

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Котлова Никиты Юрьевича «Молекулярная классификация и изучение подтипов микроокружения диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы на основе транскриптомных данных», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – «Молекулярная и клеточная биология»

Диссертационная работа Никиты Котлова посвящена одной из наиболее актуальных проблем современной онкогематологии – выраженной гетерогенности диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). Несмотря на стандартизацию терапии первой линии (R-CHOP), более 30% пациентов не достигают стойкой ремиссии, что диктует острую необходимость в разработке новых методов стратификации пациентов и персонализации лечения.

В то время как классификация DLBCL по клетке-предшественнику (COO) и генетические подтипы (MCD, EZB и др.) позволили частично объяснить эту гетерогенность, роль опухолевого микроокружения (TME) оставалась во многом несистематизированной. Микроокружение, включающее иммунные и стромальные клетки, является не просто «фоном» для опухоли, но и активным участником, влияющим на ее выживаемость, пролиферацию и ответ на терапию. До настоящего исследования в литературе отсутствовала комплексная транскриптомная классификация подтипов TME при DLBCL, которая бы интегрировала данные о клеточном составе, генетических особенностях опухоли и клинических исходах.

Таким образом, работа Н.Ю. Котлова, направленная на создание такой классификации и исследование ее биологических и клинических свойств, является в высшей степени актуальной. Она имеет как фундаментальное значение для понимания патогенеза DLBCL, так и важное прикладное значение для разработки новых прогностических биомаркеров и терапевтических стратегий.

**Научная новизна** диссертации несомненна, поскольку автором впервые выполнены исследования, результаты которых приоритетны в данной области:

1. Впервые разработана и валидирована комплексная транскриптомная классификация подтипов опухолевого микроокружения (LME) при DLBCL, выделяющая четыре биологически и клинически значимых подтипа: LME-GC, LME-MS, LME-IN и LME-DE.
2. Установлены системные ассоциации между новыми LME-подтипами и ключевыми молекулярными характеристиками опухоли, включая классификацию COO, генетические подтипы NCI, статус метилирования ДНК и экспрессию иммунных сигнатур.
3. Показана и обоснована прогностическая и предиктивная значимость LME-

классификации. В частности, продемонстрирована ее валидность на данных клинического исследования GOYA (NCT01287741), что указывает на потенциал LME-подтипов как биомаркеров ответа на терапию, в том числе с использованием обинутузамаба.

4. В доклинических моделях (ксенографты) экспериментально подтверждена возможность функционального «перепрограммирования» иммуносупрессивного подтипа LME-DE с помощью эпигенетической терапии (азациитидин), что приводит к восстановлению экспрессии иммунных молекул и инфильтрации Т-клетками.
5. Впервые выявлена и охарактеризована связь между генетическими подтипами DLBCL (MCD, BN2, A53), использованием аутореактивного сегмента IGHV4-34 и изотипа IgM В-клеточного рецептора, что углубляет понимание механизмов онкогенной сигнализации в этих подгруппах.
6. Впервые идентифицирован и описан новый агрессивный подтип GCB DLBCL, характеризующийся мутациями в гене *FAS* и сопутствующей потерей иммунорегуляторов (TNFRSF14, PDL1), что приводит к неблагоприятному прогнозу, несмотря на «воспаленный» фенотип микроокружения.

**Теоретическая значимость** заключается в создании новой системной модели гетерогенности DLBCL, которая интегрирует три уровня биологической сложности: генетический профиль опухоли, особенности ее В-клеточного рецептора и композицию опухолевого микроокружения. Работа демонстрирует, что TME не является пассивным компонентом, а формирует устойчивые, функционально значимые состояния, которые коррелируют с молекулярным патогенезом лимфомы.

**Практическую значимость** работы трудно переоценить. Разработанная классификация LME может быть непосредственно использована в качестве нового инструмента для стратификации пациентов с DLBCL по группам прогноза. Подтверждение того, что LME-подтипы уже используются в качестве вторичных конечных точек в текущих клинических исследованиях (например, GUIDANCE-01), подчеркивает их клиническую релевантность.

Достоверность научных положений и выводов диссертации обеспечивается впечатляющим объемом проанализированного материала (мета-когорта >4500 транскриптомов), что является одним из крупнейших исследований DLBCL на сегодняшний день.

Автором использован современный арсенал методов биоинформатики и статистического анализа, включая методы машинного обучения для создания классификаторов, методы деконволюции и анализа генных сигнатур. Ключевые *in silico* наблюдения были подтверждены на уровне статистической, клинической и экспериментальной валидации.

Результаты работы апробированы и опубликованы в ведущих рецензируемых

журналах (Cancer Discovery, Cancer Cell, Nature Communications, Blood), что свидетельствует об уровне полученных данных. Выводы диссертации логичны, полностью соответствуют поставленным задачам.

Диссертация изложена на 119 страницах и имеет классическую структуру. Она включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (141 источник). Работа иллюстрирована 59 рисунками и 2 таблицами.

- Во **Введении** убедительно обоснована актуальность темы, четко сформулированы цель и задачи, а также научная новизна и практическая значимость.
- **Обзор литературы** (Глава 1) представляет собой исчерпывающий анализ современного состояния проблемы, демонстрируя глубокое владение автором материалом, от фундаментальных основ В-клеточной биологии до новейших генетических классификаций DLBCL.
- **Материалы и методы** (Глава 2) детально описывают все использованные подходы, от сбора данных и биоинформатической обработки до постановки экспериментов *in vivo*. Особо следует отметить создание и валидацию платформо-независимых классификаторов COO и DHITsig, что является важным методологическим достижением.
- **Результаты и обсуждение** (Глава 3) – основная часть работы. В ней последовательно излагаются все этапы исследования: от создания и валидации LME-сигнатур до их клинической и функциональной характеристики, интеграции с генетикой и данными по В-клеточному рецептору. Обсуждение результатов проводится на высоком научном уровне, с корректным сопоставлением с данными литературы.
- **Заключение и Выводы** – Хотелось особо отметить, что выводы логично и точно суммируют результаты проделанной работы и содержат четкое решение задач, сформулированных во введении. Это, казалось бы, адекватное и очевидное суммирование проделанной работы. Однако, такое реципрокное соответствие в нашей практике, к сожалению, встречается не часто.

При общем высоком уровне выполнения диссертационной работы, хочу отметить несколько положений и замечаний, которые носят дискуссионный или уточняющий характер, не снижая ее научной ценности:

1. **Ограничения *in silico* подхода.** Основой работы является биоинформатический анализ данных bulk RNA-seq. Методы деконволюции клеточного состава (Kassandra, ssGSEA) являются мощным, но все же оценочным инструментом. Хотя автор проводит валидацию с использованием данных сортировки клеток и ИГХ, было бы ценно обсудить потенциальные ограничения этого подхода, например, невозможность различения функциональных состояний клеток (M1/M2 макрофаги) с той же точностью, что и при методах одноклеточного секвенирования (scRNA-seq).



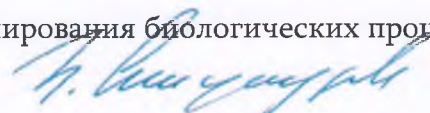
2. **Категоризация биологического континуума.** Любая классификация, включая предложенную LME, неизбежно разделяет биологический континуум на дискретные группы. В работе LME-подтипы представлены как четыре четких кластера. Представляет интерес, в какой степени существуют «пограничные» или «смешанные» фенотипы микроокружения и какова их клиническая значимость?
3. **Масштаб экспериментальной валидации.** Функциональные эксперименты *in vivo* (с азациитидином и компонентами матрикса) являются несомненным достоинством работы. Однако они проведены на ограниченном числе моделей (линия A20 и две модели PDTX). Насколько универсальны эти выводы для всех опухолей, отнесенных к подтипам LME-DE или LME-MS? Это замечание, думаю, скорее, определяет направление для будущих исследований.
4. **Публикации.** Список содержит шесть статей, опубликованных, в основном, в высокорейтинговых журналах. Понятно, что работы такого рода выполняются коллективно, но лишь в одной из статей диссертант первый автор, а в большинстве - он «один из многих». Здесь хотелось бы получить разъяснения по корреляции между указанной в диссертации «личного вклада» и вклада соавторов.

Указанные замечания носят дискуссионный или технический характер и не умаляют научной и практической ценности диссертации.

Диссертационная работа Н.Ю. Котлова «Молекулярная классификация и изучение подтипов микроокружения диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы на основе транскриптомных данных» является завершенным, самостоятельным научным исследованием. По своей актуальности, научной новизне, объему использованных методов, теоретической и практической значимости полученных результатов работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, **Котлов Никита Юрьевич**, заслуживает присуждения искомой ученой степени **кандидата биологических наук** по специальности 03.00.03 – «Молекулярная и клеточная биология».

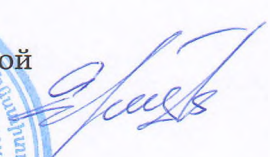
Официальный оппонент,

Зав. лаб. компьютерного моделирования биологических процессов  
ИМБ НАН Армении, д.б.н.

  
К.Б. Назарян

Подпись К.Б. Назаряна заверяю:

Ученый секретарь Института молекулярной  
биологии НАН РА, к.б.н.

  
З. А. Хачатрян

