

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

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.** Широкие возможности молекулярно-генетических методов исследований позволили получить массу новых данных, не все из которых можно объяснить и использовать без системного понимания общих патологических процессов. Полученные знания о молекулярно-генетической природе различных видов патологии выглядят разрозненными и новые биоинформационные методы анализа позволяют делать новые выводы и, в конечном итоге, систематизировать данные, представляя новые возможности для патофизиологии, в целом.

Этиологическими факторами различной иммуноопосредованной патологии считаются не только функциональные нарушения, но и генетические, в том числе точечные мутации. Выявление соответствующих генетических нарушений позволяет своевременно идентифицировать патологию, в том числе на доклиническом этапе, что необходимо использовать для ранней диагностики и скрининга. Тем не менее, даже при тяжелой стадии патологического процесса выявление мутации позволяет оптимизировать диагностический поиск, выйти на соответствующий болезни патогенез и сменить терапевтическую тактику, перейти к использованию персонализированной терапии, в том числе с использованием таргетных препаратов, направленных на компенсацию генетического дефекта. Таким образом, методы секвенирования нового поколения должны рассматриваться с позиции системной биологии патофизиологии, а биоинформационные методы являются необходимым компонентом анализа патогенеза, позволяя не только обнаруживать новые патогенные мутации, но и способствуя изучению патогенеза болезни на молекулярном уровне.

Наступившая эра «больших данных» объединяет различные науки о жизни с физикой и математикой. Благодаря междисциплинарному подходу, удастся выявить природу различных генетических болезней, их патогенез и соответствующие терапевтические методы воздействий. Выясняется, что многие заболевания невозможно объяснить моногенной причиной, а для идентификации причинных мутаций из миллионов выявленных необходимо объединять различные данные.

Автором диссертационной работы проведено комплексное исследование моделей иммунозависимой патологии на примере таких болезней, как онкология и первичные иммунодефициты. Рак мочевого пузыря, выбранный исследователем в качестве модели для изучения, является одним из распространенных видов рака. Первичные иммунодефициты по последним данным являются широко распространенной во всех популяциях патологией, которая скрывается под другими диагнозами и приводит не только к хроническим рецидивирующим инфекционным процессам, но аутоиммунным и онкологическим осложнениям. Поэтому выбор двух первичных иммунодефицитов для исследования врожденной иммунопатологии – общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН), являющимся наиболее распространенным представителем этой группы болезней, и синдром Хеннекама, как один из самых редких в мире, - представляется очень удачным сочетанием. Для оценки патофизиологических процессов автор взял клинические данные пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (МИРМП), которые были получены с сервера «Атлас генома рака» (TCGA), данных секвенса микро РНК (мкРНК) из сервера «Broad GDAC Firehose», необработанных данных секвенса 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. Источники и разнообразие качественных данных позволяют высоко оценить диссертационное исследование Лю Гоцзюня и полученные им результаты, что соотносится с заявленной целью диссертационного исследования, с определением генов-кандидатов и идентификацией мутантных генов, участвующих в патогенезе заболеваний, носит актуальный и своевременный характер.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы.** Лю Гоцзюнь в диссертационном исследовании провел систематический анализ сигнальных путей, значимых для иммунитета, позволяющих проанализировать патофизиологические механизмы гетерогенности мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря и выявить прогностические биомаркеры двух подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Впервые при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря, при разных его подтипах, выявлены различия результатов молекулярных взаимодействий молекул мкРНК, днРНК и мРНК. Благодаря исследованию, впервые представлен новый взгляд на мультигенную природы общего варибельного иммунодефицита. Автору удалось математически доказать давно подтверждаемую на практике особенность мультигенных заболеваний и представить широкую взаимосвязь вовлеченных в синдром ОВИН множества генов. Кроме того, благодаря проведенным исследованиям, существенно был расширен спектр генов, в которых необходимо проводить поиск патогенных мутаций при ОВИН. Благодаря сочетанию нескольких методов, автор представил перечень вероятно-патогенных мутаций в генах, комбинация которых может приводить к развитию первичного иммунодефицита «синдром Хеннекама».

**Практическая значимость.** Лю Гоцзюнь доказал значительную роль микро РНК miR-141-5p, miR-141-3p, miR-200c-3p, длинных некодирующих РНК (днРНК) AC010326.3 и AC073335.2 (контролирующие GATA3), MIR100HG (ингибирующая CLIC4 и PALLD), мРНК молекул CLIC4 (хлоридный внутриклеточный канал 4), GATA3 (транскрипционный фактор),

PALLD (Palladin, белок, ассоциированный с цитоскелетом) в патогенезе мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (МИРМП). Использование этих маркеров необходимо для классификации подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Кроме того, были выявлены особенности функционирования опухолевой ткани при разных подтипах МИРМП. Выявлен факт повышенной экспрессии генов, относящихся к процессу эпителиально-мезенхимального перехода, метастазирования и функционирования иммунной системы, при базальном подтипе рака мочевого пузыря. Люминальный подтип характеризуется относительно повышенной экспрессией генов, отвечающих за метаболические процессы. Для иммунотерапии важным представляется выявление высокой экспрессии, так называемых, иммунных контрольных точек (PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG-3), что необходимо учитывать при выборе способов терапии (иммунотерапии) рака мочевого пузыря. Предложенные в диссертации 172 гена-кандидата ОВИН помогут осуществить раннюю диагностику ОВИН и помочь в создании таргетной терапии. Выявленные Лю Гоцзюнем гомозиготные и гетерозиготные генные мутации при синдроме Хеннекама могут иметь патогенетическую значимость и позволят расширить диагностические возможности, с учетом понимания патогенеза синдрома Хеннекама.

**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). Для выявления вероятно патогенных мутаций у пациентов с фенотипом синдром Хеннекама использованы данные полногеномного секвенирования.

Использование современных математических методов анализа, в том числе с использованием программного языка python, R и вычисления на суперкомпьютере Института математики и механики УрО РАН показывают высокий уровень статистической обработки полученных данных, базирующийся 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 Гоцзюня обсуждены на нескольких 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», работу Министерства здравоохранения Свердловской области и используются для научных исследований в лаборатории иммунологии воспаления и обучения в аспирантуре Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

## **СТРУКТУРА РАБОТЫ**

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа Лю Гоцзюня 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. Список литературы включает всего 204 источника, в том числе 5 отечественных и 199 зарубежных.

**Во введении** Лю Гоцзюнь объясняет актуальность поставленной проблемы, проводит обоснование целесообразности проведения данной работы и отражает научную новизну работы. Цель и задачи исследования четко сформулированы.

**В обзоре литературы** автор представляет и анализирует накопленные на сегодняшний день данные об известных молекулярных маркерах иммунозависимых патологий - мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, общий переменный иммунодефицит и синдром Хеннекама. Представлены сведения о распространенности, прогнозе, лечении и молекулярных подтипах мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря. Представлена классификация, сведения о распространенности, диагностике, лечении и профилактике первичных иммунодефицитов. Обозначена проблема отсутствия понимания мультигенной природы многих болезней, объясняется необходимость использования биоинформационных методов для раскрытия патогенеза первичных иммунодефицитов и других иммунопатологических состояний с целью их раннего выявления, правильной постановки диагноза и назначения эффективной терапии. Приводятся данные по внедрению в клиническую практику иммунотерапии злокачественных новообразований и необходимости поиска новых генов-кандидатов различной патологии, в том числе при синдроме Хеннекама. Обзор хорошо иллюстрирован.

**Глава «Материалы 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 инфильтрирующих опухоль клеток для каждого образца с использованием CIBERSORT. В главе приводится подробное описание кластерного анализа данных мРНК, мкРНК и днРНК пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря, анализ выживаемости и анализ обогащения по функциональной принадлежности генов, характерных для разных субтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Также описан подход машинного обучения с целью скрининга репрезентативных генов при МИРМП.

В данной 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 и гена-кандидата для пациента с синдромом Хеннекама. Данная глава также иллюстрирована таблицами, рисунками и тремя 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»** посвящена результатам собственных исследований, полученных автором диссертационной работы. В главе

проводится распределение 403 образцов МИРМП на два молекулярных типа, описываются выявленные особенности, что обеспечивает более глубокое понимание гетерогенности рака мочевого пузыря. Все данные и материалы сопровождаются графиками, таблицами, иллюстрациями и сопровождаются очень подробным описанием. В конце главы резюмируются полученные результаты, в том числе сведения о том, что перекрестное взаимовлияние мРНК и днРНК, обусловленное miR-200c и miR-141, может играть значительную роль в онкогенезе и прогрессировании опухоли. GATA3, CLIC4, PALLD, MIR-200c-3p, miRNA-141-3p, miRNA-141-5p, AC010326.3, AC073335.2 и MIR100HG могут служить прогностическими биомаркерами мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, а также использоваться как маркеры для классификации подтипов. Исследована взаимосвязь между подтипами и маркерами иммунотерапии, что необходимо учитывать при назначении иммунотерапии опухолей.

**В Главе 4 «Идентификация генов-кандидатов общего переменного иммунодефицита»** исследуется мультигенная природа общего переменного иммунодефицита. Проводится анализ взаимосвязей генов нозологических синдромов группы общего переменного иммунодефицита. Приведены результаты исследований автором межбелковых взаимодействий, опосредующих мультигенную природу ОВИН. Лю Гоцзюнь выявил 172 новых гена-кандидата ОВИН, которые взаимодействуют с известными генетическими маркерами исследуемой патологии. Представлены доказательства в виде новых опубликованных другими зарубежными авторами данных, экспериментально подтверждающих проведенные теоретические исследования. 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. Данный раздел исследования позволил показать эффективность и широкие возможности прикладного использования методов, примененных для фундаментальных исследований в диссертационной работе.

**В Заключении** автор резюмирует необходимость использования биоинформационных методов для расшифровки особенностей патогенеза иммуноопосредованных патологий и современной разработки средств персонализированной медицины. Также 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 и клинических при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря, общем вариабельном иммунодефиците и синдроме Хеннекама.

**Практические рекомендации** отражают полученные в диссертационной работе данные, которые можно применить в клинической практике при диагностике и лечении иммуноопосредованных патологий, связанных с описанными иммунопатологическими процессами.

**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. В исследовании охвачены, как минимум, 3 отдельные патологии, причем, каждая из них, взятая по отдельности, достойна отдельного исследования. Почему Вы не ограничились в своем выборе какой-либо одной формы и предпочли столь широкий охват?

2. Вы утверждаете, что люминальный подтип рака мочевого пузыря с мышечной инвазией в меньшей мере экспрессирует иммуносупрессивные гены, чем базальный подтип. Значит ли это, что эффективность иммунотерапии для данных подтипов будет различной?

3. Можете ли Вы, на основании Ваших исследований, обозначить перспективные мишени для разработки таргетной терапии?

4. Возможно ли рассматривать изученные Вами иммунодефициты как предраковые состояния?

**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, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Лю Гоцюня полностью отвечает требованиям раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утв. Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изм., утв. 21.04.2016 г. № 335, 02.08.2016 г. № 748), 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 биологических наук, профессор,  
директор Высшей медико-биологической школы,  
зав. лабораторией перспективных исследований  
молекулярных механизмов стресса  
ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
университет (национальный  
исследовательский университет)»

В.Э. Цейликман

« 22 » января \_\_\_\_\_ 2020 г.



ВЕРНО  
Начальник службы  
делопроизводства ЮУоГУ  
И.А. Тузанкина

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 454080, г. Челябинск, пр. Ленина, д.76, тел./факс +7 (351) 267-96-87. <https://www.medical.susu.ru>.

Отзыв официального оппонента поступил «23» января 2020 г.  
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02

И.А. Тузанкина

С отзывом официального оппонента ознакомлен «23» января 2020 г.  
Соискатель

Лю Гоцюнь

Г. Лю