

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Пятницкого Михаила Алексеевича «Высокопроизводительное секвенирование в молекулярной онкологии: поиск мишеней и стратификация пациентов для персонализации противоопухолевой терапии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика».

Актуальность темы диссертации

Развивающиеся в последнее время технологии микрочипов и секвенирования следующего поколения (NGS) привели к накоплению знаний об ассоциациях признаков, измеренных функционально-геномными методами, с различными заболеваниями, в том числе злокачественными опухолями. Анализ этих данных с использованием методов системной биологии позволяет предсказывать биомаркеры и новые мишени, а также разрабатывать новые стратегии лечения. Исследования геномики опухолей способствуют ранней диагностике заболевания, предсказанию прогноза течения и ответа на терапию за счет обнаружения специфических однонуклеотидных замен, структурных вариаций, изменений копийности генов и так далее. Несмотря на то, что сложные механизмы патогенеза и клеточная гетерогенность затрудняют диагностику и лечение рака, всесторонний анализ функционально-геномных данных помогает выявить новые диагностические и прогностические биомаркеры. Кроме того, методы системной биологии облегчают разработку новых перспективных противораковых препаратов. Интегративный анализ клинических и функционально-геномных данных позволяет предсказывать биологические мишени, ассоциированные с процессами онкогенеза. Таким образом, можно резюмировать, что выбранная М.А. Пятницким тема диссертации, связанная с системно-биологическим анализом NGS-данных, является актуальной.

Общие сведения о диссертации

Представленная диссертационная работа изложена на 239 страницах текста, в ней есть 57 рисунков, 23 таблицы. Работа состоит из введения, шести глав основного текста, заключения, выводов и списка литературы из 446 источников, а также приложения. Обзор литературы по теме работы дан в первой главе диссертации, во второй главе приводится описание исходных данных и методов их обработки. В главах с третьей по шестую подробно излагаются и обсуждаются полученные результаты.

Содержание работы

Во разделе «Введение» диссертационной работы обозначена актуальность рассматриваемой проблематики, определяется цель и задачи планируемого исследования, личный вклад соискателя, а также положения работы, которые предстоит защищать. Далее изложены научная и практическая ценность диссертации, публикационная активность автора.

Обзор литературы

В первой главе представленной работы дан обзор литературы, состоящий из трёх подразделов. В первом из них соискателем суммированы методы выявления критически важных генов в раковом геноме, далее описываются подходы к анализу транскриптомных данных методами системной биологии. Наконец в третьем разделе описаны проблемы персонализации противоопухолевой терапии. Необходимо отметить, что несмотря на разнообразие затрагиваемых тематик, каждый подраздел достаточно полно и подробно суммирует основные наработки в каждой области.

Методы исследования

Во второй главе работы описываются использованные наборы данных и алгоритмы. Также приведено описание экспериментальных методик, включая полноэкзомное секвенирование, подавление экспрессии генов и определение функциональной активности клеток меланомы. Приведены описания программного

конвейра для аннотации генетических вариантов и модели данных разработанной платформы для прецизионной онкологии.

Результаты работы

Описанию результатов работы и их обсуждению посвящены остальные главы диссертации с третьей по шестую. При этом каждая глава представляет собой независимое законченное исследование научной проблемы или изложение научно обоснованного технологического решения связанного с анализом генома или транскриптома опухолевых клеток.

Третья глава диссертационной работы описывает оригинальный подход к определению уязвимых точек в протеоме опухоли. Для этого соискателем разработан метод по определению консервативных белков, чья интактная функциональность необходима для жизнедеятельности раковых клеток. Указанный метод опирается на данные по сравнительной частоте патогенных соматических мутаций и герминативных полиморфизмов. В результате применения выстроенной системы фильтрации генов, соискателем был получен список из 91 белок-кодирующего гена, предположительно важных для выживаемости клеток меланомы. Интересным фактом является обнаруженное обогащение этого списка мембранными белками. В качестве биологического объяснения соискателем предложена гипотеза о возможной связи с иммунным надзором, характерной именно для клеток меланомы.

Важно отметить, что помимо фундаментального интереса, разработанный соискателем метод определения уязвимых точек в протеоме опухоли может быть применен для идентификации биологических мишеней новых противоопухолевых препаратов.

Следующая глава диссертации описывает новый подход к стратификации пациентов, опирающийся на результаты транскриптомного профилирования. Для этого соискателем использован системно-биологический подход, опирающийся на идентификацию активированных регуляторов генной экспрессии. В работе предложены и реализованы два способа валидации получаемых результатов. В первом случае соискателем проведено численное сравнение по метрике индекса

Рэнда с рядом существующих алгоритмов и показано преимущество созданного метода. Во втором случае соискателем проведена биологическая интерпретация получаемых кластеров генов-регуляторов экспрессии на примере изучения молекулярных механизмов, ассоциированных с эффективностью терапии цетуксимабом. В результате удалось сформулировать гипотезу об участии TGF- β -индуцированного эпителиально-мезенхимального перехода в развитии резистентности к анти-EGFR терапии.

Необходимо подчеркнуть, что соискателем выложен в открытый доступ программный код, реализующий разработанный метод стратификации пациентов.

В пятой главе диссертационной работы иллюстрируется применение разработанного соискателем программного конвейера по аннотации и приоритизации соматических и герминативных генетических вариантов. С этой целью детально проанализированы результаты полноэкзомного секвенирования пациентов с колоректальным раком и гепатоцеллюлярной карциномой. Соискателем показано, что применение разработанного программного обеспечения позволяет идентифицировать клинически значимые мутации, что может быть использовано для оптимизации стратегии лечения.

Наконец, в шестой главе работы описана программная система для прецизионной онкологии, разработанная под руководством соискателя. Указанная программная система предназначена для автоматической генерации списка потенциально эффективных лекарственных препаратов, исходя из результатов молекулярно-генетических анализов опухоли, включая данные NGS, иммуногистохимические исследования и т.д. Соискателем подробно описана архитектура и функционал разработанной системы, включая методики контроля качества экспериментальных данных, алгоритмы нормализации, фильтрации и аннотации генетических вариантов. Отдельный раздел посвящен базе данных клинически значимых биомаркеров.

В разделе «Заключение» соискатель кратко суммирует полученные результаты, намечая перспективы дальнейших исследований по каждому из

направлений. Особое внимание уделено проблемам трансляции функционально-геномных технологий в клиническую практику.

Выводы диссертации логично вытекают из полученных результатов и в достаточной степени обоснованы.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе исследования Пятницким М.А. предложено несколько оригинальных подходов к решению научных и практических задач.

Научный интерес представляет сформулированный соискателем метод поиска критически важных белков. В основе предложенного метода лежит идея поиска генов, специфично гипомутированных в опухолевых клетках. Насколько мне известно, представленная работа является одной из первых, в которой изучали негативный отбор в опухолях, используя значительные массивы накопленных данных по мутациям. Соискателем также предложена интересная биологическая интерпретация экспрессии молекулы МНС-II клетками меланомы в сочетании со значительным ответом Т-клеток на персонализированные неоэпитопы опухоли у пациентов.

Далее, интересен развиваемый соискателем подход к решению задачи разделения на группы полнотранскриптомных профилей образцов. Представленный алгоритм позволяет не только решать задачу кластеризации образцов, но и определять активированные сигнальные пути. Это открывает возможность детального анализа результатов транскриптомного профилирования различных заболеваний с практическим выходом в виде идентификации потенциальных биомаркеров для диагностики и мишеней для терапевтического воздействия.

Наиболее очевидна практическая применимость результатов, излагаемых в пятой и шестой главах представленной работы. Под руководством соискателя создана программная система, предназначенная для автоматической интерпретации результатов высокопроизводительного секвенирования образцов опухоли пациента, что позволяет на практике реализовывать принципы прецизионной онкологии. Важно отметить, что найденные системой ассоциации вида “биомаркер-препарат” не

являются результатом *in silico* предсказания, а отобраны из научных статей и клинических испытаний, и разделены по уровням доказательности. Это может повысить доверие практикующих врачей к системе, поскольку позволяет проанализировать первоисточники и составить собственное мнение о целесообразности той или иной тактики лечения онкопациента. Разработанная система может применяться в различных лечебных учреждениях онкологической направленности, например ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, АО "ЕМЦ" и прочих.

Диссертационная работа М.А. Пятницкого написана хорошим литературным языком, содержит минимальное количество опечаток.

Автореферат диссертации полностью отвечает требованиям ВАК. Материалы, изложенные в автореферате, соответствуют полученным в диссертации результатам, которые опубликованы в 44 публикациях, включая 24 статьи в профильных рецензируемых иностранных журналах, а также журналах входящих в список изданий, рекомендуемых ВАК РФ.

Замечания и вопросы по работе

Работа по поиску уязвимых точек протеома клеток меланомы кажется не вполне оконченной. Предложено несколько биологических объяснений, почему нокдаун четырех генов не влияет на уровень жизнеспособности и скорость деления клеток меланомы. Как можно было бы (или нельзя) некоторые из этих объяснений проверить?

В обсуждении раздела по поиску уязвимых точек протеома клеток меланомы отмечено, что «результаты предложенного способа определения уязвимых белков существенно зависят от имеющегося размера выборки». Следует ли понимать это, как возможность того, что неуспех экспериментальной проверки мог (также) объясняться статистическими причинами, и что при больших объемах исходных данных, мутации в этих генах могли бы быть найдены? Можно ли оценить вероятность, – аналог *p-value* – что выбранный ген не является уязвимым, но тем не менее прошел все

фильтры? Проводился ли анализ устойчивости результатов к содержанию и объему исходных данных?

Программное обеспечение bSNEA, реализующее разработанный подход к стратификации пациентов, доступно через Sourceforge. Публикацию кода следует, несомненно, воспринимать как достоинство. Кроме того, код (минимально) документирован, а в теле кода можно найти комментарии. Однако, мне не удалось понять, под какой именно лицензией был опубликован код. Отсутствие четкой лицензии является недостатком.

Впрочем, указанные замечания не снижают общее положительное впечатление о работе.

Заключение

Диссертационная работа Пятницкого Михаила Алексеевича «Высокопроизводительное секвенирование в молекулярной онкологии: поиск мишеней и стратификация пациентов для персонализации противоопухолевой терапии», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой.

По своей научной новизне, актуальности и практической значимости представленная диссертационная работа полностью отвечает всем требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 г. с изменениями в редакции от 11 сентября 2021г. №1539, а ее автор, Пятницкий М.А., заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика».

Главный научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
доктор биологических наук,

Аульченко Юрий Сергеевич

/ Аульченко Ю.С. /

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
Адрес: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10
Телефон: +7 (383) 363-49-80
Электронный адрес: icg-adm@bionet.nsc.ru

Подпись Ю.С. Аульченко
Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН



23.09.2022 г.

Орлова Г.В.