

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертационную работу Пустоваловой
Маргариты Витальевны «Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского
излучения в малых дозах в мезенхимальных стволовых клетках человека»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.01 – Радиобиология

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа Пустоваловой М.В. посвящена актуальной проблеме радиобиологии - изучению закономерностей и механизмов действия ионизирующего излучения в малых дозах (до 100 мЗв) на биологические объекты. Несмотря на интенсивные исследования этой проблемы в течение последних 30 лет, проблема далека от разрешения и по-прежнему вызывает многочисленные дискуссии специалистов в области радиационной биологии и медицины. Среди многочисленных аспектов этой проблемы большой и заслуженный интерес вызывают исследования эффектов радиационного воздействия на стволовые клетки животных и человека – немногочисленную, но очень важную клеточную популяцию, которая обеспечивает поддержание гомеостаза в нормальных физиологических условиях и при действии повреждающих факторов. Как стало понятно в последние годы в связи со стремительным развитием молекулярной и клеточной биологии, именно стволовые клетки организма во многом определяют развитие разнообразных заболеваний, течение патологического процесса и эффективность его лечения. Поэтому изучение свойств стволовых клеток, их ответа на различные повреждающие воздействия актуально не только с теоретической, но и практической точек зрения.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), обладающие иммуномодулирующими свойствами, высоким пролиферативным потенциалом и способностью дифференцироваться в различных направлениях, уже давно привлекают внимание исследователей как перспективный тип стволовых клеток для использования в регенеративной медицине. В настоящее время МСК являются одним из наиболее хорошо изученных типов стволовых клеток и наряду с гемопоэтическими стволовыми клетками находят всё большее практическое применение при лечении целого ряда заболеваний. Вместе с тем, закономерности и механизмы ответа МСК на радиационное воздействие в малых дозах изучены недостаточно, хотя информация об этом необходима не только для выяснения последствий применения диагностических процедур у пациентов после введения МСК, но и для оценки влияния малых доз радиации на многочисленные контингенты людей, включая профессионалов атомной энергетики, авиации, космонавтики, специалистов в области ядерной медицины и фармацевтики, жителей загрязненных радионуклидами территорий, ликвидаторов аварии на ЧАЭС и т.д. Вместе эти обстоятельства определяют высокую актуальность данной работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации и их достоверность

Научные положения и выводы диссертационной работы Пустоваловой М.В. базируются на обширном экспериментальном материале, который получен автором с помощью адекватных методов исследования, поэтому являются обоснованными и достоверными. В этой связи следует отметить, что работа выполнена на современном методическом уровне, соответствующем мировым стандартам. Были использованы такие надежные и хорошо зарекомендовавшие себя высокотехнологичные методы как культивирование МСК, иммунофенотипирование клеток с помощью проточной цитометрии, иммунофлуоресцентная детекция белков, участвующих в reparации повреждений ДНК, и иммунофлуоресцентный анализ пролиферативной активности клеток с помощью многоцветной флуоресцентной микроскопии, цитохимическое выявление и количественная оценка стареющих клеток.

По количеству выполненных независимых экспериментов и повторов, количеству проанализированных объектов (6 клеточных культур МСК), использованию необходимых контролей, адекватных методов статистической обработки исследование соответствует общепринятым нормам и правилам, поэтому надежность полученного экспериментального материала не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов исследования и их практическая значимость

В работе получены новые данные об образовании и деградации фокусов белков, участвующих в reparации повреждений ДНК, в МСК человека после действия редкоионизирующего (рентгеновского) излучения в малых дозах. В значительной степени новизна полученных результатов связана с изучением колокализации фокусов γ H2AX и фокусов фосфорилированной киназы ATM (pATM) в разные сроки после облучения в дозах до 100 мГр. Хотя ранее была известна взаимосвязь γ H2AX фокусов с фазой синтеза ДНК в интактных клетках, данные об этом в условиях радиационного воздействия в малых дозах получены впервые. Важно, что это позволило понять механизм формирования остаточных фокусов γ H2AX в МСК и прояснить их биологическую значимость после облучения в малых дозах, объяснив этот феномен повышением пролиферативной активности изучаемых клеток в ранние сроки после облучения (но не снижением эффективности reparации двунитевых разрывов ДНК в диапазоне малых доз, как это активно обсуждается в литературе). Этот результат интересен не только с научной, но и практической точки зрения в плане возможного применения методов количественной оценки γ H2AX фокусов для биологической дозиметрии ионизирующих излучений. Полученные в диссертационной работе Пустоваловой М.В. данные указывают на необходимость более осторожного отношения к вопросу о биодозиметрии на основе таких методов и более тщательного изучения возможных ограничений их использования при анализе дифференцированных клеток (прежде всего, клеток крови).

Также и в научном, и в практическом плане представляют интерес новые данные об отсутствии влияния малых доз радиации на старение и нестабильность генома МСК по критерию количества γН2АХ фокусов, маркирующих двунитевые разрывы ДНК, в отдаленные сроки после облучения *in vitro*. Это – тот самый отрицательный результат, который может иметь большие последствия в плане оценки опасности облучения человека в малых дозах. Конечно, микроокружение *in vivo* способно оказывать влияние на свойства МСК, поэтому этот результат требует дальнейших исследований на уровне организма.

В целом, полученные результаты характеризуются значительной научной новизной, представляют не только теоретический, но и практический интерес для дальнейшего развития радиационной биологии и медицины. Результаты работы отражены в научных публикациях в рецензируемых журналах, в том числе на английском языке, были неоднократно представлены и обсуждены на всероссийских и зарубежных конференциях.

Оценка содержания и оформления работы

Диссертационная работа написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты экспериментов, их обсуждение, заключение, выводы и библиографический список, включающий 212 источников. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и включает 18 рисунков, большинство из которых содержит несколько графиков и/или микрофотографий.

Во введении автором обоснована необходимость изучения влияния ионизирующих излучений в малых дозах на МСК, обоснован выбор объекта исследования, сформулированы цели, задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, объективно определена научная новизна и практическая значимость работы.

Обзор литературы (глава 1) представляет подробный и объективный анализ имеющихся данных о свойствах МСК и особенностях влияния ионизирующих излучений на эти клетки в различных аспектах, в том числе влияние на репарацию повреждений ДНК, пролиферацию, процессы старения и канцерогенеза. Особое внимание уделено анализу современных представлений об образовании двунитевых разрывов ДНК под действием эндо- и экзогенных факторов, механизмах репарации таких повреждений и их ключевой роли в судьбе облученных клеток. Эта глава хорошо структурирована, поэтому, несмотря на обширный материал, легко и с интересом читается. Учитывая, что в обзоре представлены последние публикации 2015-2017 гг и проведен их критический анализ, можно заключить, что этот материал представляет интерес для радиобиологов и заслуживает тиражирования. Следует отметить, что автор диссертационной работы представила такой обзор в несколько сокращенном виде в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология», в котором он был принят к печати в 2018 году.

Материалы и методы исследования достаточно подробно изложены в главе 2, которая дает полную информацию о спектре использованных методик и объеме проведенной

работы. Детально описаны методы выделения и культивирования МСК из слизистой десны и костного мозга, методы иммуноцитохимического исследования белков γ H2AX, pATM, Ki67, метод цитохимического выявления стареющих клеток по присутствию в них фермента β -галактозидазы. Кроме того, в этом разделе работы дана иммунофенотипическая характеристика выделенных МСК по широкому спектру поверхностных маркеров.

В главе 3 приведены результаты исследования и обсуждение, которые можно разделить на 3 основные блока:

1. Закономерности накопления двунитевых разрывов ДНК в ходе длительного культивирования МСК слизистой десны (вплоть до 22 пассажа). Установлен важный факт, определивший дизайн последующих этапов диссертационной работы, а именно показано примерно 3-кратное увеличение числа фокусов γ H2AX – маркеров двунитевых разрывов ДНК - на поздних (18-22) пассажах по сравнению с ранними (3-8) пассажами. Это увеличение было, по крайней мере, частично ATM-независимым и затрагивало как пролиферирующие, так и покоящиеся клетки. На основании этих данных в дальнейшей работе использовались только ранние пассажи МСК, на которых не происходило дополнительной индукции двунитевых разрывов ДНК.

2. Выяснение ранних эффектов действия рентгеновского излучения на МСК (до 24ч после облучения), включая:

- исследование дозовой (20-250 мГр) и временной (5-120 мин) зависимостей числа и колокализации фокусов γ H2AX и pATM;
- сравнение пострадиационных изменений числа и колокализации фокусов γ H2AX и pATM после облучения МСК в дозах 80 и 1000 мГр с учетом пролиферативной активности клеток;

Эта часть работы занимает центральное место в диссертационной работе. Обнаружено, что кинетика образования и деградации фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК в МСК существенно различается при облучении в малых и средних дозах. Установлен феномен длительного поддержания повышенного числа фокусов γ H2AX в МСК, подвергшихся радиационному воздействию в малых дозах. Полученные данные позволили заключить, этот феномен является ATM-независимым и характерен только для пролиферирующих клеток.

Известно, что свойства (в том числе радиобиологические характеристики) МСК разного происхождения могут различаться, поэтому в этом разделе работы имело бы смысл, во-первых, указать, какие именно МСК (слизистой десны и/или костного мозга) использовались в данном разделе работы; во-вторых, если использовались культуры МСК десны, то указать, сколько именно таких культур участвовало в экспериментах (все 5 или меньше) и каковы были индивидуальные различия; в-третьих, если использовались культуры МСК разного происхождения, то описать изучаемые дозовые и временные зависимости отдельно для МСК, выделенных из слизистой десны и костного мозга.

3. Изучение отдаленных эффектов облучения МСК костного мозга (на 3-11 пассажах после облучения в дозах 80 и 1000 мГр) по критериям количества фокусов γ H2AX, пролиферативной активности (экспрессии Ki67) и доли клеток с высокой активностью β -галактозидазы, являющейся классическим маркером клеточного старения. В этом разделе работы показано, что воздействие рентгеновского излучения в малой дозе на МСК не приводит к отдаленным последствиям облучения, ассоциированным с накоплением двунитевых разрывов ДНК, изменением пролиферативной активности и клеточным старением потомков облученных клеток (в отличие от радиационного воздействия в средней дозе 1 Гр). Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что фокусы γ H2AX, длительно существующие после облучения в малых дозах (по крайней мере, до 24 ч), не приводят к отдаленным последствиям радиационного воздействия по изученным критериям у потомков облученных клеток.

Полученные результаты сопоставлены с данными литературы. Представленный в этой главе анализ показывает глубокое знание автором теоретических вопросов по теме диссертационной работы. Далее (в разделе «Заключение») кратко изложено основное содержание диссертационной работы, из которого логично вытекают выводы.

В целом, следует отметить стилистические достоинства диссертационной работы, ясное и четкое изложение полученных результатов, адекватные и полностью обоснованные выводы.

Основные результаты диссертационной работы отражены в 4 статьях в рецензируемых журналах и 7 тезисах докладов, опубликованных в материалах международных и российских конференций. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Замечания не принципиального характера связаны с подразделом 3.2 диссертационной работы, для которого следует уточнить:

1. тканевое происхождение МСК, использованных в экспериментах;
2. индивидуальные различия в радиобиологических характеристиках МСК слизистой десны, если таковые были использованы в экспериментах;
3. наличие или отсутствие различий в радиобиологических характеристиках МСК разного происхождения, если в экспериментах использовались МСК из костного мозга и слизистой десны.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Пустоваловой Маргариты Витальевны «Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в малых дозах в мезенхимальных стволовых клетках человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной самостоятельной научно-

квалификационной работой, в которой дается новое решение актуальной задачи - выяснение закономерностей и последствий действия ионизирующего излучения в малых дозах на мезенхимальные стволовые клетки, имеющей существенное значение для радиационной биологии и регенеративной медицины. По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Пустовалова Маргарита Витальевна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология.

Официальный оппонент:

заведующая отделом радиационной биохимии,

заведующая лабораторией пострадиационного восстановления

Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба —

филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор биологических наук, профессор

Занур

Замулаева И.А.

249036 Калужская область, г. Обнинск, ул. Королёва, д.4

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыбасова

филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

men. 909-251-67-10

эл. почта: zamulaeva@mail.ru

«20» августа 2018 г.

Подпись доктора биологических наук, профессора Замулаевой И.А. заверяю.

Ученый секретарь Медицинского радиологического

научного центра им. А.Ф. Цыба —

филиала ФГБУ «Национальный медицинский

исследовательский центр радиогигиологии»

Министерства здравоохранения

кандидат биологических наук



Печенина Н.А.