

## ОТЗЫВ

официального оппонента, д.м.н. Литвиновой Л.С. на диссертационную работу Лю Гоцзюня «Патофизиологические генозависимые механизмы отдельных типов иммуноопосредованной патологии», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

**Актуальность темы исследования.** Новые методы исследований в иммунологии, молекулярной биологии, патологии, генетике и др. областях, затрагивающие отдельные аспекты патофизиологического процесса, ставят сложную задачу относительно анализа и интерпретации больших массивов данных, с целью их дальнейшего практического применения в медицине. Согласно вышеизложенному системное изучение сконцентрированных данных невозможно без применения биоинформационных подходов. Нарушение механизмов регуляции врожденного и адаптивного иммунитета приводит к развитию иммуноопосредованных патологий, в том числе, первичных иммунодефицитов и онкологических заболеваний, этиологическими факторами которых могут стать как крупные генетические поломки, так и точечные мутации генов. Наличие ранней диагностики, с использованием разработанной панели патогенетических молекулярных маркеров и генов-кандидатов патогенеза, позволит избежать ошибок при постановке диагноза, снизить риск осложнений и рецидивов, повысить эффективность терапии и качество жизни пациентов. Идентификация значимых патологических генов (их мутаций) позволит понять патогенетические механизмы формирования иммуноопосредованных патологий, способствуя развитию персонализированной терапии. Методы секвенирования нового поколения совместно с биоинформационными подходами являются важным средством обнаружения новых патогенных генов, способствуя развитию персонализированной медицины. Необходимость внедрения междисциплинарного анализа клинических данных с целью их правильной трактовки в эпоху «больших данных» очевидна. С появлением новых фактов принятые научные парадигмы изменяются. Ставится под сомнение

моногенность заболеваний, появляются новые методы выявления причинно-значимых генов при полигенных патологиях. Совокупность клинических и экспериментальных данных позволит правильно идентифицировать гены-кандидаты при различных видах патологий, а анализ независимых выборок позволит определить их патогенетическую роль. Патогенетическая значимость мутаций при моногенных патологиях определяется посредством данных полногеномного / полноэкзомного секвенирования генетического материала пациента и других членов его семьи.

Предпринятое автором диссертационной работы комплексное исследование моделей иммунозависимой патологии, протекающих с нарушениями пролиферации (рак мочевого пузыря, группа первичных иммунодефицитов, первичный иммунодефицит из группы комбинированных первичных иммунодефицитов, ассоциированных с синдромальными проявлениями – синдром Хеннекама), с использованием клинических данных пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (МИРМП), данных сиквенса мРНК, длинных некодирующих РНК (днРНК) из сервера «Атлас генома рака», данных сиквенса микро РНК (мкРНК) из сервера «Broad GDAC Firehose», необработанных данных сиквенса РНК из портала данных TCGA, данных экспрессии генов, полученных с использованием микрочипов ДНК, полученных из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO), анализ геномной ДНК пациентки с клиническим диагнозом «синдром Хеннекама» и секвенирование всего генома, анализ результатов полногеномного секвенирования и выявление мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов, безусловно, характеризует патологические процессы, происходящие в организме при рассматриваемых заболеваниях. В связи с вышеизложенным, диссертационное исследование Лю Гоцзюня, ориентированное на изучение молекулярных и генозависимых механизмов отдельных типов иммуноопосредованной патологии, с определением генов-кандидатов и идентификации мутантных генов, участвующих в патогенезе заболеваний, носит актуальный и своевременный характер.

## **Научная новизна и теоретическая значимость работы**

В диссертационном исследовании Лю Гоцзюнь проведен систематический анализ сигнальных путей, значимых для иммунитета, приводящих к гетерогенности базального и люминального подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. В работе впервые представлены данные, позволяющие дифференцировать подтипы мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря на основе результатов молекулярных взаимодействий молекул мкРНК, днРНК и мРНК. Научный интерес представляет новая перспектива понимания мультигенной природы группы синдромов первичных иммунодефицитов «Общая вариабельная иммунная недостаточность», благодаря полученным результатам анализа взаимосвязей генов. Кроме того, автором разработан новый метод прогнозирования генов-кандидатов группы синдромов первичных иммунодефицитов «Общая вариабельная иммунная недостаточность» путем включения в клиничко-биоинформационный анализ 15 факторов ко-экспрессии, межбелкового взаимодействия и данных сигнальных путей. Кроме того, на основании проведенных анализов, Лю Гоцзюнь представил перечень вероятно-патогенных мутаций в генах, комбинация которых может приводить к развитию первичного иммунодефицита «синдром Хеннекама». Лю Гоцзюнь определил повышение уровня экспрессии генов, относящихся к процессу эпителиально-мезенхимального перехода, метастазирования и функционирования иммунной системы, при базальном подтипе рака мочевого пузыря. Лю Гоцзюнь отметил, что базальный подтип рака мочевого пузыря ассоциируется с более высокими значениями экспрессии иммуносупрессорных рецепторов (PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG3), чем люминальный подтип. Кроме того, автор обнаружил повышение уровня экспрессии генов, отвечающих за метаболические процессы при люминальном подтипе рака. Представленные в работе Лю Гоцзюнь данные, обеспечивают более глубокое понимание иммунологической гетерогенности рака мочевого пузыря. Кроме того, Лю Гоцзюнь обнаружил, что гомозиготная мутация (g.125452634G>A) в гене FAT4, гетерозиготная мутация (g.36575963G>A) в гене RAG1, гетерозиготная мутация (g.9715914T>A) в гене PIK3CD и гетерозиготная мутация (g.36471505C>T) в CSF3R могут иметь

патогенетическую значимость с учетом понимания патогенеза синдрома Хеннекама.

### **Практическая значимость**

Практическая значимость диссертационного исследования Лю Гоцзюня заключается в идентификации новых молекул микро РНК, длинных некодирующих РНК, мРНК, которые могут служить новыми прогностическими параметрами или маркерами классификации подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Предложенные в диссертации 172 гена-кандидата ОВИН помогут осуществить раннюю диагностику ОВИН и помочь в создании таргетной терапии. Выявленные Лю Гоцзюнь гомозиготные и гетерозиготные генные мутации при синдроме Хеннекама позволят расширить диагностические возможности данного заболевания.

### **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

В диссертационном исследовании Лю Гоцзюня сформировано шесть выводов, три научных положения и четыре практических рекомендации, которые полностью отражают полученные автором данные. Достоверность и обоснованность сформулированных научных положений и выводов подтверждена высоким научно-методическим уровнем выполнения диссертационной работы. В работе приведены результаты анализа клинических данных пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (МИРМП), данных секвенса мРНК, длинных некодирующих РНК (днРНК) и микро РНК (мкРНК) (из «Атласа генома рака» и «Broad GDAC Firehose»), необработанных данных секвенса РНК (403 пациентов и 19 образцов для контроля из нормальной ткани, портал данных TCGA), данных экспрессии генов, полученных с использованием микрочипов ДНК 139 пациентов с МИРМП (из базы данных Gene Expression Omnibus - GEO), данных экспрессии генов, полученных с использованием микрочипов ДНК 111 пациентов с ОВИН и 56 относительно здоровых контрольных образцов (из базы данных GEO), данных полногеномного секвенирования и выявление мутаций/однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в геномной ДНК пациента с клиническим диагнозом «синдром Хеннекама».

Полученные в ходе исследования результаты подвергнуты корректной и адекватной статистической обработке, базирующейся на современных биоинформационных подходах и инструментах, а также математических моделях. Применяемые автором методы исследования являются целеопределяющими и достаточными для получения информации по решению сформулированных в работе задач.

Результаты работы Лю Гоцзюнь неоднократно обсуждены на иммунологических конгрессах и форумах, в достаточной степени представлены широкому кругу исследователей в 7 публикациях, индексируемых в международных электронных базах Web of Science и Scopus, а также в изданиях, рецензируемых ВАК РФ. Полученные Лю Гоцзюнем данные внедрены в практику ГАУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница». Список предложенных Лю Гоцзюнем генов-кандидатов ОВИН внедрен для использования в работе лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН в преподавательской деятельности и консультативной медицинской практике.

### **Структура работы**

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа Лю Гоцзюнь изложена на 144 страницах машинописного текста, иллюстрирована 12 таблицами, 30 рисунками и 3 формулами; состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, трех глав с результатами собственных исследований, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованных литературных источников. В конце диссертации представлен список литературы, включающий 204 источника (5 - отечественных и 199 - зарубежных).

**Во введении** автор обосновывает целесообразность проведения данной работы и отражает научную новизну работы, цель и задачи исследования четко сформулированы.

**В обзоре литературы** обобщены и проанализированы накопленные на сегодняшний день сведения об известных молекулярных маркерах иммунозависимых патологий (рак мочевого пузыря, группа первичных иммунодефицитов, первичный иммунодефицит из группы комбинированных

первичных иммунодефицитов, ассоциированных с синдромальными проявлениями – синдром Хеннекама), отсутствии возможности анализа полного спектра клинических и лабораторных данных с целью раннего выявления, правильной постановки диагноза и назначения эффективной терапии пациентам. По своей структуре данная глава подразделяется на три подглавы на основании вышеперечисленных патологий. Приводятся данные по внедрению в клиническую практику иммунотерапии злокачественных новообразований и необходимости поиска новых генов-кандидатов патогенетического процесса при онко-заболеваниях, генетических поломок при общих варибельных иммунодефицитах, а также новых мутаций при редком первичном иммунодефиците – синдроме Хеннекама. Приведены данные, что дисрегуляция иммунных механизмов, в основе которых могут лежать моногенные/полигенные мутации, приводит к перепрограммированию метаболических путей и, как следствие, патологическому воспалению и нарушению процесса пролиферации, характеризующегося прогрессирующим развитием иммуноопосредованных патологий.

Приведены сведения об участии Т-, В-лимфоцитов и макрофагов в патогенезе иммуноопосредованных патологий и их функциональных изменениях, связанных с мутациями определенных генов (и нарушении сигнальных путей). Обзор хорошо иллюстрирован. В заключении каждой из трех подглав автор обосновывает необходимость обращения к выбранной теме диссертации.

**Глава «Материал и методы исследований»** содержит ссылки на серверы, из которых были получены клинические данные и данные секвенса пациентов с МИРМП с указанием количества образцов опухолевых и нормальных тканей, выбранных для анализа. Кроме того, указан источник данных по ДНК-микрочипированию пациентов с МИРМП и ОВИН. В главе представлен список из 351 гена первичного иммунодефицита и 39 генов, связанных с ОВИН, используемый в диссертационном исследовании. Описана работа с ДНК пациента с диагнозом синдром Хеннекама, с момента ее выделения до проведения технологии секвенирования нового поколения методом парноконцевого чтения. Приведена методика оценки инфильтрующих

опухоль клеток для каждого образца с использованием CIBERSORT. В главе приводится описание кластерного анализа данных мРНК, мкРНК и днРНК пациентов с МИРМП, анализ выживаемости и анализ обогащения по функциональной принадлежности генов, характерных для разных субтипов РМП. Также описан подход машинного обучения с целью скрининга репрезентативных генов при МИРМП. Во 2 главе описано применение метода DEG (Differentially expressed genes) для определения различий экспрессии генов в контрольных и онко- образцах тканей, конструирование подтип-зависимой сети взаимодействий мРНК-мкРНК-днРНК. Кроме того, в главе приводится описание метода оценки плотности генной сети и биологического расстояния для генов ОВИН и других первичных иммунодефицитов, прогнозирования генов-кандидатов и методов определения новых генов-кандидатов ОВИН. Описаны методы визуализации сетей молекулярного взаимодействия. Приведено описание метода полногеномного секвенирования и поиска гена-кандидата для пациента с синдромом Хеннекама.

Данная глава иллюстрирована таблицами, рисунками и формулами.

**Глава 3** «Использование молекул MIR-141-5P, MIR-141-3P, MIR-200C-3P, AC010326.3, AC073335.2, MIR100HG, CLIC4, GATA3, PALLD в качестве прогностических биомаркеров у пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря» освещает результаты собственных исследований, полученных автором диссертационной работы. Все данные представлены в виде графиков, таблиц, рисунков и сопровождаются подробным описанием. В конце главы резюмируются полученные результаты относительно классификации базального и люминального подтипов МИРМП, основанной на различной экспрессии генов и сетях взаимодействий молекул мкРНК-мРНК-днРНК, а также маркерах иммунотерапии.

В **Главе 4** «Идентификация генов-кандидатов общего варибельного иммунодефицита» приведены результаты исследований автором межбелковых взаимодействий, опосредующих мультигенную природу ОВИН. Кроме того, автор выявил 172 новых гена-кандидата ОВИН, которые взаимодействуют с известными генетическими маркерами исследуемых патологий. Описанные результаты проиллюстрированы рисунками, таблицами и графиками.

**В 5 Главе** диссертационной работы представлены результаты использования методов идентификации мутаций генов (биоинформационных и методов секвенирования) как, вероятно, патогенных (FAT4, RAG1, PIK3CD и CSF3R) при фенотипическом проявлении синдрома Хеннекама. Раздел завершается обобщающим заключением, что существенно улучшает восприятие представленной информации.

**В Заключении** автор резюмирует необходимость использования биоинформационных методов для расшифровки особенностей патогенеза иммуноопосредованных патологий и квалифицированной разработки средств персонализированной медицины. Кроме того, в данной главе представлены перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

**Выводы** соответствуют поставленным задачам и полностью отражают результаты выполненного исследования, в которых диссертант формулирует выявленные взаимосвязи генных мутаций, генных взаимодействий, патологических генов-кандидатов с развитием иммуноопосредованных патологий: инвазивно-мышечным раком мочевого пузыря, общим переменным иммунодефицитом и синдромом Хеннекама.

**Практические рекомендации** отражают полученные в диссертационной работе данные, которые можно применить в клинической практике при диагностике и лечении иммуноопосредованных патологий, связанных с нарушениями пролиферативного процесса в организме.

**Список литературы** полный и составлен по библиографическим правилам. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, результаты диссертационной работы прошли апробацию на конгрессах и конференциях. Автореферат написан хорошим литературным языком и содержит достаточное количество иллюстративного материала (рисунков, таблиц, формул), облегчающих его восприятие. Автореферат отражает все необходимые разделы диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет.



Работа, безусловно, интересна и полно раскрывает особенности патофизиологических генозависимых механизмов отдельных типов иммуноопосредованной патологии. При ознакомлении с диссертационной работой возник ряд вопросов уточняющего характера:

1. По какому принципу были отобраны модели заболеваний для Вашей работы?

2. Какие гены-супрессоры инвазивно-мышечного рака мочевого пузыря были выявлены в Вашей работе? Какие гены, обладающие супрессорным действием в онкологии мочевого пузыря известны по данным литературы?

3. Имеются ли различия (в сигнальных путях) в моделях базального и люминального рака мочевого пузыря?

4. Активация PI3K-Akt пути, на Ваш взгляд, в большей степени характеризует базальный или люминальный тип инвазивно-мышечного рака мочевого пузыря?

5. Что Вы можете сказать, на основании проведенного исследования, об активации сигнального пути PI3K-Akt и его участии в развитии общей вариабельной иммунной недостаточности? Обнаружены ли новые молекулярные пути, активация которых связана с развитием и прогрессированием ОВИН?

6. Как Вы считаете, что необходимо предпринять для повышения осведомленности врачей общей практики, педиатров и терапевтов относительно диагностических мер иммуноопосредованных патологий?

**Заключение.** Диссертационная работа Лю Гоцзюня «Патофизиологические генозависимые механизмы отдельных типов иммуноопосредованной патологии» представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, содержащее решение значимой для патологической физиологии задачи по анализу больших массивов данных, объединяющих клинические исследования, данные анамнеза, данные секвенирования, с применением биоинформационных технологий и математического моделирования, с целью поиска универсальных генов-кандидатов и генных мутаций, участвующих в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний, протекающих с нарушением

пролиферативного процесса, а также разработки и совершенствования методов диагностики и персонализированной медицины при данных патологиях.

По актуальности, объему наблюдений, используемым методическим подходам, научной новизне, практической ценности полученных данных и выводов диссертационная работа Лю Гоцзюня полностью отвечает требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней», (утв. Постановлением Правительства РФ от 25.09.2013 г. № 842, в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 355, от 29.05.2017 г. № 650, от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата наук, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,  
директор Центра иммунологии и клеточных  
биотехнологий, профессор кафедры  
фундаментальной медицины  
медицинского института  
БФУ им. И. Канта

Л.С. Литвинова

«17» сентября 2020 г.

**Данные об авторе отзыва:** Литвинова Лариса Сергеевна, доктор медицинских наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры фундаментальной медицины медицинского института БФУ им. И. Канта; 236000, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6; тел.: 89114820489; 8(4012)595595-доб. 6631; e-mail: larisalitvinova@yandex.ru



Отзыв официального оппонента поступил «06» февраля 2020 г.  
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02

И.А. Тузанкина

С отзывом официального оппонента ознакомлен «06» февраля 2020 г.  
Соискатель

Г. Лю

