

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук
Шпагиной Любови Анатольевны
на диссертационную работу Савина Иннокентия Андреевича
«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 диссертационной работы

Тема диссертационной работы, несомненно, актуальна для современной медицинской науки. Развитие хронической бронхолегочной патологии обусловлено сложным взаимодействием множества факторов риска и генетически предрасположенного организма человека. Тяжесть течения и исход (выздоровление или развитие легочного фиброза) острых заболеваний также во многом определяются особенностями генетической регуляции различных биохимических процессов. Таким образом, результаты генетических исследований являются ключевыми для понимания патогенеза и поиска новых подходов к терапевтической стратегии.

В настоящее время смертность от бронхолегочной патологии все еще остается очень высокой (в 2021г 78,7:100000 населения, что соответствует третьему рангу) [Росстат, 2022]. Персонализированный подход представляет возможность улучшить результаты лечения и увеличить продолжительность жизни больных. Персонафикация рисков воспалительных, фиброзных и онкологических заболеваний легких во многом определяется изучением роли генов-регуляторов. Так, известно, что наличие у пациента однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) rs5995653 или rs62081416 указывает на высокую чувствительность воспаления к глюкокортикоидам [Hernandez-Pacheco N. et al., 2019], rs73650726 – на хороший эффект бронхолитиков группы бета-2 агонистов [Spear M.L. et al., 2019].

Кроме того, знание особенностей генетического регулирования позволит понять клеточно-молекулярные патогенетические механизмы и выявить мишени терапии. Достигнутые в последнее время некоторые успехи лечения респираторных болезней, такие как снижение смертности от пневмоний, бронхиальной астмы [Росстат, 2022], появление возможности замедлить прогрессирование легочного фиброза [Finnerty JP, et al, 2021], связаны именно с достаточным пониманием паттерна аллергического воспаления и механизмов регуляции фиброза [Чучалин А.Г. и др., 2022; Charles Det al., 2022; Finnerty JP, et al, 2021]. В первую очередь необходимо понимание генетической основы и патогенеза перехода, острого воспаления в хроническое, персистирующего воспаления, связи воспаления и фиброза, воспаления и злокачественной трансформации. Таким образом, диссертационное исследование Савина И.А. посвященное идентификации и валидации

генов, регулирующих развитие острых воспалительных процессов в легких и их переход в легочный фиброз, является актуальным как для биологии, так и для медицины. Исследование описывает этап биоинформатического анализа, проведенного для идентификации данных генов, *in vivo* этап работы, в рамках которого были поставлены мышинные модели острого повреждения легких и острой астмы с пост-астматическим фиброзом и этап валидации результатов биоинформатического анализа на материале от *in vivo* моделей. Описание результатов сопровождается их обсуждением в рамках поиска потенциальных мастер-регуляторов перехода от острых воспалительных процессов в легочный фиброз.

Научная новизна

Научная новизна данной работы заключается в комплексном применении методов биоинформатического анализа с последующей валидацией на материале от *in vivo* моделей, что обеспечивает высокую точность данных, полученных в результате такого комбинированного анализа. Автором было обнаружено, что некоторые гены, регулирующие развитие острого повреждения легких, связаны с развитием COVID-19, в то время как другой ряд генов, регулирующих развитие острого повреждения легких, являются прогностическими маркерами выживаемости при злокачественных новообразованиях легких. Показано, что морфологические признаки ремоделирования дыхательных путей и легочного фиброза формируются уже на стадии подострого астма-ассоциированного воспаления. Были идентифицированы гены, регулирующие развитие острого астматического воспаления и раннего пост-астматического фиброза. Также был идентифицирован ряд генов-потенциальных пан-фибротических регуляторов. Установлено, что профиль экспрессии генов при пост-астматическом фиброзе у мышей обладает наибольшим сходством с профилем экспрессии генов при идиопатическом легочном фиброзе у людей.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Результаты, полученные в данной работе, обладают большой практической значимостью, поскольку расширяют современные представления о механизмах, лежащих в основе развития острого повреждения легких различной этиологии и их перехода в легочный фиброз. Ряд идентифицированных генов может быть рассмотрен в качестве потенциальных молекулярных маркеров и терапевтических мишеней при воспалительных заболеваниях легких, вызванных в том числе и SARS-CoV-2 и злокачественными новообразованиями легких. Также полученные результаты могут использоваться в качестве теоретической базы при разработке новых подходов стратификации риска развития осложнений у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями легких.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Савина Иннокентия Андреевича изложена на 218 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания результатов и их параллельного обсуждения, заключения, выводов, списка сокращения и списка литературы. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 8 таблицами. Список литературы содержит 800 источников.

Во введении автор описывает актуальности и степень разработанности тематики исследования, ставит цель исследования и задачи для ее выполнения, описывает научную новизну исследования и его теоретическую и практическую значимость, формулирует положения, выносимые на защиту, дает информацию о степени достоверности и апробации результатов и личном вкладе автора в работу.

В главе «Обзор литературы» автор описывает современные представления об острых воспалительных заболеваниях легких, чаще всего приводящих к развитию легочного фиброза (острое повреждение легких и бронхиальная астма), приводит характеристику гистологических изменений в легких как при развитии острых воспалительных изменений, так и при ранней и поздней стадии легочного фиброза. Далее приводится обзорное описание и характеристика эффекторных клеток в развитии фиброза, пяти наиболее значимых в развитии легочного фиброза молекулярных сигнальных путей. Следующая часть литературного обзора посвящена описанию релевантных мышечных моделей острого повреждения легких и легочного фиброза. Затем описываются прогностические маркеры острого повреждения и фиброза легких. Последняя часть литературного обзора перед заключением описывает актуальные терапевтические подходы к блокированию перехода острого воспаления в фиброз легких. В заключении к обзору литературы автор обобщает изложенную информацию и описывает перспективны дальнейших исследований.

В главе «Материалы и методы» автором описаны использованные подходы к анализу данных, реагенты, оборудование и лабораторные животные. Значительную часть главы занимает описание использованных методов. Это современные молекулярно-биологические и биохимические методы, такие как: работа с РНК, реакция обратной транскрипции, проведение ПЦР в режиме реального времени для определения уровней экспрессии мРНК, гистохимические, иммуногистохимические методы исследования, твердофазный иммуноферментный анализ. Также приведено довольно подробное описание использованных методов биоинформатического анализа. Методы, использованные в работе, позволяют решить поставленные цель и задачи, а результаты получены на достаточном количестве экспериментального и теоретического материала. Методы статистической обработки выполнены корректно.

В главе «Результаты и их обсуждение» автором представлены результаты работы и их обсуждение. В целом, данную главу можно логически разделить на две части.

Первая часть касается идентификации генов потенциальных мастер-регуляторов острого повреждения легких с помощью биоинформатического анализа, валидация на материале от *in vivo* модели острого повреждения легких, с последующим анализом роли ОПЛ ассоциированных генов в других заболеваниях легких, сопровождающихся воспалением, и злокачественных заболеваниях легких. Так, автором идентифицирован ряд генов (*Il-6*, *Timp1*, *Ccl2*, *Socs3*, *Serpine1*, *Ptx3*, *Cat* и *Eln*) которые являются основными участниками развития воспалительного процесса и последующего ремоделирования легких, и которые могут являться потенциальными прогностическими маркерами и терапевтическими мишенями при заболеваниях, сопровождающихся острыми воспалительными процессами в легких. Далее описывается *in vivo* модель острого повреждения легких, изменения в ткани легких и мРНК генов, которыми сопровождается развитие воспалительного процесса и его терапия противовоспалительными средствами. Затем описывается процесс идентификации ОПЛ ассоциированных генов, участвующих в развитии COVID-19 (*Saa1*, *Rsad2*, *Rtp4*, *Ifi44* *Mmp8*,) и делается вывод о возможности использования данной *in vivo* модели в качестве платформы для разработки средств противовоспалительной терапии. Завершается первая часть описанием возможной прогностической функции ряда ОПЛ ассоциированных генов (*TIMP1*, *SERPINE1*, *PLAUR*, *PTX3*) при злокачественных новообразованиях легких, а именно аденокарциномы легких (LUAD) и плоскоклеточного рака легких (LUSC).

Вторая часть данной главы посвящена идентификации генов, ассоциированных с развитием острой астмы и пост-астматического фиброза с помощью биоинформатического анализа с последующей валидацией результатов биоинформатического анализа на *in vivo* модели овальбумин-индуцированной острой астмы и пост-астматического фиброза. Показано, что гены *Fnl*, *Igf1*, *Ccl2*, *C3*, *Timp1*, *Muc5b*, *Muc5ac*, *Cat* и *Cyp2e1* ассоциированы с развитием острой астмы и могут являться регуляторами ранних фибротических изменений в легких. Профиль изменения уровней экспрессии исследуемых генов также показал, что используемая в данном исследовании модель овальбумин-индуцированной астмы может представлять из себя многообещающую платформу как для изучения ранних фибротических изменений в легких, так и для разработки средств терапии. Далее были идентифицированы гены, регулирующие развитие фиброза не-астматической этиологии (блсоницин-индуцированный легочный фиброз), и после пересечения этих генов с генами, регулирующими развитие пост-астматического фиброза, выявлены потенциальные универсальные пан-фибротические гены-регуляторы. Проведенный текст-майнинговый

анализ выделил из числа данных генов 4 наиболее многообещающих: *Col4a1*, *Col4a2*, *Thbs2* и *Tyrobp*. Для валидации на *in vivo* модели острой астмы и пост-астматического фиброза были выбраны 4 вышеупомянутых гена и ген *Coll1a1* в качестве контроля, поскольку это хорошо известный компонент развития фибротических изменений в легких. По результатам валидации гены *Col4a1* и *Col4a2* были выбраны как потенциальные пан-фибротические регуляторы. В последней части данной главы проведено сравнение профилей экспрессии генов, регулирующих развитие легочного фиброза у мышей с профилем экспрессии генов у пациентов с хроническими заболеваниями легких, (идиопатический легочный фиброз, хроническая обструктивная болезнь легких, хроническая эмфизема и кистозный фиброз). Выявлено, что профиль экспрессии при пост-астматическом фиброзе у мышей обладает наибольшим сходством с профилем экспрессии раннего идиопатического фиброза у человека в ткани легких, и некоторым сходством с хронической обструктивной болезнью легких, при анализе бронхоальвеолярной жидкости.

Заключение по всей диссертационной работе вынесено в отдельную главу 4, где автор еще раз подчеркивает актуальность темы данной работы, делает выводы по всем полученным результатам, а также представляет направление дальнейших исследований путем постановки вопроса, являются ли изменения уровней экспрессии идентифицированных генов первичным событием в цепочке, приводящей к развитию фибротических изменений в результате острых воспалительных процессов, или это всего лишь следствие регуляторных изменений, происходящих на более высокой ступени регуляторной иерархии? Автор предлагает ответить на этот вопрос путем проведения экспериментов с оценкой влияния подавления экспрессии идентифицированных генов на процесс развития острых воспалительных изменений в легких и их переход в легочный фиброз.

Степень обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность

Положения, выносимые на защиту написаны достаточно подробно и кратко, полностью соответствуют полученным результатам, достоверность которых не вызывает сомнения. Выводы, сделанные по итогам работы, сформулированы корректно.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями п. 25 «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Принципиальных замечаний нет.

В процессе дискуссии хотелось бы обсудить следующие вопросы:

- Какие из выявленных Вами генов регуляторов раннего пост-астматического фиброза могут быть рекомендованы к изучению в качестве маркеров диагностики и прогноза в клинических исследованиях?

- Как Вы объясняете выявленное сходство профилей экспрессии генов пост-астматическом фиброза у мышей и идиопатического легочного фиброза у человека?

Заключение

Диссертационная работа Савина Иннокентия Андреевича «Идентификация и валидация генов, регулирующих развитие острых воспалительных изменений в легких и их переход в легочный фиброз», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи – установление новых звеньев патогенеза острого и хронического воспаления в легких, выявление перспективных молекулярных маркеров трансформации воспаления в фиброз, маркеров выживаемости при злокачественных новообразованиях легких, на основе выявления ключевых генов-регуляторов.

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 автор заслуживает ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:

заведующая кафедрой госпитальной терапии и медицинской реабилитации

ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор

(14.01.04 – внутренние болезни)

Дата «18» 04 2023 г.

Л.А. Шпагина

Подпись Шпагиной Люс

Начальник отдела кадров

ФГБОУ ВО НГМУ

О.А. Кох

Федеральное государственное би
образования «Новосибирский госуда
здравоохранения Российской Федерац
630091, Новосибирск, Краснь.
rector@ngmu.ru, Сайт: <https://ngmu.ru/>

высшего
истерства

E-mail: