

**Заключение диссертационного совета 24.1.172.01, созданного на базе
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича», по диссертации на соискание ученой степени
доктора наук**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 27 октября 2022 г. № 4

О присуждении Пятницкому Михаилу Алексеевичу, гражданину РФ, учёной степени доктора биологических наук.

Диссертация «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, принята к защите 07 июля 2022 г., протокол № 2, диссертационным советом 24.1.172.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения (ФГБНУ) «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, созданного Приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012 г. с внесением изменений Приказом Минобрнауки России № 1162/нк от 12 октября 2022 г.

Соискатель Пятницкий Михаил Алексеевич, 1983 года рождения.

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Выявление взаимосвязанных белков методами анализа геномов» по специальности 03.00.28 – биоинформатика защитил в 2009 году в диссертационном совете, созданном на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Работает ведущим научным сотрудником, руководителем группы медицинской геномики в лаборатории анализа постгеномных данных ФГБНУ

«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Диссертация выполнена в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научные консультанты – доктор биологических наук, академик РАН Лисица Андрей Валерьевич, главный научный сотрудник группы биобанкинга ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» и доктор биологических наук, профессор РАН Мошковский Сергей Александрович, заведующий кафедрой биохимии медико-биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования (ФГАОУ ВО) «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ.

Официальные оппоненты:

Аульченко Юрий Сергеевич, доктор биологических наук, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики СО РАН», главный научный сотрудник лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа;

Стрельников Владимир Викторович, доктор биологических наук, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», заведующий лабораторией эпигенетики;

Орлов Юрий Львович, доктор биологических наук, профессор РАН, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры информационных и интернет-технологий

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки (ФГБУН) Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, гор. Москва, в своём положительном заключении, подписанном Макеевым Всеволодом Юрьевичем, доктором физико-

математических наук, членом-корреспондентом РАН, заведующим лабораторией системной биологии и вычислительной генетики, отметила, что в разделе литературного обзора, посвящённом системной биологии применительно к транскриптомике, хотелось бы видеть больше описаний графовых методов, а также результатов сравнительного анализа производительности алгоритмов; стоило бы добавить в раздел «Материалы и методы», где автором описан метод силуэтов, использованный для определения количества кластеров, и описание L-метода, упоминаемого в работе в качестве альтернативного для этой цели; в работе не приведена оценка времени, необходимого для анализа «типичного» пациента и не указаны минимальные требования к серверу, на котором может быть развёрнута платформа для прецизионной онкологии. Однако сделанные замечания не меняют общего положительного впечатления о выполняемой работе и не снижают её научной и практической ценности.

Соискатель имеет 69 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 46 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях – 24, из них 19 в международных научных изданиях, а также 17 публикаций по докладам на российских и международных научных конференциях, 3 главы в коллективных монографиях, 1 патент, 1 свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Pyatnitskiy, M.A., Arzumanian, V.A., Radko, S.P., Ptitsyn, K.G., Vakhrushev, I.V., Poverennaya, E.V., Ponomarenko, E.A. Oxford Nanopore MinION Direct RNA-Seq for Systems Biology // Biology. 2021. V. 10. №11. P. 1131-1143. (ИФ 5,1, печ. листы 1,39).

В работе анализировали применимость прямого секвенирования РНК на приборе MinION (Oxford Nanopore Technologies, ONT) для получения надежных оценок активации сигнальных путей для единичного образца. Для этого сделали несколько повторов транскриптомного профилирования

клеточной линии HepG2 с помощью технологии ONT и с помощью Illumina NovaSeq. Для предсказания активированных сигнальных путей использовали методы ssGSEA и singscore. Соискатель спланировал дизайн исследования, выполнил анализ результатов экспериментальных измерений, участвовал в написании текста публикации.

2. Poverennaya E., Kiseleva O., Romanova A., Pyatnitskiy M. Predicting Functions of Uncharacterized Human Proteins: From Canonical to Proteoforms // Genes. 2020. V. 11. №6. P. 1-17 (ИФ 3,9, печ. листы 1,96).

В данной работе представлен подход к анализу молекулярных функций генов в различных условиях. Проанализировали результаты экспериментов из базы данных BioPlex 2.0, чтобы предсказать функции белков uPE1 (экспрессия которых была подтверждена на протеомном уровне, но отсутствуют функциональные аннотации) и их альтернативно сплайсирующихся изоформ. Путём построения сети взаимодействий для 12 тыс. идентифицированных белков, кодируемые 11 тыс. гены, с помощью предложенной методики удалось предсказать категории генной онтологии для 387 генов uPE1. Представленный подход может быть использован для определения специфических функций гена (включая различные транскрипты) в опухолевых клетках. Соискатель участвовал в написании публикации и планировании дизайна исследования, реализовал методику предсказания функций сплайсформ, принимал участие в анализе и интерпретации полученных результатов.

3. Пятницкий М.А., Карпов Д.С., Мошковский С.А. Методы поиска критически важных генов в раковом геноме // Биомедицинская химия. 2018. Т. 64. №4. С. 303-314. (ИФ 0,6, печ. листы 0,86).

В работе собраны и проанализированы основные экспериментальные и вычислительные подходы к поиску критически важных генов. Понятие критически важных генов, утрата функции которых приводит к гибели клетки, является одной из основополагающих концепций генетики и имеет большое значение для фундаментальных и прикладных исследований, особенно перспективно изучение данной области применительно к онкологии, поскольку поиск генетических уязвимостей раковых клеток позволяет выявить новые

потенциальные мишени для противоопухолевой терапии. Соискатель спланировал структуру работы и проанализировал различные вычислительные подходы к поиску критически важных генов, а также работы по синтетическим летаям и некодирующим участкам генома, написав основную часть публикации.

4. Lobas A.A., Pyatnitskiy M.A., Chernobrovkin A.L., Ilna I.Y., Karpov D.S., Solovyeva E.M., Kuznetsova K.G., Ivanov M.V., Lyssuk E.Y., Kliuchnikova A.A., Voronko O.E., Larin S.S., Zubarev R.A., Gorshkov M.V., Moshkovskii S.A. Proteogenomics of malignant melanoma cell lines: the effect of stringency of exome data filtering on variant peptide identification in shotgun proteomics. // J Proteome Res. 2018. V.17. №5. P. 1801-1811. (ИФ 4,4, печ. листы 1,15).

В работе представлены результаты изучения влияния фильтрации геномных данных для применения в протеогеномике при использовании данных секвенирования экзона и анализа ЖХ-МС/МС 6 повторов для 8 клеточных линий меланомы. Для генерации специфических версий баз данных последовательностей использовали серию из шести различных настроек для идентификации однонуклеотидных полиморфизмов, вставок и делеций. Соискатель участвовал в получении и обработке результатов, включая анализ данных экзомного секвенирования и построение шести наборов данных с различной достоверностью идентификации генетических aberrаций.

5. Kotelnikova E., Pyatnitskiy M., Paleeva A., Kremenetskaya O., Vinogradov D. Practical aspects of NGS-based pathways analysis for personalized cancer science and medicine // Oncotarget. 2016 V. 7. №32. P. 52493-52516. (ИФ 3,3, печ. листы 2,77).

В работе анализируется тераностическая ценность системно-биологического анализа и интеграции различных видов омиксных данных для персонализированной оптимизации противоопухолевой терапии. Соискатель участвовал в написании публикации, проанализировал различные методы системной биологии и интеграции - омиксных данных, а также подходы к функциональной интерпретации результатов транскриптомного профилирования применительно к прецизионной онкологии.

6. Kotelnikova E. A., Logacheva M. D., Nabieva E. R., Pyatnitskiy M. A., Vinogradov D. V., Makarova A. S., Demin A. V., Paleeva A. G., Kremenetskaya O. S., Penin A. A., Klepikova A. V., Kasianov A. S., Shavochkina D. A., Kudashkin N. E., Patyutko Yu. I., Muge N. S., Kondrashov A. S., Lazarevich N. L. NGS-based identification of druggable alterations and signaling pathways – hepatocellular carcinoma case report // *Biopolym. Cell.* 2015. V. 31. №6. P.436-446. (ИФ 0,2, печ. листы 1,62).

В работе изучали клинически значимые молекулярные события у пациента с гепатоцеллюлярной карциномой. Представлены результаты секвенирования экзона и транскриптома опухолевой ткани и ее соответствующего контроля. В исследовании проиллюстрирована потенциальная клиническая ценность комплексного подхода к прецизионной онкологии, включая совместный анализ генома и транскриптома. Соискатель участвовал в анализе и интерпретации геномных и транскриптомных данных, включая аннотацию всех обнаруженных герминативных и соматических генетических вариантов.

7. Pyatnitskiy M., Karpov D., Poverennaya E., Lisitsa A., Moshkovskii S. Bringing Down Cancer Aircraft: Searching for Essential Hypomutated Proteins in Skin Melanoma. // *PLoS One.* 2015. V. 10. №11. P. e0142819. (ИФ 3,2, печ. листы 1,62).

В работе представлен новый подход к идентификации генов/белков, необходимых для выживания раковых клеток. Авторы предположили, что такие гены, должны нести меньшее количество патогенных мутаций в раковых клетках по сравнению с полиморфизмами, обнаруживаемыми в нормальных клетках. Соискатель участвовал в разработке подхода к поиску уязвимых мест в раковом геноме/протеоме, проанализировал данные по мутациям в меланоме и здоровых тканях согласно предложенному методу, написал основную часть публикации.

8. Pyatnitskiy M., Mazo I., Shkrob M., Schwartz E., Kotelnikova E. Clustering gene expression regulators: new approach to disease subtyping // *PLoS One.* 2014. V. 9. №1. P. e84955 (ИФ 3,2, печ. листы 1,16).

В работе представлен новый метод субтипирования заболеваний и стратификации пациентов, основанный на анализе активированных регуляторов генной экспрессии. Показано, что предложенный подход дает хорошие результаты по сравнению с другими родственными методами, в то же время предоставляя дополнительный уровень понимания молекулярных механизмов патогенеза. Соискатель участвовал в разработке метода стратификации пациентов, осуществил его программную реализацию, провел сравнительный анализ транскриптомных данных для сопоставления с аналогичными алгоритмами и написал основную часть публикации.

9. Kotelnikova E., Shkrob M., Pyatnitskiy M., Ferlini A., Daraselia N. Novel approach to meta-analysis of microarray datasets reveals muscle remodeling-related drug targets and biomarkers in Duchenne muscular dystrophy // PLoS Comp Biol. 2012. V. 8. №2. P. e1002365 (ИФ 4,4, печ. листы 1,16).

В исследовании предложен новый вычислительный подход для обнаружения лекарств и биомаркеров по результатам транскриптомного профилирования. Метод основан на агрегировании отдельных экспериментов в сочетании с использованием алгоритма Subnetwork Enrichment Analysis (SNEA) с целью найти статистически значимые ключевые регуляторы генной экспрессии. Соискатель участвовал в планировании дизайна исследования, реализовал предложенный алгоритм анализа транскриптомных данных, провел его валидацию и участвовал в написании текста публикации.

10. Pyatnitskiy M., Karpova M., Moshkovskii S., Lisitsa A., Archakov A. Clustering Mass Spectral Peaks Increases Recognition Accuracy and Stability of SVM-based Feature Selection // J Proteomics Bioinform. 2010. V.3 №2. P. 48-54. (ИФ 2,6, печ. листы 0,81).

В работе разработан метод поиска дискриминаторных пиков как способ выявления достоверных биомаркеров. Алгоритм включает применение кластерного анализа и метода опорных векторов. Эффективность метода продемонстрирована на примере масс-спектрометрического профилирования образцов плазмы для пациенток с раком яичников. Применение предложенного подхода привело к статистически значимому повышению точности, а

кластеризация пиков способствовала более стабильным результатам отбора признаков и придавала биологический смысл выбранным значениям m/z . Соискатель спланировал дизайн исследования, реализовал предложенный алгоритм анализа данных, провел его валидацию и участвовал в написании текста публикации.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

В отзыве официального оппонента Орлова Юрия Львовича, доктора биологических наук, профессора РАН, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессора кафедры информационных и интернет-технологий, отмечены некоторые замечания, в частности, наличие ряда англицизмов в терминологии, таких как хотспот, бэкенд. Также поставлены вопросы, а именно: какое минимальное количество пациентов необходимо для корректной работы алгоритма; возможно ли применение данного алгоритма для стратификации пациентов с диагностированными заболеваниями другого типа. Указано также на необходимость варьирования алгоритмов кластерного анализа для оценки влияния параметров. Вместе с тем, отмечается, что диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне и полученные результаты не вызывают сомнения.

В отзыве официального оппонента Стрельникова Владимира Викторовича, доктора биологических наук, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», заведующего лабораторией эпигенетики, имеются некоторые замечания и предложения. Так, ставится вопрос, почему для поиска критически важных для меланомы генов в работе не использовались результаты транскриптомных, эпигеномных и протеомных исследований, данные которых в большей степени отражают молекулярный фенотип опухоли. В главе, посвященной геномике и транскриптомике для индивидуальной онкофармакологии, уместно было бы обсудить ограничения

использования экзомного секвенирования для поиска соматических генетических вариантов в материале опухоли с учетом генетической гетерогенности опухолевого образца. Высказанные замечания и пожелания никак не влияют на высокую оценку работы и не снижают ее научно-практической ценности;

В отзыве официального оппонента Аульченко Юрия Сергеевича, доктора биологических наук, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики СО РАН», главного научного сотрудника лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа, отмечается, что работа по поиску уязвимых точек протеома клеток меланомы кажется не вполне законченной, так как предложено несколько объяснений того, что нокдаун четырех генов не влияет на жизнеспособность и деление клеток меланомы, и спрашивается, возможно ли проверить некоторые из этих объяснений, а также был ли произведен анализ устойчивости результатов к содержанию и объему исходных данных при определении уязвимых белков. Также указывается на отсутствие лицензии, по которой был опубликован код для доступа к программному обеспечению bsNEA через Sourceforge, разработанному для стратификации пациентов. Однако указанные замечания не снижают общее положительное впечатление о работе;

В положительном отзыве на автореферат Сычева Дмитрия Алексеевича, доктора медицинских наук, профессора, профессора РАН, академика РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ректор, заведующего кафедрой клинической фармакологии и терапии имени академика Б.Е. Вотчала, замечаний нет.

В положительном отзыве на автореферат Цуканова Алексея Сергеевича, доктора медицинских наук, профессора, ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России, руководителя отдела лабораторной генетики, отмечается, что в работе

не представлены результаты катамнестической оценки, вероятно из-за ориентированности работы на создание оригинальной интернет-платформы, но всё же было бы интересно проследить терапевтический эффект для тех или иных выделенных генетических мутаций и длительность ремиссий. Указанное замечание носит сугубо рекомендательный характер и не умаляет ценность и качество диссертационной работы, а напротив подчеркивает важность и сложность многоаспектной темы, требующей дальнейших детализированных исследований.

В положительном отзыве на автореферат Любченко Людмилы Николаевны, доктора медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующей отделом молекулярной генетики и клеточных технологий, отмечается, что в работе хотелось бы видеть больше описания клинических случаев, проанализированных с помощью разработанной системы, а также указано на слишком малый размер текста на рисунке 10, который представляет собой снимок с экрана. Однако эти замечания никак не умаляют высокой научной и практической ценности диссертационной работы.

В положительном отзыве на автореферат Имянитова Евгения Наумовича, доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководителя научного отдела опухолевого роста, отмечается, что в автореферате хотелось бы видеть пояснения о потенциальной применимости разработанной программной системы в сфере жидкостной биопсии. Однако это небольшое замечание и отдельные стилистические недочёты не снижают общее положительное впечатление от работы, которая выполнена на высоком научном и методическом уровне.

В положительном отзыве на автореферат Зверевой Марии Эмильевны, доктора химических наук, профессора ФГБОУ ВО «Московский

государственный университет имени М.В. Ломоносова», заместителя декана Химического факультета, замечаний нет.

В положительном отзыве на автореферат Дышлогого Сергея Анатольевича, доктора биологических наук, ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Институт наукоемких технологий и передовых материалов, старшего научного сотрудника лаборатории биологически активных соединений, отмечается, что хотелось бы видеть более подробный анализ списка белков, которые могут быть потенциальными мишенями для противоопухолевой терапии, а также следовало бы указать погрешность при представлении результатов в виде процентов (как например, на стр. 16 автореферата). Однако данные замечания несколько не снижают общего положительного впечатления от представленной работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован тем, что доктора биологических наук Аульченко Юрий Сергеевич, Стрельников Владимир Викторович и Орлов Юрий Львович являются ведущими специалистами в области анализа геномных и транскриптомных данных применительно к молекулярной онкологии, что подтверждается их публикациями в ведущих мировых и отечественных рецензируемых журналах; ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук является одним из ведущих центров в области биоинформатики, системной биологии и сравнительной геномики.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- впервые представлен новый подход к поиску белков, критически важных для функционирования опухолевых клеток, и основанный на анализе большого массива данных о соматических мутациях; выявленные белки могут рассматриваться как перспективные мишени при создании новых препаратов для противоопухолевой терапии;
- разработан новый метод для стратификации пациентов, основанный на анализе транскриптомных данных и выявлении активированных генов-регуляторов экспрессии;

- разработан программный конвейер для аннотации генетических вариантов, предназначенный для помощи эксперту в идентификации клинически значимых мутаций по результатам высокопроизводительного секвенирования генома опухоли;
- разработано и создано программное обеспечение (веб-платформа) по автоматической интерпретации молекулярного профиля онкологического пациента, позволяющее реализовывать принципы персонализированной медицины с целью оптимизации противораковой терапии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что, поиск так называемых незаменимых генов, потеря которых может привести к гибели некоторых клеток или всего организма, не только помогает понять требования к минимальному геному для клеточной жизни, но также играет важную роль в открытии генов, ассоциированных с болезнями человека; разработанный метод определения уязвимых точек в протеоме опухоли имеет научный интерес и может быть использован в фундаментальных исследованиях по идентификации биологических мишеней новых противоопухолевых препаратов. Полученные в работе результаты представляют большой интерес для биоинформатической науки, связанной с вопросами анализа, интерпретации и клинического использования «омиксных» данных.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что разработанные подходы к анализу результатов секвенирования геномов и транскриптомов опухоли позволяют вплотную подойти к проблеме оптимизации стратегии противоопухолевой терапии, тем самым реализуя принципы персонализированной медицины; разработана интернет-платформа для автоматической клинической интерпретации результатов различных типов молекулярно-генетических анализов опухоли, применение которой позволит врачу-онкологу максимально полноценно проанализировать всю совокупность результатов анализов и скорректировать тактику лечения. Результаты и выводы работы могут иметь также практическое применение и для подготовки профильных специалистов на кафедрах

онкологии ВУЗов, в учебных программах циклов усовершенствования врачей, профессиональной переподготовке врачей-онкологов.

Оценка достоверности результатов исследования подтверждается тем, что в работе применяются современные биоинформатические программные инструменты и экспериментальные методики, используются адекватные статистические методы обработки данных. Для анализа отобраны выборки большого объема, что дополнительно повышает степень достоверности полученных результатов. В работе широко используются методы валидации, сравнение с аналогичными алгоритмами и сопоставление с результатами, опубликованными в мировой научной литературе. Все сформулированные в диссертации выводы полностью основываются на результатах проведенных исследований.

Личный вклад соискателя состоит в том, что им был разработан и реализован оригинальный метод поиска уязвимых точек в раковом протеоме, а также проведен соответствующий анализ для мутаций, наблюдающихся в клетках меланомы. Соискатель разработал и реализовал новый алгоритм кластеризации образцов, охарактеризованных с помощью транскриптного профилирования, провел сравнительный анализ, изучил и интерпретировал данные по чувствительности пациентов с колоректальным раком к терапии цетуксимабом. Соискатель участвовал в персонализированном анализе генома и транскриптома различных образцов опухоли, разработав и применив программный конвейер по аннотации генетических вариантов. Под руководством соискателя была разработана веб-платформа для автоматической клинической интерпретации результатов высокопроизводительного секвенирования генома и транскриптома раковых клеток.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний.

На заседании 27 октября 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Пятницкому Михаилу Алексеевичу учёную степень доктора биологических наук за новые научно обоснованные биоинформатические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны в области персонифицированной терапии социально значимых заболеваний

(злокачественных опухолей).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против - 0, недействительных бюллетеней – 0.

Зам. председателя Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН



Поройков В.В.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

27 октября 2022 года