

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Боголюбовой-Кузнецовой Аполлинии Васильевны «Молекулярные, гистологические и иммунологические особенности редких форм рака щитовидной железы», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.03 – Иммунология

Актуальность темы диссертационного исследования

Представленная диссертация посвящена комплексному исследованию Уортино-подобного варианта папиллярного рака щитовидной железы (ПРЦЖ) – одного из редких и недостаточно охарактеризованных в настоящее время вариантов ПРЦЖ. Основное внимание исследования сосредоточено вокруг разносторонней характеристики клеточного состава компонентов иммунной системы, окружающих и инфильтрирующих опухоль, как характеристике взаимодействия опухоли с иммунной системой. Исследование клеточного состава и функционального состояния клеток иммунной системы, взаимодействующих с опухолью совершенно необходимо для понимания механизмов реализации противоопухолевого иммунитета, предотвращающих и замедляющих прогрессию опухоли, механизмов нарушения противоопухолевого контроля. Полученные в результате подобных исследований сведения необходимы для повышения эффективности существующих и разработке новых способов терапии онкозаболеваний. Согласно БД PubMed, за последние 5 лет в области исследования опухолевого инфильтрата различных видов опухолей опубликовано около 3000 работ (учтены только статьи, выданные системой при поиске по нескольким ключевым словам из заголовка и/или реферата статей), почти половина из которых опубликованы в течение прошлого и первой половины текущего года, что отражает высокую актуальность данного направления. Описанный ранее, до результатов настоящего исследования, факт наличия выраженного иммунного инфильтрата в опухоли данного типа (Уортино-подобного варианта папиллярного рака щитовидной железы (ПРЦЖ)) предполагает высокую активность иммунной системы по контролю ее развития, что определяет необходимость подробного исследования клеточного состава и функциональных характеристик его компонентов, с целью изучения механизмов осуществления такого контроля и его нарушения. Кроме того, сравнительно небольшой массив данных, описывающих морфологические и генетические особенности опухолей данного типа, определяют необходимость таких комплексных исследований, как представленная работа. Заключая, актуальность выбранного направления исследования не вызывает сомнений.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

Общее количество исследованных в работе образцов Уортино-подобного варианта ПРЦЖ составляет более 10% от общего количества опубликованных в настоящее время описаний опухолей такого типа. Впервые проведен комплексный анализ морфологических и молекулярно-клеточных характеристик опухолей данного типа. В результате показана высокая частота присутствия компонента «высоких клеток», характерного для агрессивного варианта ПРЦЖ. Анализ геномной вариабельности показал ассоциацию варианта BRAF V600E с присутствием высокой доли «высоких клеток» в опухоли. Сходство Уортино-подобного варианта ПРЦЖ и варианта ПРЦЖ из

высоких клеток также подтверждено с помощью анализа профилей экспрессии мРНК и микроРНК с использованием данных, полученных из базы данных TCGA.

Анализ наличия в клетках опухоли внутрихромосомных транслокаций RET/PCT1 и RET/PCT3, впервые проведенный на уровне геномной ДНК для данного типа опухолей, показал низкую частоту таких транслокаций, в отличие от ранее полученных результатов с использованием методов иммуногистохимии.

Впервые для Уортино-подобного варианта ПРЦЖ охарактеризована представленность и распределение основных клеточных компонентов иммунного инфильтрата опухоли. Показано существование третичных лимфоидных структур (ТЛС) и впервые исследован субпопуляционный состав клеток ТЛС для данного типа опухолей.

Используя данные базы TCGA и опубликованные подходы к *in silico* анализу данных РНК-секвенирования, в работе впервые исследована представленность различных клеток иммунной системы в инфильтрате опухоли и проведена оценка уровня экспрессии цитокинов и хемокинов, связанных с функционированием плазматических клеток, обнаруженных среди клеток опухоли.

С использованием методов иммуногистохимии и анализа длин ПЦР-продуктов показана поликлональность субпопуляций В-клеток и гамма-дельта Т-клеток, инфильтрирующих опухоль и находящихся в ТЛС, а также экспрессия молекул CTLA-4 и PD-1 опухолевыми Т-лимфоцитами.

Достоверность полученных в работе результатов определяется значительным объемом исследованных образцов опухоли, применением современных и надежных методов экспериментальной работы, соответствием результатов, полученных различными методами и на различных выборках образцов (данных, полученных экспериментально и *in silico*), применением соответствующих статистических методов обработки данных. Полученные в работе результаты, где это применимо, сопоставлены с имеющимися в литературе сведениями.

Выводы диссертационной работы полностью основаны на полученных результатах, сформулированы корректно и обладают научной новизной.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

В результате проведенного исследования впервые получен уникальный комплекс данных о морфологических и молекулярно-клеточных характеристиках Уортино-подобного варианта папиллярного рака щитовидной железы. Полученные данные имеют в большей степени фундаментальный характер и в значительной степени формируют современное понимание особенностей опухолей данного типа, но также демонстрируют необходимость дифференциальной диагностики опухолей этого типа от близких вариантов ПРЦЖ, а также потенциал создания методов терапии, основанных на активизации компонентов иммунной системы, окружающих и инфильтрирующих опухоли такого типа.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа оформлена по стандартному плану и включает разделы «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Благодарности» и «Список литературы». Работа изложена на 121 странице (включая Приложения), включает 26 рисунков и 4 таблицы. Список источников включает 169 ссылок. Приложения состоят из 3 таблиц.

В разделе «Введение» автор кратко описывает состояние проблемы, подчеркивает актуальность исследования и формулирует цель работы и задачи, которые необходимо решить для ее достижения. Также раздел «Введение» включает такие подразделы, как «Научная новизна работы», «Теоретическая и практическая значимость работы», «Методология и методы диссертационного исследования», «Основные положения, выносимые на защиту», «Достоверность полученных результатов», «Апробация результатов работы», «Личный вклад автора», обычно включаемые в автореферат. Такой прием позволяет сразу понять суть представленной работы и облегчает анализ.

Раздел «Обзор литературы» с основными молекулярно-клеточными особенностями биологии опухолей, описывает имеющиеся сведения по составу иммунного инфильтрата опухолей, дает краткое описание современных подходов к иммунотерапии опухолей. Значительная часть раздела посвящена описанию морфологических особенностей различных типов папиллярного рака щитовидной железы. Далее приводятся имеющиеся на данный момент сведения о составе иммунного инфильтрата ПРЦЖ, описываются генетические особенности опухолей щитовидной железы и отдельных вариантов ПРЦЖ. В разделе «Обзор литературы» приводятся актуальные и релевантные предмету исследования данные, накопленные к настоящему времени.

Раздел «Материалы и методы» описывает методологию работы. В большинстве случаев методики описаны достаточно подробно, однако есть недочеты (см. Замечания). Раздел «Материалы и методы» в комбинации с Приложениями подробно описывают особенности выборки пациентов, образцы опухолей которых используются в работе.

Раздел «Результаты» описывает полученные в ходе исследования результаты экспериментальной и аналитической работы. Раздел выстроен последовательно, описание данных достаточно четкое. Существенным плюсом является общая схема всех исследований, выполненных в работе, приведенная на рис. 11. В соответствии с логикой работы, на первом этапе автор описывает морфологические особенности Уортино-подобного варианта ПРЦЖ в сравнении с другими типами ПРЦЖ. Далее приводятся результаты исследования молекулярно-генетических особенностей данного варианта и проводится сопоставление молекулярно-генетических особенностей с морфологическими. Далее автор переходит к анализу иммунного инфильтрата, где на первом этапе исследует представленность и распределение в опухоли субпопуляций Т-, В-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток с помощью методов иммуногистохимии. Данный раздел снабжен большим количеством иллюстраций тканевых срезов, но также приводятся и количественные данные, полученные после анализа срезов. Следующие два раздела посвящены исследованию представленности различных субпопуляций иммунных клеток (макрофагов, Th1, Th17, плазматических клеток) и экспрессии факторов, обеспечивающих функционирование плазматических клеток, с помощью анализа экспрессии различных генов *in silico* по данным из TCGA. Последний раздел посвящен характеристике клональности Т- и В-лимфоцитов в опухолевом инфильтрате. Приведены данные, полученные с помощью двух разных методов оценки клональности для образцов выборки, сформированной автором и образцов из коллекции TCGA.

В разделе «Обсуждение результатов» проводится тщательное сопоставление полученных данных как между выборками образцов, использованных в работе, так и с имеющимися литературными данными. На основе полученных результатов формируются предварительные заключения и основные выводы работы, представленные в разделе «Выводы».

Характеризуя в целом, можно заключить, что работа изложена грамотным языком, логично и последовательно. Полученные результаты хорошо структурированы и хорошо оформлены в виде рисунков и таблиц. Автореферат диссертационной работы отражает все основные результаты работы и хорошо оформлен, позволяя в полной мере ознакомиться с сутью работы и основными полученными результатами и сформулированными на их основе выводами.

Опубликование результатов в научной печати

По полученным результатам опубликовано 5 статей в рецензируемых изданиях, индексируемых РИНЦ, что существенно превышает минимально требуемое число статей для присуждения ученой степени «кандидат наук». В четырех статьях автор диссертации указан первым в списке соавторов, из них две статьи опубликованы в журналах, индексируемых системой Scopus, одна в журнале, индексируемом системой Web of Science. Результаты работы представлены на нескольких международных и российских конференциях в форме устных и стендовых докладов.

Замечания, комментарии и вопросы к представленной работе

Безусловно сильной стороной работы является применение различных способов анализа клеточного состава иммунного инфильтрата опухолевых образцов и данных, полученных из разных источников (коллекции образцов собранных в Медицинском радиологическом научном центре и коллекции образцов TCGA), а также тщательное сопоставление результатов, полученных разными методами.

Вместе с тем к работе имеется ряд замечаний/вопросов:

- с чем связан выбор именно TCR gamma для анализа клональности Т-клеток, инфильтрирующих опухоль? Локус TCR gamma является наименее вариабельным. При этом, формируемый зрелым геном гамма-локуса TCR экспрессируется особой популяцией Т-лимфоцитов, не самой многочисленной в составе иммунной системы, а основной вклад в популяцию Т-клеток третичных лимфоидных структур стоило бы ожидать от альфа-бета Т-лимфоцитов?

- для определения субпопуляции плазматических клеток в работе использовали сочетание маркеров CD20 (негативный сигнал) и CD79a (позитивный сигнал). Вместе с тем, молекула CD79a (Iga), ассоциирована с экспрессией В-клеточного рецептора. При этом, согласно господствующему мнению, комплекс В-клеточного рецептора не экспрессируется на поверхности плазматических клеток. Кроме того, экспрессия CD79a показана на поверхности супрессорных клеток миелоидного ряда при немелкоклеточном раке легкого. Использовались ли какие-то дополнительные маркеры для идентификации плазматических клеток при иммуногистохимическом анализе (н-р, CD138)?;

- для идентификации фолликулярных дендритных клеток использовался маркер CD21, однако молекула CD21 также экспрессируется на мембране В-лимфоцитов, которые также были идентифицированы в ТЛС. Использовались ли какие-то дополнительные маркеры для окрашивания мембраны фолликулярных дендритных клеток чтобы отличить их от В-лимфоцитов в ТЛС?;

- при статистической обработке результатов анализа уровня экспрессии различных цитокинов и хемокинов не указано использование «коррекции на множественное сравнение». Статистическая значимость полученных в работе результатов не страдает при использовании даже самого строгого способа коррекции (поправка Бонферрони), однако

аккуратность применения статистических методов требует учета множественности сравнения;

- изучение полученных в работе результатов *in silico* анализа состава иммунного инфильтрата сильно затруднялось отсутствием описания смыслового содержания и принципов определения «сигнатур» для идентификации групп клеток и определения их представленности. В разделе Материалы и Методы в соответствующем подразделе лишь указано, что анализ проводился на основе результатов работы Thorsson с соавторами. В разделе Результаты также не приводится описания структуры данных. Даются уже результаты обсчета. С учетом того, что *in silico* анализ иммунного инфильтрата является существенной частью представленной работы, представляется важным включение более подробного описания используемых данных для анализа («сырые» прочтения, FPKM/RPKM, нормированные данные «сигнатур»), принципа формирования «сигнатур» и способа обсчета. То же касается расчета клональности по данным из TCGA;

- на рисунке 13 указаны два способа анализа варибельности экзона 15 гена BRAF: «с/без обогащения по мутациям». Хотелось бы понять, что имеется ввиду, так как в разделе Материалы и Методы нет никаких подробностей, поясняющих что значит обогащение и для чего оно делалось. Также это никак не обсуждается в разделе Результаты;

- на рисунке 21 приводятся результаты «анализа размера эффекта» для параметров иммунной инфильтрации для *in silico* анализа. В сопутствующем тексте сказано, что «были выделены параметры, наиболее интересные для сравнения иммунного инфильтрата опухолей...». При этом неясно каким образом были отобраны параметры по значению индекса d-Коэна (каким было пороговое значение?), а если параметры выбирался по каким-то другим признакам, то по каким?;

- на рисунке 14 приведены результаты электрофореза ПЦР-продуктов для идентификации транслокаций RET/PTC1 и RET/PTC3. При этом ни в разделе Материалы и Методы, ни на рисунке 13, ни в тексте не дается указаний на ожидаемую длину ПЦР-продукта в случае наличия транслокации;

- в разделе Материалы и Методы приведено подробное описание анализа распределения длин ПЦР-продуктов для исследования клональности В-лимфоцитов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и с окрашиванием серебром. При этом результаты такого анализа нигде не приведены и никак не обсуждаются. Включение описания данного метода в текст диссертационной работы выглядит избыточным.

Заключение

Высказанные замечания не снижают значимости выполненного исследования. Представленная Боголюбовой-Кузнецовой А.В. диссертационная работа «Молекулярные, гистологические и иммунологические особенности редких форм рака щитовидной железы» соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Содержание работы соответствует паспорту специальности «03.03.03 – Иммунология». Диссертационная работа оформлена в соответствии с Приложениями 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Соискатель Боголюбова-Кузнецова Аполлинария Васильевна заслуживает присуждения ученой степени «кандидат биологических наук» по специальности 03.03.03 – иммунология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории сравнительной и функциональной геномики
отдела геномики адаптивного иммунитета
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук»

ЗВЯГИН Иван Владимирович



«13» июня 2019 г.

Контактные данные:

тел. +7 (495) 330-42-88, электронная почта: izvyagin@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.03 – молекулярная биология

Адрес места работы:

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»

Тел.: +7(495)335-01-00; электронная почта: office@ibch.ru

Подпись сотрудника ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» Звягина И.В. удостоверяю:

Ученый секретарь

ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук», д. ф.-м. н



В. А. Олейников
«14» июня 2019 г.