеваний легких. Исследованные *in vivo* модели могут использоваться в качестве платформы для разработки средств противовоспалительной и антифибротической терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Воспалительный процесс и последующее ремоделирование внеклеточного матрикса являются основополагающими этапами острого повреждения легких (ОПЛ), а узловые гены, вовлеченные в эти процессы (*Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*, *Ptx3*, *Cat*, *Eln*), могут являться потенциальными прогностическими маркерами и терапевтическими мишенями ОПЛ.

2. *In vivo* модель ЛПС-индуцированного ОПЛ может быть использована в качестве платформы для разработки средств противовоспалительной терапии при SARS-CoV-2-ассоциированном повреждении легких.

3. Изменение экспрессии генов *TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR* и *PTX3*, играющих ключевую роль в развитии ОПЛ, отражает тяжесть течения и скорость прогрессирования злокачественных новообразований легких.

4. Гены *Fn1*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Muc5b*, *Muc5ac*, *Cat*, *Cyp2e1*, ассоциированные с развитием острой астмы, могут являться регуляторами ранних фибротических изменений в легких.

5. *In vivo* модель овалбумин-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза может быть использована в качестве платформы как для изучения ранних фибротических изменений в легких, так и для разработки средств их терапии.

6. Пост-астматический фиброз у мышей обладает наибольшим сходством с ранним идиопатическим легочным фиброзом у человека, а гены *Col4a1* и *Col4a2* могут являться потенциальными предикторами и ранними маркерами развития легочного фиброза.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая достоверность полученных результатов гарантирована достаточным объемом материала для исследования, использованием стандартизированных наборов реагентов, валидацией результатов биоинформатического анализа на мышиных моделях, а также методами статистической обработки полученных результатов.

По материалам исследования опубликовано **14** работ, из них: **4** статьи в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, и **10** тезисов в сборниках Российских и международных конференций. Результаты исследования были представлены в рамках: Научной конференции с элементами школы молодых ученых «Biotop 2020: актуальные вопросы современной биологии», 21-24 декабря 2020, г. Новосибирск, Россия; Первой всероссийской школы для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021, 4-9 июля 2021, г. Новосибирск, Россия; Научной школы-конференции для молодых ученых «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины», 22-24 ноября 2021, г. Новосибирск, Россия; Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24-28 июля 2022, г. Новосибирск, Россия; II Объединенного научного форума: VII съезд физиологов СНГ, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», 3-7 октября 2022, г. Сочи, Россия.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 218 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 8 таблиц. Библиография содержит 800 литературных источников.

Вклад автора

Результаты, представленные в диссертационном исследовании, получены самим автором или при его непосредственном участии. Биоинформатический анализ был проведен совместно с сотрудником лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН к.б.н. Марковым Андреем Владимировичем. Автор выражает глубокую

признательность и благодарность своему научному руководителю к.м.н. Сеньковой Александре Васильевне за чуткое руководство и бесконечное терпение; научному консультанту д.б.н., чл.-корр. Зенковой Марине Аркадьевне за идеологическое направление и концептуальную поддержку работы; к.б.н. Маркову Андрею Владимировичу за обширную поддержку, оказанную при овладении методами биоинформатического анализа; к.б.н. Бреннеру Евгению Владиславовичу и д.б.н. Черноловской Елене Леонидовне за помощь в освоении ОТ-ПЦР анализа; а также всем сотрудникам лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН за поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленных целей в работе использовались методы биоинформатического анализа (отбор наборов транскриптомных данных, функциональный анализ, построение генно-ассоциативных сетей, текст-майнинговый анализ), *in vivo* модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких, ОВА-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза, анализ клеточного состава и уровня цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости, гистологическое и иммуногистохимическое исследование ткани легких, анализ уровней экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР анализа. Общая схема исследования представлена на Рис. 1.

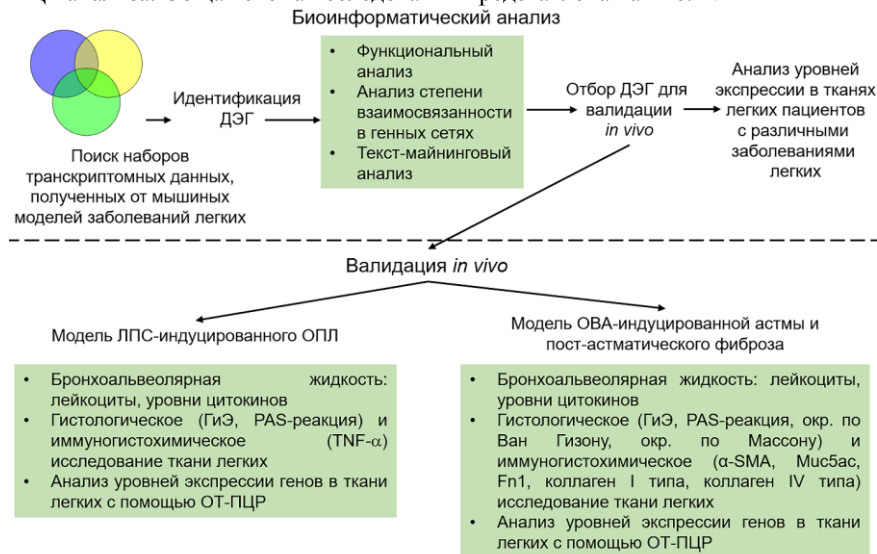


Рисунок 1. Общая схема исследования, представленная двумя основными подходами: биоинформатическим анализом и валидацией полученных данных *in vivo*. ДЭГ – дифференциально экспрессированные гены, ЛПС – липополисахарид, ОПЛ – острое повреждение легких, ОВА – овалбумин, ГиЭ – гематоксилин и эозин, ОТ-ПЦР – обратная транскрипция полимеразная цепная реакция.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация ключевых генов, вовлеченных в развитие ОПЛ различной этиологии

Идентификацию узловых генов, ассоциированных с развитием ОПЛ различной этиологии, проводили путем оценки изменения их экспрессии в воспаленной легочной ткани по сравнению со здоровыми легкими путем ре-анализа данных кДНК микрочипирования из следующих датасетов: GE58654 (гипероксия), GSE80011 (вирус гриппа), GSE130936 (ЛПС), GSE94522 (блеомицин) (Рис. 2). Было выявлено 58 общих для всех наборов данных дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) (Рис. 2А), 48 из которых были up-регулированы, а 10 – down-регулированы.

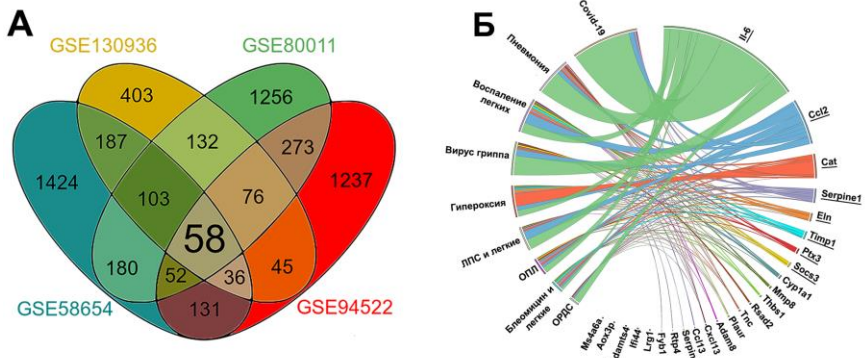


Рисунок 2. Ключевые гены, вовлеченные в развитие ОПЛ различной этиологии, идентифицированные с помощью биоинформатического анализа. (А) Венн диаграмма, иллюстрирующая ДЭГ, общие для четырех независимых наборов данных. **(Б)** Совместное упоминание идентифицированных ДЭГ с ОПЛ-ассоциированным терминами в научной литературе, депонированной в базе данных MEDLINE.

При реконструкции генно-ассоциативных сетей для всех проанализированных наборов данных с помощью базы данных STRING в программном обеспечении Cytoscape были выявлены генные взаимодействия с высокой степенью достоверности ($\geq 0,7$) с последующим подсчетом степени взаимосвязанности каждого из 58 ДЭГ. В топ-10 наиболее взаимосвязанных в ОПЛ-ассоциированном регуломе генов вошли про-воспалительные цитокины и хемокины *Il-6*, *Cxcl13* и *Ccl2*, а также регуляторы взаимодействия клеток с другими клетками и внеклеточным матриксом (ВКМ), такие как *Timp1*, *Adam8*, *Thbs1*, *Serpina3n* и *Serpine1*. Также в топ-10 ОПЛ-ассоциированных узловых генов вошли *Socs3* и *Rtp4*. В топ-25 наиболее взаимосвязанных генов вошли регуляторы гомеостаза ВКМ (*Plaur*, *Mmp8*, *Eln*, *Adamts4*, *Tnc*), участники иммунного ответа (*Ifi44*, *Rsad2*, *Ptx3*, *Lcn2*), регуляторы передачи сигналов (*Lrg2*, *Fyb1*, *Ms4aba*), а также гены, кодирующие антиоксидантный фермент *Cat* и фермент метаболизма ксенобиотиков *Cyp2e1*.

Далее, для анализа степени исследованности данных генов в области легочного воспаления/повреждения был проведен текст-майнинг анализ совместного упоминания генов и ключевых слов, ассоциированных с легочной патологией, в текстах научных статей, депонированных в базе данных MEDLINE с помощью сервиса GenClIP3 (Рис. 2Б). Текст-майнинг анализ показал, что 20 из 25 узловых генов были связаны с процессами, ассоциированными с воспалением/повреждением легких, при этом 8 генов (*Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*, *Ptx3*, *Cat* и *Eln*) оказались наиболее связанным с изученными заболеваниями. Учитывая ключевую роль в регуляции воспаления легких различной этиологии, данные текст-майнингового анализа, а также узловую позицию в ОПЛ-ассоциированных сетях, следующие гены – потенциальные мастер-регуляторы (далее гены ПМР) были выбраны нами для валидации *in vivo*: *Il-6* (позиция в списке генов = 1), *Timp1* (3), *Ccl2* (4), *Socs3* (7), *Serpine1* (9), *Ptx3* (16), *Cat* (18), и *Eln* (21).

***In vivo* модель липополисахарид (ЛПС)-индуцированного ОПЛ:**

патоморфологическая и молекулярно-биологическая характеристика

Для оценки изменения уровней экспрессии идентифицированных генов ПМР как в процессе развития острого воспаления легких, так и при его терапии противовоспалительными соединениями использовали *in vivo* модель ЛПС-индуцированного ОПЛ, а в качестве противовоспалительных препаратов – солоколсон метил (СМ) и дексаметазон, характеризующихся разным механизмом действия (Рис. 3).

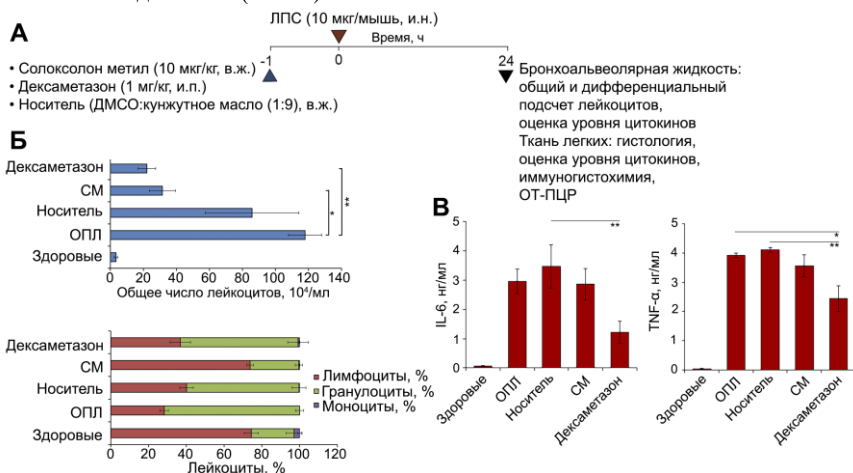


Рисунок 3. Влияние противовоспалительных соединений на развитие ЛПС-индуцированного ОПЛ *in vivo*. (А) Схема эксперимента. (Б) Общее и дифференциальное число лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости здоровых и экспериментальных животных. (В) Уровень про-воспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α в бронхоальвеолярной жидкости здоровых и экспериментальных мышей.

Мышам интраназально вводили ЛПС (10 мкг/мышь) и через 24 ч анализировали изменения в легких (Рис. 3А). СМ и дексаметазон вводили внутривенно за 1 ч до индукции воспаления. В качестве растворителя для СМ использовали кунжутное масло (носитель). Через 24 ч после введения ЛПС происходило развитие острого воспалительного процесса в дыхательной системе мышей, который характеризовался увеличением в бронхоальвеолярной жидкости общего числа лейкоцитов (за счет гранулоцитов) и уровня про-воспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α (Рис. 3Б, В). Гистологически ткань легких мышей с ОПЛ характеризовалась выраженной нейтрофильной воспалительной инфильтрацией, циркуляторными нарушениями, деструктивными изменениями в бронхиальном и альвеолярном эпителии, а также реактивной гиперпродукцией слизи и гиперэкспрессией TNF- α в бронхиальном эпителии (Рис. 4).

Введение СМ и дексаметазона предотвращало развитие острого воспаления в дыхательной системе мышей, что выражалось в уменьшении интенсивности воспалительной инфильтрации, снижении общего числа лейкоцитов и про-воспалительных цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости (Рис. 3Б, В), а также уменьшении воспалительной инфильтрации, циркуляторных и деструктивных изменений в ткани легких мышей с ОПЛ (Рис. 4). Окраска по Шиффу показала, что СМ и дексаметазон эффективно предотвращают гиперпродукцию слизи бронхиальным эпителием, а иммуногистохимическая окраска легких показала, что СМ, но не дексаметазон, предотвращает активацию продукции TNF- α бронхиальным эпителием (Рис. 4).

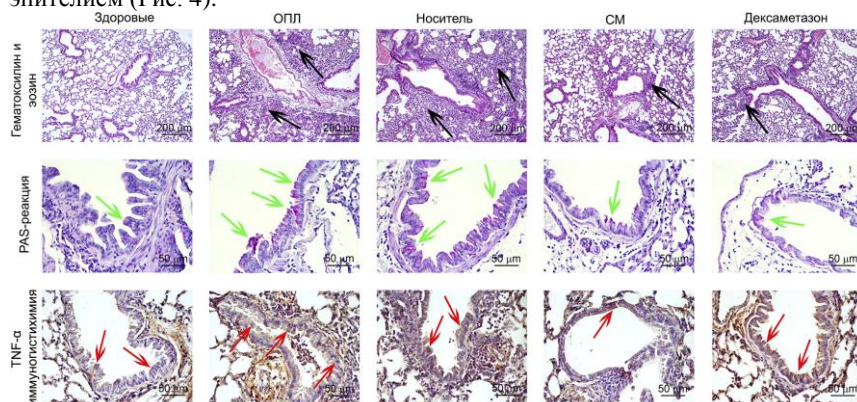


Рисунок 4. Гистологическое исследование ткани легких здоровых мышей и мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после введения противовоспалительных соединений. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$ (верхняя панель); окраска по Шиффу (PAS-реакция), ув. $\times 400$ (средняя панель); иммуногистохимическая окраска антителами к TNF- α , ув. $\times 400$ (нижняя панель). Черными стрелками указана воспалительная инфильтрация, зелеными –

гиперпродукция слизи, красными – повышенная экспрессия TNF- α бронхиальным эпителием.

Таким образом, описанная *in vivo* модель ОПЛ может быть использована в качестве платформы для валидации роли ключевых генов в развитии легочного воспаления и оценки их чувствительности к противовоспалительной терапии.

Анализ паттернов экспрессии генов ПМР в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ

Уровни экспрессии генов, идентифицированных в качестве ПМР развития острого воспалительного процесса в легких, были проанализированы с помощью ОТ-ПЦР в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ (Табл. 1).

Таблица 1. Уровни экспрессии генов ПМР ОПЛ в ткани легких экспериментальных животных.

Группа	Название гена							
	<i>Il-6</i>	<i>Ccl2</i>	<i>Cat</i>	<i>Serpine1</i>	<i>Eln</i>	<i>Timp1</i>	<i>Ptx3</i>	<i>Socs3</i>
ОПЛ	258,8	244,9	-1,9	25,2	2,1	117,8	3,5	35,0
Носитель	252,8	310,6	-2,6	36,4	1,4	154,6	3,9	37,7
СМ	137,9*	164,6***	-2,1*	18,5*	-1,2	108,2*	4,0	23,1**
Дексаметазон	167,3	179,6***	-2,1*	20,8**	-1,5	98,2*	3,4	24,4**

Статистический анализ проведен с помощью двухстороннего непарного т-теста по Стьюденту, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ по сравнению с носителем. За 1 принят уровень экспрессии гена в ткани легких здоровых мышей.

Ткань легких здоровых животных характеризовалась низкими уровнями экспрессии исследуемых генов, в то время как введение ЛПС приводило к значительному повышению их экспрессии: *Il-6* > *Ccl2* > *Timp1* > *Socs3* > *Serpine1* > *Ptx3* > *Eln*. (Табл. 1). Снижение уровня экспрессии после введения ЛПС наблюдалось только для гена *Cat*, что коррелирует с данными биоинформатического анализа. При введении противовоспалительных соединений уровни экспрессии генов *Il-6* и *Ccl2* снижались в ткани легких мышей с ОПЛ по сравнению с контролем в большей степени, чем остальные гены, однако через 24 ч после индукции не достигали уровня здоровых животных. Снижение уровней экспрессии других генов ПМР в ткани легких мышей с ОПЛ при введении СМ и дексаметазона было менее значительным, чем у *Il-6* и *Ccl2*: по степени абсолютного снижения уровней экспрессии гены расположились в следующем порядке: *Serpine1* \geq *Eln* > *Timp1* \approx *Socs3*. Экспрессия *Ptx3* не изменялась в ответ на введение СМ и дексаметазона. Уровень экспрессии гена *Cat* не изменялся в ткани легких мышей с ОПЛ после введения противовоспалительных соединений по сравнению с группой, не получавшей лечение, однако был несколько увеличен по сравнению с группой, получавшей только носитель. Таким образом, показано, что уровни экспрессии генов ПМР (*Il6*, *Ccl2*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1* и *Socs3*) коррелировали с тяжестью ОПЛ: возрастали в ткани легких мышей при развитии ОПЛ и снижались под действием

противовоспалительной терапии, что подтверждает их регуляторную роль в развитии и разрешении воспалительного ответа в легких.

Идентификация узловых генов, связанных с развитием COVID-19, и их валидация на *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ

Для анализа вовлеченности ОПЛ-ассоциированных генов в развитие COVID-19 было проведено сопоставление 58 общих ДЭГ, участвующих в развитии легочного воспаления у мышей, с генами, активация которых была обнаружена в ткани легких пациентов, умерших от COVID-19 [Daamen и др., 2021] (Рис. 5А).

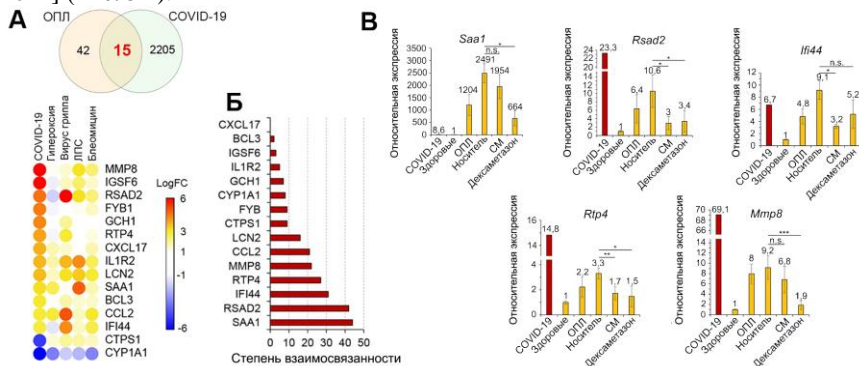


Рисунок 5. Участие ОПЛ-ассоциированных генов в регуляции повреждения легких, индуцированного SARS-CoV-2. (А) Верхняя панель: Венн-диаграмма общих генов, регулирующих развитие ОПЛ у мышей и COVID-19 у человека по данным Daamen и др. Нижняя панель: тепловая карта, иллюстрирующая уровни экспрессии 15 общих генов. **(Б)** Значения степеней взаимосвязанности ОПЛ-ассоциированных генов в регуломе COVID-19. **(В)** Уровни экспрессии ОПЛ/COVID-19 ассоциированных генов в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ.

Было идентифицировано 15 ОПЛ-ассоциированных генов, чьи уровни экспрессии изменялись при развитии COVID-19. Анализ генно-ассоциативной сети показал, что гены *SAA1*, *RSAD2*, *IFI44*, *RTP4* и *MMP8* обладают высоким уровнем взаимосвязанности, что говорит об их возможной регуляторной роли в развитии повреждения легких, индуцированного SARS-CoV-2 (Рис. 5Б). Затем, уровни экспрессии данных высоко взаимосвязанных с регуломом COVID-19 генов были проанализированы в ткани легких мышей с ОПЛ (Рис. 5В). Введение ЛПС приводило к значительному повышению экспрессии всех вышеуказанных генов в ткани легких экспериментальных животных, а противовоспалительная терапия вызывала снижение их экспрессии. При этом дексаметазон оказывал более значительный эффект по сравнению с CM, что выражалось в снижении уровней экспрессии 4 из 5 анализируемых генов (*Saa1*, *Rsad2*, *Rtp4*, *Mmp8*), в то время как CM уменьшал экспрессию только 3 генов (*Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4*). Полученные результаты говорят о необходимости дальнейшего исследования ОПЛ/COVID-19-ассоциированных генов в качестве

потенциальных терапевтических мишеней, воздействие на которые могло бы уменьшить тяжесть ОРДС, ассоциированного с SARS-CoV-2.

Корреляции между ОПЛ-ассоциированными ДЭГ и выживаемостью пациентов с злокачественными новообразованиями легких

Учитывая тесную связь острого и хронического воспаления, метаплазии, дисплазии и злокачественной трансформации, была проанализирована связь между ОПЛ-ассоциированными ДЭГ и выживаемостью пациентов с аденокарциномой легких (LUAD) и плоскоклеточным раком легких (LUSC) с помощью баз данных The Cancer Genome Atlas (TCGA) и Human Protein Atlas (HPA).

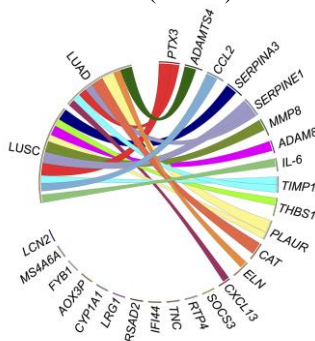


Рисунок 6. Связь ОПЛ-ассоциированных ДЭГ с выживаемостью пациентов с аденокарциномой легких (LUAD) и плоскоклеточным раком легких (LUSC). Корреляции выживаемости пациентов с уровнями экспрессии генов были проанализированы с помощью базы данных TCGA. Данные представлены в виде Circos плота, где ширина полосы прямо пропорциональна величине *r*.

Анализ баз данных TCGA и HPA показал, что из топ-25 генов, ассоциированных с ОПЛ, 14 связаны с ухудшением прогноза у пациентов с LUAD и LUSC (Рис. 6). Среди данных генов, повышение уровней экспрессии *PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1* и *PLAUR* ассоциировано с низкой выживаемостью пациентов как с LUAD, так и с LUSC. Учитывая тот факт, что данные 4 гена участвуют также в ремоделировании ВКМ, процесса, ассоциированного с злокачественной трансформацией и метастазированием [Eble, Niland, 2019], данные ОПЛ-ассоциированные гены могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров тяжести течения и возможного рецидива злокачественных новообразований легких.

Идентификация ключевых генов, ассоциированных с развитием астмы и пост-астматического фиброза

Идентификацию узловых генов, ассоциированных с острым астматическим воспалением проводили путем анализа уровней экспрессии генов в легких мышей с астмой по сравнению со здоровыми легкими путем ре-анализа 5 наборов данных полногеномного микрочипирования, полученных от мышинных моделей острой астмы (Рис. 7). В результате данного анализа было выявлено 47 ДЭГ, общих для всех наборов данных (Рис. 7А). Для анализа взаимодействий между данными генами была реконструирована генно-ассоциативная сеть, в состав которой вошли только 10 из 47 общих генов: гены, кодирующие про-воспалительные хемокины (*Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl12*), регулятор внеклеточного матрикса *Timp1*, компонент слизи *Muc5ac*, фактор

путей, были идентифицированы топ-10 ключевых генов (*Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl12*, *Timp1*, *Muc5ac*, *F5*, *Cyp2e1*, *Adra2a*, *Ear1*, *Tkl1*).

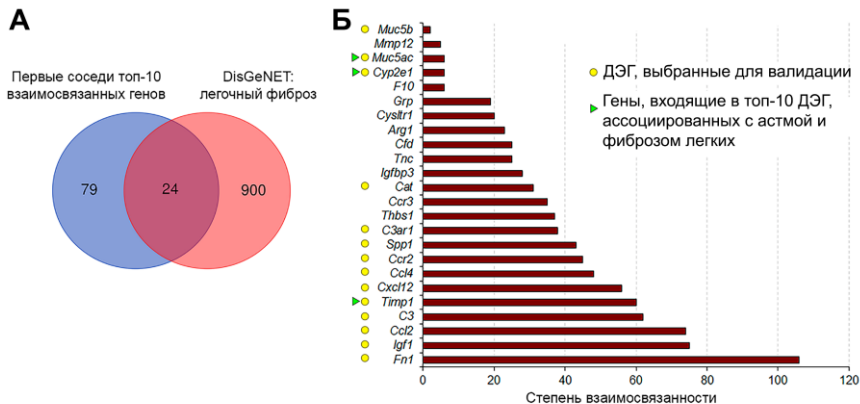


Рисунок 8. Вовлеченность ключевых генов, ассоциированных с острой астмой, в развитие легочного фиброза. (А) Диаграмма Венна, демонстрирующая гены, общие для топ-10 наиболее взаимосвязанных генов и их первых соседей и генов, ассоциированных с развитием легочного фиброза в базе данных DisGeNET. (Б) Степень взаимосвязанности 24 общих генов в генно-ассоциативной сети, сконструированной из генов, ассоциированных с фиброзом легких в базе данных DisGeNET.

Сравнение идентифицированных топ-10 узловых генов и их первых соседей с генами, ассоциированными с развитием легочного фиброза в базе данных DisGeNET, позволило идентифицировать возможные маркерные гены перехода от острого астматического воспаления к пост-астматическому фиброзу. Учитывая проведенный анализ, топ-10 астматических генов, наиболее связанных с регуломом легочного фиброза (*Fn1*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Cxcl12*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Spp1*, *C3ar1*), а также гены *Cat*, *Cyp2e1* и *Muc5ac/Muc5b* были выбраны для дальнейшей валидации *in vivo*.

***In vivo* модель овальбумин (ОВА)-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза**

Для постановки модели ОВА-индуцированной астмы и пост-астматического фиброза мышей линии Balb/C сенситизировали путем трех интраперитонеальных инъекций ОВА и гидроксида алюминия $Al(OH)_3$ на 1, 7 и 14 дни, с последующей четырехкратной ингаляцией 2% раствора ОВА на 21, 22, 23 и 24 дни эксперимента. Мышей выводили из эксперимента через 24 ч (острая фаза) и 4 недели (подострая фаза) после последней ингаляции ОВА, проводили забор бронхоальвеолярной жидкости и ткани легких для гистологического анализа и ОТ-ПЦР (Рис. 9А).

Ингаляции ОВА приводили к развитию острого воспаления в дыхательной системе мышей, которое характеризовалось повышением в

бронхоальвеолярной жидкости общего числа лейкоцитов (за счет гранулоцитов) и уровней про-воспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 (Рис. 9Б, В).

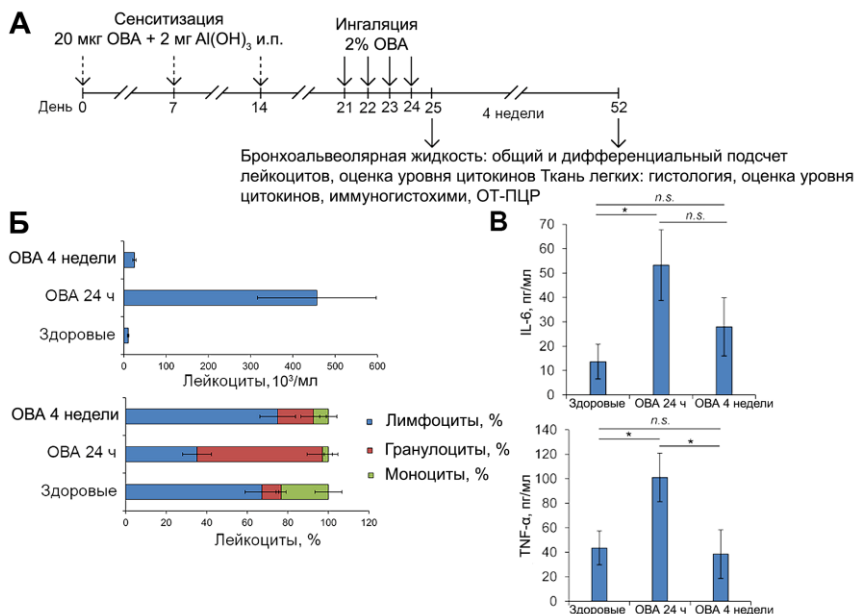


Рисунок 9. *In vivo* модель ОВА-индуцированной астмы. (А) Схема эксперимента. **(Б, В)** Общее и дифференциальное число лейкоцитов **(Б)**, а также уровни про-воспалительных цитокинов **(В)** в бронхоальвеолярной жидкости здоровых и экспериментальных животных через 24 ч и 4 недели после индукции.

Гистологически легкие мышей с ОВА-индуцированной астмой характеризовались воспалительной инфильтрацией, представленной гранулоцитами и локализованной преимущественно вокруг бронхов (Рис. 10). Также была обнаружена реактивная гиперпродукция слизи. Окраска на компоненты ВКМ (коллаген и эластин) и антителами к TNF- α показала базальное окрашивание структур легких как здоровых мышей, так и мышей с острой астмой (Рис. 10). Подострая фаза астматического воспаления характеризовалась нормализацией числа лейкоцитов и гранулоцитов, а также уровней IL-6 и TNF- α практически до уровня здоровых животных (Рис. 9Б, В). Гистологически в легких наблюдалась остаточная воспалительная инфильтрация, а также снижение реактивной гиперпродукции слизи. Однако были обнаружены признаки отложения компонентов ВКМ, разрастания соединительно-тканых волокон и начальной стадии перибронхиального легочного фиброза (Рис. 10). Иммуногистохимическое окрашивание легких показало увеличение экспрессии α -SMA в ткани легких мышей с подострой астмой, что подтверждает развитие легочного фиброза (Рис. 10).

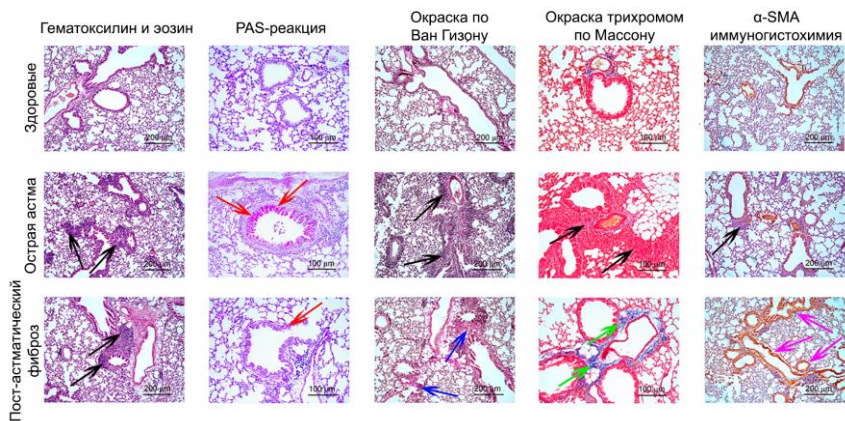


Рисунок 10. Патоморфологические изменения в ткани легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом. Ув. $\times 100$ (окраска гематоксилином и эозином, окраска по Ван Гизону, α -SMA) и $\times 200$ (PAS-реакция, трихром по Массону). Черными стрелками указана воспалительная инфильтрация, красными – гиперпродукция слизи, синими – эластиновые волокна; зелеными – коллагеновые волокна; фиолетовыми – компоненты стромы, окрашенные антителами к α -SMA.

Таким образом, оказалось, что инициация фибротических изменений в легких мышей с астмой возможна даже в отсутствие повторных циклов ингаляций ОВА, а использованная модель отражает клиническую и гистологическую картину ранних стадий ремоделирования дыхательных путей и фиброза легких.

Анализ паттернов экспрессии генов, ассоциированных с развитием астмы и легочного фиброза

Уровни экспрессии генов, ассоциированных с развитием острой астмы и пост-астматического фиброза, были оценены в ткани легких мышей с ОВА-индуцированной астмой через 24 ч (острая астма) и 4 недели (пост-астматический фиброз) после индукции (Табл. 2).

Таблица 2. Уровни экспрессии генов, идентифицированных в качестве маркеров астмы и легочного фиброза, в ткани легких с ОВА-индуцированной астмой и пост-астматическим фиброзом.

Группа	Название гена						
	<i>Timp1</i>	<i>Ccl2</i>	<i>Igf1</i>	<i>Muc5b</i>	<i>C3</i>	<i>Fnl</i>	<i>Muc5ac</i>
Астма	45,7*	29,5***	16,3*	12,2*	10,8***	5,9*	5,7*
Фиброз	2,3*	2,3*	1,7*	2*	3,3*	2,3*	1,5
	<i>C3ar1</i>	<i>Spp1</i>	<i>Ccr2</i>	<i>Cxcl12</i>	<i>Ccl4</i>	<i>Cyp2e1</i>	<i>Cat</i>
Астма	4,7***	3,4*	3,3	2	1,8	-4,8***	-11,2
Фиброз	-1,6	-1,6	1	1,5	-1,6	-2,8***	-9,6*

Статистический анализ был выполнен с помощью двухстороннего непарного t-теста по Стьюденту; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. За 1 принят уровень экспрессии гена в ткани легких здоровых мышей.

Ткань легких здоровых животных характеризовалась низкими уровнями экспрессии исследуемых генов, в то время как ингаляции ОВА приводили к многократному увеличению их экспрессии (*Timp1* > *Ccl2* > *Igf1* > *Muc5b* > *C3* > *Fn1* > *Spp1* > *C3ar1* > *Muc5ac*), кроме генов *Cat* и *Cyp2e1*. При развитии пост-астматического фиброза экспрессия некоторых генов снижалась до уровня здоровых животных (*Spp1*, *C3ar1*, *Muc5ac*), а остальных – оставалась на повышенном уровне. Таким образом, валидация идентифицированных ключевых генов в ткани легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом показала возможное вовлечение этих генов в регуляцию ранних фибротических изменений уже на стадии подострого астматического воспаления.

Идентификация генов, ассоциированных с фиброзом не-астматической этиологии, в развитии острой астмы и пост-астматического фиброза

Ре-анализ трех независимых наборов транскриптомных данных, полученных на моделях блеомицин-индуцированного фиброза, позволил идентифицировать 130 общих генов (Рис. 11А). Дальнейшее сравнение данных генов с астматическим регуломом выявило 119 блеомицин-специфичных генов (Рис. 11А).

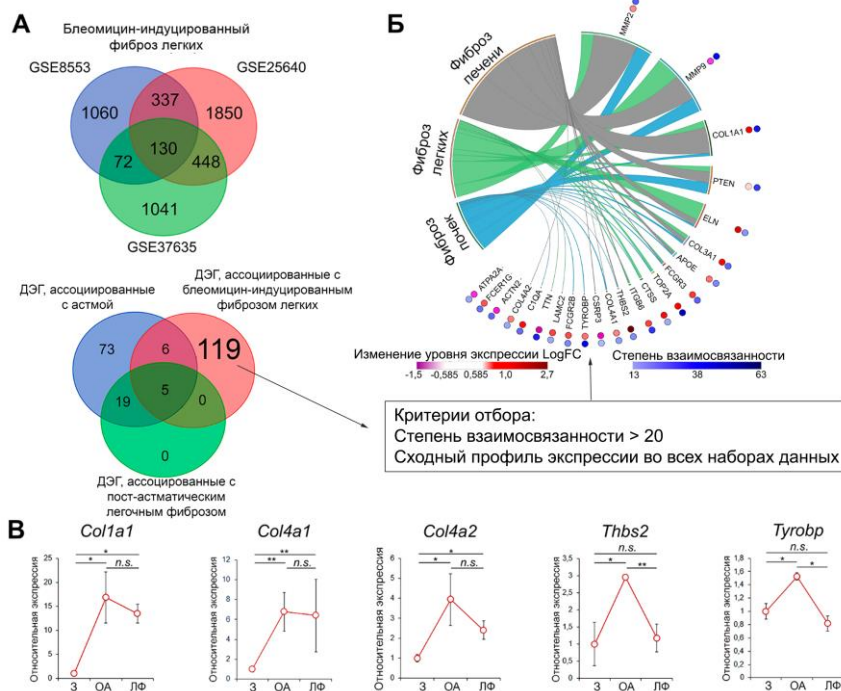


Рисунок 11. Вовлеченность генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом легких, в развитие астмы и пост-астматического

фиброза. (А) Диаграмма Венна, демонстрирующая гены, задействованные в развитии блеомицин-индуцированного фиброза легких (верхняя панель). Диаграмма Венна, демонстрирующая ДЭГ, общие для блеомицин-индуцированного фиброза и астма-ассоциированного воспаления (нижняя панель). (Б) Анализ совместного упоминания идентифицированных ДЭГ в связи с ключевыми словами, связанными с фиброзом различных органов, в научной литературе. (В) Уровни экспрессии идентифицированных генов в легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом.

Далее, для оценки значимости выявленных блеомицин-специфичных ДЭГ в качестве универсальных маркеров фиброза были выбраны 23 узловых гена и проанализировано их совместное упоминание с терминами “pulmonary fibrosis”, “hepatic fibrosis” и “renal fibrosis” с помощью текст-майнингового анализа (Рис. 11Б). Обнаружено, что некоторые узловые гены, в том числе *Col4a1* и *Col4a2*, практически не упоминаются в связи с вышеуказанными фибротическими патологиями в научных текстах. Учитывая данные результаты, гены *Coll1a1* (известный регулятор развития фиброза), *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs2* и *Tyrobp* были выбраны для валидации на *in vivo* модели острой астмы и пост-астматического фиброза (Рис. 11В). Оказалось, что уровни экспрессии *Coll1a1*, *Col4a1* и *Col4a2* возрастали в тканях легких мышей с острой астмой и оставались на таком же уровне при пост-астматическом фиброзе, в то время как уровни экспрессии генов *Thbs2* и *Tyrobp* повышались при острой астме и уменьшались до уровня здоровых животных при пост-астматическом фиброзе. Таким образом, проведенный анализ доказывает участие идентифицированных астма-ассоциированных генов в регуляции легочного фиброза различной этиологии и указывает на возможность рассмотрения генов *Col4a1* и *Col4a2* в качестве новых потенциальных маркеров раннего фиброза легких.

Анализ уровней экспрессии узловых фиброз-ассоциированных генов мышей у пациентов с хроническими патологиями легких

Для того, чтобы оценить, насколько тесно гены, идентифицированные в качестве регуляторов развития легочного фиброза на мышинных моделях, связаны с хроническими заболеваниями легких человека, уровни экспрессии данных генов были определены в тканях легких, полученных от пациентов с идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), хронической эмфиземой (Эм) и кистозным фиброзом (КФ) (Рис. 12). Оказалось, что только при идиопатическом легочном фиброзе изменения в транскриптом были схожи с профилем экспрессии генов, регулирующих развитие астма- и блеомицин-индуцированного легочного фиброза у мышей. Данные изменения были выявлены в ткани легких, но не в периферической крови или бронхоальвеолярной жидкости больных с ИЛФ. В то же время, у пациентов с ХОБЛ, паттерны экспрессии генов, сходные с ИЛФ, были обнаружены в бронхоальвеолярной жидкости и мокроте, но не в ткани легких и периферической крови. Обнаруженное сходство профилей экспрессии ключевых фибротических генов в ткани легких

мышей и пациентов с ИЛФ предполагает наличие близкой связи между идентифицированными генами и ранними стадиями ремоделирования легких.

ДЭГ, ассоциированные с блеомycin-индуцированным фиброзом

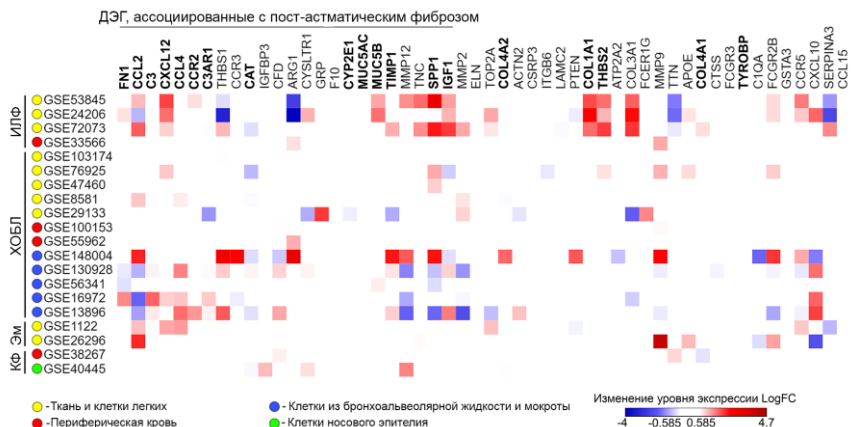


Рисунок 12. Уровни экспрессии астма- и блеомycin-специфических ДЭГ в ткани легких пациентов с хроническими заболеваниями легких. Построение тепловой карты было выполнено с помощью Morpheus. $\text{LogFC} = \text{Log}_2$ (разы изменения экспрессии). ИЛФ – идиопатический легочный фиброз, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, Эм – хроническая эмфизема, КФ – кистозный фиброз. Жирным шрифтом выделены гены, валидированные *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы ключевые гены (*Il-6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, *Ptx3*, *Socs3*), ассоциированные с развитием острого повреждения легких (ОПЛ) различной этиологии.

2. На *in vivo* модели ЛПС-индуцированного ОПЛ показано:

а) введение липополисахарида (ЛПС) вызывает развитие выраженных воспалительных изменений в дыхательной системе мышей, а введение противовоспалительных соединений с разным механизмом действия препятствует прогрессированию ЛПС-индуцированных воспалительных изменений в легких мышей;

б) прогрессирование ЛПС-индуцированного ОПЛ вызывает активацию экспрессии ряда идентифицированных генов, а применение противовоспалительной терапии приводит к подавлению их экспрессии.

3. Выявлена связь между рядом ОПЛ-ассоциированных генов (*Saa1*, *Rsd2*, *Ifi44*, *Rtp4*, *Mmp8*) и COVID-19-ассоциированным регулоном. На модели ЛПС-индуцированного ОПЛ показана чувствительность данных генов к про-воспалительным стимулам и противовоспалительной терапии.

4. Обнаружены корреляции между рядом ОПЛ-ассоциированных генов (*PTX3*, *TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR*) и неблагоприятным прогнозом для пациентов с опухолевыми заболеваниями легких.

5. Идентифицированы ключевые гены, ассоциированные с развитием острых астматических изменений в легких (*Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl12*, *Timp1*, *Muc5ac*, *F5*, *Cyp2e1*, *Adra2a*, *Ear1*, *Tk1*). Показана потенциальная связь ряда астма-ассоциированных генов (*Fnl1*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Cxcl12*, *Ccl4*, *Ccr2*, *Spp1*, *C3ar1*) с развитием легочного фиброза.

6. На *in vivo* модели острой и подострой овалбумин-индуцированной астмы показано:

а) морфологические признаки ремоделирования дыхательных путей и легочного фиброза появляются уже на стадии подострого астма-ассоциированного воспаления;

б) гены, ассоциированные с развитием острой астмы (*Timp1*, *Ccl2*, *Igf1*, *Muc5ac*, *Muc5b*, *C3*, *Fnl1*, *Cat*, *Cyp2e1*), являются участниками ранних фибротических изменений в легких;

в) уровни экспрессии генов, ассоциированных с блеомицин-индуцированным фиброзом (*Coll1a1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs1* и *Tyropb*), повышались в ткани легких мышей с острой астмой и пост-астматическим фиброзом, а гены *Col4a1* и *Col4a2* могут являться новыми потенциальными предикторами и ранними маркерами легочного фиброза.

7. Обнаружено, что профили экспрессии генов, ассоциированных с пост-астматическим и блеомицин-индуцированным фиброзом у мышей, обладают наибольшим сходством с ранним идиопатическим легочным фиброзом у человека, что предполагает наличие близкой связи между идентифицированными генами и начальными стадиями фиброза легких.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Sen'kova A.V., Savin I.A., Brenner E.V., Zenkova M.A., Markov A.V. Core genes involved in the regulation of acute lung injury and their association with COVID-19 and tumor progression: A bioinformatics and experimental study. *PLoS ONE*. 2021; 16(11): e0260450. (Q1, IF 3.752)

2. Savin I.A., Markov A.V., Zenkova M.A., Sen'kova A.V. Asthma and post-asthmatic fibrosis: a search for new promising molecular markers of transition from acute inflammation to pulmonary fibrosis. *Biomedicines*. 2022; 10(5):1017. (Q1, IF 4.757)

3. Sen'kova A.V., Savin I.A., Odarenko K.V., Salomatina O.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A., Markov A.V. Protective effect of soloxolone derivatives in carrageenan- and LPS-driven acute inflammation: pharmacological profiling and mechanism of action. *Biomed Pharmacother*. 2023; 159:114231. (Q1, IF 7.419)

4. Savin I.A., Zenkova M.A., Sen'kova A.V. Pulmonary fibrosis as a result of acute lung inflammation: molecular mechanisms, relevant *in vivo* models, prognostic and therapeutic approaches (Review). *Int J Mol Sci*. 2022; 23, 14959. (Q1, IF 6.208)

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-30011.