

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича «Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.1 - Радиобиология

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Абдуллаева С.А. посвящена исследованию митохондриальной дисфункции, возникновению и аккумуляции мутантных копий митохондриальной ДНК (мтДНК) в тканях и биологических жидкостях животных, подвергшихся радиационному воздействию. Стабильность и сохранение митохондриального генома, изменение количества копий мтДНК в клетках играют важную роль в адаптации человека и животных к различным условиям внешней среды. С нарушениями мтДНК и как следствие этого – дисфункцией митохондрий, ассоциируется широкий спектр патологических состояний, среди которых: нарушения работы иммунной системы, развитие раковых опухолей, преждевременное старение и т.д. Таким образом, тема диссертационной работы, несомненно, актуальна и представляет интерес для фундаментальной и практической биомедицины.

Научная новизна

В диссертационной работе получены новые сведения об особенностях репарации яДНК, синтезе мтДНК и уровне ее мутантных копий в различных отделах мозга (гиппокамп, кора и мозжечок) крысы после их облучения. Показано, что в гиппокампе, наиболее радиочувствительной области мозга, наблюдался самый высокий уровень мтДНК с мутациями.

Установлено, что в клетках головного мозга и селезенки мышей, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения, в линейной зависимости от дозы (1-5 Гр) возрастает уровень мутантных копий мтДНК с максимумом на 8-й день после облучения, с последующим снижением мутаций к 28-му дню пострадиационного времени.

Показано, что после облучения животных в кровоток поступает большое количество внеклеточной мтДНК (вк-мтДНК), существенная часть которой представлена мутантными копиями. Уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови мышей зависит от дозы их облучения, при этом увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме совпадает со снижением их уровня в тканях облученных животных.

С отчётом ознакомлен 28.09.2023
(Абдуллаев С.А.) ОА

Ход №	4840
Дата	25 СЕН 2023
Кол-во листов:	8
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России	

Впервые показано преодоление вк-мтДНК (наряду с вк-яДНК) почечного барьера и перехода ее в мочу у животных, подверженных воздействию рентгеновского излучения, а также после введения цитостатического препарата - блеомицина. Обнаружена дозовая зависимость выявленных эффектов. При этом определенная доля фрагментов вк-мтДНК мочи облученных крыс содержит мутантные копии.

В работе показано, что последствия радиационного воздействия можно снизить путем введения экзогенного мелатонина как до, так и после облучения. При этом мелатонин эффективнее проявляет радиозащитные свойства как радиомитигатор, т.е. после облучения. Кроме того, эффективным радиомитигатором (по-видимому и сенолитиком) оказался известный гипогликемический препарат - метформин, который способствует активной экскреции вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой облученных крыс.

В целом, результаты диссертационного исследования являются уникальными и вносят существенный вклад в понимании радиационно-индуцированного ответа организма на облучение и роли мтДНК в этом процессе. Важно отметить, что полученные данные позволяют оценивать вк-мтДНК в биологических жидкостях в качестве потенциального неинвазивного биомаркера при оценке радиационного поражения и воздействия генотоксических агентов на организм человека и животных.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты диссертационной работы существенно дополняют знания о механизмах развития реакции организма на ионизирующее излучение. Получены новые данные по развитию радиационного мутагенеза мтДНК и изменению уровней мутантных копий мтДНК в тканях облученных животных в пострадиационной период, что представляет значительный интерес для фундаментальной радиобиологии.

Важным практическим результатом работы является обнаружение повышенного уровня общего количества фрагментов вк-ДНК, а также увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме и моче облученных животных. Показано, что мтДНК является более уязвимой мишенью (чем яДНК) для ионизирующего излучения и других генотоксических агентов, поэтому повышенное содержание мутантных форм вк-мтДНК в плазме крови и моче после радиационного воздействия и влияния других генотоксикантов можно рассматривать как потенциальный чувствительный биомаркер для оценки радиационного поражения и наличия генотоксического эффекта. Таким образом, практическая значимость данной диссертационной работы определяется возможностью разработки на основе внеклеточной ДНК в биологических жидкостях быстрой и

чувствительной тест-системы, для оценки клеточной гибели при действии радиации и других генотоксичных агентов, а также оценки эффективности противолучевых средств.

Структура и объем работы

Диссертация С.А. Абдуллаева изложена на 213 страницах, построена и оформлена по общепринятой схеме. Работа начинается «Списком принятых в работе сокращений» и «Введения», после которого представлены «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложения». Диссертация содержит 35 рисунков и 3 таблицы. Список используемой литературы содержит 443 источника.

Полнота изложения основных результатов диссертации в рецензируемых научных изданиях. Основные результаты диссертации опубликованы в 55 научных работах, в том числе в 18 статьях в рецензируемых научных журналах (7 российских и 11 иностранных), рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Оценка содержания диссертационной работы

Название диссертации С.А. Абдуллаева отражает ее содержание; в автореферате отражены основные результаты и выводы, представленные в диссертации.

Во «**Введении**» излагаются общие вопросы: актуальность научной проблемы, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования, указана новизна полученных результатов, их научно-практическая ценность. Сформулированы основные положения диссертации, которые выносятся на защиту, приведены данные об апробации результатов.

Глава «**Обзор литературы**» включает обширный и всесторонний анализ информации по изучаемой проблеме, в полной мере отражает текущее положение исследований в данной области, а также подчеркивает актуальность диссертационной работы. Обзор состоит из трех разделов, в которых раскрываются вопросы о роли мтДНК в функционировании и стабильности клеток млекопитающих при действии ионизирующей радиации, особенности внеклеточной ДНК как потенциального биомаркера оценки лучевой реакции организма, влияние радиопротекторов на функционирование митохондрий и целостность мтДНК в облученных клетках. Следует отметить логичность изложения, хороший литературный язык и качественный иллюстративный материал.

Глава «**Материалы и методы**» расписана достаточно подробно, с указанием первоисточников и позволяет при необходимости воспроизвести эксперименты

диссертации в других лабораториях. В работе использованы современные молекулярно-биологические, радиобиологические и статистические методы. Целесообразность выбранных методов не вызывает сомнений.

В главе «Результаты и обсуждение» приведены результаты собственных исследований автора и их обсуждение. Показано, что экспрессия генов, поддерживающих функционирование митохондрий, активность репарации яДНК, синтез мтДНК и количество ее мутантных копий, в различных отделах мозга облученных крыс отличаются. Наиболее радиочувствительной областью головного мозга является гиппокамп. Образование мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения. Детально исследованы количества, временные интервалы существования мутантных копий мтДНК в тканях и биологических жидкостях (плазме крови и моче) животных, подвергнутых действию ионизирующей радиации и генотоксического агента - блеомицина. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК (а также их мутантных копий) в биологических образцах имеет линейную зависимость от дозы радиации и концентрации химиотерапевтического препарата. Показано, что мелатонин проявляет выраженные радиозащитные свойства (при введении его как до, так и после воздействия радиации), снижает уровень мутантных копий мтДНК, а также способствует восстановлению функций митохондрий в тканях облученных животных. Исследованы радиозащитные свойства метформина, который способствует усиленной экскреции вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой облученных крыс, и действует преимущественно как радиомитигатор. Следует отметить большой объем выполненных исследований, а также последовательность и логичность в проведении экспериментов. Объем работы, повторности исследований и корректная статистическая обработка дают читателю возможность полностью представить себе ход исследований и оценить достоверность результатов. Автором проведен подробный критический анализ полученных результатов. Все положения, вынесенные на защиту, подтверждаются материалами диссертации.

Раздел «Заключение», написан лаконично и аргументировано. Выводы целиком вытекают из содержания работы, четко сформулированы и не вызывают возражений.

Изложенный в диссертации материал свидетельствует о научной зрелости автора, его способности успешно применять широкий спектр экспериментальных подходов на высоком методическом уровне, проводить серьезную аналитическую работу, комплексно оценивать полученные результаты и формулировать научно-обоснованные выводы.

Замечания

В целом, я высоко оцениваю теоретическое и практическое значение рецензируемой работы. Тем не менее, в ходе чтения работы возникло несколько замечаний:

- 1) Несмотря на то, что литературный обзор написан очень хорошим научным языком и освещает различные аспекты взаимодействия митохондрий и mtДНК с ионизирующим излучением, сигнально-регуляторной роли внеклеточной ДНК (в особенности ее окисленной формы) уделено недостаточно внимания.
- 2) Стр.88. «Очевидно, что возрастание количества синтезированного продукта в реакциях с этими образцами ДНК обусловлено снижением повреждений, способных снижать активность ДНК-полимеразы [436].». Не совсем корректное выражение. Активность ДНК-полимеразы не меняется, а вот мест для «посадки» этого фермента на поврежденной ДНК действительно может оказаться меньше, что сказывается на эффективности ПЦР.
- 3) Стр.155. «Повышенный уровень вк-мтДНК по сравнению с вк-ядНК в моче крыс, наблюдаемый после облучения и введения блеомицина, возможно, обусловлен не только активацией апоптоза клеток [296, 392, 439], но и митофагией – селективным удалением поврежденных митохондрий, сопряженным с аутофагией [349, 393, 439]. Повышенный уровень мтДНК явно обусловлен активацией митофагии [365, 411].». Согласен, участие митофагии в появлении внеклеточной мтДНК возможно. В перспективе это могло бы стать хорошим продолжением исследований. Какие основные маркеры митофагии известны в облученных тканях?
- 4) Стр.120. «Многие ученые в последние десятилетия, были заняты разработкой новой методики, с помощью которой возможно уменьшить повреждения, которые наносит радиация. Данная методика базируется на применении митохондриально ориентированных антиоксидантов.». Не совсем корректное выражение. Помимо митохондриально-направленных радиопротекторов в разработке были препараты, имеющие другие механизмы действия.
- 5) Стр. 132. «При этом результаты показывают, что в ткани коры мозга восстановление содержания глутатиона происходит более активно у мышей, которым вводили МЕЛ после облучения. Таким образом, данные анализов показывают, что в облученных клетках и по этим маркерам также реализуется радиопротекторный и радиомитигаторный потенциал МЕЛ, как результат повышения уровня антиоксидантной активности в клетках.». Известен ли механизм влияния мелатонина на уровень глутатиона в клетках?

- 6) Стр.137. «Несмотря на то, что молекулярные механизмы действия МФ остаются до конца неизученными, известно, что это лекарство снижает частоту возникновения онкогенеза у людей, и увеличивает продолжительность жизни у грызунов [344]. МФ также способствует повышению эффективности радиотерапии опухолей при его комбинированном применении [345, 346]. МФ стимулирует митофагию поврежденных или нефункциональных органелл, обеспечивая восстановление здоровой популяции митохондрий в клетках [363, 364].». Хотелось бы отметить, что метформин является эффективным соединением против дикарбонильных соединений (малоновый диальдегид, глиокаль, метилглиокаль) - долгоживущих, высокореакционных вторичных продуктов свободнорадикального окисления, возникающих после развития окислительного стресса. По-видимому, радиомитигаторный эффект метформина может быть связан с подавлением развития карбонильного стресса, неизбежно возникающего после воздействия ионизирующего излучения.
- 7) Каким образом, в случае тотального облучения животных или однократного введения блеомицина, отличить вк-мтДНК в моче, которая преодолела почечный барьер из крови, от вк-мтДНК из эпителия почечной ткани и мочевого пузыря? Известен ли вклад эпителия мочеполовой системы в содержании трансренальной ДНК в моче? Как может влиять локальное облучение (например, краинальное) на уровень вк-мтДНК в моче животных?

Следует отметить, что сделанные замечания не носят принципиального характера и не ставят под сомнение высокую научную значимость этой работы.

Заключение

Таким образом, подводя итог всему вышесказанному, следует констатировать, что научно-исследовательская работы Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича на тему «Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома» является завершенной научно-квалификационной работой, содержащей новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, свидетельствующие о значительном вкладе автора в радиобиологию. В данной работе решена актуальная научно-практическая задача по исследованию возникновения и аккумуляции мутантных копий мтДНК и изменения количественного содержания копий мтДНК в клетках тканей организма млекопитающих, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения, а также выяснении возможности циркуляции внеклеточных ДНК в биологических жидкостях в пострадиационный период, с целью использования их в качестве неинвазивных биомаркеров

оценки радиационного ответа организма, а также биологических эффектов воздействия других генотоксических агентов.

Работа соответствует современным требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, в редакциях от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а её автор Абдуллаев Серажутдин Абдуллаевич заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.1 - Радиобиология.

Ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории

Механизмов редокс-регуляции клеточных процессов

Института биофизики клетки РАН,

доктор биологических наук



Шарапов М.Г.

ул. Институтская, 3, Пущино 142290, Россия

эл. почта: sharapov.mg@yandex.ru

тел.: +7 (4967) 73-95-37

Подпись д.б.н. Шарапова М.Г. заверяю

Ученый секретарь Института биофизики клетки РАН,

обособленного подразделения «Федерального исследовательского центра

«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

кандидат биологических наук



Шавкунов К.С.

18 сентября 2023 г.

