

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, Колосовой Наталии Гориславовны, на диссертацию Савина Иннокентия Андреевича на тему «Идентификация и валидация генов, регулирующих развитие острых воспалительных изменений в легких и их переход в легочный фиброз», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 – биохимия

### **Актуальность темы выполненной работы**

Острые и хронические заболевания легких остаются серьезной проблемой для здравоохранения. Заболеваемость и смертность от острого повреждения легких (ОПЛ) значительно возросла в результате пандемии новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-2019). Вклад в увеличение смертности вносит как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), так и развитие фиброза легких, эффективных методов лечения которого не существует. При этом наиболее значимым фактором риска хронизации процесса и развития фиброза легких является возраст. Закономерно, что существенный вклад в неуклонное увеличение заболеваемости легочным фиброзом и смертности от него вносит старение населения планеты на фоне увеличения продолжительности жизни. Ситуация осложняется тем, что длительные воспалительные процессы в легких способствуют развитию предопухолевых состояний. В результате особую актуальность приобрели исследования, направленные на выяснение механизмов развития острого повреждения легких, на поиск биохимических и молекулярных предпосылок его прогрессии и перехода в ОРДС или в хроническое воспаление и развитие легочного фиброза. В этой связи не вызывает сомнений актуальность цели диссертационной работы И.А. Савина, посвященной идентификации узловых генов, вовлеченных в развитие воспаления легких различной этиологии, поиску потенциальных молекулярных предпосылок тяжелого течения заболевания и выявлению специфических биомаркеров перехода от острых воспалительных изменений в легких к легочному фиброзу.

### **Научная значимость и новизна исследования**

Оригинальность и принципиальную новизну исследования И.А. Савина определил использованный им комплексный подход. В его основу был положен всесторонний биоинформатический анализ всех данных об изменениях транскриптомов легких при моделировании воспаления различной этиологии на животных моделях, имеющихся на сегодня в базах данных. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), построение генно-ассоциативных сетей и анализ текстов (текст майнинг)



позволили автору определить ключевые гены, которые вовлекаются в развитие острого повреждения легких независимо от его этиологии и показать, что основополагающими этапами патологического процесса являются воспалительный процесс и последующее ремоделирование внеклеточного матрикса. Экспериментальная проверка результатов биоинформатического анализа в условиях моделирования воспаления и его коррекции подтвердила, что выявленные ключевые гены, ассоциированные с развитием ОПЛ, могут рассматриваться как его регуляторы, а узловые гены – служить потенциальными прогностическими маркерами и терапевтическими мишенями. В работе впервые показано, что некоторые ассоциированных с ОПЛ гены (*Saa1, Rsad2, Ifi44, Rtp4, Mmp8*) связаны также и с развитием COVID-19, при этом их экспрессия в легких усиливается в острой фазе липополисахарид-индуцированного воспаления и подавляется на фоне противовоспалительной терапии. Автором впервые установлено, что изменения экспрессии генов *TIMP1, SERPINE1, PLAUR* и *PTX3*, играющих ключевую роль в развитии ОПЛ, отражают тяжесть течения и скорость прогрессии злокачественных новообразований легких и могут рассматриваться как их потенциальные маркеры. На модели овалбумин-индуцированной астмы И.А. Савиным идентифицированы ключевые гены, с изменениями экспрессии которых связано развитие как острого астматического воспаления, так и пост-астматического фиброза (*Timpl, Ccl2, Igf1, Muc5ac, Muc5b, C3, Fn1, Cat, Cyp2e1*). Доказанное автором сходство изменений профиля экспрессии генов в легких мышей при пост-астматическим фиброзе и у людей с идиопатическим фиброзом легких позволило ему выявить новые потенциальные предикторы и ранние маркеры легочного фиброза. Таким образом, очевидны как новизна, так и высокая теоретическая и научно-практическая значимость диссертационной работы И.А. Савина.

### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертационная работа И.А. Савина изложена на 218 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 8 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы. Следует отметить, что библиография диссертационной работы беспрецедентно велика – список процитированной литературы содержит 800 названий. Оформление диссертации соответствует требованиям, установленным Министерством образования Российской Федерации.

Во введении автор обосновывает актуальность проблемы исследования, формулирует цели и основные задачи исследования, оценивает научную новизну,



теоретическую и практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту. Раздел о личном вкладе автора в получение результатов подробно и четко отражает как личный вклад автора, так и вклад коллег-ученых, принимавших участие в совместных работах по теме диссертации.

*Обзор литературы* представляет собой объемный (58 страниц), насыщенный информацией раздел диссертационной работы. Автор дает развернутый анализ современных представлений об этиологии, патогенезе, патоморфологических и патофизиологических особенностях течения острого воспаления легких, рассматривает все известные механизмы и пути перехода острых воспалительных изменений легких в фиброз, обсуждает и систематизирует молекулярные механизмы и признанные на данный момент прогностические маркеры его развития, освещает последние достижения в области стандартной и ген-направленной терапии рассматриваемых патологических состояний. Особое внимание И.А. Савин уделяет развернутой характеристике имеющихся в настоящее время релевантных мышиных моделей острого повреждения и фиброза легких, а также астмы и пост-астматического фиброза, обсуждает и систематизирует используемые в клинической практике и потенциальные прогностические маркеры ОПЛ и легочного фиброза. Все положения «Обзора литературы» подкреплены многочисленными ссылками на оригинальные работы различных авторов. Обзор отлично структурирован, логически выстроен, прекрасно иллюстрирован и написан грамотным и доступным языком. Его завершает обобщающее заключение, в котором автор делает акцент на нерешенных вопросах и дает исчерпывающее обоснование актуальности своего исследования.

*В Главе 2, содержащей экспериментальную часть*, приведено подробное описание методов и подходов, которые автор применил для решения поставленных задач и достижения цели исследования. Следует отметить их высокий научно-методологический уровень, широкий спектр использованных в работе методов биоинформатики и их удачное сочетание с молекулярно-биологическими, гистологическими и иммуногистохимическими подходами в экспериментах, выполненных на лабораторных животных. Все методики, использованные и оптимизированные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность для воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных статистических методов, информация о которых представлена в этом разделе.

*Раздел «Результаты и обсуждение»* выглядит как хорошо спланированное многоплановое исследование. В нём И.А. Савин продуктивно сочетает биоинформатические методы и подходы с экспериментальными исследованиями, переходя



от изучения отобранных в базах данных, ранее полученных на моделях ОПЛ транскриптомов легких, к экспериментальной проверке результатов этого анализа на мышинных моделях ОПЛ и астмы. В частности, одним из важнейших итогов этого раздела работы явилась идентификация ключевых генов, вовлеченных как в регуляцию острого воспаления легких у мышей различной этиологии, так и перехода острого воспаления в легочный фиброз. Закономерно, что при сопоставлении изменений этих ОПЛ-ассоциированных генов с профилем экспрессии генов в легких пациентов с COVID-19 были выявлены общие гены, обладающие регуляторной ролью как при прогрессировании ОПЛ, так и при развитии вызванного COVID-19 ОРДС. Более неожиданным и принципиально важным представляется доказательство того, что в число ОПЛ-ассоциированных генов вошли гены, продукты которых участвуют в процессах злокачественной трансформации ткани легких и играют ключевую роль в озлокачествлении и метастазировании опухолей.

На следующем этапе работы автором на основании биоинформатического анализа транскриптома (данных полногеномного микрочипирования) легких здоровых мышей и мышей с острой астмой были определены ключевые гены, ассоциированные с развитием острых астматических изменений в легких, среди которых выявлены гены – потенциальные маркеры перехода от острого астматического воспаления к пост-астматическому фиброзу. Далее на мышинной модели ОВА-индуцированной астмы автором были идентифицированы ключевые гены, участвующие в развитии острых воспалительных изменений в легких и контролирующие переход от острого воспаления к легочному фиброзу, в том числе – новые гены, с изменением экспрессии которых уже на стадии острого/подострого воспаления легких связано развитие ранних фибротических изменений легких. В целом, приведенные в этом разделе экспериментальные данные убеждают в том, что воспалительный процесс в легких может становиться триггером, запускающим каскад реакций, приводящих к ремоделированию внеклеточного матрикса и развитию фиброза легких. Подтверждением справедливости такого заключения явилось проведенное автором сравнение экспериментально определенных им уровней экспрессии ключевых генов, ассоциированных с развитием пост-астматического и блеомицин-индуцированного легочного фиброза на мышинных моделях, с их экспрессией у пациентов с различными хроническими патологиями легких.

*В разделе «Заключение»* И.А. Савин суммирует полученные результаты, дает их трактовку, но при этом, к сожалению, достаточно скупо обсуждает и сопоставляет свои результаты с уже имеющимися в литературе данными. Очевидно, что в определенной степени это связано с масштабами проведенного исследования. Раздел «Выводы» содержит



7 пунктов, они соответствуют поставленным задачам и сформулированы на основе полученных результатов.

### **Достоверность и обоснованность полученных результатов**

Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием комплекса современных методов и подходов, количество которых впечатляет. Объем, сложность и глубина проведенных исследований определили важность и новизну полученных результатов. Достоверность полученных результатов определили использование соответствующих поставленным задачам методических подходов, критический анализ мировой литературы, а также использование адекватных статистических методов обработки данных. Результаты диссертационной работы опубликованы в четырех научных статьях в высокорейтинговых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, доложены на десяти российских и международных конференциях. Все сформулированные в диссертации положения, выводы полностью базируются на результатах проведенных исследований.

### **Вопросы и замечания по работе**

Принципиальных замечаний по работе нет. Единственный недостаток масштабного исследования И.А. Савина, на мой взгляд, вытекает из ее достоинств: складывается впечатление, что не все полученные в работе впервые и принципиально важные данные отражены в разделе «Новизна...» и нашли отражение в положениях, выносимых на защиту. Разумеется, это обстоятельство никак не влияет на высокую положительную оценку исследования, тем более, что все результаты опубликованы в журналах Q1.

В порядке дискуссии хотелось бы уточнить позицию автора по поводу его результатов, на основании которых сформулировано первое положение, выносимое на защиту. Насколько правомерно рассматривать в качестве потенциального прогностического маркера информацию об уровнях экспрессии в лёгких ключевых генов-регуляторов острого повреждения? Учитывая системный характер воспаления, нельзя ли использовать с этой целью доступные клетки крови? При любом остром повреждении легких, в том числе – при коронавирусной инфекции (COVID-19), ключевыми патогенетическими процессами становятся воспаление и окислительный стресс. Ожидаемо, что в список выявленных ключевых-генов регуляторов ОПЛ вошли гены, продукты которых являются цитокинами, хемокинами и компонентами внеклеточного матрикса. И только один – ген каталазы – оказался связанным с окислительным стрессом. Примечательно, что и в списке из 58 ДЭГ, общих для ОПЛ различной этиологии, кроме каталазы не было ни одного гена, продукты которых можно рассматривать как компоненты системы антиоксидантной защиты или



потенциальные источники гиперпродукции активированных форм кислорода. Возможно ли как-то объяснить этот феномен с учетом того, что значительное снижение активности каталазы недавно было выявлено (Cavalcanti et al., 2022) в крови пациентов с COVID-19? Его масштабы коррелировали с тяжестью и неблагоприятным прогнозом, но наблюдались на фоне значительного снижения уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Заключение

Диссертационная работа И.А. Савина «Идентификация и валидация генов, регулирующих развитие острых воспалительных изменений в легких и их переход в легочный фиброз», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «биохимия», является цельным завершённым научным исследованием, направленным на решение актуальной задачи – выяснение молекулярно-генетических механизмов развития легочного воспаления различной этиологии и выявление потенциальных молекулярных маркеров перехода от острых воспалительных изменений в легких к легочному фиброзу. Основные научные результаты диссертационного исследования представлены в 4 статьях в ведущих международных изданиях по профилю работы и доложены на российских и международных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации. В нем корректно отражены результаты и выводы работы, новизна и практическая значимость исследования. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости квалификационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации № 426 от 20.03.2021), а ее автор Савин Иннокентий Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:

заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения

ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр

Институт цитологии и генетики СО РАН"

доктор биологических наук, профессор

(03.00.14 – физиология человека и животных

и 03.00.04 – биохимия)

"20" апреля 2023 г.

Подпись Н.Г. Ко

Колосова Наталия Гориславовна

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН  
к.б.н. Г.В. Орлова